

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Unidad Monterrey**

*Estudio in silico de la dinámica espacio-temporal de la  
somitogénesis*

Tesis que presenta:  
**Jesús Pantoja Hernández**

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

Director de Tesis:  
Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, Nuevo León

Junio de 2021

# Dedicatoria

A mis padres, que aunque ya no están físicamente conmigo los llevaré siempre en mi corazón.

A mi esposa Yadith por su amor, apoyo y comprensión.

A mis hijas Abigaíl y Melissa, sin ellas no hubiera encontrado la motivación para culminar este logro.

# Agradecimientos

Al CINVESTAV Unidad Monterrey y toda su comunidad de investigadores por compartir su conocimiento y brindarme su apoyo.

En especial a mi asesor el Dr. Moisés Santillán por su guía y sus acertados consejos para la realización de esta tesis.

A mis sinodales internos el Dr. Jesús Rodríguez, el Dr. Daniel Sánchez y el Dr. Bruno Escalante por sus comentarios para mejorar este trabajo.

Al Dr. Víctor Breña por su apoyo durante la colaboración realizada y por aceptar ser parte de mi comité tutorial.

Al Conacyt por la beca de posgrado otorgada, sin la cual no hubiera sido posible cumplir con esta meta en mi vida profesional.

# Resumen

Durante la embriogénesis ocurren una serie de complejos procesos que culminan con la formación de un organismo con todos sus órganos definidos. En esta etapa es cuando se definen por completo las características morfológicas y funcionales de todo ser vivo multicelular. Para que este proceso se desarrolle satisfactoriamente, es necesario que exista una gran coordinación entre los múltiples mecanismos involucrados. Uno de los procesos que exhibe esta gran coordinación durante el desarrollo embrionario de los vertebrados es la somitogénesis; etapa embrionaria en la que a partir del mesodermo presomítico se originan los somitas. Durante la somitogénesis se hace evidente el acoplamiento espacio-temporal de mecanismos que operan a diferente escala, ya que se observa como una expresión oscilatoria en el tiempo de diversas proteínas se coordina con la aparición de aglomerados celulares que comparten un estado de diferenciación que culmina con una agrupación espacial de las células que componen a los somitas. En este trabajo se busca analizar mediante modelos matemáticos aspectos fundamentales que intervienen en esta coordinación espacio-temporal de la somitogénesis. Para esto se plantea el uso de dos modelos con una perspectiva a diferente escala.

Por un lado, se plantea el estudio de la somitogénesis con un modelo a escala del tejido tomando como base un modelo de reacción-difusión ya reportado (modelo PORD) el cual explica algunos resultados experimentales que otro modelo muy aceptado (modelo de reloj y frente de onda) no puede explicar. Sin embargo, el modelo PORD tiene como desventaja que es muy sensible a pequeñas variaciones, además que requiere de condiciones iniciales específicas para reproducir estos resultados. La propuesta de esta parte del trabajo es plantear un modelo híbrido que reúna las virtudes de los modelos PORD y reloj y frente de onda para obtener un modelo más completo. Este objetivo se cumple parcialmente, ya que el modelo híbrido planteado, aunque obtiene cierta robustez, no es suficiente para reproducir esta característica de la somitogénesis. Pero, a partir de este resultado surge la

posibilidad que las interacciones a nivel celular que no se consideran en el modelo híbrido contribuyan con la robustez. En ese sentido se propone un segundo modelo a escala celular para analizar un fenómeno muy interesante de la somitogénesis: la sincronización que exhiben las células del mesodermo presomítico. Con este modelo se busca analizar el efecto de factores como: la cantidad de células, el nivel de conectividad, la fuerza de interacción y la variabilidad celular afectan la sincronización entre estas células. Interesantemente se encontró que los efectos de la variabilidad se ven disminuidos mientras más grande sea el grupo de células que se consideran en el modelo.

# Abstract

During embryogenesis, occurs a series of complex processes that culminate in the formation of a living being with all its organs defined. It is at this stage that the morphological and functional characteristics of any organism are completely defined. For this process to develop satisfactorily, it is necessary a great coordination between the multiple mechanisms involved. One of the processes where this great coordination is evident during the embryonic development of vertebrates is somitogenesis; embryonic stage in which somites originate from the presomitic mesoderm. During somitogenesis, the spatio-temporal coupling of mechanisms that operate at different scales becomes evident, since it is observed how an oscillatory expression in time of various proteins is coordinated with the appearance of cellular agglomerates that share a state of differentiation which is represented by the spatial grouping of the cells that constitute the somites. This work aims to analyze fundamental aspects that intervene in this spatio-temporal coordination of somitogenesis through mathematical models. For this, the use of two models with a perspective on a different scale is proposed.

On the one hand, is proposed the study of somitogenesis with a model based on a reaction-diffusion model already reported (PORD model) which explains some experimental results that a highly accepted model (clock and wavefront model) cannot explain. However, the PORD model has as disadvantage that it is very sensitive to small variations, in addition it requires specific initial conditions to reproduce these results. The proposal of this part of the work is to pose a hybrid model that combines the virtues of the PORD and wavefront models to obtain a more complete model. This goal is partially met, since the hybrid model, although it obtains robustness, is not enough to reproduce this characteristic of somitogenesis. But this result, arises the possibility that considering interactions at the

cellular level contribute to somitogenesis robustness. In this sense, a second model is proposed on a cellular scale to analyze a very interesting phenomenon of somitogenesis: the synchronization between cells of the presomitic mesoderm. The aim of this model is to analyze the effect of factors such as the amount of cells, the connectivity level, the coupling strength, and the cellular variability on the synchronization between these cells. Interestingly, it was found that the effects of variability are diminished the larger the group of cells considered in the model.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Somitogénesis . . . . .	2
1.2. Antecedentes . . . . .	6
1.3. Planteamiento del problema . . . . .	11
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>13</b>
2.1. Hipótesis . . . . .	13
2.2. Objetivo general . . . . .	13
2.3. Objetivos específicos . . . . .	13
<b>3. Metodología</b>	<b>14</b>
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>16</b>
4.1. Estudio a escala del tejido . . . . .	16
4.1.1. Desarrollo del modelo . . . . .	17
4.1.2. Estimación de los parámetros . . . . .	21
4.1.3. Métodos numéricos . . . . .	24
4.1.4. Resultados . . . . .	25
4.1.5. Discusión . . . . .	33
4.2. Estudio a escala de redes de células . . . . .	36
4.2.1. Desarrollo del modelo . . . . .	38
4.2.2. Estimación de los parámetros . . . . .	42

4.2.3. Métodos numéricos . . . . .	43
4.2.4. Resultados . . . . .	43
4.2.5. Discusión . . . . .	59
<b>5. Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>63</b>
<b>Apéndice A</b>	<b>64</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>81</b>

# Capítulo 1

## Introducción

El proceso de la somitogénesis se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. En el ser humano este proceso esta precedido por una serie de etapas que inician con la fecundación del óvulo, posteriormente inicia la etapa de segmentación, que consiste de varias divisiones celulares a un ritmo acelerado, cuando se llega a un estadio aproximado de 16 células el embrión entra en una fase de compactación en donde las células más externas se adhieren fuertemente entre si al punto que pierden su identidad individual cuando se observa con microscopio [1, 2]. Posteriormente se inicia un proceso de cavitación, que consiste en la formación de un espacio en el interior del embrión que está lleno de líquido. En este punto el embrión ya consta de 2 tipos diferentes de células, uno que corresponde a la capa externa denominada trofoblasto y otro correspondiente a un grupo interno de células llamado masa celular interna. Las células de la masa celular interna darán origen al cuerpo del embrión y algunas estructuras extraembrionarias, mientras que las células del trofoblasto solo formarán estructuras extraembrionarias, incluidas las capas más externas de la placenta [3]. Posteriormente, en la masa celular interna se produce una invaginación que da origen al blastoporo, al tiempo que sus células se diferencian en tres tipos de células germinales primarias que componen los tejidos del ectodermo, mesodermo y endodermo.

La siguiente etapa de desarrollo corresponde a la gastrulación. Esta etapa se caracteriza por que las células diferenciadas en ectodermo, mesodermo y endodermo empiezan a organizarse en capas [4]. Posteriormente estas capas se pliegan para formar un cuerpo cilíndrico que después tomará la forma representativa del embrión. En este nivel de desarrollo ya se pueden diferenciar varias estructuras embrionarias como son la notocorda, el tubo neural, y la cresta neural [2]. Posteriormente, las células del mesodermo sufren una diferenciación adicional y dan origen a otros tejidos: el mesodermo lateral, mesodermo intermedio y mesodermo presomítico. En este último es donde se llevará a cabo el proceso de la somitogénesis.

## 1.1. Somitogénesis

La somitogénesis es un proceso del desarrollo embrionario común a todos los vertebrados, consiste en la segmentación secuencial del Mesodermo Presomítico (MPS) en bloques de células llamados somitas [1]. Los somitas son aglomerados celulares formados por una gran cantidad de células que están delimitadas por una capa epitelial que separa a cada somita. La fase inicial de la formación de los somitas comienza con una agrupación de células que se identifican como somitómeros, los cuales se originan partir de dos bandas homogéneas de células mesenquimatosas del MPS. Estas agrupaciones se pueden observar al microscopio e indican la posición en la que posteriormente se formarán los somitas como se muestra en la figura 1.1.

Los somitas son estructuras celulares transitorias, ya que a través de diferenciaciones posteriores darán origen a diversos tejidos del dorso como: vértebras, costillas, músculo esquelético, cartílago y dermis [5]. Eventos que interfieren con el desarrollo normal de la somitogénesis dan lugar a enfermedades congénitas como la disostosis espondilocostal [6, 7]. En la figura 1.2 se pueden ver las malformaciones en las costillas y vértebras que presentan los individuos que padecen esta enfermedad.

La formación de los somitas se da en pares y de manera periódica, organizándose de manera bilateral a lo largo del eje del embrión, esta periodicidad en la aparición

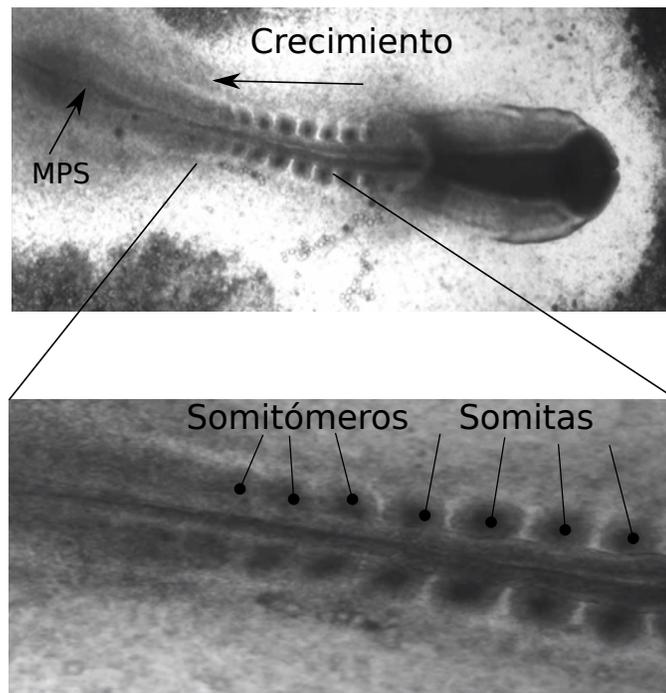


Figura 1.1: Microscopía óptica de un embrión de ratón donde se puede apreciar la agrupación de células correspondiente a los somitómeros que posteriormente se segmentarán para dar origen a los somitas.



Figura 1.2: Sintomatología que presentan los individuos que padecen la disostosis espondilocostal, enfermedad congénita relacionada con el desarrollo anormal de la somitogénesis.

de los somitas es un proceso muy regular entre individuos de la misma especie. En el ser humano un par de somitas se forma aproximadamente cada 4.5 horas, en embriones de ratón cada 120 minutos, en embriones de pollo cada 90 minutos y en pez cebra cada 30 minutos . Por esta razón el número de somitas es un buen indicador para medir la edad de los embriones cuando se encuentran en este nivel de desarrollo.

La somitogénesis es un proceso que va más allá de la segmentación del MPS, ya que para cuando un par de somitas se ha formado, las células que los componen poseen información que les permite guiar diferenciaciones posteriores. Estas diferenciaciones están mediadas por una compleja red de regulación genética en la que se han identificado una gran cantidad de interacciones [8]. Estas interacciones dirigen diferenciaciones subsiguientes que provocan que una vez formado los somitas las células que los componen cambien su organización inicial causando que dentro de cada somita se puedan identificar 3 secciones con grupos de células diferenciadas como se muestra en la figura 1.3. Las células que se ubican cerca de la notocorda

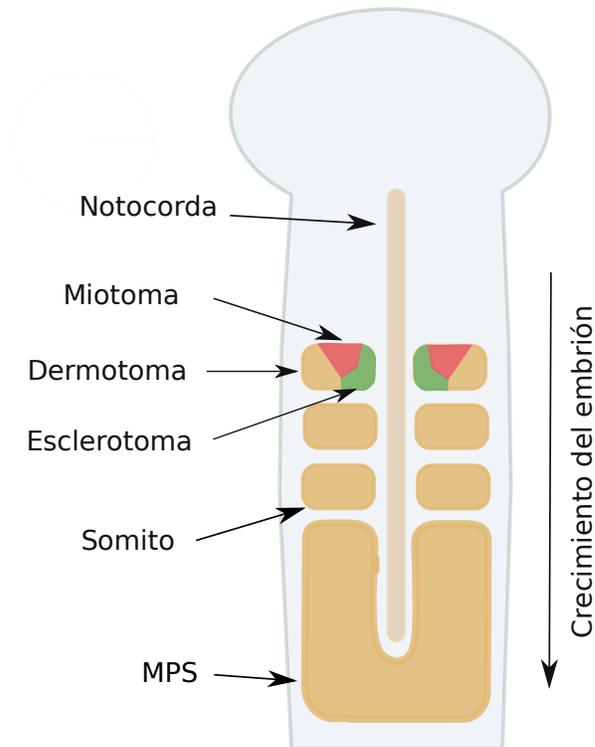


Figura 1.3: Una vez que el somita se ha formado las células que lo componen sufren una re-organización dando origen a 3 diferentes tipos celulares: esclerotoma, miotoma y dermatoma.

formaran el esclerotoma, a partir de estas células se originaran las vértebras, las costillas y la columna vertebral. Por su parte las células agrupadas en la sección dorsomedial del somita forman el miotoma del cual se originaran los músculos de la caja torácica y extremidades. Finalmente la sección dorsal del somita generará el dermatoma del cual se originaran la dermis de la región torácica.

El trabajo desarrollado en esta tesis no se ocupará de estudiar como se controlan los detalles moleculares de la diferenciación de los somitas, únicamente abordará aspectos relacionados con la periodicidad y regularidad de la segmentación del MPS.

## 1.2. Antecedentes

La somitogénesis es un proceso que se manifiesta a nivel del tejido del MPS, en el que las interacciones de miles de células presomíticas son influenciadas por los diferentes tejidos embrionarios que las circundan. Estas diferentes interacciones, tanto celulares como entre tejidos tienen un efecto en el desarrollo de la somitogénesis y contribuyen en elevar el nivel de complejidad que se ha hecho evidente en los resultados que se han obtenido al analizar este proceso, donde se ha encontrado que debido a la gran cantidad de células y a las interacciones multiescala que presentan, permiten la aparición de comportamientos emergentes que no se observan en sus componentes individuales [9].

Estas características han demandado el uso de distintas herramientas que se han desarrollado para el estudio de sistemas complejos, entre las que están el uso de modelos matemáticos. En general, la estrategia que se ha seguido, es desarrollar modelos para estudiar aspectos de la somitogénesis a cierta escala en específico. De este modo, se han desarrollado modelos que buscan dar una explicación a algunos aspectos de la somitogénesis basándose en las diferentes características que exhibe este proceso. Por ejemplo, a nivel celular se ha asociado la periodicidad de la somitogénesis al ciclo de la división celular en el MPS [10]. También se ha planteado que la adhesión celular juega un papel primordial [11, 12], así como las interacciones mecánicas entre las células del MPS [13, 14]. También hay modelos que analizan este proceso al estudiar la distribución de morfógenos, sustancias que dirigen la correcta diferenciación de las células en el MPS [15, 16]. De los diferentes modelos desarrollados, uno que asocia la interacción de un mecanismo oscilador con la distribución de morfógenos como mecanismo de información posicional, es el que ha sido de los más aceptados. Este modelo ha sido denominado como modelo de reloj y frente de onda.

Este modelo fue planteado en 1976 por J. Cooke y E. C. Zeeman [17], en esencia propone que la interacción de un mecanismo de reloj con un frente de diferenciación o frente de onda que viaja en dirección anterior-posterior puede explicar como es controlada la periodicidad espacio-temporal característica de la somitogénesis. En

la figura 1.4 se presenta un esquema de la propuesta de este modelo. En esta figura se esquematiza como las oscilaciones en la concentración de diversas proteínas (reloj de segmentación), que se generan en las células del MPS, se detienen en el sitio donde el futuro par de somitas se formará. La ubicación donde se forma cada par de somitas esta determinada por la posición de un frente de onda, el cual se va desplazando de acuerdo al crecimiento que va teniendo el embrión.

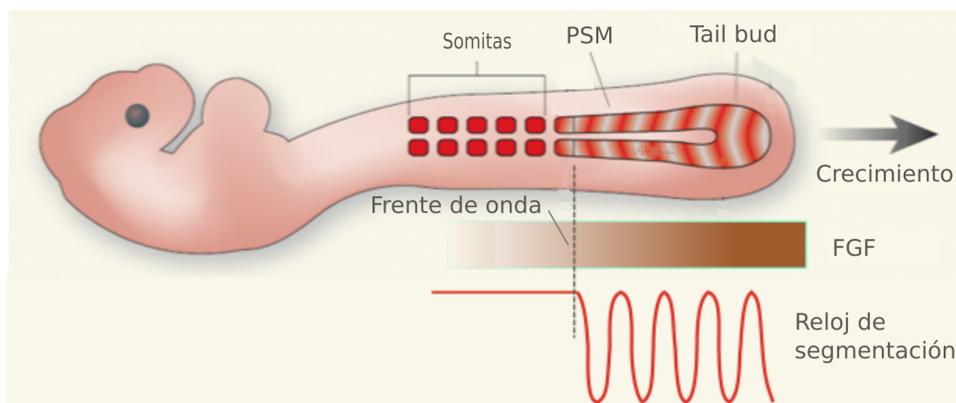


Figura 1.4: Esquema que ilustra la explicación que da el modelo de reloj y frente de onda para la somitogénesis.

Después del planteamiento de este modelo, las investigaciones entorno a la somitogénesis continuaron desarrollándose, lográndose obtener evidencia experimental que le dió respaldo, siendo así que se lograron identificar los posibles componentes moleculares en que se fundamenta.

La primer evidencia que se obtuvo en apoyo a este modelo, fue acerca de la existencia de un mecanismo molecular capaz de generar oscilaciones en el MPS. Se trató del gen *harly1*, el cual tiene un patrón de expresión oscilatoria en las células del MPS en embriones de pollo [18]. Posteriormente se identificaron en embriones de ratón 22 genes con esta característica [19].

Con estos descubrimientos se confirmó la presencia de un oscilador genético que opera dentro del MPS de los embriones de vertebrados, el cual es el responsable de generar las oscilaciones que dirigen la periodicidad en la formación de los somitas

de acuerdo al crecimiento que va presentando el embrión [3, 20].

La explicación mas aceptada sobre el origen de las oscilaciones en la expresión de estos genes es que tienen un efecto inhibitorio en su propia expresión. Además de que en este efecto inhibitorio hay retardos involucrados. Estos retardos corresponden al tiempo necesario para que la síntesis de las proteínas se complete, e involucra principalmente el tiempo necesario para la transcripción y traducción [21]. En la figura 1.5 se esquematiza de forma resumida este mecanismo.

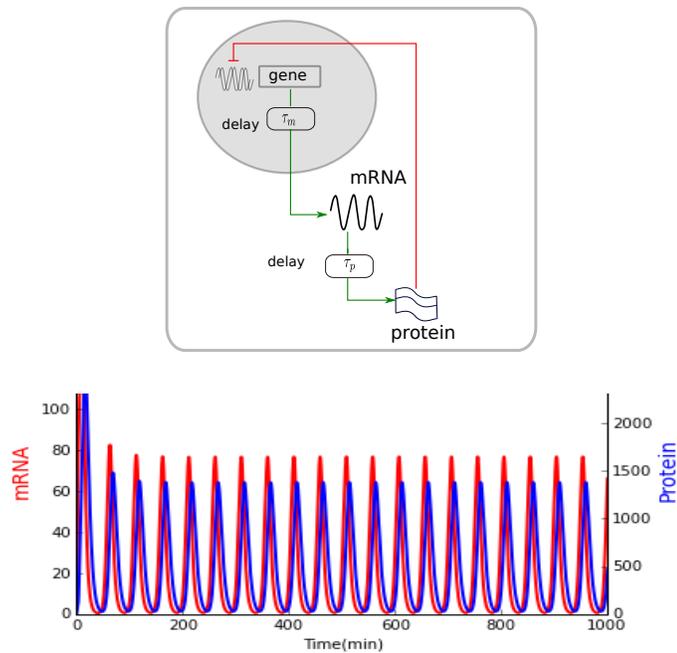


Figura 1.5: Mecanismo del reloj de segmentación. Las oscilaciones en las concentraciones de las proteínas son originadas debido a los retardos  $\tau_m$  (tiempo necesario para la transcripción) y  $\tau_p$  (tiempo necesario para la traducción) en el efecto autoinhibitorio.

Por otra parte, el mecanismo correspondiente al frente de onda, esta asociado con el crecimiento del embrión producido por la proliferación de las células situadas en

la porción más posterior de la región no segmentada del MPS conocida como *tail bud*. Las células de esta zona se reproducen por la influencia de una concentración local elevada del Factor de Crecimiento Fibroblástico (*FGF*) que es producida por estas células [2]. Por otro lado, en la parte más anterior la concentración de *FGF* es menor, ya que las moléculas de *FGF* difunden hacia el resto del embrión y se degradan conforme pasa el tiempo. Durante este proceso llega un punto en el que las células del MPS se exponen a una concentración umbral (frente de onda) que permite que estas células sigan con el proceso de maduración y se puedan formar los somitas. Este valor umbral se va desplazando de acuerdo al crecimiento del embrión y de esta forma indica la posición donde se formará el siguiente par de somitas (ver figura 1.4).

El mecanismo descrito anteriormente se ha validado experimentalmente, ya que se han descubierto diversas moléculas que se distribuyen en forma de gradiente a lo largo de embriones de diferentes especies, que cumplen con las características de un frente de onda. Por ejemplo se ha encontrado que *Wnt3a* y *FGF* se distribuyen con una mayor concentración en la parte posterior y una menor en la parte anterior en embriones de ratón [22], también se ha identificado al ácido retinoico que está distribuido de manera opuesta a la de *Wnt3a* y *FGF* [23].

Posterior a la identificación de los componentes moleculares que le dan sustento al modelo de reloj y frente de onda, se obtuvieron resultados experimentales adicionales que respaldaron a este modelo. Por ejemplo, se llevó a cabo un experimento utilizando embriones de pez cebra donde al alterar externamente la velocidad del frente de onda representado por un gradiente de *FGF*, da como resultado la formación de somitas de diferente tamaño, lo cual concuerda con la explicación del modelo de reloj y frente de onda [24]. Los resultados de este experimento respaldan la explicación que da el modelo de reloj y frente de onda.

Sin embargo, también hay estudios cuyos resultados no se explican con el modelo de reloj y frente de onda. Por ejemplo, se realizó un experimento en embriones de pollo en el que se transplanta un segmento de MPS a la periferia de un embrión anfitrión para dejar el tejido libre por completo del efecto de cualquier molécula

que pudiera representar el frente de onda, y se pudo observar que aún así se lleva a cabo la formación de somitas aunque de manera irregular, además, esta formación se da de manera simultánea [25].

En otro experimento en embriones de ratón, se suprimió la expresión de las proteínas *FGF4* y *FGF8* y a pesar que el desarrollo del embrión no continuó más allá de unos días se pudo observar que en ausencia del frente de onda formado por la difusión de estas proteínas, se formaron los somitas aunque también de forma irregular [26]. Además, hay otra observación que no se ha logrado determinar a que se debe, la cual es que en embriones de ratón normales, los primeros 4 pares de somitas aparecen de manera simultánea [25].

Todos estos aspectos quedan fuera de la explicación que da el modelo de reloj y frente de onda ya que de acuerdo con este modelo, para la formación de los somitas se requiere de la interacción de los dos mecanismos, debido a que, por un lado el reloj de segmentación indica cuando se forma cada par de somitas y el frente de onda indica la posición donde se forman.

Poco después que se propusiera el modelo de reloj y frente de onda, Meinhardt propuso un modelo conceptualmente diferente [27]. Este modelo esta basado en el descubrimiento realizado por el matemático Alan Turing, en el que al analizar la estabilidad de un modelo de reacción-difusión pudo determinar las condiciones necesarias en las que los estados de equilibrio espacialmente homogéneos podían evolucionar en la generación de patrones de alta y baja concentración. Debido a este descubrimiento, cuando se determina que un sistema de reacción-difusión presenta este tipo de inestabilidad se le denomina inestabilidad de Turing. Este comportamiento es provocado por un cambio en la estabilidad del sistema ocasionado por el efecto de la difusión [28].

De acuerdo al modelo propuesto por Meinhardt [27], el movimiento del frente de onda es un fenómeno emergente, que no es originado por una señal de posicionamiento externo [27, 29]. En otras palabras, se puede reproducir la dinámica de la somitogénesis sin necesidad de un frente de onda externo.

Encontrar las discrepancias experimentales referentes al modelo de reloj y frente de

onda descritas anteriormente, propició que el mecanismo propuesto por el modelo de Meinhardt fuera retomado recientemente por Cotterell y colaboradores (2015) para plantear un modelo para la somitogénesis [30].

El modelo propuesto por Cotterell y colaboradores [30] fue denominado modelo PORD (Modelo de Reacción-Difusión Progresivo Oscilatorio). De acuerdo a los resultados reportados [30], este modelo puede reproducir la formación simultánea de somitas y además es compatible con características importantes de la somitogénesis como la regulación del tamaño de los somitas. También, el modelo PORD hace predicciones respecto a experimentos de manipulación del gradiente de *FGF* y de cortes de tejido en el MPS que son más consistentes con las observaciones experimentales que el modelo de reloj y frente de onda.

A pesar de que el modelo PORD puede explicar los resultados experimentales que no puede el modelo de reloj y frente de onda, este modelo tiene un gran inconveniente: es muy sensible a pequeñas variaciones en las variables de estado. Por ejemplo cuando el modelo se prueba con condiciones iniciales aleatorias o se considera el ruido intrínseco inherente a cualquier proceso biológico, los patrones de expresión genética se producen de manera desordenada. Sin embargo, hay que notar que este comportamiento es el que se observa experimentalmente cuando las células del MPS no están bajo la influencia de un frente de onda externo, pero contrasta con la robustez observada en la formación de los somitas en condiciones normales.

### 1.3. Planteamiento del problema

Durante la somitogénesis se hace evidente el acoplamiento espacio-temporal de mecanismos que operan a diferente escala, ya que se observa como una expresión oscilatoria en el tiempo de diversas proteínas se coordinan con la aparición de aglomerados celulares que componen a los somitas. Esta coordinación espacio-temporal ha inspirado el desarrollo de diferentes modelos que buscan explicar como es controlada esta característica.

El modelo PORD, es un modelo a escala del tejido en el que las interacciones a largo alcance mediadas por la difusión juegan un papel fundamental. Una de las principales características de este modelo es que no requiere de la información posicional del frente de onda para reproducir el proceso de segmentación del MPS, pero tiene el inconveniente que es muy sensible a pequeñas variaciones y requiere condiciones iniciales específicas para reproducir los resultados.

Analizando estos aspectos, surge la posibilidad que si se integra en el modelo PORD el efecto del frente de onda es posible que se superen estos inconvenientes. Adicionalmente, el modelo PORD al estudiar la somitogénesis a escala del tejido no contempla las diferentes interacciones a nivel celular que se llevan a cabo durante este proceso. En ese sentido un fenómeno que depende de estas interacciones y que interviene de manera fundamental en el desarrollo de la somitogénesis es la sincronización de las oscilaciones en la expresión de proteínas en las células del MPS. Hay estudios que muestran que cuando se pierde la sincronización en las células del MPS la somitogénesis se desarrolla de manera anormal [31, 32].

La sincronización es un fenómeno que se presenta en un amplio rango de sistemas cuando sus componentes interactúan entre si, y se ha determinado que independientemente del sistema el comportamiento de la sincronización depende principalmente de factores como la cantidad de componentes que integran el sistema, el número de componentes que interactúan, la fuerza de conexión entre ellos y la variabilidad que presentan los componentes, por lo tanto es conveniente determinar el efecto de estas características sobre la sincronización en las células del MPS.

Al determinar que la pérdida de la sincronización provoca una segmentación anormal del MPS se expone como las interacciones a nivel celular tienen un efecto a nivel del tejido, sin embargo, un modelo que solo considere las interacciones a escala celular difícilmente podrá dar una explicación al proceso de segmentación. En este contexto queda por determinar la influencia de estas interacciones multiescala sobre la robustez de la somitogénesis.

Con este contexto, en esta tesis nos planteamos la siguiente hipótesis.

# Capítulo 2

## Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis

La robustez espacio-temporal de la somitogénesis es afectada por interacciones a escala del tejido e interacciones a escala celular.

### 2.2. Objetivo general

Estudiar la dinámica espacio-temporal de la somitogénesis mediante dos modelos a diferente escala, uno a escala del tejido y otro a escala celular.

### 2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Estudiar un modelo a escala del tejido y analizar su estabilidad para caracterizar su robustez ante diferentes variaciones.

2.3.2. Estudiar con un modelo a escala celular como el número de células, el nivel de conectividad, la fuerza de conexión y la variabilidad celular afectan la sincronización de las células del MPS.

# Capítulo 3

## Metodología

En los últimos años, estudios sobre la somitogénesis han revelado que este proceso es regulado por una compleja red de interacciones tisulares, celulares y moleculares [3, 8]. Esta complejidad hace que el entendimiento de este proceso sea un verdadero desafío. En ese sentido el uso de modelos matemáticos han cobrado una gran relevancia. Normalmente, la implementación de modelos sigue dos estrategias, una que involucra analizar cuantitativamente cada componente y sus interacciones para después realizar las simulaciones. Esta estrategia es efectiva cuando se implementan modelos para estudiar sistemas relativamente simples. Sin embargo para sistemas más complejos en los cuales están involucrados parámetros espacio-temporales se vuelve casi imposible obtener una predicción significativa con estos modelos. En este caso normalmente se utiliza una segunda estrategia en la que se omiten los detalles de los componentes, con esto se busca obtener información útil que permita entender cualitativamente la dinámica del sistema en estudio.

La selección de una u otra estrategia para estudiar un sistema se basa en la característica que se quiere analizar. En esta tesis se busca estudiar un aspecto clave de la somitogénesis: su robustez en la periodicidad espacio-temporal. Para este fin, inicialmente se plantea analizar el modelo PORD (un modelo a escala del tejido) para determinar si la inclusión del frente de onda permite eliminar su sensibilidad

a las variaciones. Posteriormente mediante un modelo a escala celular se plantea el estudio de un fenómeno que esta mediado por las interacciones a nivel celular en el MPS: la sincronización. Con este modelo se busca analizar el efecto de características como el tamaño de la red, el número de conexiones en la red, la fuerza de conexión, y la variabilidad en los parámetros tienen sobre la sincronización.

# Capítulo 4

## Resultados y discusión

### 4.1. Estudio a escala del tejido

La intrincada red de interacciones genéticas involucradas en la somitogénesis que se ha documentado hasta el momento muestra lo difícil que resulta definir el impacto que cada interacción tiene en el comportamiento de todo el sistema. Además, si se busca desarrollar un modelo matemático para describir este proceso es necesaria la definición de los parámetros requeridos por el modelo, lo cual para el caso de la somitogénesis aunque ha habido avances aún hay mucho que se desconoce. Cuando se presenta el caso de desarrollar un modelo que reproduzca un resultado pero no hay información suficiente acerca de las interacciones y valores de los parámetros es posible usar técnicas computacionales para investigar las posibles redes de interacción y parámetros que den los resultados esperados. Este fue el procedimiento realizado por Cotterel y colaboradores [33]. En este trabajo mediante un barrido de las posibles combinaciones de redes de máximo 3 componentes pudieron definir la red más simple que pudo reproducir el proceso de la segmentación del MPS. Es así que llegaron a el planteamiento de una red de dos componentes y las interacciones requeridas para reproducir el proceso de la somitogénesis. Basados en este resultado es como se originó el modelo PORD.

### 4.1.1. Desarrollo del modelo

La propuesta del modelo PORD se basa en la red de regulación genética mostrada en la figura 4.1A. Esta red esta compuesta de dos genes hipotéticos, que codifican una proteína activadora  $A$  y una represora  $R$ . Como se muestra en el esquema, la proteína  $A$  promueve su propia expresión así como la de  $R$ , por su parte la proteína  $R$  reprime la expresión de  $A$ . Adicionalmente, la proteína  $R$  tiene la capacidad de difundir a través del medio extracelular y afectar a otras células.

El esquema original planteado por Cotterell y colaboradores en [30] contempla que solo la proteína  $R$  puede difundir como se muestra en la figura 4.1A. En nuestro caso, iniciaremos con una modificación a este esquema y consideraremos que también la proteína activadora puede difundir lo que da lugar al esquema de la figura 4.1B. Esto se propone de esta forma ya que es necesario considerar la difusión del activador para poder acoplar el frente de onda con el modelo PORD (ver apéndice A), debido a estas modificaciones al modelo planteado en esta tesis lo denominaremos modelo híbrido. Estas interacciones definen una red de interacciones típica denominada sistema de interacción activador-represor [34].

Para el desarrollo del modelo híbrido representado en el esquema de la figura 4.1B, partiremos de la premisa que, en general el tiempo de vida del *ARN* mensajero es mucho menor que el de las proteínas, entonces es posible considerar una aproximación de estado cuasi-estacionario, con lo que la dinámica del activador  $A$  y su represor  $R$  puede ser representado mediante un modelo de reacción-difusión compuesto por el siguiente sistema ecuaciones en derivadas parciales:

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \alpha_A P_A(A, R) - \mu_A A + D_A \nabla^2 A, \quad (4.1a)$$

$$\frac{\partial R}{\partial t} = \alpha_R P_R(A) - \mu_R R + D_R \nabla^2 R, \quad (4.1b)$$

donde  $\alpha_A$  y  $\alpha_R$  son las tasas máximas de expresión para el activador y el represor respectivamente;  $P_A$  y  $P_R$  son las probabilidades de que el promotor del gen  $A$  y  $R$  estén activos;  $\mu_A$  y  $\mu_R$  son las correspondientes tasas de degradación de cada proteína y  $D_A$  y  $D_R$  son los respectivos coeficientes de difusión.

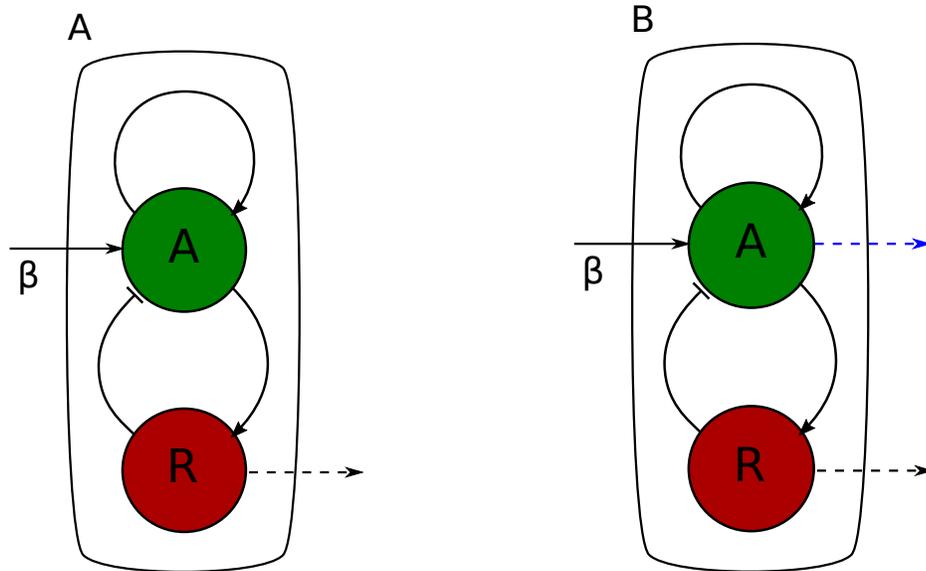


Figura 4.1: Red de interacción activador-represor. A) Representación esquemática de la red de regulación genética propuesta por Cotterell y colaboradores (2015) para el modelo PORD [30]. B) Red propuesta para el desarrollo del modelo híbrido. Esta red consiste de dos genes que codifican para una proteína activadora  $A$  y una represora  $R$ . Las líneas continuas con punta de flecha y línea perpendicular denotan regulación positiva y negativa respectivamente.  $\beta$  representa la regulación externa sobre la proteína  $A$  debido al efecto del frente de onda. Las líneas punteadas corresponden a la difusión. El proceso de difusión representado por la flecha azul no había sido considerada en el modelo PORD, pero es incluida para el desarrollo del modelo híbrido propuesto en el presente trabajo.

Como se explicó anteriormente,  $A$  tiene un efecto activador sobre si mismo a la vez que es reprimido por  $R$ , por lo tanto  $P_a(A, R)$  debe ser una función creciente de  $A$  y decreciente de  $R$ . Por otro lado  $R$  es activado por  $A$ , así que  $P_R(A)$  debe de ser una función creciente de  $A$ . Tomando esto en cuenta, Meinhardt [27] consideró

que  $P_A(A, R) = \rho_1 A^2/R$  y  $P_R(A) = \rho_2 A^2$ , con  $\rho_{1,2} > 0$ . Estas expresiones tienen algunos problemas desde un punto de vista bioquímico, ya que  $P_A(A, R)$  diverge cuando  $A \rightarrow \infty$ , sin embargo, en la realidad la tasa de expresión génica se debe saturar para concentraciones altas del activador. Por otro lado, ambas  $P_A(A, R)$  y  $P_R(A)$  divergen cuando  $R \rightarrow 0$ , esto se deduce al notar que:  $P_A(A, R)$  se incrementa al cuadrado sin límite a medida que  $R$  se aproxima a 0, por lo tanto promueve un crecimiento del activador ya que  $\partial A/\partial t > 0$ , en consecuencia se da un crecimiento sin límite para  $P_R(A)$ .

Por su parte, para superar los inconvenientes señalados anteriormente, en Cotterell et. al. [30] se propusieron las siguientes funciones:

$$P_A(A, R) = \Phi \left( \frac{l_1 A - l_2 R + \beta}{1 + l_1 A - l_2 R + \beta} \right), \quad (4.2a)$$

$$P_R(A) = \frac{l_3 A}{1 + l_3 A}, \quad (4.2b)$$

donde  $l_1$ ,  $l_2$  y  $l_3$  definen la fuerza de interacción entre  $A$  y  $R$ , y  $\beta$  es el efecto externo del frente de onda sobre  $A$ . Para evitar valores negativos se introdujo la función  $\phi(x) = x.H(x)$ , donde  $H(x)$  es la función Heaviside estándar ( $H(x) = 1$  para  $x \geq 0$  y  $H(x) = 0$  para  $x < 0$ ). Aunque la función  $P_A(A, R)$  definida en 4.2a cumple con los requisitos de ser una función creciente de  $A$  y decreciente de  $R$ , esta presenta características que también son inadecuadas biológicamente. La función  $\phi(x)$  no es continua en  $x = 0$ . Esta característica no es conveniente para modelos matemáticos inspirados en procesos biológicos ya que puede causar complicaciones cuando se analiza el comportamiento dinámico del sistema; en Hang y Zhang (2010) y Castillo et. al. (2015) se presenta una discusión acerca del comportamiento dinámico en sistemas oscilatorios compuestos por funciones de este tipo.

Para el desarrollo del modelo híbrido, se propone un enfoque en el que las funciones  $P_A(A, R)$  y  $P_R(A)$  se obtienen al asumir que el activador y el represor comparten el mismo sitio de unión al promotor del gen  $A$ , y que ambos, el activador y el represor, interactúan con sus respectivos sitios de unión al promotor de los genes  $A$  y  $R$  de

manera cooperativa. Con esto se tiene que las funciones  $P_A(A, R)$  y  $P_R(A)$  quedan definidas como:

$$P_A(A, R) = \frac{\beta + (A/K_1)^{n_1}}{1 + (A/K_1)^{n_2} + (R/K_2)^{n_2}}, \quad (4.3a)$$

$$P_R(A) = \frac{(A/K_3)^{n_3}}{1 + (A/K_3)^{n_3}}, \quad (4.3b)$$

donde  $K_1$  representa la constante de saturación media para la reacción de unión entre el activador y el promotor del gen  $A$ ;  $n_1$  es el coeficiente de Hill que indica la cooperatividad entre activador y el promotor del gen  $A$ ;  $\beta$  es la regulación externa que el frente de onda tiene sobre  $A$ , la constante de saturación media y el coeficiente de Hill para la interacción entre el represor y el promotor del gen  $A$  están representados por  $K_2$  y  $n_2$ , respectivamente; y  $K_3$  y  $n_3$ , son la constante de saturación media y el coeficiente de Hill para la interacción entre el activador y el promotor del gen  $R$ .

Es así que, las ecuaciones (4.1) y (4.3) constituyen el sistema de reacción-difusión para la red de expresión génica que modela las interacciones espacio-temporales entre las concentraciones de las dos proteínas representadas en la figura 4.1B.

Adicionalmente, el modelo representado por las ecuaciones (4.1) y (4.3) se puede adimensionalizar al definir las siguientes variables:

$$\begin{aligned} x' &= x/L, & y' &= y/L, & z' &= z/L, & t' &= t\mu_A, \\ a &= \frac{A\mu_A}{\alpha_A}, & d_a &= \frac{D_A}{\mu_A L^2}, & k_1 &= \frac{K_1\mu_A}{\alpha_1}, & k_2 &= \frac{K_2\mu_R}{\alpha_3}, \\ r &= \frac{B\mu_r}{\alpha_r}, & d_r &= \frac{D_R}{\mu_A L^2}, & k_3 &= \frac{K_3\mu_R}{\alpha_R}, & \mu &= \frac{\mu_R}{\mu_A}, \end{aligned}$$

donde  $L$  es la longitud característica de sistema (4.1). Así obtenemos el siguiente sistema de reacción-difusión adimensional:

$$\frac{\partial a}{\partial t'} = P_a(a, r) - a + d_a \nabla'^2 a, \quad (4.4a)$$

$$\frac{\partial r}{\partial t'} = \mu (P_r(a) - r + d_r \nabla'^2 r), \quad (4.4b)$$

donde  $\nabla'^2$  es el laplaciano con respecto a  $(x', y', z')$ , y

$$P_a(a, r) = \frac{\beta + (a/k_1)^{n_1}}{1 + (a/k_1)^{n_1} + (r/k_2)^{n_2}}, \quad (4.4c)$$

$$P_r(a) = \frac{(a/k_3)^{n_3}}{1 + (a/k_3)^{n_3}}. \quad (4.4d)$$

Por claridad, se eliminará la notación  $(\cdot)'$  de aquí en adelante.

#### 4.1.2. Estimación de los parámetros

Dado que los genes que se están considerando en el modelo son hipotéticos, no es posible estimar los valores de los parámetros a partir de datos experimentales específicos. Para determinar sus valores, se realizó un análisis de bifurcación del sistema sin difusión, para esto se empleó el método de continuación numérica implementado en XPPAUT [35]. Para empezar, siguiendo las mismas consideraciones que en Cotterell et. al. [30], se tomó  $n_3 = \mu = 1$ , y  $n = n_1 = n_2$ .

Posteriormente, se realizó el análisis de bifurcación para determinar los intervalos de los parámetros para los que el sistema exhibe oscilaciones sostenidas en ausencia de difusión. Esta característica es esencial para establecer la periodicidad de la somitogénesis.

En la figura 4.2 se muestra el diagrama de bifurcación para cada parámetro. Ahí es posible observar el intervalo de valores cuando el sistema está en un régimen oscilatorio. Este intervalo está delimitado por los puntos donde se presenta una bifurcación de Hopf. Analizando este diagrama, podemos ver que para el parámetro  $\beta$  (figura 4.2A) ocurre solo una bifurcación de Hopf, en el que se puede apreciar que para determinado valor de  $\beta$  las oscilaciones desaparecen. Esto indica que

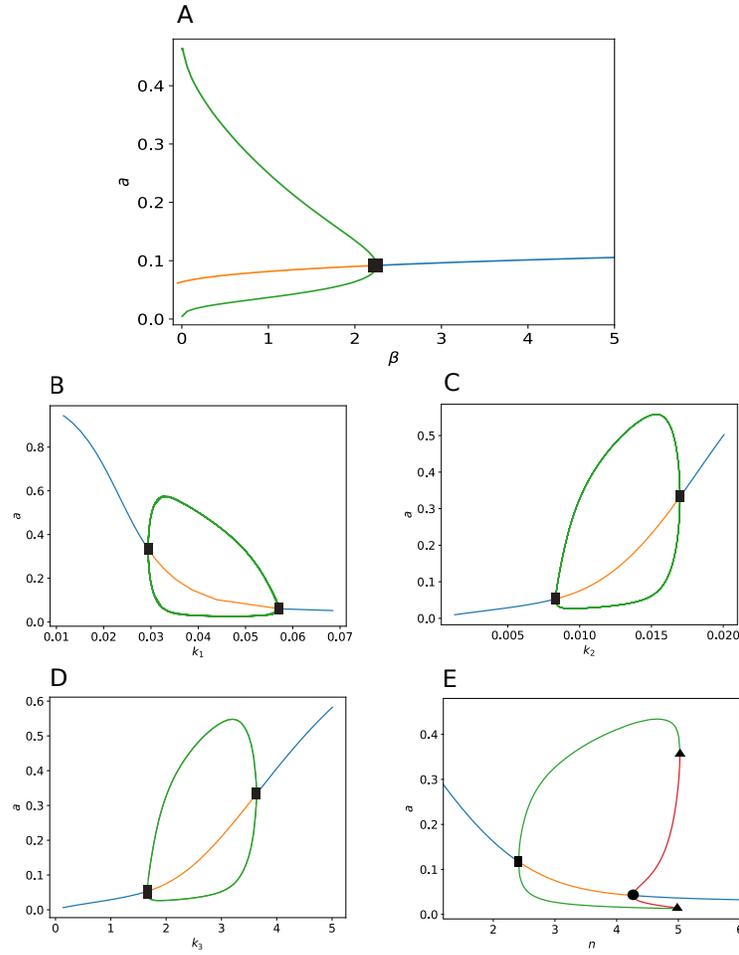


Figura 4.2: Diagrama de Bifurcación del sistema (4.4) (sin considerar los términos de difusión) al variar: A) la regulación externa de activador  $\beta$ . Los parámetros correspondientes a las constantes de saturación B)  $k_1$ , C)  $k_2$  y D)  $k_3$ , y E) el coeficiente de Hill  $n$ . Las líneas continuas color azul (naranja) corresponden a puntos de equilibrio estables (inestables), y las líneas verdes (rojas) corresponden a ciclos límite estables (inestables). Los cuadrados (círculos) rellenos indican bifurcaciones de Hopf supercríticas (subcríticas) y los triángulos bifurcaciones Pitchfork. Los valores para los parámetros restantes en cada panel son:  $k_1 = 0.05$ ,  $k_2 = 0.01$ ,  $k_3 = 2.0$ ,  $n = 3.0$ , y  $\beta = 0.5$ , respectivamente.

para valores pequeños de  $\beta$  la amplitud de las oscilaciones se incrementa y estas oscilaciones desaparecen para valores de  $\beta$  mayores a 2.25. También podemos ver en las figuras 4.2 B)-D) que para los parámetros  $k_1, k_2$  y  $k_3$  existen dos puntos de bifurcación de Hopf, los cuales determinan el intervalo de valores en los que se mantiene un comportamiento oscilatorio. Es interesante observar en la figura 4.2 E), que para el parámetro  $n$  existe un intervalo de biestabilidad, ya que en ese intervalo coexiste un estado de equilibrio estable con un ciclo límite. Esto indica que existe un sistema de “encendido y apagado” del gen, esto significa que el sistema presenta histéresis, la cual esta controlada por el nivel de cooperatividad del sistema que esta representado por el parámetro  $n$ .

Los valores de los parámetros  $d_r$  y  $d_a$  se determinaron del análisis de estabilidad espacial desarrollado en el Apéndice A. En las simulaciones realizadas, se consideraron valores intermedios dentro de los intervalos determinados en la figura 4.2. Estos valores se presentan en la Tabla 4.1. Dado que el parámetro  $\beta$  representa el efecto externo del frente de onda este funcionará como parámetro de control y su valor se establecerá de acuerdo a las características de cada simulación.

Parámetro	valor
$k_1$	0.05
$k_2$	0.01
$k_3$	2.0
$n$	3.0
$d_r$	$2.5 \times 10^{-3}$
$d_a$	$5.0 \times 10^{-5}$

Tabla 4.1: Valores de los parámetros utilizados en las simulaciones. Se obtuvieron a partir del análisis de bifurcación del sistema (4.4) y el análisis de estabilidad espacial realizado en el Apéndice A.

### 4.1.3. Métodos numéricos

Partiendo de la suposición que el MPS puede ser considerado como una estructura unidimensional, se tomó en cuenta una única dimensión espacial,  $x$ , con límites en  $x = 0$  y  $x = 1$ . Con estos límites se establece una ventana de observación en el MPS donde  $x = 0$  corresponde a el extremo posterior. Para solucionar numéricamente el sistema (4.3) se implementó el algoritmo de Euler con el método estándar de diferencias finitas de tres puntos en `Julia`; así como condiciones de frontera de Newman:

$$\left. \frac{\partial a}{\partial x} \right|_{(0,t)} = \left. \frac{\partial a}{\partial x} \right|_{(1,t)} = \left. \frac{\partial r}{\partial x} \right|_{(0,t)} = \left. \frac{\partial r}{\partial x} \right|_{(1,t)} = 0, \quad (4.5)$$

con las siguientes condiciones iniciales (a no ser que se establezca de otra manera):

$$a(x, 0) = \begin{cases} 0.05 & \text{for } x = 1, \\ 0 & \text{for } 0 \leq x < 1, \end{cases} \quad r(x, 0) = 0, \text{ for } 0 \leq x \leq 1. \quad (4.6)$$

Esta condiciones iniciales indican que el sistema esta inicialmente homogéneo, excepto por una perturbación en el extremo anterior de la ventana de observación. También se realizaron simulaciones estocásticas, en las que se agregó ruido blanco Gaussiano al sistema. Para estas simulaciones se sustituyeron las ecuaciones (4.1a) y (4.1b) por:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = P_a(a, r) - a + d_a \nabla^2 a + c_v \bar{a} dW, \quad (4.7a)$$

$$\frac{\partial r}{\partial t} = \mu(P_r(a) + r - d_r \nabla^2 r) + c_v \bar{r} dW, \quad (4.7b)$$

donde  $\bar{a}$  y  $\bar{r}$  representan respectivamente los valores del punto de equilibrio inestable de  $a$  y  $r$ ,  $c_v$  es el coeficiente de variación del ruido blanco y  $dW/dt$  es el ruido blanco que tiene una distribución normal con media 0 y varianza 1. Para resolver el sistema de ecuaciones parciales estocásticas representado por las ecuaciones 4.7, se utilizó el método Euler-Murayama implementado en `Julia`.

#### 4.1.4. Resultados

Debido a que las funciones originales del modelo PORD se modificaron, iniciaremos con simulaciones para validar si el modelo híbrido es capaz de reproducir los resultados obtenidos por Cotterell et. al. [30] con el modelo PORD.

Para esto, se consideró a  $d_a = 0$ ,  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ ,  $\beta = 0.5$ , y se solucionó numéricamente el sistema (4.1). Estos resultados se muestran en la figura 4.3A.

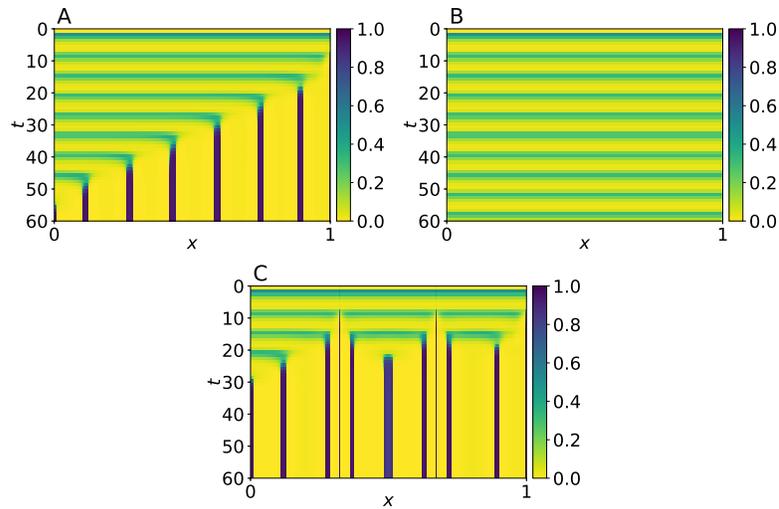


Figura 4.3: Evolución espacio-temporal de  $a$  en el sistema (4.4), con condición de frontera como en (4.5), para diferentes condiciones iniciales: A)  $r(x, 0) = 0$  para todo  $x \in [0, 1]$ ,  $a(x, 0) = 0$  para  $0 \leq x < 1$ , y  $a(1, t) = 0, 05$ ; B)  $r(x, 0) = a(x, 0) = 0$  para todos  $x \in [0, 1]$ ; C)  $r(x, 0) = 0$  y  $a(x, 0) = 0$  para todo  $x \in [0, 1]$  y  $a(x, 0) = 0.05$  en  $x = 0.325, 0.675, 0.9975$ . Los valores de los parámetros se establecieron de la siguiente manera:  $k_1 = 0.05$ ,  $k_2 = 0.01$ ,  $k_3 = 2$ ,  $n = 3$ ,  $\beta = 0.5$ ,  $d_a = 0$  y  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ .

Podemos ver que el comportamiento oscilatorio gradualmente da lugar a un patrón que consiste en regiones alternadas de alta y baja expresión genética. Se observa también que la dinámica de formación de patrones comienza en la posición de

la perturbación inicial y se propaga con velocidad constante. Esto muestra que la perturbación inicial es esencial para la aparición del patrón, si el sistema esta inicialmente homogéneo, el comportamiento oscilatorio continúa indefinidamente como se muestra en la figura 4.3B. Por otro lado, en la figura 4.3C podemos ver que cuando se soluciona el sistema con más de una perturbación inicial, cada una de ellas origina una secuencia de formación de patrones. y cuando dos de estas secuencias chocan se cancelan. Estos resultados concuerdan y son equivalentes a los obtenidos con el modelo PORD planteado por Cotterell et. al. [30].

Después de analizar estos resultados, se puede sugerir que la transición de un comportamiento oscilatorio a un estado de expresión constante (que corresponde a la aparición de las regiones de alta y baja expresión) es provocado por una inestabilidad causada por la difusión que interactúa con un ciclo límite [36, 37]. Para verificar esto, en el apéndice A se presenta un análisis de la estabilidad espacial del sistema (4.4)-(4.5). Con este análisis se pudo confirmar que, con los valores de los parámetros utilizados para obtener los resultados anteriores el sistema es espacialmente inestable. Recordemos que los resultados que se acaban de describir son consistentes con lo que se ha reportado en experimentos donde se observa que los somitas pueden formarse en ausencia de un frente de onda. También explican porqué los somitas se forman casi simultáneamente y de forma irregular, ya que cualquier perturbación inicial en el tejido del MPS origina rápidamente un límite del somita y la secuencia de formación del patrón choca casi de inmediato con secuencias vecinas. Estos resultados muestran que, el frente de onda no es estrictamente necesario para la formación de somitas, sin embargo, hay varios estudios que confirman su importancia durante el proceso de la somitogénesis [24, 26].

En particular, se ha reportado que el frente de onda representado por el gradiente de *FGF* es requerido para mantener a las células en un estado indiferenciado [38]. A partir de esto, se puede especular que aunque un frente de onda no es estrictamente necesario para generar un patrón de segmentación, la robustez característica de la somitogénesis se puede alcanzar al acoplar el sistema de reacción-difusión con un frente de onda, y con esto también eliminar la dependencia de condiciones iniciales

específicas.

La dinámica del frente de onda está asociado con un gradiente del factor de crecimiento fibroblástico (*FGF*) [26], el cual es producido en la parte posterior del embrión conocida como *tail bud* y de ahí difunde al resto del MPS. En consecuencia la concentración del *FGF* decrece en dirección posterior-anterior, y conforme el embrión crece, el *tail bud* se desplaza provocando que el frente de onda se mueva en dirección anterior-posterior conforme transcurre el tiempo. Sabiendo esto y considerando que este efecto externo es capturado por el parámetro  $\beta$ , el siguiente paso será acoplar este parámetro con la dinámica del frente de onda.

Al hacer esto se espera que para valores grandes de  $\beta$  el sistema exhiba un ciclo límite estable y conforme va disminuyendo se vuelva inestable para cierto valor umbral de  $\beta$ . En otras palabras niveles altos de  $\beta$  (que corresponden a niveles altos de *FGF*) mantienen la expresión oscilatoria estable y se evita la formación de somitas y una vez que  $\beta$  cruza cierto valor umbral hace que el ciclo límite se vuelve inestable y entonces cualquier inhomogeneidad dispara la formación de los somitas en la posición donde el umbral es alcanzado.

Este razonamiento se confirmó al realizar el análisis de estabilidad en función de los parámetros  $\beta$  y  $d_a$  presentado en el Apéndice A. En este análisis se encontró que cuando el sistema es equivalente al modelo PORD, esto es,  $d_a = 0$ , el sistema nunca se vuelve espacialmente estable, incluso para valores muy grandes de  $\beta$  (vea la figura 6.2c con  $\kappa^2 = 0$ ). Con este resultado queda claro que con  $d_a = 0$  no es posible obtener un cambio de estabilidad. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, una característica de los modelos de reacción-difusión es que su estabilidad puede cambiar en función de los coeficientes de difusión [28, 34]. Entonces, esto sugiere que al incluir el coeficiente de difusión en el activador se logre afectar la estabilidad del modelo y sea posible acoplarlo con el frente de onda. En la figura 6.1 del Apéndice A, se puede ver que para un valor fijo de  $d_a = 5 \times 10^{-5}$  el sistema experimenta una bifurcación de un ciclo límite estable a inestable a medida que el valor de  $\beta$  varía.

Para apreciar este cambio de estabilidad, presentamos en la figura 4.4 los resultados

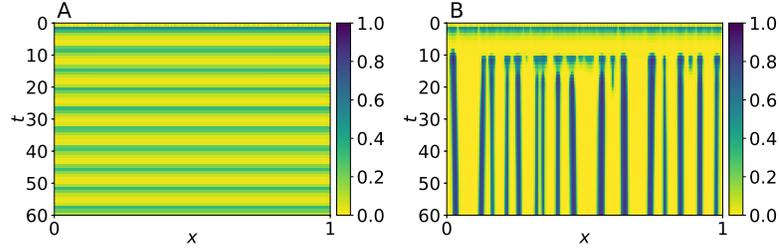


Figura 4.4: Evolución espacio-temporal de  $a$  para el sistema (4.4), con condiciones de frontera como en (4.5), para: A) espacialmente estable con  $\beta = 0.5$ ; B) espacialmente inestable con  $\beta = 0.01$ . En ambos casos, las condiciones iniciales para  $a$  se seleccionaron de una distribución uniforme aleatoria en el intervalo  $[0, 0.1]$ , mientras que  $r(x, 0) = 0$  para todo  $x \in [0, 1]$ . Los valores de los parámetros se establecieron de la siguiente manera:  $k_1 = 0.05$ ,  $k_2 = 0.01$ ,  $k_3 = 2$ ,  $n = 3$ ,  $d_a = 5 \times 10^{-5}$  y  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ .

de dos simulaciones, una en la que el ciclo límite es estable y otra en la que es inestable. Como se puede ver en la figura 4.4A, que corresponde a un valor para  $\beta$  donde el sistema es estable, el comportamiento oscilatorio se mantiene sin que se genere ningún patrón. Por el contrario, en la figura 4.4B, en el que el valor de  $\beta$  corresponde al régimen inestable, podemos ver como inmediatamente después de iniciar la simulación emerge una serie de patrones irregulares.

Para probar si la bifurcación mencionada anteriormente es suficiente para que al acoplar el comportamiento oscilatorio del sistema con el frente de onda se logre controlar la estabilidad y con esto dirigir la aparición de los somitas, se realizaron simulaciones en las cuales en lugar de tomar un valor constante de  $\beta$  se le asignó un valor de la forma:

$$\beta(x, t) = \beta_0 \frac{K_{1/2}^m}{K_{1/2}^m + (x - vt)^m}. \quad (4.8)$$

Se puede apreciar que esta expresión corresponde a una regulación externa del

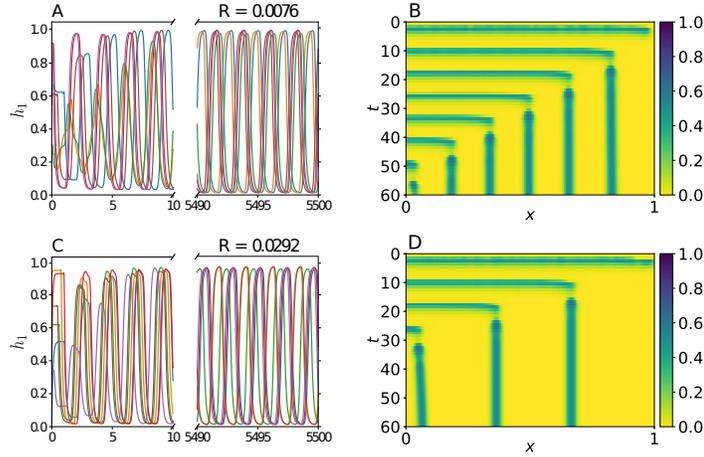


Figura 4.5: Evolución espacio-temporal de  $a$  de acuerdo al sistema (4.4) para  $\beta$  como en (4.8) y condiciones de frontera como en (4.5). A) Evolución del frente de onda  $\beta$  con  $v = 0.02$  y B) formación de patrones correspondientes a los somitas para una velocidad  $v = 0.02$ ; C) evolución del frente de onda  $\beta$  con  $v = 0.04$  y D) formación de patrones correspondientes a los somitas para una velocidad  $v = 0.04$ . Las condiciones iniciales para  $a$  consisten en valores aleatorios tomados de una distribución uniforme en el intervalo  $[0, 0.1]$ , mientras que  $r(x, 0) = 0$  para todos  $x \in [0, 1]$ . Los valores de los parámetros se establecieron de la siguiente manera:  $k_1 = 0.05$ ,  $k_2 = 0.01$ ,  $k_3 = 2$ ,  $n = 3$ ,  $d_a = 5 \times 10^{-5}$  y  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ .

gen  $A$  con un perfil sigmoideo que decae en función del tiempo y la posición y se desplaza en dirección posterior-anterior a una velocidad  $v$ . Es decir, captura el comportamiento dinámico del perfil de  $FGF$ .

En la figura 4.5 se presentan los resultados de dos simulaciones en las cuales se tomaron dos valores diferentes para la velocidad;  $v = 0.02$  y  $v = 0.04$ , además se estableció  $K_{1/2} = 1.6$ ,  $m = 4$ . Observe que, en ambas simulaciones, el patrón se origina con el mismo periodo de las oscilaciones, pero las regiones correspondientes a los somitas son más grandes para el frente de onda con mayor velocidad. Para

visualizar más claro esta relación, en la figura 4.6A se muestran los resultados en donde se confirma que el tamaño de los somitas es proporcional a la velocidad del frente de onda. Este resultado concuerda con la observación experimental en la cual se producen somitas más grandes cuando la velocidad del perfil de  $FGF$  se incrementa [24].

También se muestra en la figura 4.6B, que el tamaño de los somitas no está regulado por la velocidad del frente de onda cuando  $d_a = 0$ , confirmando que la difusión del activador es necesaria para un correcto acoplamiento de las oscilaciones con el frente de onda. Además, una característica importante que se obtiene cuando  $d_a > 0$ , es que no es necesario asignar una condición inicial específica para obtener un patrón correcto de segmentación. Las simulaciones de las figuras 4.5 y 4.6A se realizaron tomando condiciones iniciales aleatorias, pero los mismos resultados se obtienen con condiciones iniciales homogéneas.

Por el contrario, en las simulaciones de la figura 4.6B fue necesario considerar condiciones iniciales homogéneas con una pequeña perturbación en  $x = 1$  (ya que  $d_a = 0$  en este caso). El comportamiento observado en las figuras 4.5 y 4.6 es similar a otros modelos para la somitogénesis, en los que el efecto del frente de onda provoca una transición de un estado oscilatorio a uno biestable [39]. Lo que hace diferente al presente modelo es el mecanismo dinámico que activa la segmentación. En este modelo cuando el parámetro  $\beta$  (el cual representa el efecto externo del frente de onda) disminuye debajo de cierto valor umbral la dinámica del sistema se vuelve inestable. Por lo tanto cualquier inhomogeneidad es intensificada y provoca un patrón bien diferenciado de alta y baja expresión.

Este mecanismo tiene dos características que lo hacen interesante: 1) ya que el comportamiento del sistema cambia cuando se modifica el valor de  $\beta$ , un gradiente en  $\beta$  da lugar a inhomogeneidades, por lo que no se necesita de una condición inicial especial para la creación de patrones; y 2) el hecho de que el sistema sea espacialmente estable para valores altos de  $\beta$ , significa que  $\beta$  introduce un control externo sobre la estabilidad, que a su vez modula el tamaño del patrón y atenúa las inhomogeneidades iniciales que se presentan de forma natural.

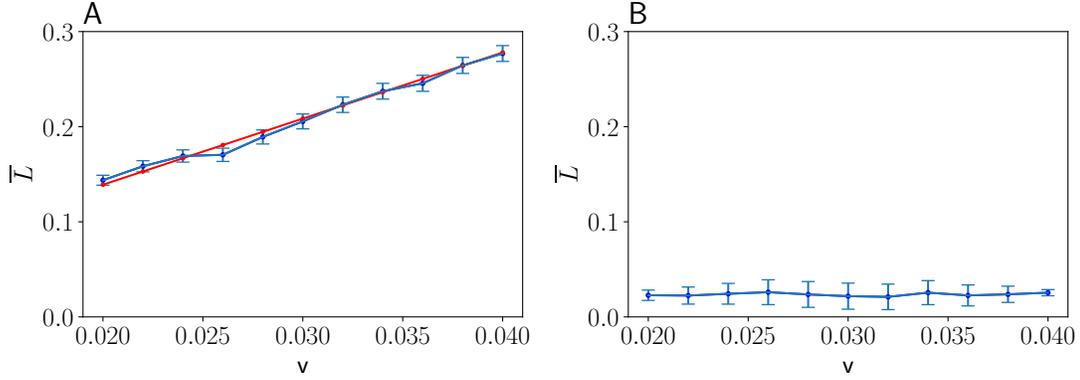


Figura 4.6: Gráficas del tamaño promedio del somita ( $\bar{L}$ ) en función de la velocidad del frente de onda ( $v$ ) para dos casos diferentes: A) considerando la difusión del activador,  $d_a = 5 \times 10^{-5}$  (la línea roja corresponde a  $\bar{L} = vT$ , con  $T$  el periodo de las oscilaciones) y B) sin considerar la difusión en el activador. En ambos casos el tamaño promedio del somita fue calculado sobre 10 simulaciones independientes.

Se verificó que en este modelo la frecuencia de las oscilaciones disminuye con el valor de  $\beta$ . Esto implica que la región anterior del MPS oscila a una frecuencia menor que la región posterior, lo cual concuerda con observaciones experimentales [40, 41]. Estos resultados se pueden ver en la figura 4.7. Este es un resultado interesante, ya que se puede obtener un perfil de frecuencias acorde a resultados experimentales por medio de un modelo muy simple, ya que la mayoría de las veces esto es algo que se asume a priori [42], dado que generalmente se requieren modelos más complejos para reproducir estos resultados [41].

Hasta el momento hemos visto que el sistema genera los patrones de forma correcta cuando las condiciones iniciales son aleatorias en el rango de  $[0, 0.1]$ . Para determinar que tan robusto es el sistema a las condiciones iniciales, se realizaron 10 simulaciones independientes para diferentes niveles de variabilidad en las condiciones iniciales. Se tomaron condiciones iniciales aleatorias de una distribución uniforme en el intervalo de  $[0, m]$ , donde  $m$  es un parámetro cuyo valor determina

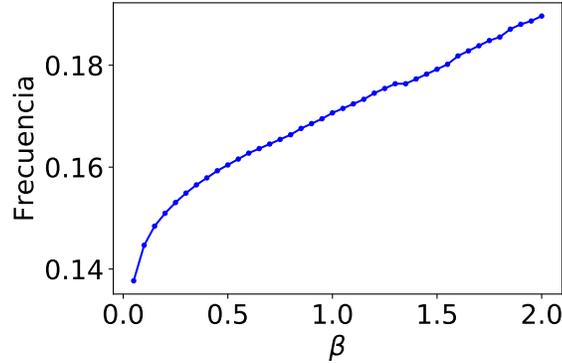


Figura 4.7: Gráfica de la frecuencia de las oscilaciones en función del parámetro  $\beta$ . Este perfil de frecuencias concuerda con observaciones experimentales en donde la región anterior (valores de  $\beta$  pequeños) oscila a una frecuencia menor.

el nivel de variabilidad. En cada simulación se calculó el coeficiente de variación para la longitud de los somitas ( $CV_L$ ) y se graficó el promedio de las 10 simulaciones para cada nivel de variabilidad. Los resultados se presentan en la figura 4.8. Ahí podemos ver que el coeficiente de variación promedio para el tamaño de los somitas es muy pequeño para todos los casos y prácticamente el mismo para todos los niveles de variabilidad, por lo tanto no depende del nivel de variabilidad de las condiciones iniciales. Esto nos confirma que el modelo híbrido es muy robusto a este tipo de variabilidad.

Como una prueba adicional a la robustez del modelo, se realizaron simulaciones en las que se agregó ruido blanco Gaussiano a ambas variables ( $a$  y  $r$ ), con esto se buscó probar la robustez del sistema a este tipo de variabilidad. Como se puede ver en la figura 4.9, estos resultados muestran que, cuando el coeficiente de variación del ruido es  $CV_{ruido} = 0.05$ , la formación de somitas procede de una manera casi normal a pesar de las fluctuaciones en los niveles de expresión genética. Por el contrario, cuando  $CV_{ruido} = 0.1$ , aunque al inicio algunos somitas logran formarse secuencialmente, posteriormente se pierde la periodicidad, así como la regularidad en el tamaño de los somitas.

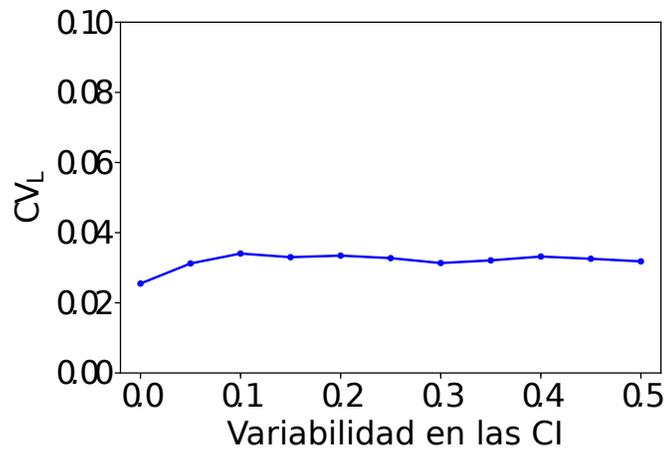


Figura 4.8: Gráficas del coeficiente de variación del tamaño de los somitas en función de la variabilidad en las condiciones iniciales (CI).

Para cuantificar la robustez del modelo a este tipo de variabilidad, se realizaron simulaciones con diferentes intensidades de ruido. Específicamente, se realizaron 10 simulaciones independientes para cada intensidad de ruido y se calculó el coeficiente de variación del tamaño de los somitas. Los resultados se muestran en la figura 4.10. En esta gráfica podemos ver que la variabilidad en el tamaño de los somitas se incrementa a medida que aumenta la intensidad del ruido añadido. Esto indica que el sistema no es tan robusto al ruido como lo es a la variabilidad en las condiciones iniciales, ya que la segmentación se lleva a cabo de manera correcta únicamente con un nivel bajo de ruido.

#### 4.1.5. Discusión

Los resultados presentados en la sección anterior muestran que el modelo híbrido sufre una bifurcación en la que un ciclo límite estable se vuelve inestable como resultado de su interacción con el frente de onda. Desde una perspectiva biológica, esta bifurcación permite explicar por que los somitas pueden formarse en ausencia de un frente de onda (característica que el modelo de reloj y frente de onda falla

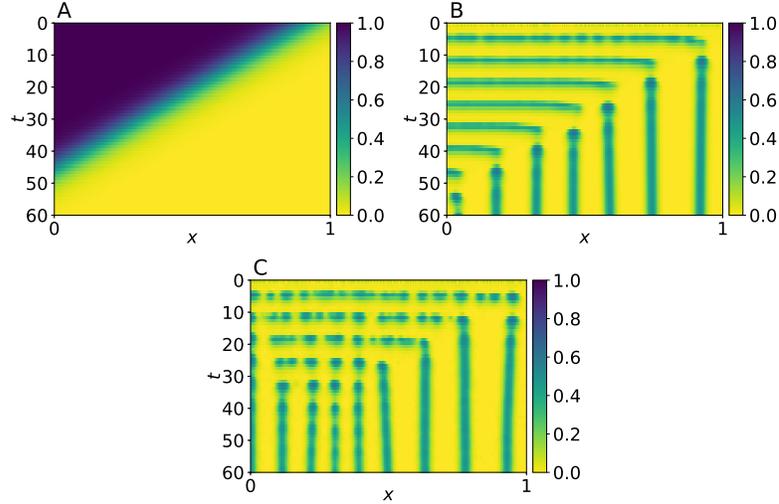


Figura 4.9: Evolución espacio-temporal de  $a$  para el sistema (4.7) con  $\beta$  como en (4.8) y condiciones de frontera como en (4.5). A) Perfil de velocidad para  $\beta$  con  $v = 0.02$ , B) patrón de formación de somitas con intensidad de ruido  $c_v = 0.05$  y C)  $c_v = 0.1$ . Las condiciones iniciales para  $a$  consisten en valores aleatorios de una distribución uniforme en el intervalo  $[0, 0.1]$ , mientras que  $r(x, 0) = 0$  para todos  $x \in [0, 1]$ . Los valores de los parámetros se establecieron como sigue:  $k_1 = 0.05$ ,  $k_2 = 0.01$ ,  $k_3 = 2$ ,  $n = 3$ ,  $d_a = 5 \times 10^{-5}$  y  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ .

en explicar). Con estos resultados se redefine la función del frente de onda durante la somitogénesis al eliminar la sensibilidad del modelo ante la variabilidad en las condiciones iniciales así como la dependencia de condiciones iniciales específicas, recordemos que estos aspectos son dos de los puntos débiles del modelo PORD original.

Sin embargo, el modelo presenta una robustez limitada ante el ruido intrínseco, elemento que está presente en todo proceso biológico. Este resultado no concuerda con la robustez que caracteriza a la somitogénesis. Ya que hay estudios en los cuales para observar anomalías durante la somitogénesis es necesario realizar per-

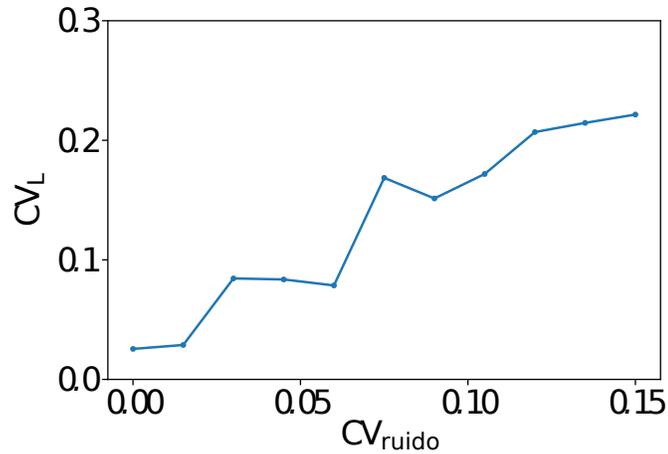


Figura 4.10: Gráfica del coeficiente de variación del tamaño de los somitas ( $CV_L$ ) en función del coeficiente de variación del ruido blanco Gaussiano añadido ( $CV_{\text{ruido}}$ )

turbaciones mayores que generalmente no se presentan en condiciones normales [43].

Hay que recordar que el modelo híbrido estudia la somitogénesis considerando aspectos a una escala del tejido, en la que la difusión tiene un gran impacto en su dinámica, pero no considera que las células del MPS interactúan de manera activa cuando están en contacto [32, 44]. Sabiendo esto, una posibilidad que queda por explorar es si estas interacciones a nivel celular tienen un efecto sobre la robustez que exhibe la somitogénesis. Un fenómeno relacionado con estas interacciones es la sincronización que logran las células del MPS. Como ya se mencionó se ha demostrado que este fenómeno está estrechamente relacionado con el desarrollo correcto de la somitogénesis [44]. Por lo tanto es posible que el mecanismo que permite la sincronización en las células del MPS pueda contribuir en la robustez que presenta la somitogénesis. Por lo tanto, enseguida se continuará con un estudio de la sincronización durante la somitogénesis con un modelo que considere las interacciones a escala celular.

## 4.2. Estudio a escala de redes de células

Las oscilaciones que se observan a nivel del MPS se originan en cada una de las células que lo componen, las cuales exhiben una gran diferencia cuando se analizan de manera individual [45]. Sin embargo, debido a que las células pueden interactuar entre ellas pueden llegar a sincronizarse y es posible observar en la escala del tejido oscilaciones uniformes.

La sincronización es un fenómeno universal que se presenta desde escalas astronómicas en el movimiento de los planetas, hasta niveles nanoscópicos en donde los átomos excitados emiten fotones que logran sincronizarse en una misma frecuencia para formar un haz de luz láser [46]. Interesantemente, este fenómeno juega un papel fundamental en muchos procesos biológicos incluyendo la somitogénesis. Se ha identificado que, independientemente de la escala y si se manifiesta en objetos inanimados o en sistemas biológicos, este fenómeno presenta propiedades comunes que determinan su comportamiento, entre las más representativas están: la cantidad de elementos que interactúan para sincronizarse, la fuerza de conexión entre estos componentes, así como la variabilidad de los componentes [46, 47].

Por lo tanto, como complemento a los resultados presentados hasta el momento en el presente trabajo, se plantea el desarrollo de un modelo para estudiar la robustez de la sincronización entre las células del MSP durante la somitogénesis en función de los factores mencionados anteriormente. Para la implementación de dicho modelo, lo primero es considerar que a nivel celular la interacción entre las células del MPS que permite su sincronización se da mediante la vía de señalización *Delta-Notch*.

Para que la esta vía de señalización se active, es necesario que las células del MPS tengan contacto físico entre ellas. La interacción mediante esta vía involucra principalmente a la red de regulación genética del reloj de segmentación como se muestra en la figura 4.11.

Este esquema corresponde a la interacción entre dos células del MSP de pez cebra cuando están en contacto. La red esta compuesta por las proteínas *Her1*, *Hes6* y *Her7*, las cuales son proteínas que estan directamente relacionadas con la segmen-

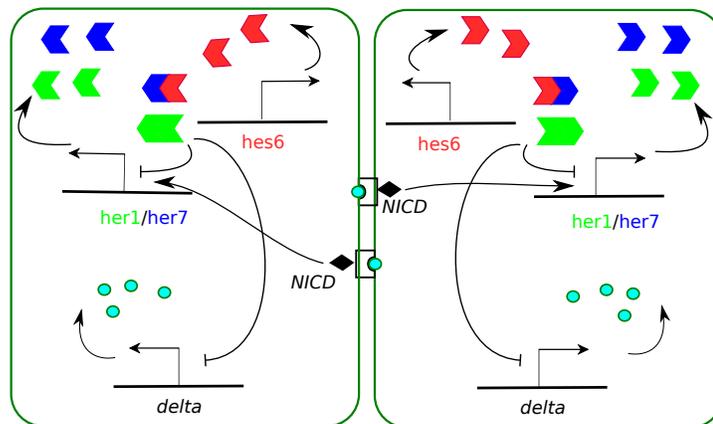


Figura 4.11: Representación esquemática de la vía de señalización *Delta-Notch* en células del MPS de pez cebra. La unión de un ligando *Delta* de una célula al receptor transmembranal *Notch* de su célula vecina provoca que se libere el dominio intracelular de *Notch* (*NICD*), el cual llega al núcleo y actúa como factor de transcripción promoviendo la activación de los genes *her1/her7*.

tación del MPS [48]. Estas proteínas forman dímeros entre ellas con cualquier combinación, pero solo los homodímeros *Her1/Her1* y los hetero-dímeros *Hes6/Her7* son los que tienen un efecto inhibitorio en la expresión de *Her1* y *Her7*, así como también en la expresión de la proteína *Delta*. La importancia de la proteína *Delta* radica en que actúa como ligando para el receptor *Notch* de células adyacentes. *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*). En general *NECD* actúa como receptor de varios ligandos, para el caso de células del MPS, se une a ligandos de la familia *Delta*. Por medio de esta proteína se activa la vía de señalización *Delta-Notch* cuando las células del MPS entran en contacto.

Esta vía de señalización funciona de la siguiente manera: una vez que el ligando *Delta* de una célula es sintetizado, viaja y se ancla a la membrana celular, de esta forma puede tener contacto físico con el receptor *Notch* (*NECD*) de una célula vecina provocando que se libere el *NICD*, el cual es capaz de llegar al núcleo celular y actuar como factor de transcripción para los genes *her1* y *her7* promoviendo su activación. De esta forma es como las células adyacentes pueden afectarse mutuamente y con esto llegan a sincronizarse. Es así que, para desarrollar un modelo matemático para analizar la sincronización se puede considerar a cada célula como un oscilador y la vía *Delta-Notch* el medio por el cual estos osciladores se acoplan para sincronizarse.

### 4.2.1. Desarrollo del modelo

Para iniciar con el desarrollo del modelo, tomaremos como punto de partida el trabajo realizado por Scroter et. al. [48]. En este, se desarrolló un modelo matemático para analizar el efecto que tiene cada proteína sobre la amplitud y frecuencia de las oscilaciones en una célula del MPS. El modelo desarrollado por Schroter et. al. [48], considera las interacciones mostradas en la figura 4.12. En esta red de interacción genética, el origen de las oscilaciones en cada célula es debido a la autorepresión de los genes *her1* y *her7*, después de que sus proteínas han formado

dímeros con *Hes6*, otro miembro de la misma familia bHLH (de sus siglas en inglés basic helix loop helix), la cual ya se ha reportado que no tiene una expresión oscilatoria [49, 50, 51, 52]. Como ya se comentó anteriormente estas tres proteínas forman dímeros de cualquier combinación, pero solo los homodímeros *Her1/Her1* y los heterodímeros de *Hes6/Her7* tienen un efecto represor en la expresión de *Her1* y *Her7*. Basándose en estas interacciones y al normalizar las variables de estado, Scroter et. al. [48] planteó el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales con retardo (DDE) para modelar el comportamiento temporal de la concentración de las proteínas *Her1*, *Hes6* y *Her7* dentro de una célula del MPS.

$$\frac{dh_1(t)}{dt} = \gamma_1 \frac{1}{1 + (h_1(t - \tau_1))^2 + h_7(t - \tau_1)h_6(t - \tau_1)} - h_1(t) - \delta(h_1(t)(2h_1(t) + h_6(t) + h_7(t))), \quad (4.9)$$

$$\frac{dh_6(t)}{dt} = \gamma_6 - h_6(t) - \delta h_6(t)(h_1(t) + 2h_6(t) + h_7(t)), \quad (4.10)$$

$$\frac{dh_7(t)}{dt} = \gamma_7 \frac{1}{1 + (h_1(t - \tau_7))^2 + h_7(t - \tau_7)h_6(t - \tau_7)} - h_7(t) - \delta(h_7(t)(h_1(t) + h_6(t) + 2h_7(t))), \quad (4.11)$$

donde,  $h_k$  ( $k = 1, 6, 7$ ) representa la concentración normalizada de cada proteína,  $\gamma_k$  denota la tasa máxima de transcripción,  $\delta$  es la tasa efectiva de degradación de cada uno de los dímeros y  $\tau_k$  corresponde al tiempo necesario desde el inicio de la transcripción hasta terminar las modificaciones postraduccionales de cada proteína.

El modelo conformado por las ecuaciones (4.9) - (4.11), representa el reloj de segmentación dentro de una sola célula. Nuestro interés está en analizar la sincronización en grupos de células del MPS, como ya se mencionó esta sincronización se da mediante la interacción entre células por medio de la vía de señalización *Delta-Notch*. Por lo tanto, es necesario modificar este modelo para considerar estas interacciones. En ese sentido, se ha reportado que los dímeros que reprimen la expresión de las proteínas *Her1* y *Her7* también reprimen la expresión de la proteína *Delta* [48, 53]. Por lo tanto, después de hacer las mismas simplificaciones

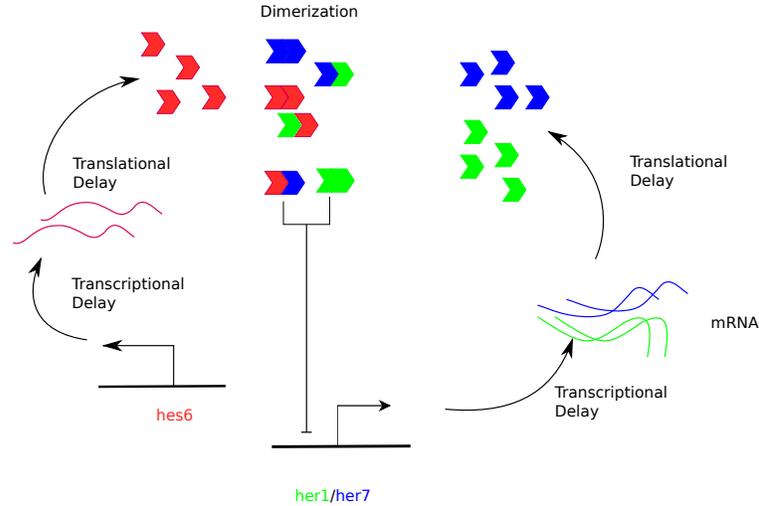


Figura 4.12: Vía de regulación del reloj de segmentación del pez cebra. Las proteínas *Her1*, *Hes6* y *Her7* se ensamblan en dímeros de cualquier combinación, pero solo los dímeros *Her1/Her1* y *Hes6/Her7* tienen un efecto inhibitorio sobre la transcripción de los genes *her1/her7*, esto después de los retardos debidos al tiempo necesario para la transcripción y traducción de las proteínas.

que Scotter et al. [48], obtenemos que la ecuación para modelar la dinámica de la proteína *Delta* es:

$$\frac{dD(t)}{dt} = \gamma_D \frac{1}{1 + (h_1(t - \tau_D))^2 + h_7(t - \tau_D)h_6(t - \tau_D)} - D(t), \quad (4.12)$$

donde  $D$  denota la concentración de la proteína *Delta*, mientras que  $\gamma_D$  y  $\tau_D$  están definidas como en las ecuaciones (4.9) - (4.11). El conjunto de ecuaciones (4.9) - (4.12) constituyen el modelo para la dinámica del reloj de segmentación del pez cebra incluyendo a la proteína *Delta* en una célula aislada del MPS. Para modelar un grupo de células que interactúan mediante la vía *Delta-Notch*, el modelo requiere

ser modificado de la siguiente manera:

$$\frac{dh_{1i}(t)}{dt} = \gamma_1 \frac{1}{1 + (h_{1i}(t - \tau_1))^2 + h_{7i}(t - \tau_1)h_{6i}(t - \tau_1))^2} \times g\left(\sum_j D_j\right) - h_{1i}(t) - \delta(h_{1i}(t)(2h_{1i}(t) + h_{6i}(t) + h_{7i}(t))), \quad (4.13)$$

$$\frac{dh_{6i}(t)}{dt} = \gamma_6 - h_{6i}(t) - \delta h_{6i}(t)(h_{1i}(t) + 2h_{6i}(t) + h_{7i}(t)), \quad (4.14)$$

$$\frac{dh_{7i}(t)}{dt} = \gamma_7 \frac{1}{1 + (h_{1i}(t - \tau_7))^2 + h_{7i}(t - \tau_7)h_{6i}(t - \tau_7))^2} \times g\left(\sum_j D_j\right) - h_{7i}(t) - \delta(h_{7i}(t)(h_{1i}(t) + h_{6i}(t) + 2h_{7i}(t))), \quad (4.15)$$

$$\frac{dD_i(t)}{dt} = \gamma_D \frac{1}{1 + (h_{1i}(t - \tau_D))^2 + h_{7i}(t - \tau_D)h_{6i}(t - \tau_D))^2} - D_i(t), \quad (4.16)$$

donde el subíndice  $i$  se refiere a la  $i$ -ésima célula en la red, mientras que la sumatoria en el argumento de la función  $g(\sum_j D_j)$  se realiza sobre las células que interactúan con la célula  $i$ , por medio de la vía *Delta-Notch*. La función  $g(\sum_j D_j)$  representa el efecto que las proteínas *Delta* de las células con las que esta en contacto tienen sobre la tasa de transcripción de la  $i$ -ésima célula. Dado que, la proteína *Delta* de las células vecinas promueven la liberación de *NICD* dentro de la  $i$ -ésima célula y estos dominios actúan como activadores de los genes *her1* y *her7*, una propuesta plausible para  $g(\sum_j D_j)$  es una función de Hill creciente [54, 55]:

$$g\left(\sum_j D_j\right) = \frac{(\sum_j D_j)^2}{k_D^2 + (\sum_j D_j)^2}, \quad (4.17)$$

donde  $k_D$  es la constante de saturación media. Con esto el sistema de ecuaciones (4.13) - (4.17) define el modelo que se usará para estudiar la sincronización en grupos de células del MPS.

Para cuantificar el nivel de sincronización entre un grupo de células del MPS, utilizaremos el parámetro de orden  $R$  definido en [56]. Este parámetro determina la distribución de fases de un grupo de osciladores y esta definido como sigue:

$$R = \frac{Var(M)}{\overline{Var(b_i)}}, \quad (4.18)$$

donde  $Var(M)$  se refiere a la varianza de la media del grupo de osciladores, mientras que  $\overline{Var(b_i)}$  es el promedio de la varianza de cada uno de los osciladores que conforman el grupo. Este parámetro toma valores entre 0 (cuando no hay sincronización) y 1 (cuando hay sincronización con todos los osciladores en fase) [57].

### 4.2.2. Estimación de los parámetros

Los valores de los parámetros que usaremos en las simulaciones fueron tomados de [48, 58]. Estos valores se presentan en la tabla 4.2, después del proceso de normalización.  $k_D$  es un parámetro de control cuyo valor es variado en secciones subsecuentes para investigar su influencia en el comportamiento del sistema.

Parameter	Value	Ref.
$\gamma_1$	10	[48]
$\gamma_6$	25	[48]
$\gamma_7$	10	[48]
$\gamma_D$	2	[58]
$\delta$	1	[48]
$\tau_1$	1.02	[48]
$\tau_7$	1	[48]
$\tau_D$	1.85	[58]

Tabla 4.2: Valores de los parámetros usados en las simulaciones para estudiar la sincronización en grupos de células del MSP.

### 4.2.3. Métodos numéricos

Para solucionar las ecuaciones del modelo, se realizó una implementación en Python utilizando la biblioteca PyDelay, la cual utiliza el método *Bockagi-Shampine* para resolver ecuaciones diferenciales con retardo.

En la tabla 4.2 se puede ver que  $\tau_7 = 1$ . Esto significa que en el modelo adimensional el tiempo está normalizado respecto al retardo asociado con el tiempo requerido para la producción de una proteína funcional que incluye los tiempos requeridos en la transcripción, el empalme, la traducción y demás modificaciones postraduccionales de la proteína *Her7*, que se ha estimado en alrededor de 18 minutos [21]. Tomando esto en consideración, todas las simulaciones fueron realizadas por un periodo de 5500 unidades de tiempo normalizadas, pero solamente las últimas 500 unidades fueron consideradas para el cálculo del parámetro de orden, de esta forma nos aseguramos que el sistema ha alcanzado un estado estacionario independientemente de las condiciones iniciales.

Para realizar las simulaciones, se utilizaron condiciones iniciales aleatorias en donde a todas las variables de cada célula en la red se les asignó un mismo valor inicial seleccionado aleatoriamente de una distribución uniforme en el intervalo  $[0, 1]$ . Es decir, todas las variables correspondientes a una célula dada tienen el mismo valor inicial, pero a cada célula se le asignaron condiciones iniciales diferentes. Con esto, nos aseguramos que todas las células de la red tengan fases iniciales distintas. Debido a lo anterior, el resultado de cada simulación puede ser diferente, por este motivo se realizaron 10 simulaciones independientes para cada caso, esto con la finalidad de poder analizar estadísticamente los resultados obtenidos. Adicionalmente para algunos de los experimentos, los parámetros también se variaron aleatoriamente.

### 4.2.4. Resultados

El planteamiento general, es estudiar el efecto del tamaño de la red, el nivel de conectividad, la fuerza de conexión y la variabilidad en los parámetros sobre la

sincronización en grupos con diferente cantidad de células del MPS. Para este fin, se configuraron los grupos de células en un tipo de red circular como la que se muestra en la figura 4.13. En esta configuración cada uno de los nodos de la red representa una célula. Además, cada nodo está conectado por aristas (que representa la interacción mutua de las células) a  $m$  nodos adelante y  $m$  nodos atrás. Por conveniencia solo se consideraron redes con un número impar de nodos, de esta manera el número máximo de niveles de conexión de una red con  $n$  nodos será siempre entero y está determinado por  $(n - 1)/2$ .

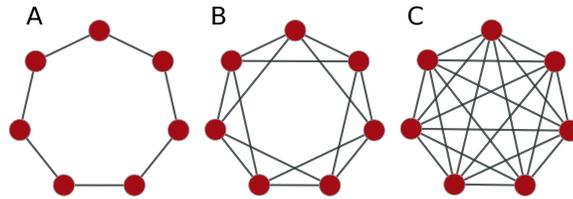


Figura 4.13: Ejemplos de diferentes niveles de conectividad para grupos de células del MPS configuradas en redes circulares. A) Las células están ordenadas en un círculo y cada una interactúa con sus primeros vecinos (nivel de conexión igual a 1). B) Las células interactúan con sus primeros y segundos vecinos (nivel de conexión igual a dos). C) Cada célula interactúa con sus primeros, segundos y terceros vecinos (nivel de conexión igual a 3).

Las redes circulares propuestas tienen características que las hacen convenientes para estudiar la sincronización en las células del MPS. Por ejemplo dado que todos los nodos son idénticos, es posible enfocarse en el efecto que la cantidad de nodos, la fuerza de interacción y la variabilidad de los parámetros de cada nodo tienen sobre la sincronización sin tener que preocuparse por otros factores como el efecto de las condiciones de frontera.

### **Efecto del tamaño de la red y los niveles de conexión sobre la sincronización**

Primero, vamos a investigar que efecto tiene el tamaño de una red de células del MPS y su nivel de conexión en la sincronización. Para esto se realizaron simulaciones para redes de diferente tamaño (11, 21 y 41 células), con los valores de los parámetros mostrados en la tabla 4.2 (en experimentos preliminares se confirmó que con estos valores las células generan oscilaciones sostenidas). Mientras que se estableció el parámetro  $k_D = 1$ , para cada simulación, las condiciones iniciales se establecieron como se describió en la sección 4.2.3.

En la figura 4.14, se presentan los resultados obtenidos de 3 simulaciones para los niveles de conectividad 1, 3 y 6 en la red de 21 células. Se puede ver que, a medida que aumenta el nivel de conectividad, comienzan a aparecer grupos de células sincronizadas, y que todas las células se sincronizan en el nivel de conectividad igual a 6. El fenómeno en el cual grupos de osciladores dentro de una red se sincronizan es conocido como sincronización en clústeres y es un campo activo de investigación [59, 60, 61, 62, 63].

Para extender y cuantificar los resultados mostrados en la figura 4.14, se consideraron todos los niveles de conectividad posibles para dicha red, se realizaron 10 simulaciones para cada configuración de la red y se calculó el promedio del parámetro de orden en función del nivel de conectividad. Lo mismo se hizo para las redes de 11 células y 41 células, con esto se buscaba analizar la influencia del tamaño de la red y el nivel de conectividad en la sincronización. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 4.15. Ahí podemos ver que a medida que aumenta el nivel de conexión se facilita la sincronización de las células.

Es interesante notar que este comportamiento no depende del tamaño de la red, ya que la sincronización de todas las células siempre se logra cuando el nivel de conectividad es igual o mayor que 6. Es decir, cuando cada célula de la red interactúa con al menos 12 de sus vecinos más cercanos (6 antes y 6 después a lo largo de la red circular). Esto también sugiere que existe un tamaño mínimo de red que permite la sincronización de todas las células, que para el conjunto de parámetros

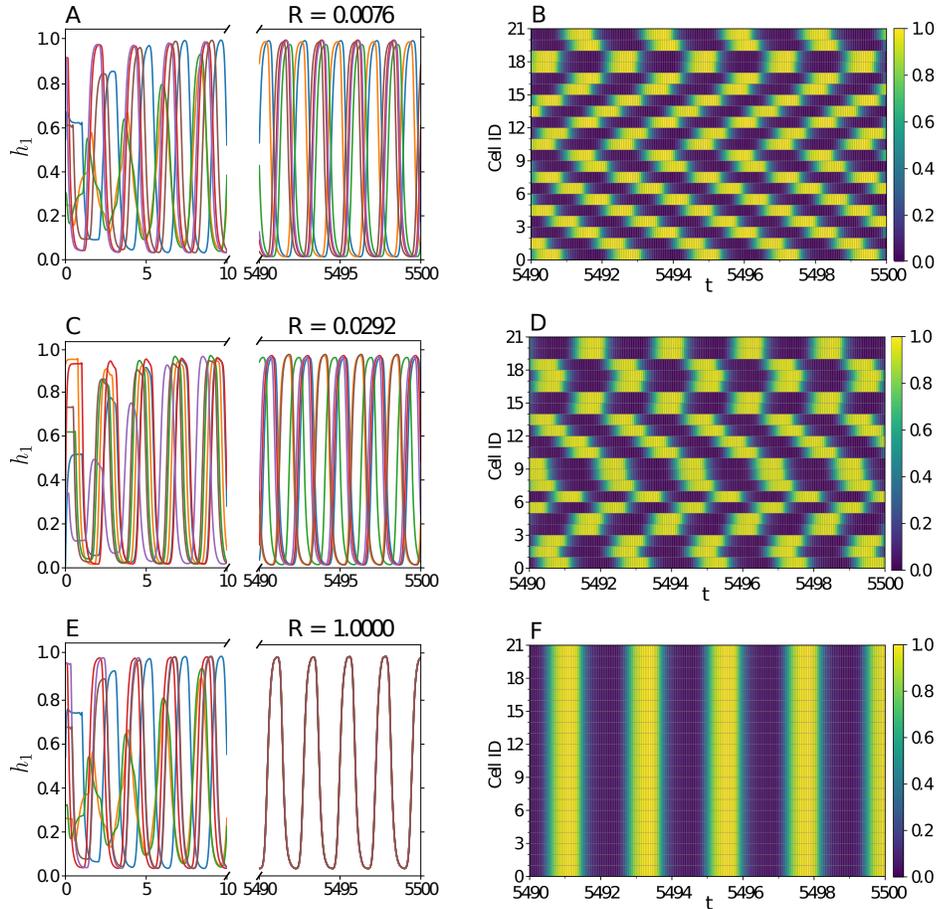


Figura 4.14: Resultados de simulaciones con la red de 21 células y niveles de conectividad iguales a 1 (paneles A y B), 3 (paneles C y D) y 6 (paneles E y F). En las gráficas de la primera columna se muestra la evolución temporal de la proteína  $Her_1$  para un grupo de células de la red (IDs: 1, 5, 9, 13, 17 y 21), al inicio de la simulación, y una vez que se ha alcanzado un comportamiento estacionario. En general, el comportamiento estacionario se alcanza aproximadamente a las 1,000 unidades de tiempo, sin embargo, las simulaciones se prolongaron hasta 5,500 unidades de tiempo para asegurar haber llegado a dicho estado estacionario. También se muestra el valor del parámetro de orden ( $R$ ) cuando se ha alcanzado el comportamiento estacionario. Las figuras en la columna de la derecha ilustran (por medio de mapas de calor) el correspondiente comportamiento estacionario de las 21 células de la red para el periodo de tiempo de la columna izquierda donde se ha alcanzado el comportamiento estacionario.

usados en estas simulaciones, la red debe estar compuesta de al menos 13 células para lograr la sincronización.

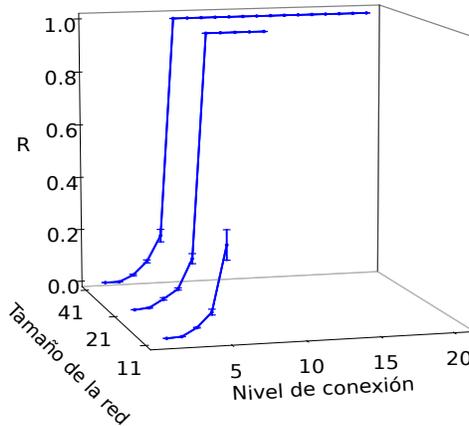


Figura 4.15: Gráficas del valor promedio del parámetro de orden ( $R$ ) en función del nivel de conexión para las 3 redes de células. Las barras de error indican el error estándar. Se consideraron todos los niveles de conectividad posibles para cada red. El máximo nivel de conectividad para una red de tamaño  $2n + 1$  es  $n$ , el cual corresponde a una red conectada completamente. En ese sentido, los niveles de conectividad máximos son: 5, para la red de tamaño 11; 10, para la red de tamaño 21; 20, para la red de tamaño 41.

Los resultados mostrados en la figura 4.15 corresponden a una conectividad simétrica como se describe en la figura 4.13. Para verificar si esta simetría tiene algún efecto en la sincronización, se realizaron simulaciones variando aleatoriamente las células con las que determinada célula interactúa. Los resultados se muestran en la figura 4.16.

Como se puede ver, los resultados muestran la misma tendencia hacia la sincronización, coincidiendo en que un nivel de conexión igual o mayor a 6 es necesario para alcanzar la sincronización, sin importar la simetría de la red.



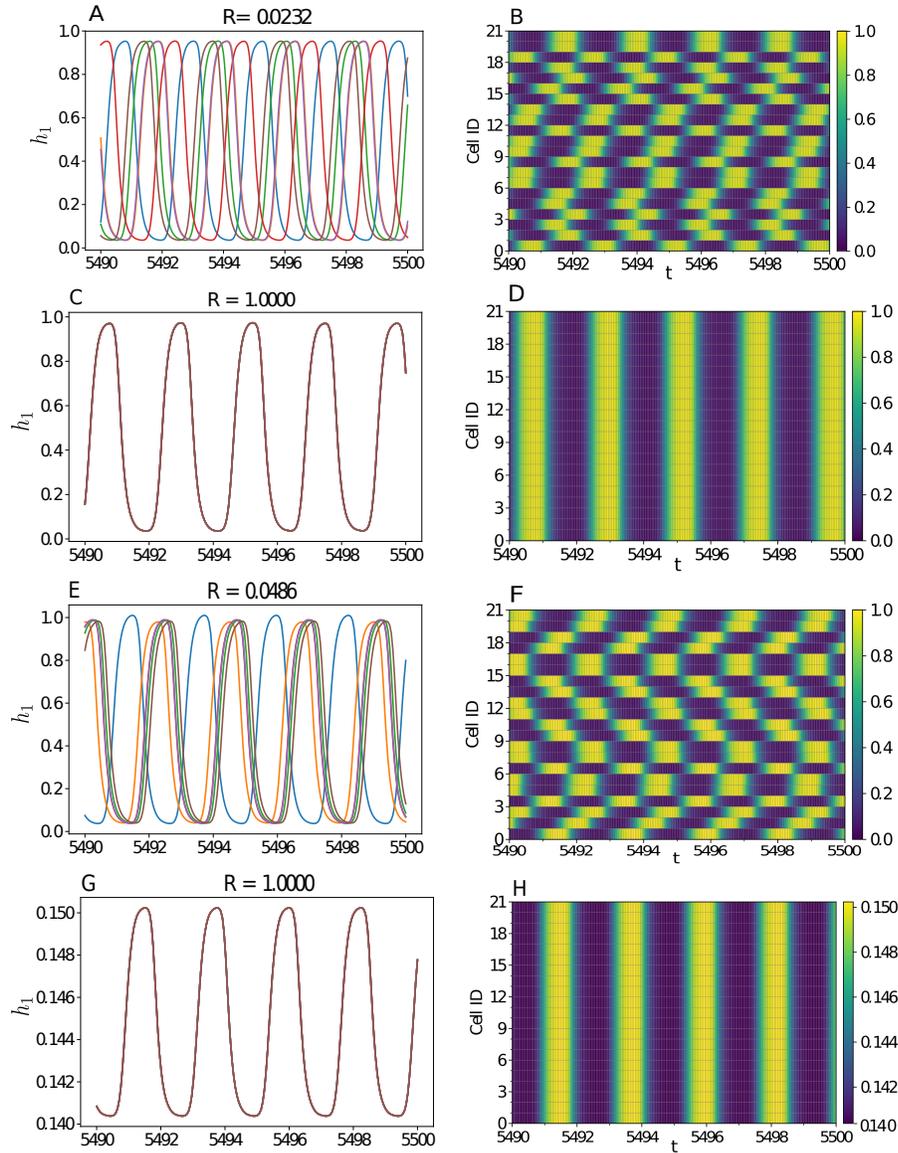


Figura 4.17: Comportamientos observados en la red de 21 células, con nivel de conectividad igual a 2, con diferentes fuerzas de conexión. En las gráficas de la primera columna se muestra la evolución temporal del nivel de la proteína  $Her_1$  para un grupo de células (ID: 1, 5, 9, 13, 17 y 21), una vez que se ha alcanzado un comportamiento estacionario. También se muestra el valor correspondiente del parámetro de orden ( $R$ ) en la parte superior. Las figuras en la columna de la derecha muestran (mediante mapas de calor) el comportamiento estacionario de las 21 células en la red. El valor del parámetro  $k_D$  es diferente para cada gráfica:  $k_D = 0$  para los paneles A y B,  $k_D = 0.16$  para los paneles C y D,  $k_D = 0.64$  para los paneles D y F, y  $k_D = 10.24$  para los paneles G y H. Note la diferencia de escala en los gráficos G y H, en comparación con los demás paneles.

### Efecto de la fuerza de conexión en la sincronización

El siguiente paso será estudiar cómo la fuerza de conexión afecta la sincronización. En el modelo las interacciones entre células están representadas por la función  $g(D)$ , la cual representa el efecto sobre el nivel de expresión de los genes involucrados en el reloj de segmentación debido a la activación de la vía *Delta-Notch*, cuando entran en contacto un grupo de células. Se puede ver en la definición de  $g(D)$  (ecuación 4.17) que valores pequeños de  $k_D$  significa que se requieren niveles menores de la proteína *Delta* para activar los genes del reloj de segmentación. Con esto se deduce que la fuerza de conexión es una función decreciente de  $k_D$ . Para analizar como la fuerza de conexión entre células afecta la sincronización, se realizaron simulaciones para la red de 21 células variando el valor del parámetro  $k_D$  en un rango de  $[0, 164]$ . Con este rango de valores es posible observar la variedad de comportamientos que se ilustran en la figura 4.17. En esta figura se puede ver que las células no se sincronizan cuando el valor de  $k_D$  es cero o está muy cerca de cero (tomar  $k_D = 0$  es equivalente a asumir que todas las células de la red son independientes ya que  $g(D) = 1$  con este valor de  $k_D$ ). Pero a medida que aumenta el valor de  $k_D$ , grupos de células sincronizadas comienzan a aparecer y aumentan de tamaño hasta que, finalmente, todas las células se sincronizan (figura 4.18). La sincronización completa se mantiene para un rango de valores de  $k_D$  pero, cuando el valor de  $k_D$  es suficientemente grande, la interacción entre células se debilita y las células de la red empiezan a oscilar con diferentes fases. Si el valor de  $k_D$  se incrementa aun más, se inicia un régimen en el que todas las células oscilan en sincronía pero con una amplitud muy reducida.

Para esta red se realizaron simulaciones adicionales tomando más valores de  $k_D$ . Específicamente, se realizaron 10 simulaciones para cada valor de  $k_D$  y se calculó el promedio de parámetro de orden correspondiente. En la figura 4.18 se puede ver la dependencia del parámetro de orden  $R$  en función del parámetro  $k_D$ . Esta figura muestra de una forma más detallada los rangos de valores para  $k_D$  en los que se observan los diferentes comportamientos ilustrados en la figura 4.17.

Aunque los resultados de las figuras 4.17 y 4.18 corresponden a una red en específico,

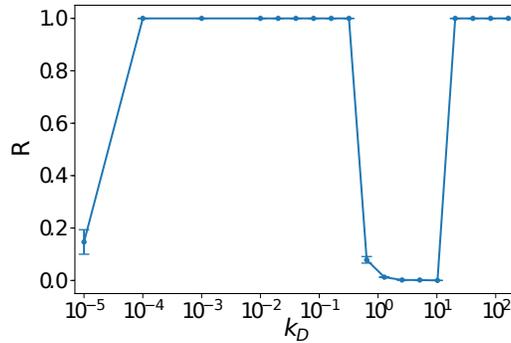


Figura 4.18: Gráfica del promedio del parámetro de orden  $R$  en función del parámetro  $k_D$  para la red de 21 células y nivel de conectividad igual a 2 (las barra de error denotan el error estándar).

se obtiene el mismo comportamiento para diferentes tamaños de red y diferentes niveles de conexión. Esta generalidad, se observó al investigar el comportamiento de la sincronización en las 3 diferentes redes con todos los niveles de conectividad posibles. Los resultados se muestran a manera de resumen en la figura 4.19. En esta figura se pueden observar comportamientos similares, independientemente del tamaño de la red y el nivel de conectividad. Para que las gráficas sean más claras, no se muestran los intervalos donde  $R$  alcanza valores cercanos a 1 cuando  $k_D$  toma valores altos, pero este comportamiento se observa en todos los casos. Interesantemente, podemos ver que la sincronización se logra con valores de  $k_D$  más elevados a medida que aumenta el nivel de conectividad. Esto indica que, aumentar el número de conexiones por célula compensa la reducción de la fuerza de conexión. En otras palabras, es necesario que más células interactúen para mantener un nivel de expresión dado de la proteína *Delta* cuando se aumenta el valor de  $k_D$ .

Además, resulta interesante que en estos resultados se presente un régimen de sincronización con baja amplitud para valores altos de  $k_D$ . Este fenómeno denominado en inglés “oscillation death” [64], normalmente se presenta cuando un grupo de osciladores tiene un acoplamiento fuerte, pero en este caso se presenta cuando

el acoplamiento es débil, esto se debe probablemente, a que en nuestro modelo hay retardos involucrados.

Para integrar los resultados de la figura 4.19, se elaboró el diagrama de fases que se muestra en la figura 4.20, donde se puede ver cómo la sincronización depende del parámetro  $k_D$  y del nivel de conectividad. Este diagrama corresponde a la red de 21 células, pero se obtienen resultados cualitativamente similares para las redes de los diferentes tamaños. Este diagrama es el resultado de analizar el valor del parámetro de orden  $R$  y la amplitud de las oscilaciones al variar  $k_D$  en el rango  $[0, 164]$  para cada nivel de conectividad. En el diagrama se pueden apreciar de manera clara los diferentes cambios en el comportamiento de la sincronización mostrados en la figura 4.18.

También se exploró como los resultados presentados en la figura 4.19 dependen de los demás parámetros. Se encontró que estos no tienen un efecto significativo en la sincronización a excepción del parámetro  $\gamma_D$ , que representa la tasa de expresión máxima de la proteína *Delta*. Por este motivo se realizaron simulaciones variando también este parámetro, los resultados se presentan en la figura 4.21.

En estos resultados se puede ver que, si bien, el incrementar el valor del parámetro  $\gamma_D$  favorece la sincronización, se da un mayor efecto cuando se incrementa el nivel de conexión. Esto nos indica que el parámetro que más influye en la sincronización es  $k_D$ , el parámetro relacionado con la fuerza de conexión.

### **Robustez de la sincronización ante la variabilidad de parámetros en las células del MPS.**

Otro de los factores que determinan el comportamiento de la sincronización es el grado de diferencia que tienen los elementos que interactúan. En ese sentido, una manera de representar esas diferencias en el nuestro modelo es considerar valores diferentes para los parámetros de cada célula en la red. Para estudiar como las diferencias entre células del MPS afecta la sincronización, se realizaron simulaciones en las que todos los parámetros de las ecuaciones para cada célula en la red se variaron de acuerdo a una distribución normal con media igual al valor base co-

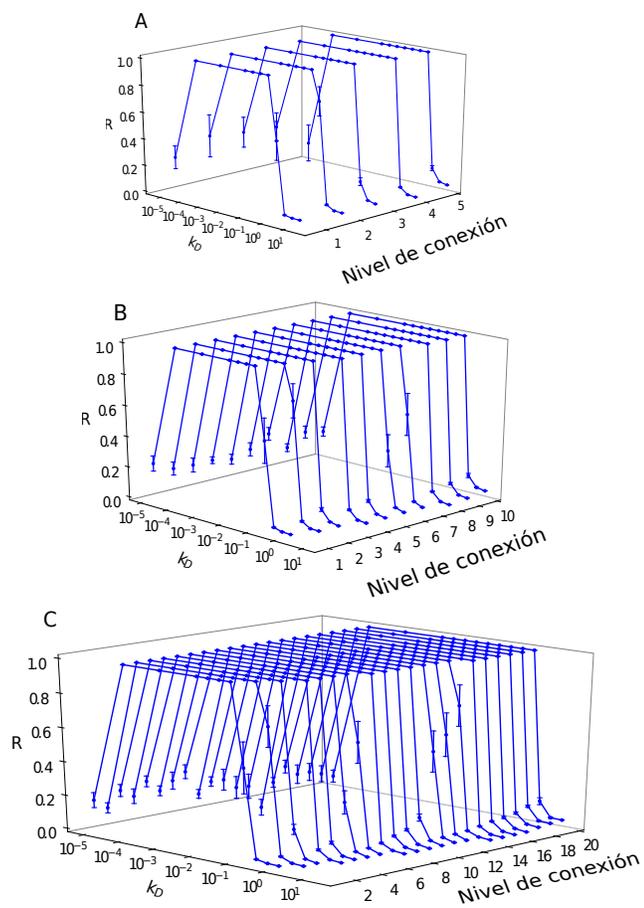


Figura 4.19: Gráficas del valor promedio del parámetro de orden  $R$ , en función del parámetro  $k_D$  y el nivel de conexión para los tres tamaños de red, A) red de 11 células, B) red de 21 células y C) red de 41 células. Las barras de error denotan el error estándar

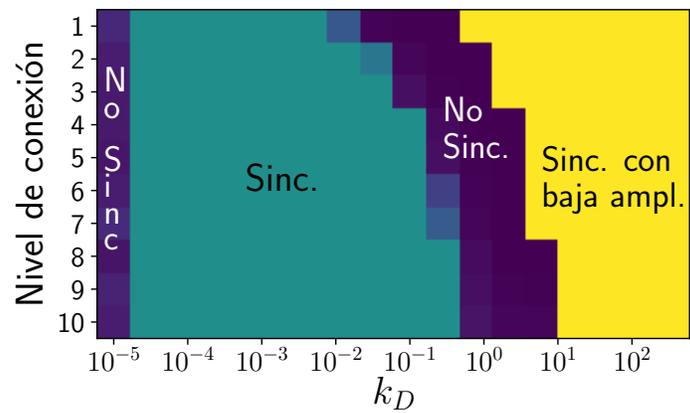


Figura 4.20: Diagrama de fases que ilustra los diferentes comportamientos de la sincronización en la red de 21 células en función del parámetro  $k_D$  y el nivel de conectividad. Las 4 secciones del diagrama corresponden a los comportamientos ilustrados en la figura 4.17. Las secciones con colores intermedios entre las regiones Sinc y No Sinc representan combinaciones de valores  $k_D$  y niveles de conexión en los que se forman grupos de células sincronizadas.

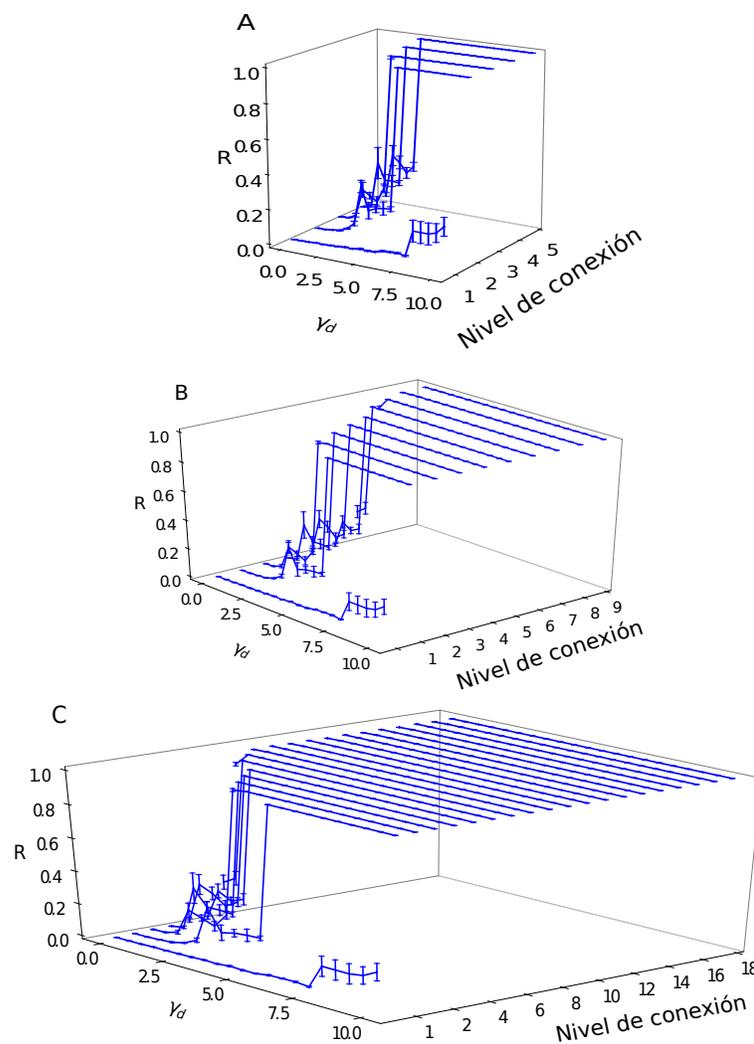


Figura 4.21: Gráficas del valor promedio del parámetro de orden  $R$  con sus correspondientes barras de error estándar en función del parámetro  $\gamma_D$ , para los 3 diferentes tamaños de red estudiados, A) red de 11 células, B) red de 21 células y C) red de 41 células.

rrespondiente reportado en la tabla 4.2, y con una desviación estándar en el rango

de 5 % a 25 % de este valor base. Dado que el valor más grande para la desviación estandar es 0.25 veces el valor base para cada parámetro, la probabilidad de que se obtenga un valor negativo es baja, sin embargo, para evitar esta posibilidad, se agregó una instrucción en el algoritmo que soluciona el sistema de ecuaciones de manera que cuando se obtenga un valor negativo este sea establecido a cero.

En la figura 4.22 se muestra el comportamiento estacionario de una simulación individual para la red de 21 células, con un nivel de conexión igual a 4 y diferentes niveles de variabilidad. Es interesante ver que para este caso particular, altos niveles de variabilidad inducen la aparición de grupos sincronizados y en un caso (paneles E y F) se alcanza prácticamente la sincronización total.

Para tener una perspectiva general del comportamiento de la sincronización, se realizaron las simulaciones para los 3 grupos de células con todos los niveles de conexión posibles para los diferentes niveles de variabilidad. Para estos resultados se realizaron 10 simulaciones independientes para cada red y se calculó el promedio del parámetro de orden  $R$  y su error estándar. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.23.

Se puede observar que sin importar el tamaño de la red, la variabilidad en los parámetros tiene un efecto positivo en la sincronización para los niveles de conexión menores a 6, ya que el valor del parámetro de orden  $R$  se incrementa en estos niveles. Este resultado es importante, ya que en la realidad biológica las células del MPS tiene contacto físico con una cantidad limitada de células, que interesantemente se ha determinado de forma experimental que cada célula del MPS interactúa físicamente con aproximadamente 10 células [49], lo cual, de acuerdo a este resultado sería un factor que facilita su sincronización.

Para ilustrar esta observación, en la figura 4.24 se muestran las gráficas del parámetro de orden  $R$  en función de los niveles de variabilidad en los parámetros para las 3 redes y un nivel de conectividad igual a 4. En esta figura se puede apreciar que en la mayoría de los casos se obtiene un valor del parámetro de orden mayor cuando esta presente la variabilidad. Por el contrario, la variabilidad en los parámetros tiene un efecto negativo para niveles de conectividad mayores a 6, ya que el valor

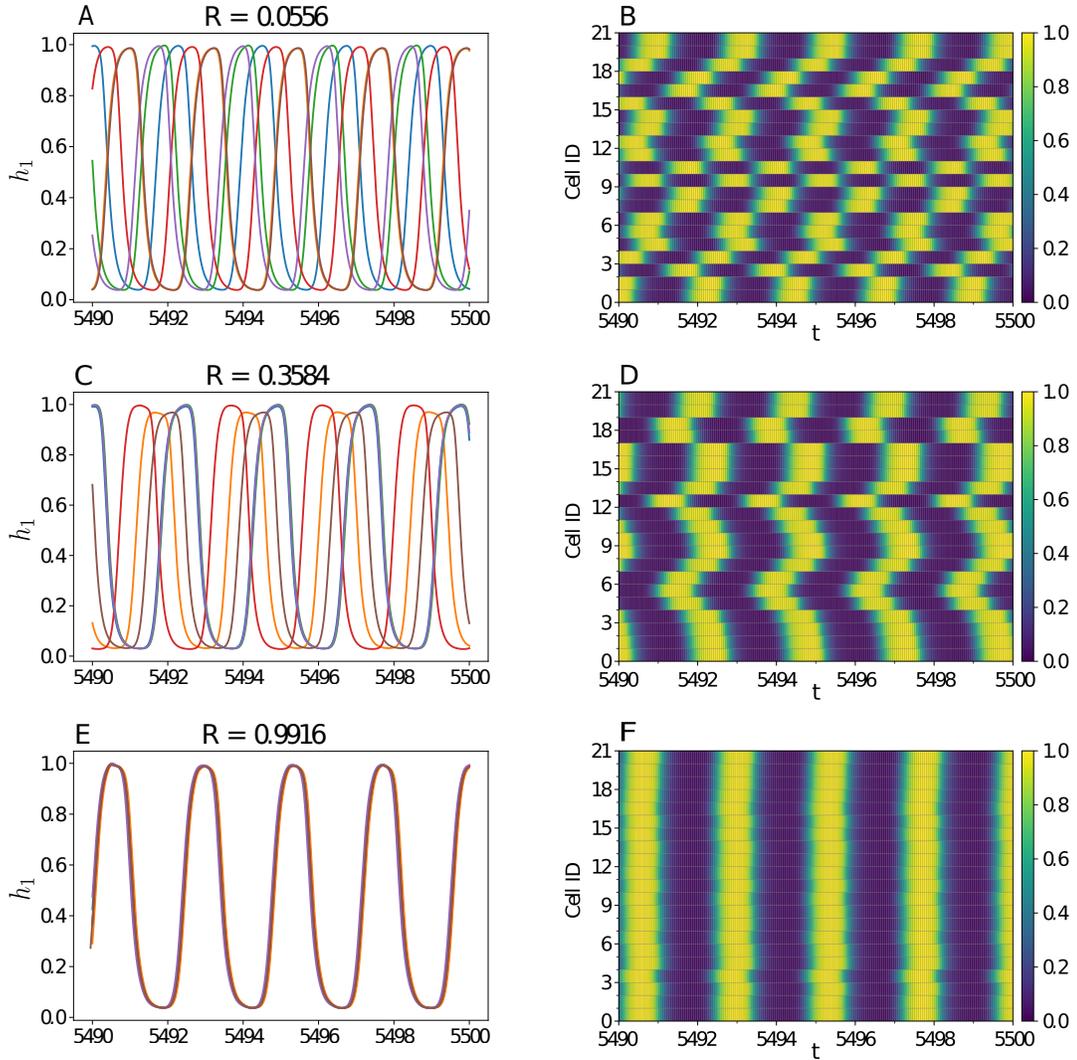


Figura 4.22: Comportamiento estacionario en la red de 21 células con un nivel de conectividad igual a 4 y varios niveles de variabilidad. En las figuras de la primera columna se muestra la evolución temporal de los niveles de la proteína  $Her_1$  para una selección de células en la red (IDs: 1, 5, 9, 13, 17 y 21), una vez que el estado estacionario se ha alcanzado. Se muestra también el valor correspondiente del parámetro de orden  $R$ . Las figuras de la columna de la derecha muestran por medio de mapas de calor, el comportamiento estacionario de las 21 células de la red. El nivel de variabilidad es de 0 % para los paneles A y B, 10 % para paneles C y D y 25 % para paneles E y F.

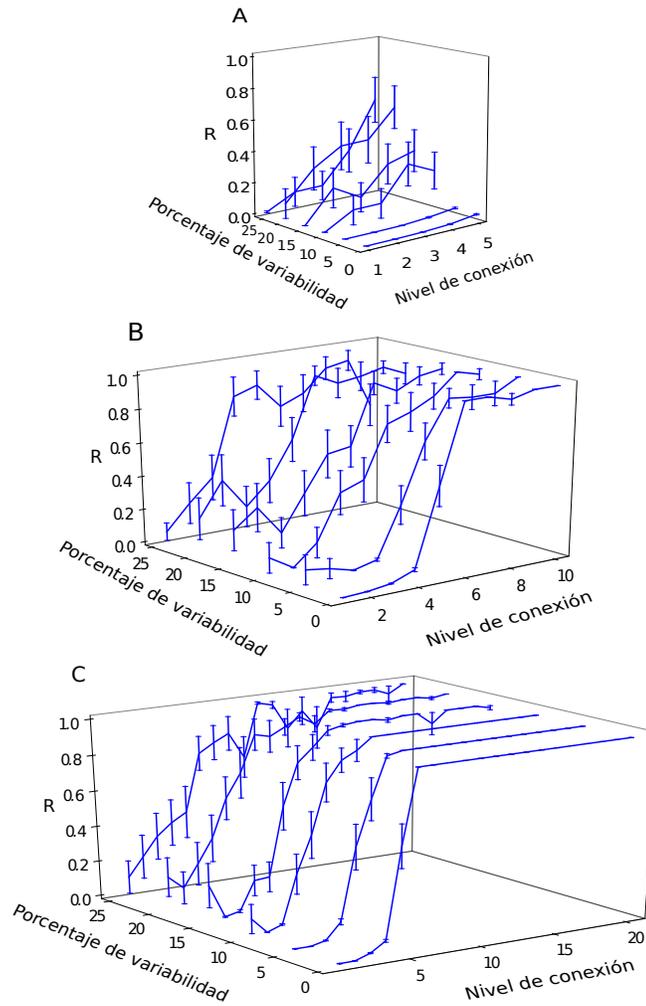


Figura 4.23: Gráficas del promedio del parámetro de orden  $R$  con sus correspondientes barras de error estándar en función del nivel de conectividad para diferentes niveles de variabilidad en los parámetros. Los resultados en cada panel corresponden a las 3 redes estudiadas A) red de 11 células, B) red de 21 células, y C) red de 41 células.

de  $R$  disminuye ligeramente para los niveles mayores a 6.

También se puede apreciar que el efecto de la variabilidad es atenuado conforme el tamaño de la red se incrementa. Este resultado sugiere que, mientras mas grande sea la red, los efectos de la variabilidad entre las células del MPS se ven disminuidos. Este resultado es relevante, ya que es posible observar una disminución de los efectos de la variabilidad al considerar un grupo de solo 41 células, si extendemos estos resultados y consideramos que el MPS esta compuesto por miles de células es de esperarse que los efectos de esta variabilidad se vean muy disminuidos.

#### 4.2.5. Discusión

Al analizar los resultados mostrados anteriormente es posible hacer algunas observaciones interesantes.

Al determinar que existe un nivel de conexión mínima para que se logre la sincronización, esto implica que debe existir una cantidad mínima de células que interactúen para que se pueda lograr la sincronización. Además, es interesante el resultado que muestra que la desaparición de las oscilaciones tenga lugar en el régimen de acoplamiento débil cuando se ha reportado que generalmente este fenómeno se da cuando la fuerza de conexión es fuerte [64]. Otro resultado importante se da al observar que la variabilidad pueda tener un efecto benéfico en la sincronización lo cual tiene implicaciones biológicas interesantes ya que la variabilidad es una propiedad inherente en todo sistema biológico. Además, este fenómeno ya se ha observado en otros procesos biológicos [65, 66]

Pero el resultado mas sobresaliente es que los efectos de la variabilidad disminuyen al aumentar el tamaño de la red, lo cual implica que si consideramos la gran cantidad de células que componen al MPS nos indica que las interacciones a nivel celular en una red muy grande eliminaria los efectos negativos de la variabilidad.

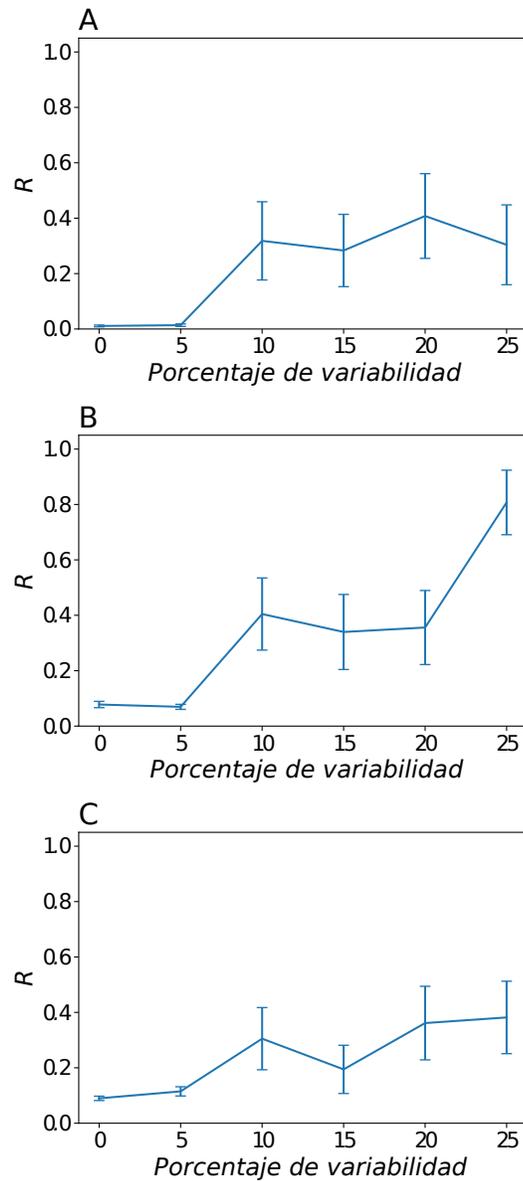


Figura 4.24: Gráficas del valor del parámetro de orden  $R$  para los diferentes niveles de variabilidad en las redes de: A) 11 células, B) 21 células y C) 41 células. Note como en el panel B) para el 25% de variabilidad se llega a un nivel alto de sincronización

# Capítulo 5

## Conclusiones

La mayoría de los modelos que se han desarrollado para explicar la somitogénesis normalmente se enfocan en dar una explicación desde una perspectiva específica, este enfoque está justificado dada la complejidad de este proceso, sin embargo, ha sido escasa la conexión que se ha podido hacer al intentar relacionar los resultados obtenidos en cada escala.

En la presente tesis se realizó un estudio mediante modelos matemáticos para estudiar aspectos clave que caracterizan a la somitogénesis. Para este fin se estudió la somitogénesis con dos modelos a diferente escala (uno a escala del tejido y otro a escala de decenas de células). Al analizar los resultados del modelo a escala del tejido se encontró que al acoplar un modelo de reacción-difusión con el mecanismo de frente de onda (modelo híbrido), es posible explicar aspectos que el modelo PORD original no puede. Esta explicación se basa en el efecto en la estabilidad que el parámetro relacionado con el frente de onda tiene en el modelo. Esto da como resultado que mediante este parámetro sea posible controlar donde se origina espacialmente un patrón diferenciado de expresión genética. Sin embargo el efecto en la estabilidad que tiene este parámetro no es suficiente para explicar la gran robustez que presenta la somitogénesis. Sin embargo, el resultado obtenido con el modelo a escala celular cuando se probó con la variabilidad en los parámetros

mostró que al aumentar el tamaño de la red los efectos de la variabilidad se ven disminuidos, lo que indica que si se implementa un modelo que considere la gran cantidad de células que conforman el MPS los efectos de la variabilidad se verían minimizados, esto indica que las interacciones a nivel celular tienen un impacto en la robustez a nivel del tejido.

Esto confirma la hipótesis planteada, con lo que se puede concluir que: las interacciones multiescala están involucradas en la robustez de la coordinación espacio-temporal de la somitogénesis.

# Capítulo 6

## Perspectivas

La periodicidad temporal de la somitogénesis es establecida por el mecanismo de interacción genética conocido como reloj de segmentación. Aunque el planteamiento más aceptado para el origen de las oscilaciones es el retardo en la autorepresión de genes principalmente pertenecientes a las vías de señalización *Wnt*, *FGF* y *Notch*, esta no es la única posibilidad que se puede considerar para explicar este comportamiento, ya que es posible que estas oscilaciones sean el resultado de las diferentes interacciones entre esta gran cantidad de genes. Debido a esto, no se ha llegado a definir si existe un oscilador maestro o si las oscilaciones son un fenómeno emergente debido a estas diferentes interacciones.

Por este motivo, la propuesta presentada para el desarrollo del modelo PORD al plantear una red de interacciones activador-represor hipotética que sea capaz de generar oscilaciones y con esto capturar de manera simplificada este comportamiento es valiosa. Además, al plantear una reacción que genere oscilaciones sin la inclusión de los retardos permite que, mediante el análisis de estabilidad se pueda determinar de manera más directa el efecto de la difusión en su dinámica, ya que los retardos cambian de manera significativa el comportamiento de los modelos de reacción-difusión [67]. Aunque los mecanismos planteados para la generación de oscilaciones en cada modelo son diferentes, es posible encontrar a ambos dentro de

la arquitectura comprendida en las vías *Wnt*, *FGF* y *Notch* [8, 21], por esta razón nos planteamos como perspectiva definir un modelo de reacción-difusión que considere de manera general estas vías y sus interacciones para determinar si es posible extender los resultados obtenidos en este trabajo a un modelo donde explícitamente se considere las vías *Wnt*, *FGF* y *Notch*. Con esto, se podría avanzar hacia la posible identificación de los componentes que plantea de manera hipotética el modelo PORD.

# Apéndice A

## Análisis de estabilidad espacial

El modelo de reacción-difusión propuesto por las ecuaciones 4.4, captura el efecto del frente de onda por medio del parámetro  $\beta$ , adicionalmente, también considera que la proteína del gen activador puede difundir. A continuación se realizará un análisis de estabilidad para estudiar el efecto que estos dos parámetros tienen en la estabilidad del sistema y así determinar si este afecto les permite controlar la aparición de los patrones que representan la formación de los somitas. El modelo correspondiente a las ecuaciones (4.4) puede ser representado en forma general como:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = f(a, r) + d_a \nabla^2 a \quad (6.1a)$$

$$\frac{\partial r}{\partial t} = g(a, r) + d_r \nabla^2 r, \quad (6.1b)$$

donde los términos de reacción  $f(a, r)$  y  $g(a, r)$  están definidos de la siguiente manera:

$$f(a, r) = \frac{\beta + (a/k_1)^n}{1 + (a/k_1)^n + (r/k_2)^n} - a, \quad (6.1c)$$

$$g(a, r) = \frac{(a/k_3)^{n_3}}{1 + (a/k_3)^{n_3}} - r. \quad (6.1d)$$

Primeramente, se debe considerar que las soluciones biológicamente relevantes corresponden a las raíces positivas del sistema 6.1. Si definimos  $w = (a, r)^T$ , tenemos que el sistema 6.1 puede representarse con notación vectorial como:  $w_t = F(w) + D\nabla^2 w$ , donde  $F(w) = (f(a, r), g(a, r))^T$  y  $D = \text{diag}(d_a, d_r)$ . Haciendo esto, para una solución de  $F(w) = 0$  dada por  $w^* = (a^*, r^*) > 0$  el sistema 6.1 tiene una solución local de la forma:

$$w(x, t) = \sum_{m=0}^{\infty} \gamma_m e^{-\lambda(\kappa^2)t} w_m(x), \quad (6.2)$$

donde  $w_m(x)$  satisface la ecuación de Helmholtz  $\nabla^2 w_m + \kappa^2 w_m = 0$ , con  $\kappa$  representando el modo de onda. Los coeficientes  $\gamma_m$  están determinados por la expansión en serie de Fourier de las condiciones iniciales y  $\lambda$  es el valor propio de la evolución temporal. Estos tres parámetros determinan la solución de (6.2), y además son intrínsecos a la geometría y condiciones de frontera del sistema. Más aún, también dependen del número de onda  $m \in \mathbb{N}$  [34]. Para iniciar con el análisis primero se obtendrá la relación de dispersión, que brinda una perspectiva de las características de la solución linealizada en función de sus parámetros. Para esto, se inicia con linealizar el sistema (6.1) en el punto de equilibrio  $w^*$ , que en notación vectorial tiene la forma

$$w_t = Jw + D\nabla^2 w, \quad (6.3)$$

donde  $J$  es la matriz Jacobiana evaluada en  $w^*$ . Dado que, nuestro interés está en analizar la dinámica en una dimensión espacial, tenemos que  $w_m(x) = \cos(\kappa x)$ , donde  $\kappa = m\pi/L$  satisface la ecuación de Helmholtz para condiciones de frontera de Neumann definidas en (4.5). Así, la ecuación (6.2) satisface a (6.3), cuando la relación de dispersión  $\lambda = \lambda(\kappa)$  está dada por

$$|J - D\kappa^2 - \lambda I| = 0, \quad I \in \mathbb{R}^{2 \times 2}, \quad (6.4)$$

esto se puede confirmar al sustituir (6.2) en (6.3). Como resultado, tenemos una ecuación que relaciona la tasa de crecimiento temporal y el modo de onda espacial  $\kappa$ . Al desarrollar (6.4) se llega a

$$\lambda^2 + b(\kappa^2)\lambda + c(\kappa^2) = 0, \quad (6.5a)$$

donde

$$b(\kappa^2) = (d_a + d_r)\kappa^2 - (f_a + g_r), \quad (6.5b)$$

$$c(\kappa^2) = d_a d_r \kappa^4 - (d_r f_a + d_a g_r)\kappa^2 + (f_a g_r - f_r g_a). \quad (6.5c)$$

Se busca analizar la estabilidad lineal del punto de equilibrio  $w^*$ , en función de los parámetros  $\beta$  y  $d_a$ , y determinar si presenta una inestabilidad de Turing la cual está dada por las siguientes condiciones [34]:

$$f_a + g_r < 0, \quad f_a g_r - f_r g_a > 0, \quad (6.6a)$$

$$d_r f_a + d_a g_r > 0, \quad d_r f_a + d_a g_r > 2\sqrt{d_a d_r (f_a g_r - f_r g_a)}. \quad (6.6b)$$

Estas condiciones definen los valores de los parámetros que dan lugar a un estado espacialmente no homogéneo del estado estacionario. En nuestro caso se busca analizar un mecanismo que desencadena oscilaciones en la red genética que posteriormente termina dando lugar a un patrón estacionario. Dicho proceso esta dinámicamente determinado por una Bifurcación de Turing-Hopf. [68, 69]. De acuerdo a las ecuaciones (6.5), esta bifurcación se presenta cuando se obtienen números imaginarios puros para los valores propios  $\lambda$  al variar  $d_a$  o  $\beta$ . Al hacer esto, se deben de cumplir dos condiciones: (1) que  $f_a + g_r = 0$  en el punto de una Bifurcación Turing-Hopf, y (2) que  $d\lambda(\kappa^2; p^*)/dp \neq 0$ , también conocida como condición de transversalidad, donde  $p^* = d_a^*$  o  $p^* = \beta^*$  representa el valor del parámetro correspondiente en la Bifurcación de Turing-Hopf. Entonces, para obtener los valores de los parámetros donde ocurre una Bifurcación de Turing, una Bifurcación

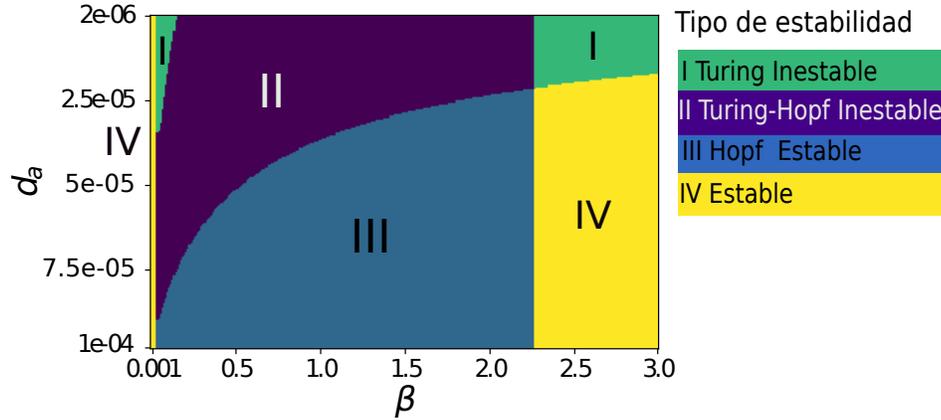


Figura 6.1: Estabilidad para los parámetros  $d_a$  y  $\beta$ . La región para cada patrón esta representada de acuerdo a la tabla de colores en el lado derecho. Los valores para los demás parámetros son  $d_r = 2.5 \times 10^{-3}$ ,  $k_1 = 5 \times 10^{-2}$ ,  $k_2 = 10^{-2}$ ,  $k_3 = 2.0$ ,  $n = 3.0$ .

de Hopf o una Bifurcación de Turing-Hopf en el sistema (6.1), se resuelve (6.5) para  $\lambda(\kappa^2)$ .

En la figura 6.1, se muestra el espacio de parámetros donde se presentan 4 diferentes tipos de estabilidad en función de los parámetros  $\beta$  y  $d_a$  en el rango de valores mostrados en la figura 6.1, los diferentes tipos de estabilidad estan identificados como: I (Turing Inestable), II (Turing-Hopf Inestable), III (Hopf Estable) y IV (Estable). Se puede ver que en la curva de transición entre las regiones II y III, los parámetros  $\beta$  y  $d_a$  siguen una relación inversa, esto es, mientras más grande sea el valor del parámetro  $\beta$ , se requerirá un valor del coeficiente de difusión  $d_a$  más pequeño para que la bifurcación ocurra. Además podemos notar que para un valor fijo de  $d_a = 5 \times 10^{-5}$ , si se varia el valor de  $\beta$  de 0 hasta 1 el sistema cruza por dos bifurcaciones, las cuales originan tres diferentes tipos de estabilidad. Estas son: Estable para  $0 \leq \beta < 0.5 \times 10^{-2}$ , el cual es seguido por una región de Inestabilidad Turing-Hopf para  $0.5 \times 10^{-2} < \beta < 0.5$ , y finalmente se llega a una región de Hopf Estable para  $0.5 < \beta \leq 1.0$ .

Los 4 tipos de estabilidad representados en la figura 6.1 están clasificadas de

acuerdo a la solución de (6.5). Una muestra para cada tipo de solución se muestra en la figura 6.2, donde las líneas continuas representan la parte real de los valores propios y la línea punteada corresponde a la parte imaginaria.

Para la región I, que corresponde a una Inestabilidad de Turing, se puede ver que la relación de dispersión tiene una parte real positiva lo cual da lugar a un intervalo de modos de onda inestables. La region II corresponde a una relación de dispersión para una inestabilidad de Turing-Hopf, donde la parte imaginaria es diferente de cero para una porción de valores de la parte real, y cuando la parte imaginaria se hace cero la parte real es positiva como en la región de Inestabilidad de Turing. Esto es, este tipo de estabilidad tiene dos características: comportamiento oscilatorio y no oscilatorio inestable. La región III, corresponde a valores de  $\beta$  y  $d_a$  en los cuales el sistema se mantiene oscilando, el cual se caracteriza por tener una relación de dispersión en la que la parte real es solo positiva para los modos de onda donde la parte imaginaria es diferente de cero. Finalmente, la región IV se caracteriza por que la relación de dispersión tiene la parte real negativa para todos los modos de onda y por lo tanto el estado homogéneo nunca se pierde. En otras palabras, la combinación de las partes real e imaginaria de  $\lambda(\kappa^2)$  en (6.4), determinan cada tipo de estabilidad, así como las transiciones entre regiones [69].

Este resultado nos da la información sobre el mecanismo de formación de los patrones, ya que la región II de la figura 6.1 corresponde a un comportamiento dinámico que consiste de oscilaciones transitorias seguidas por un estado estacionario. Esta respuesta dinámica revela la influencia de la difusión del activador en la estabilidad; en otras palabras, las oscilaciones sostenidas espacialmente estables para valores del parámetro  $\beta$  en la región III se vuelven inestables cuando  $\beta$ , para cierto valor fijo de  $d_a$  decrece para ubicarse en la región II, que corresponde a la región de Turing-Hopf inestable.

Por otro lado, las regiones I y II son especialmente relevantes ya que en esas regiones es donde se origina un patrón estacionario, aunque hay que notar que hay una diferencia clave en el comportamiento dinámico en cada escenario. Para ilustrar esta diferencia, se realizaron simulaciones para cada región al considerar como

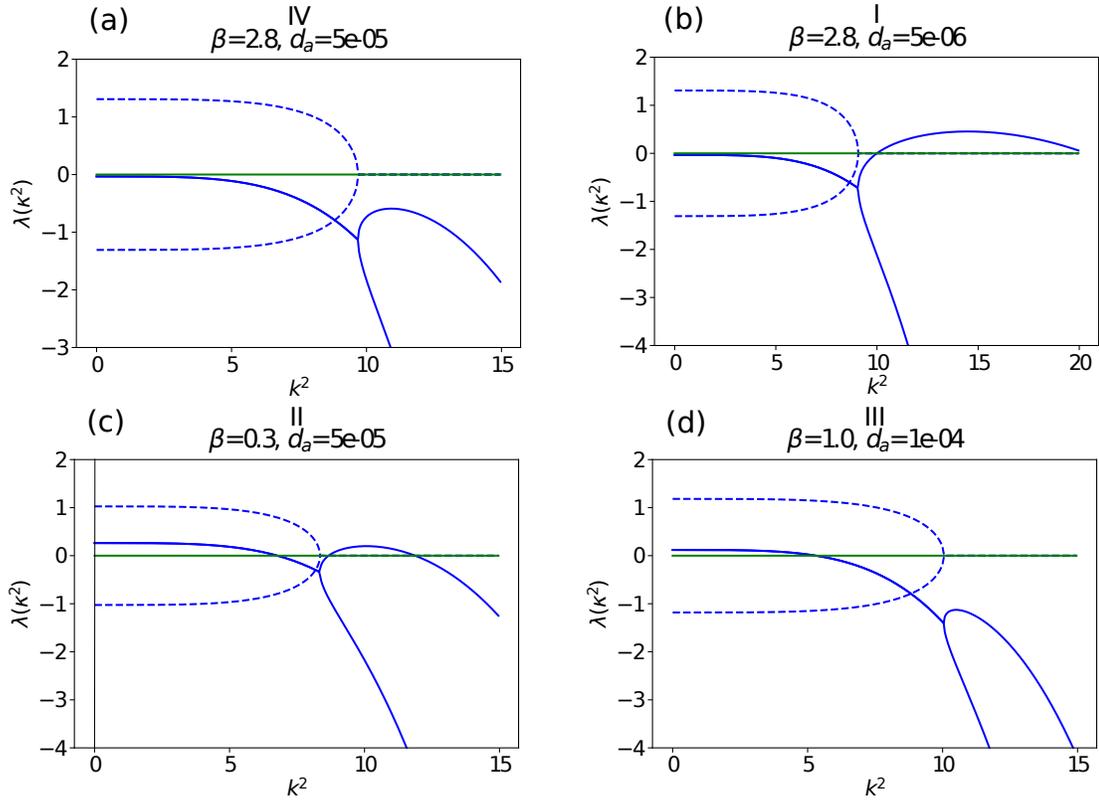


Figura 6.2: Muestras de algunas relaciones de dispersión para las regiones mostradas en la figura 6.1. La parte real de los valores propios están en línea continua y la parte imaginaria en líneas punteadas. Panel (a) corresponde a la región IV, en la que la parte real es negativa para todos los modos de onda  $\kappa^2$ ; en el panel (b) la parte real tiene dos raíces las cuales dan lugar a un patrón del tipo Turing; en el panel (c), Ocurren bifurcaciones de Turing y Hopf para diferentes modos de onda: La parte real es positiva para modos de onda que corresponde a cuando la parte imaginaria es cero y una inestabilidad de Turing ocurre como en el panel (b); en el panel (d), se aprecia una típica bifurcación de Hopf donde la parte real es positiva solo cuando la parte imaginaria es diferente de cero. Los valores de  $d_a$  y  $\beta$  se muestran respectivamente en cada panel, y los valores de los otros parámetros son  $k_1 = 5 \times 10^{-2}$ ,  $k_2 = 10^{-2}$ ,  $k_3 = 2.0$ ,  $n = 3.0$ .

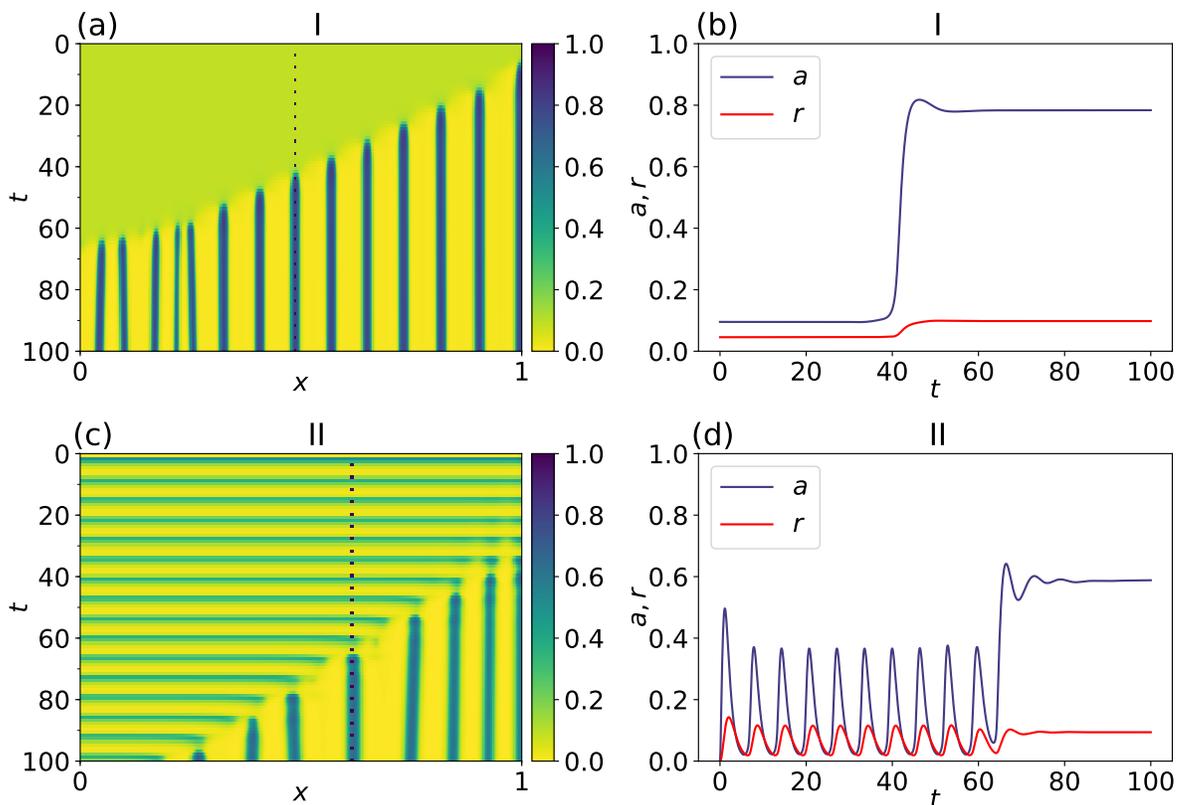


Figura 6.3: Resultados de la solución del sistema (6.1) con condiciones de frontera Neumann y valores de los parámetros como en la región I and II graficados en la figura 6.1. Una solución particular de una vista espacio-temporal de la solución que muestra la dinámica de la formación del patrón para un tipo Turing (panel a) y una tipo Turing-Hopf (panel c). La evolución temporal para cada caso en la columna del lado izquierdo para el activador  $a$  y el represor  $r$  en  $x = 0.6125$  y  $x = 0.4875$  (líneas punteadas en paneles a y c) se muestran en paneles (b) y (d), respectivamente. Las condiciones iniciales fueron tomados como una perturbación del punto de equilibrio correspondiente a las regiones I y II de la figura 6.1.

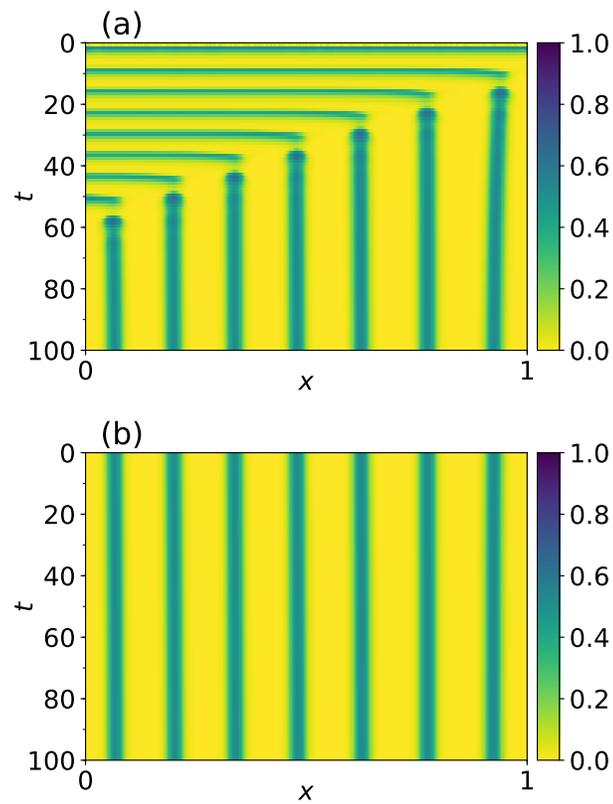


Figura 6.4: Simulaciones con el parámetro  $\beta$  como función de  $x$  y  $t$  como se indica en (4.8). Para (a), las condiciones iniciales como perturbaciones del punto de equilibrio, mientras que en (b) las condiciones iniciales son el estado final de (a).

---

condiciones iniciales una perturbación al estado de equilibrio. Estos resultados se muestran en la figura 6.3. Como se puede ver en el panel 6.3a, el sistema está inicialmente en un estado homogéneo con una ligera perturbación. A medida que el tiempo transcurre una secuencia de patrones emerge. Esto como una consecuencia de los modos de onda inestables, como se puede ver en la figura 6.2b, el cual corresponde a una región Turing Inestable (región I, en la figura 6.1).

Para apreciar esto con más claridad, en la figura 6.3b, se muestra la evolución temporal del activador y el represor para  $x = 0.6125$ . Por otro lado, en la figura 6.3c se puede ver como el sistema presenta una dinámica transitoria que inicialmente oscila como una consecuencia de la parte imaginaria diferente de cero de  $\lambda(\kappa^2)$ . Esta dinámica oscilatoria se mantiene hasta que los modos de onda inestables permiten la aparición de un patrón estacionario. Esta característica es claramente observada en la figura 6.3d. En otras palabras, aunque ambas configuraciones dinámicas dan lugar a patrones estacionarios, el comportamiento oscilatorio que finalmente termina en un patrón estacionario está dado cuando se presenta una Inestabilidad de Turing-Hopf.

En la figura 6.4 se muestran resultados adicionales donde se toma a  $\beta$  como una función espacio-temporal de acuerdo a la ecuación (4.8) con  $v = 0.02$  y  $v = -0.02$  para los resultados en las figuras 6.4a y 6.4b respectivamente. Las condiciones iniciales para la figura 6.4b corresponden a el estado final de la figura 6.4a. Se puede ver que, una vez que el patrón está completamente formado, aunque  $\beta$  varíe en una dirección inversa el patrón no se destruye. En otras palabras, este resultado indica que el mecanismo propuesto describe un proceso irreversible dado que, una vez que el frente de onda representado por  $\beta$  en (4.8) inicia el proceso de formación de los somitas este proceso no se puede deshacer.

# Bibliografía

- [1] T. W. Sadler. *Langman's medical embryology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012.
- [2] Scott Gilbert. *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 2016.
- [3] Bruce Carlson. *Human embryology and developmental biology*. Elsevier/Saunders, Philadelphia, Pa, 2014.
- [4] M Maroto, R A Bone, and J K Dale. Somitogenesis. *Development*, 139(14):2453–2456, 2012.
- [5] 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.
- [6] 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 America Inc.*, 24(april):438–441, 2000.
- [7] Philip F. Giampietro, Sally L. Dunwoodie, Kenro Kusumi, Olivier Pourquié, Olivier Tassy, Amaka C. Offiah, Alberto S. Cornier, Benjamin A. Alman, Robert D. Blank, Cathleen L. Raggio, Ingrid Glurich, and Peter D. Turnpenny.

- Progress in the understanding of the genetic etiology of vertebral segmentation disorders in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1151:38–67, 2009.
- [8] Mary-lee Dequéant and Olivier Pourquié. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat Rev Gen*, 9:370–382, 2008.
- [9] Sophie Gibb, Robin Findlay Hendry, and Tom Lancaster. *The routledge handbook of emergence*. 2019.
- [10] J. R. Collier, D. Mcinerney, S. Schnell, P. K. Maini, D. J. Gavaghan, P. Houston, and C. D. Stern. A cell cycle model for somitogenesis: Mathematical formulation and numerical simulation. *Journal of Theoretical Biology*, 207(3):305–316, 2000.
- [11] J. L. Duband, S. Dufour, K. Hatta, M. Takeichi, G. M. Edelman, and J. P. Thiery. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *Journal of Cell Biology*, 104(5):1361–1374, 1987.
- [12] Nicola J. Armstrong, Kevin J. Painter, and Jonathan A. Sherratt. Adding adhesion to a chemical signaling model for somite formation. *Bulletin of Mathematical Biology*, 71(1):1–24, 2009.
- [13] L. Truskinovsky, G. Vitale, and T. H. Smit. A mechanical perspective on vertebral segmentation. *International Journal of Engineering Science*, 83:124–137, 2014.
- [14] Santiago Schnell and Philip K. Maini. Clock and induction model for somitogenesis. *Developmental Dynamics*, 217(4):415–420, 2000.
- [15] R. E. Baker and P. K. Maini. Travelling gradients in interacting morphogen systems. *Mathematical Biosciences*, 209(1):30–50, 2007.

- 
- [16] R. E. Baker, S. Schnell, and P. K. Maini. A mathematical investigation of a Clock and Wavefront model for somitogenesis. *Journal of Mathematical Biology*, 52(4):458–482, 2006.
- [17] 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.
- [18] Isabel Palmeirim, Domingos Henrique, David Ish-Horowicz, and Olivier Pourquié. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, 91(5):639–648, nov 1997.
- [19] M.-L. Dequeant, E. Glynn, K. Gaudenz, M. Wahl, J. Chen, A. Mushegian, and O. Pourquie. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science*, 314(5805):1595–1598, dec 2006.
- [20] 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.
- [21] Julian Lewis. Autoinhibition with Transcriptional Delay. *Current Biology*, 13(16):1398–1408, aug 2003.
- [22] Alexander Aulehla and Olivier Pourquié. Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2):1–18, 2010.
- [23] Karen Niederreither, Peter McCaffery, Ursula C. Dräger, Pierre Chambon, and Pascal Dollé. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mechanisms of Development*, 62(1):67–78, 1997.
- [24] A. Sawada, M. Shinya, Y. J. Jiang, A. Kawakami, A. Kuroiwa, and H. Takeda. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development*, 128(23):4873–4880, 2001.

- 
- [25] A. S. Dias, I. de Almeida, J. M. Belmonte, J. A. Glazier, and C. D. Stern. Somites without a clock. *Science*, 343(6172):791–795, 2014.
- [26] L. A. Naiche, N. Holder, and M. Lewandoski. FGF4 and FGF8 comprise the wavefront activity that controls somitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10):4018–4023, 2011.
- [27] Meinhardt. *Models of Biological Pattern Formation* (Academic Press, London). (May 1982), 1982.
- [28] A. Turing. The chemical basis of morphogenesis. (Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, Vol. 237, No. 641. (Aug. 14, 1952), pp. 37-72.), 1952.
- [29] Meinhardt H. *Somites in Developing Embryos*. NATO ASI Series, New York, 1 edition, 1986.
- [30] James Cotterell, Alexandre Robert-Moreno, and James Sharpe. A local, self-organizing reaction-diffusion model can explain somite patterning in embryos. *Cell Systems*, 1(4):257–269, oct 2015.
- [31] 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.
- [32] Ertuğrul M. Özbudak and Julian Lewis. Notch Signalling Synchronizes the Zebrafish Segmentation Clock but Is Not Needed To Create Somite Boundaries. *PLoS Genetics*, 4(2):e15, 2008.
- [33] Cotterell James and Sharpe James. An atlas of gene regulatory networks reveals multiple three-gene mechanisms for interpreting morphogen gradients. *Molecular Systems Biology*, 6(425):1–14, 2010.
- [34] James D Murray. *Mathematical Biology*. Oxford, second edition, 1989.

- 
- [35] Bard Ermentrout. *Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems: A Guide to XPPAUT for Researchers and Students (Software, Environments and Tools)*. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1987.
- [36] M. R. Ricard and S. Mischler. Turing instabilities at Hopf bifurcation. *Journal of Nonlinear Science*, 19(5):467–496, 2009.
- [37] Yongli Song, Tonghua Zhang, and Yahong Peng. Turing-Hopf bifurcation in the reaction-diffusion equations and its applications. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 33:229–258, 2016.
- [38] M Maroto, R A Bone, and J K Dale. Somitogenesis. *Development*, 139(14):2453–2456, 2012.
- [39] Paul François, Vincent Hakim, and Eric D Siggia. Deriving structure from evolution: metazoan segmentation. *Molecular Systems Biology*, 3(1):154, January 2007.
- [40] Albert Goldbeter and Olivier Pourquié. Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the notch, wnt and FGF signaling pathways. *Journal of Theoretical Biology*, 252(3):574–585, June 2008.
- [41] Susan D. Hester, Julio M. Belmonte, J. Scott Gens, Sherry G. Clendenon, and James A. Glazier. A multi-cell, multi-scale model of vertebrate segmentation and somite formation. *PLoS Computational Biology*, 7(10), 2011.
- [42] Luis G. Morelli, Saúl Ares, Leah Herrgen, Christian Schröter, Frank Jülicher, and Andrew C. Oates. Delayed coupling theory of vertebrate segmentation. *HFSP Journal*, 3(1):55–66, February 2009.
- [43] Kazuki Horikawa, Kana Ishimatsu, Eiichi Yoshimoto, Shigeru Kondo, and Hiroyuki Takeda. Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature*, 441(7094):719–723, jun 2006.

- [44] Julian Lewis, Anja Hanisch, and Maxine Holder. Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *Journal of Biology*, 8(4):44, 2009.
- [45] Alexis B. Webb, Iván M. Lengyel, David J. Jörg, Guillaume Valentin, Frank Jülicher, Luis G. Morelli, and Andrew C. Oates. Persistence, period and precision of autonomous cellular oscillators from the zebrafish segmentation clock. *eLife*, 5(FEBRUARY2016):1–17, 2016.
- [46] Steven Strogatz. *Sync*. Hyperion, New York, 1 edition, 2003.
- [47] Pikovsky Arkady. *Synchronization*. Boris Chirikov, Predrag Cvitanovic, Frank Moss, Harry Swinney, New York, 1 edition, 2001.
- [48] 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.
- [49] K. Uriu, Y. Morishita, and Y. Iwasa. Random cell movement promotes synchronization of the segmentation clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11):4979–4984, mar 2010.
- [50] Olivier Cinquin. Repressor dimerization in the zebrafish somitogenesis clock. *PLoS Computational Biology*, 3(2):0293–0303, 2007.
- [51] Clarissa a Henry, Michael K Urban, Kariena K Dill, John P Merlie, Michelle F Page, Charles B Kimmel, and Sharon L Amacher. Two linked hairy/Enhancer of split-related zebrafish genes, her1 and her7, function together to refine alternating somite boundaries. *Development*, 129:3693–3704, 2002.
- [52] Andrew C. Oates and Robert K. Ho. Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development*, 129(12):2929–2946, 2002.

- 
- [53] C Takke and J a Campos-Ortega. Her1, a Zebrafish Pair-Rule Like Gene, Acts Downstream of Notch Signalling To Control Somite Development. *Development (Cambridge, England)*, 126(13):3005–3014, 1999.
- [54] John Stanley Griffith. Mathematics of Cellular Control Processes. *Journal of Theoretical Biology*, 20(2):209–216, 1968.
- [55] Moises Santillan. On the Use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks 2 . Derivation of the Hill function. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 3(2):85–97, 2008.
- [56] Didier Gonze, Samuel Bernard, Christian Waltermann, Achim Kramer, and Hanspeter Herzel. Spontaneous synchronization of coupled circadian oscillators. *Biophysical journal*, 89(1):120–9, 2005.
- [57] 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.
- [58] 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 (Cambridge, England)*, 140:3244–3253, 2013.
- [59] Jianwen Feng, Pan Yang, and Yi Zhao. Cluster synchronization for nonlinearly time-varying delayed coupling complex networks with stochastic perturbation via periodically intermittent pinning control. *Applied Mathematics and Computation*, 291:52–68, December 2016.
- [60] Francesco Sorrentino and Louis Pecora. Approximate cluster synchronization in networks with symmetries and parameter mismatches. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 26(9):094823, September 2016.

- 
- [61] Wei Wu, Wenjuan Zhou, and Tianping Chen. Cluster synchronization of linearly coupled complex networks under pinning control. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers*, 56(4):829–839, April 2009.
- [62] Cun Ma, Qirui Yang, Xiaoqun Wu, and Jun an Lu. Cluster synchronization: From single-layer to multi-layer networks. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 29(12):123120, December 2019.
- [63] Thomas Dahms, Judith Lehnert, and Eckehard Schöll. Cluster and group synchronization in delay-coupled networks. *Physical Review E*, 86(1):016202, July 2012.
- [64] G. B. Ermentrout. Oscillator death in populations of all to all-coupled nonlinear oscillators. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 41(2):219–231, 1990.
- [65] A. Aldo Faisal, Luc P.J. Selen, and Daniel M. Wolpert. Noise in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(4):292–303, 2008.
- [66] Yitzhak Pilpel. Noise in biological systems: Pros, cons, and mechanisms of control. *Methods in Molecular Biology*, 759:407–425, 2011.
- [67] Peter Hinow and Maya Mincheva. Linear stability of delayed reaction–diffusion systems. *Computers and Mathematics with Applications*, 73(2):226–232, 2017.
- [68] Jorge A. Castillo, Faustino Sánchez-Garduño, and Pablo Padilla. A Turing–Hopf Bifurcation Scenario for Pattern Formation on Growing Domains. *Bulletin of Mathematical Biology*, 78(7):1410–1449, 2016.
- [69] Ruey-Tarnng Liu, Sy-Sang Liaw, and Philip K. Maini. Oscillatory Turing Patterns in a Simple Reaction-Diffusion System. *J. Kor. Phys. Soc.*, 50(1):234–238, 2007.