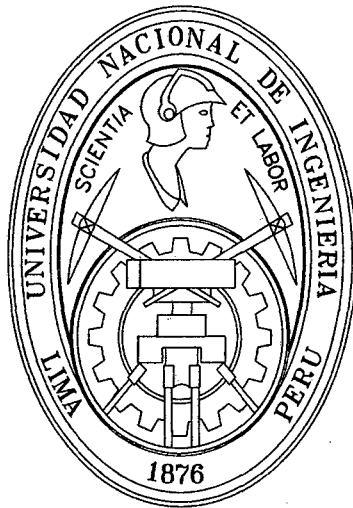


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA**



**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SENSIBILIDAD GLOBAL  
DE REDES REGULATORIAS OSCILATORIAS**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO MECATRÓNICO**

**ROLAN ALEXANDER VALLE REY SÁNCHEZ**

**PROMOCION 2008-I**

**LIMA-PERU**

**2014**

**Digitalizado por:**

**Consortio Digital del  
Conocimiento MebLatam,  
Hemisferio y Dalse**

# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Situación problemática . . . . .	4
1.2. Definición del problema . . . . .	5
1.2.1. Hipótesis . . . . .	5
1.2.2. Metodología de solución . . . . .	6
1.3. Objetivos . . . . .	7
1.3.1. Objetivo general . . . . .	7
1.3.2. Objetivos específicos: . . . . .	7
1.3.3. Resultados esperados . . . . .	7
1.4. Justificación . . . . .	8
1.4.1. Importancia de las redes regulatorias oscilatorias . . . . .	8
1.4.2. Contribución al avance de los conocimientos . . . . .	9
1.4.3. Propósito . . . . .	12
1.4.4. Motivación . . . . .	12
1.5. Limitaciones . . . . .	13
1.6. Viabilidad . . . . .	14
1.6.1. Viabilidad técnica . . . . .	14

1.6.2. Viabilidad económica . . . . .	14
1.7. Resumen de capítulos . . . . .	14
<b>2. Redes Regulatorias Oscilatorias</b>	<b>16</b>
2.1. Bases teóricas . . . . .	17
2.1.1. Osciladores autónomos . . . . .	17
2.1.2. Procesos bioquímicos celulares . . . . .	21
2.1.3. Modelado de reacciones bioquímicas . . . . .	24
2.2. Antecedentes del proyecto . . . . .	30
2.2.1. Resumen del estado del arte de la red p53 . . . . .	31
2.3. Formulación del un modelo de oscilador de la red p53 . . . . .	37
2.3.1. Modelos de la red p53-Mdm2 básicos . . . . .	38
2.3.2. Propuesta de modelo de la red p53-Mdm2 . . . . .	42
<b>3. Análisis de Sensibilidad</b>	<b>45</b>
3.1. Definición de sensibilidad . . . . .	46
3.1.1. Sensibilidad local . . . . .	46
3.1.2. Sensibilidad global . . . . .	46
3.2. Análisis de control metabólico . . . . .	47
3.3. Método desarrollado . . . . .	48
<b>4. Análisis Estadístico</b>	<b>53</b>
4.1. Descripción del trabajo . . . . .	53
4.2. Herramientas estadísticas . . . . .	54
4.2.1. Intervalo de confianza . . . . .	54
4.2.2. Boxplot . . . . .	56
4.2.3. Conceptos de agrupamiento . . . . .	59
4.2.4. Técnica de Bootstrap . . . . .	64

<b>5. Simulaciones y Resultados</b>	<b>67</b>
5.1. Simulación . . . . .	68
5.2. Resultados . . . . .	71
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b>	<b>75</b>
<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 1em; height: 1em; vertical-align: middle;"></span> Conclusiones . . . . .	75
<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 1em; height: 1em; vertical-align: middle;"></span> Recomendaciones . . . . .	77
<b>Bibliografía</b>	<b>75</b>
<b>A. Título Anexo 1</b>	<b>82</b>
A.1. Descripción de los parámetros . . . . .	82
A.2. Valores nominales de los parámetros . . . . .	84
A.3. Boxplot de las sensibilidades . . . . .	86
A.4. Códigos para las simulaciones . . . . .	91
A.5. Respuesta oscilatorias . . . . .	94
A.6. Diferencia entre el ranking de las correlaciones . . . . .	96

# Índice de Figuras

1.1. Ejemplos de osciladores a) Oscilador mecánico base de los relojes de péndulo b) Oscilador de cristal de cuarzo c) El represilador, oscilador biológico que muestra la evolución de las imágenes del análisis de fluorescencia de una la población de bacterias de <i>Escherichia coli</i> sobre un periodo de 10 horas. . . . .	4
1.2. Una jerarquía comparable entre la biología de sistemas y la ingeniería informática.(Andrianantoandro et al, 2006) . . . . .	11
2.1. Esquema de modelos dinámicos con diferente grado de detalle. (a) Modelo simplificado conejo-zorro (b) modelo más detallado considerando crias y adultos en las especies de conejo y zorro. . .	19
2.2. Gráfica de la simulación de un oscilador predador presa de la ecuacion Lotka-Volterra . . . . .	20
2.3. Trayectoria de oscilador y generador de pulso a) las trayectorias que conforma una oscilación siguen un camino ciclico llamado ciclo limite(ciclo azul) b) las concentraciones de las proteínas de un generador de pulso permanecen estable en un punto fijo, para pequeños cambios el sistema se estabiliza rápidamente(trayectoria violeta) pero para cambios mayores el sistema toma un trayectoria distante hasta estabilizarse (trayectoria roja). . . . .	21
2.4. Esquema de la organización funcional de la célula. . . . .	23

2.5. Las interacciones que toman lugar entre los tres tipos de redes bioquímicas presentes en la célula. . . . .	24
2.6. Esquema de reacciones bioquímicas básicas a) Transcripción basal b) Degradación natural c) promoción de la transcripción, d) promoción de la degradación, e) inhibición de la transcripción, f) inhibición de la degradación, g) reacción reversible, h) promoción de la fosforilización (activación). . . . .	25
2.7. Forma de la sigmoide para diferente tipo de configuración del conmutador de Michaelis-Menten. . . . .	26
2.8. a) conmutadores, b) controladores, c) osciladores, d) Filtros Amplificadores e) Filtros de ruido . . . . .	30
2.9. Evolución de las oscilaciones de p53-Mdm2 a través de las imágenes de microscopio de fluorescencia, la evolución de la concentraciones de p53 se muestran en rojo mientras que las de Mdm2 se muestran en verde, cada foto se muestra en un lapso de 20 minutos. . . . .	32
2.10. Red de la proteína p53. Las señales de estrés genético (entradas) son detectadas y translucidas al p53 a través de algunas quinazas (transductores de señal). Los nombres de las proteínas mostradas son los siguientes: APAF1 (apoptotic protease-activating factor), ATM(ataxia telangiectasia mutated), ATr(ataxia telangiectasia and rad3 related), CHK (checkpoint kinase), DNA-PK, DNA-dependent protein kinase), JNK (JUN N-terminal kinase), p53r2 (p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2-like protein) y Uv (radiación ultravioleta). . . . .	33

2.11. Modelo del rol potencial de los pulsos de ATM en la reparación del ADN. a) Cuando el rompimiento del ADN ocurre, b) varias proteínas forman un complejo en el sitio de rompimiento, c) luego, el ATM es activado por las proteínas de reconocimiento de rompimiento. d) Una vez activado, el ATM estabiliza el p53 y provoca su acumulación. e) El p53 luego cataliza la expresión de algunos genes, incluyendo genes de reparación del ADN y del inhibidor del ATM, el WiP1. f) La inhibición del ATM por el WiP1 podría resultar en la disociación del ATM de la ruptura, g) permitiendo el acceso al rompimiento. h) Aquí la reparación del ADN es exitosa, por lo cual el ATM no sería activado otra vez, y ya no activaría el p53. i) Si el rompimiento del ADN no es reparado, una nueva secuencia de activación del ATM comenzaría, resultando en un nuevo pulso del ATM y el p53. . . . .	35
2.12. Circuito del oscilador del p53-Mdm2 con los conmutadores acoplados de ATM-CHK2 y el regulador Wip1. En respuesta al daño en el ADN, el ATM es activado, y activa el CHK2, ambos catalizan el p53 afectando su interacción con uno de sus genes de señalización que es el Mdm2. P53 también cataliza la transcripción del fosfato que WiP1 regula negativamente el circuito entero mediante la desfosforilización del ATM, CHK2, p53 y Mdm2. Las líneas sólidas representan las interacciones proteína a proteína. . . . .	37
2.13. Diagrama de la red del p53 del modelo de Chickarmane. . . . .	38
2.14. Diagrama de la red del p53 del modelo de Ciliberto. . . . .	40
2.15. Diagrama de la red p53 propuesto. . . . .	42
3.1. Esquema de un planta física. . . . .	46

3.2. Indicación de las propiedades del oscilador p53-mdm2 en la simulación del modelo de Chickarmane. . . . .	48
3.3. Respuesta ante la variación del parametrode 0.1 veces a 10 veces el valor nominal de $a_0$ . . . . .	49
3.4. a) Respuesta del sistema ante la variación del parámetro $a_0$ desde 0.1 hasta 10 veces su valor nominal. b) Dependencia de las características del sistema con respecto a la variación del parámetro $a_0$ . . . . .	50
3.5. Zona de interés(intervalo donde el sistema oscila) en el método propuesto para calcular la sensibilidad global, el intervalo de $[.1;1]$ es donde esta la cota inferior de oscilacion y el intervalo $[1;10]$ es donde esta la cota superior de oscilacion. . . . .	51
3.6. a) Rangos de los valores de los parámetros normalizados dentro de los cuales el sistema oscila. b) Sensibilidades globales de las características del sistema con respecto a los parámetros. . . . .	51
3.7. Boxplot de las cotas inferios y superiores donde se mantienen oscilacion del sistema propuesto ante la variacion relativa valor de los parametros. a)Boxplot de las cotas inferios en el intervalo $[.1;1]$ b)Boxplot de las cotas superior en el intervalo $[1;10]$ . . . . .	52
4.1. Intervalo de confierza en una distribución gaussiana. . . . .	55
4.2. Relación del boxplot con la curva de distribuciones. . . . .	56



4.3. Izquierda: boxplot del valor de las sensibilidades para los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane. Derecha: representación de la distribución del valor de las sensibilidades para los valores de los parámetros obtenidos para los 150 conjuntos de parámetros a) Boxplot del extrema p53 b) Boxplot del extrema Mdm2. La barra de la derecha muestra el valor de la sensibilidad asociada a la escala de grises. . . . .	57
4.4. Izquierda: boxplot del valor de las sensibilidades para los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane. Derecha: representación de la distribución del valor de las sensibilidades para los valores de los parámetros obtenidos para los 150 conjuntos de parámetros. a)Perido b) Retardo. . . . .	58
4.5. Formación de los grupos . . . . .	59
4.6. Diferencia entre los metodos de agrupamiento . . . . .	60
4.7. Formación de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parametros pars B0 en el modelo de Chickarmane . . . . .	61
4.8. Un grupo formado de los 200 conjuntos de parametros B0 en el modelo de Chickarmane . . . . .	62
4.9. Formacion de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parametros pars B0 en el modelo propuesto . . . . .	63
4.10. Un grupo formado de los 200 conjuntos de parametros pars B0 en el modelo de propuesto. . . . .	63
4.11. La figura muestra dos curvas de probabilidades, la curva simétrica de línea curva, es la curva que teóricamente debería conseguirse para una distribución de una muestra basada en 20 observaciones. La curva con ragged es la curva de la aproximación de bootstrap basada en 20 obsevaciones aleatoriamente muestreadas de la curva normal. . . . .	64

4.12. La figura muestra una aproximación de la curva de probabilidad de la muestra basada en 1000 muestras de bootstrap generadas de la data. El 95 % de la muestra de bootstrap esta en el intervalo de 13.8 y 23.35 que es usado para el intervalo de confianza par ala media poblacional. . . . .	65
4.13. El bootstrap estima la muestra de distribución de T basada en la data. El 95 % de la muestra de bootstrap esta en el intervalo de -2.01 y 2.14 que es usado para el intervalo de confianza par ala media poblacional. . . . .	66
4.14. La figura muestra como se aplica la aproximación de bootstrap sobre la curva de probabilidad T.. . . .	66
5.1. Simulación del Modelo de Chickarmane con el primer valor encontrado cumpliedo condiciones de periodo y retardo. . . . .	69
5.2. Boxplot de los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane para los 200 conjuntos de parámetros . . . . .	69
5.3. Simulación del Modelo propuesto. . . . .	70
5.4. boxplot de los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo propuesto para los 200 conjuntos de parámetros. . . . .	70
A.1. Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades. . .	86
A.2. Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades. . .	86

A.3. Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades. . .	87
A.4. Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades. . .	87
A.5. Formación de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parámetros para B0 en el modelo de Chickarmane . . . . .	88
A.6. Medias de la sensibilidad de los parámetros que corresponden a los 6 bases de conjuntos de parámetros (B1-B6) considerando los parámetros que contribuyen en al menos 70 % del monto total. Izquierda Modelo de Chickarmane y Derecha modelo propuesto. (a,b) extrema de p53 , (c,d) extrema de Mdm2 , (e,f) periodo p53 and (g,h) retardo. . . . .	89
A.7. Medias de la sensibilidad de los parámetros que corresponden a los 6 bases de conjuntos de parámetros (B1-B6) considerando los parámetros que contribuyen en 100 % del monto total. Izquierda Modelo de Chickarmane y Derecha modelo propuesto. (a,b) extrema de p53 , (c,d) extrema de Mdm2 , (e,f) periodo p53 and (g,h) retardo. . . . .	90
A.8. Simulación para máxima concentración de ATMp del Modelo de Chickarmane con el valor original de parámetros. . . . .	94
A.9. Simulación para máxima concentración de ATMp del Modelo de Ciliberto. . . . .	95
A.10. Las diferencias entre las sensibilidades ranking de correlaciones. Las correlaciones correspondientes a los parámetros que contribuyen 70 % del monto total. . . . .	96

A.11.Las diferencias entre las sensibilidades ranking de correlaciones.

Las correlaciones correspondientes a los parámetros que contribuyen 100% del monto total. . . . . 97

# Índice de Tablas

2.1.	Procesos químicos que se realizan en las células. . . . .	22
2.2.	Reacciones bioquímicas básicas . . . . .	25
2.3.	Ultimas publicaciones relevantes de la red oscilatoria p53-Mdm2 .	30
2.4.	Especies de estudio de la red p53-Mdm2 en el modelo de Chickarmane . . . . .	38
2.5.	Reacciones de la red p53-Mdm2 del Modelo de Chickarmane . . .	39
2.6.	Especies variables de la red p53-Mdm2 en el modelo de Ciliberto	40
2.7.	Detalle de las reacciones de la red p53-Mdm2 en el modelo de Ciliberto. . . . .	42
2.8.	Reacciones de la red p53-Mdm2 en el Modelo propuesto . . . . .	44
3.1.	Propiedades de la dinámica del sistema de la red p53-Mdm2 . . .	48
4.1.	valores de interval confianza . . . . .	55
5.1.	Valores de los parámetros del primer punto hallado en el modelo de Chickarmane . . . . .	68
5.2.	valores de los parámetros del modelo propuesto en el primer punto encontrado . . . . .	68
5.3.	Influencia de los parametros en las propiedades dinamicas del sistema de la red p53-Mdm2 en el modelo de Chickarmane. . . . .	71

5.4. Influencia de los parámetros en las propiedades dinámicas del sistema de la red p53-Mdm2 en el Modelo propuesto. . . . .	72
A.1. Descripción de los parámetros de la red p53 en el modelo de Ciliberto	82
A.2. Descripción de los parámetros de la red p53 en el modelo propuesto.	83
A.3. Valores nominales de los parámetros encontrados el modelo de Ciliberto. . . . .	84
A.4. Valores nominales de los parámetros del molde propuesto. . . . .	85

# Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Alberto Coronado y a la PhD. Elizabeth Villota por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo de investigación. Así como también por la formación recibida en la actividad de la investigación científica. También quiero agradecer a mis compañeros de investigación del Grupo de Modelado y Simulación Multiescla de la FIM. Finalmente, también deseo agradecer al Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Mecánica por el financiamiento proporcionado.

# Resumen

El objetivo de la presente tesis es determinar la influencia de los parámetros de los modelos en la dinámica de la red regulatoria oscilatoria del p53 y la robustez estructural del sistema. Las redes biomoleculares que presentan comportamiento oscilatorio son muy abundantes en la naturaleza. Aunque se han identificado algunos principios de diseño, sigue siendo poco conocido cómo estas oscilaciones son afectadas cuando los parámetros cinéticos están en constante cambio, o no se conocen con precisión.

En este trabajo se evalúa la influencia de cientos de valores de parámetros en las sensibilidades de dos modelos de un sistema oscilatorio, conocido como la red principal p53. Se muestra que, en ambos modelos, el parámetro relacionado a la retroalimentación positiva p53, es el único que presenta sensibilidad importante en los valores extremos, periodos y de retardo, para todos los conjuntos de parámetros. Además, la sensibilidad de cada parámetro varía mucho más en el modelo con mayor detalle para diversos valores de parámetros.

Estos resultados resaltan la importancia de la presencia de patrones específicos de la red, además de la función de valores de parámetros, cuando se quiere caracterizar los sistemas bioquímicos oscilatorios.



# Capítulo 1

## Introducción

Los osciladores son importantes porque regulan una serie de eventos o procesos en diferentes aplicaciones industriales y domésticas. Para desarrollar un reloj (ver Figura 1.1a) fueron necesarios cientos de años hasta su concretización en el siglo XIX. Luego, en siglo XX se creó el oscilador de Cristal (ver Figura 1.1.b) que se usa en la industria electrónica. En el siglo XXI se vienen estudiando los osciladores biológicos. Un ejemplo del desarrollo de osciladores biológicos es el caso del represilador desarrollado por Michael Elowitz et al. [27], el cual constituye una red regulatoria sintética implementada en la bacteria *Escherichia coli* (ver Figura 1.1c). Una red regulatoria esta compuesta por una serie de interacciones bioquímicas que ocurren en la célula.

La presente tesis tiene como objeto el estudio de la red de regulación principal de la proteína tumor-supresor p53, cuyo mal funcionamiento se asocia al desarrollo del cáncer [36]. El estudio de la red se centra en el análisis estadístico de la sensibilidad para el modelo de Chickarmane [17] y el propuesto en este trabajo. El objetivo es determinar cual es la influencia de los parámetros en la dinámica de la red regulatoria oscilatoria del p53 y la robustez estructural del sistema.

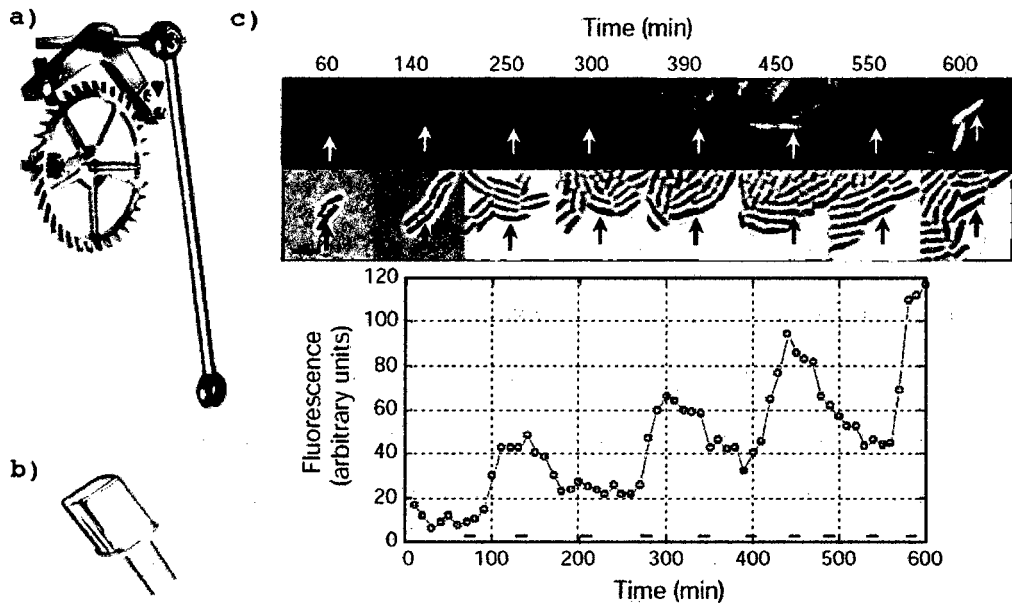


Figura 1.1: Ejemplos de osciladores a) Oscilador mecánico base de los relojes de péndulo b) Oscilador de cristal de cuarzo c) El represilador, oscilador biológico que muestra la evolución de las imágenes del análisis de fluorescencia de una la población de bacterias de *Escherichia coli* sobre un periodo de 10 horas.

A continuación se explicará la situación problemática, la definición del problema, los objetivos, la justificación, las limitaciones y la viabilidad.

## 1.1. Situación problemática

En el Perú hay alrededor de 42 mil nuevos casos de cáncer al año y con una tasa de mortalidad de aproximadamente 15 mil personas al año, según el Instituto de Enfermedades Neoplásicas. Así, el cáncer ocupa el tercer lugar como causal de muerte. Los casos más comunes son el cáncer de pulmón y de estómago, tanto para a varones y mujeres. Mientras el cáncer de mama y de cuello uterino es mas frecuente en las mujeres. En tanto que para los varones son más frecuentes el cáncer de estómago, de pulmón y de próstata. Se estima que para el 2030 la tasa de incidencia del cáncer aumente en 90 % [34].

Tengamos en cuenta que el p53 es un elemento importante en la respuesta al daño genético y su mal funcionamiento, pues está asociado al 50 % de los cánceres [37]. La comprensión de la oscilación del p53 es crucial para la simulación de cómo los fármacos afectarían a la dinámica del p53 llevando a la célula a la apoptosis y así tener terapias más efectivas. Debido a ello es necesario un estudio detallado de la sensibilidad de sus oscilaciones.

## 1.2. Definición del problema

A la fecha, se tienen diferentes modelos de la red regulatoria p53, con diversos grados de detalle. A pesar de décadas de estudio del sistema p53 [42] aún no se conocen los valores de los parámetros que definen las reacciones bioquímicas, debido a su gran variabilidad en condiciones de trabajo. Hay pocos estudios sobre cómo la variación de los parámetros influye en la dinámica del sistema. Se sabe poco sobre la influencia de la complejidad de la estructura en la robustez del sistema. Además, no está claro que tanto la arquitectura de la red, sus parámetros o una combinación de ambos influyen en la dinámica de las oscilaciones.

Para estudiar el sistema del p53 se ha elaborado una hipótesis y una metodología de solución que se explicará a continuación.

### 1.2.1. Hipótesis

La hipótesis consiste en desarrollar un modelo simplificado determinístico de la interacción de la proteína p53 y sus reguladores, cuando hay daño genético y en este caso la red p53 oscila. Este modelo reflejará las características principales del comportamiento observado en los resultados experimentales. Así mismo,

mediante el análisis estadístico de la sensibilidad, se identificarán los procesos críticos y los principales parámetros que modifican la dinámica del sistema (periodo, retraso y extremos).

### 1.2.2. Metodología de solución

Los pasos para la solución son los siguientes:

1. Desarrollar un modelo de la red p53-Mdm2 basado en los modelos de Chickarmane [17] y Ciliberto [25]. Serán consideradas las especies del p53 activo, p53 inactivo, Mdm2 citoplasmático y Mdm2 nuclear.
2. Estimar mediante búsqueda estocástica de los parámetros de las reacciones, diversos conjuntos de parámetros que produzcan para ATM fosforilado una respuesta oscilatoria. Estas oscilaciones tendrán un periodo de 5.5 horas y un retraso de 2 horas según el experimento Zatorsky et al [18].
3. Buscar las concentraciones iniciales de las especies para estado estable (sin daño genético) para ATM defosforilado, de modo que la concentración de Mdm2 sea mayor a la del p53 en el modelo de Ciliberto y la concentración de Mdm2 nuclear sea mayor a la del p53 activo en el modelo propuesto. En este paso se usó el programa de NumPy.
4. Calcular la sensibilidad de la respuesta oscilatoria ante la variación paramétrica.
5. Analizar de los resultados mediante técnicas estadísticas de agrupamiento jerárquico promedio y Bootstrap, usando el lenguaje de programación R.
6. Identificar los principales procesos y parámetros que influyen en la dinámica de la red p53 de oscilación.

## **1.3. Objetivos**

En el estudio de la red oscilatoria p53 se establece un objetivo general, objetivos específicos y alcances esperados que se explica a continuación:

### **1.3.1. Objetivo general**

Estudiar la influencia de los parámetros en dos modelos de la red regulatoria oscilatoria p53 considerando su dinámica y robustez.

### **1.3.2. Objetivos específicos:**

- a. Desarrollar un modelo determinístico de la red principal del p53 que incluya las especies del p53 activo, p53 inactivo, Mdm2 citoplasmático y Mdm2 nuclear. Este modelo debe reproducir cualitativamente las oscilaciones.
- b. Identificar los procesos críticos y los principales parámetros que modifican la dinámica del sistema (periodo, extremos y retraso).
- c. Estudiar las diferencias entre la arquitectura de un modelo establecido de la red principal del p53 y del modelo propuesto mediante el análisis sensibilidad paramétrica del sistema.

### **1.3.3. Resultados esperados**

Los resultados del modelo simplificado de la red principal del p53, de acuerdo con datos experimentales, servirán para tener una mejor comprensión de la red de oscilación del p53. Esto es fundamental en el discernimiento de las rutas

de señalización como la apoptosis (muerte celular programada), la reparación del ADN, senescencia celular (envejecimiento celular) y la detención del ciclo celular (pérdida de habilidad de la célula para replicarse). También inferir bajo qué circunstancias se manifiestan estas rutas de señalización y estimar otros comportamientos bajo diferentes estímulos. [16].

## **1.4. Justificación**

El modelo diseñado podrá servir para la simulación del ensayo de fármacos que puedan intervenir sobre alguna etapa del proceso cancerígeno y retardar su evolución. Por lo tanto, el modelo de la regulación del p53 tiene implicaciones en el desarrollo de farmacos anti-cancerígenos. Para ello, se necesita saber cómo cada uno de los transductores y reguladores del p53 trabaja en células cancerígenas. Así se podrán discernir las estrategias terapéuticas más efectivas y controlar el crecimiento de las células cancerígenas.

En general, las redes regulatorias oscilatorias están teniendo considerable importancia por su gran potencial industrial, asimismo su estudio contribuirá en el desarrollo del conocimiento de diversas aéreas como la bioelectrónica [35].

### **1.4.1. Importancia de las redes regulatorias oscilatorias**

Una red regulatoria está compuesta por una serie de interacciones bioquímicas que ocurren en la célula. Esta red tiene como misión decidir que procesos se deben efectuar controlando su desempeño. Estas redes regulatorias son como controladores celulares que usan un contador ó reloj.

Además de la importancia de las redes regulatorias en la medicina, su estudio impactará en otras áreas como la bioelectrónica y la robótica. Por ejemplo, el desarrollo de un oscilador biológico sintético tendrá una gran importancia en la industria bioelectrónica, como lo fue el oscilador de cuarzo en la electrónica. Incluso se está usando experimentalmente la teoría de redes regulatorias para programar el comportamiento colectivo de robots [38].

### **1.4.2. Contribución al avance de los conocimientos**

Los métodos usados en ingeniería de control y dinámica de sistemas ofrecen una oportunidad única en la caracterización de la red del p53 y el estudio del cáncer.

Un gran interés desde la Ingeniería de Control es entender cómo funcionan los sistemas biológicos y a partir de ello desarrollar sistemas de ingeniería más robustos y óptimos. Recientes descubrimientos en la biología motivan el desarrollo de nuevas teorías y métodos de análisis. La interrelación entre la biología y la ingeniería de control sirve para que ambas áreas se desarrollen de manera interdependiente [35].

El presente trabajo hace uso de conceptos de las nuevas áreas de investigación que están muy interrelacionadas, tales como: Sistemas Complejos y Biología de Sistemas.

#### **1.4.2.1. Comprensión del cáncer y de los sistemas complejos**

El 50 % de los casos de cáncer está asociado a una mutación de la proteína p53 [36]. El cáncer es una enfermedad heterogénea, muy compleja. Existen varios

tipos de cancer, que cambian de persona a persona. Incluso dentro de una misma población de células cancerígenas hay diferentes niveles de agresividad.

El proceso cancerígeno ocurre de diferentes modos y con diferentes resultados. Lo que muestra la variación de los parámetros de las reacciones que ocurren en las células cancerígenas. Ante esta variación de los parámetros es necesario tener en cuenta un análisis estadístico de la red de oscilación p53.

Un obstáculo clave para la terapia del cáncer es la adquisición de robustez por parte del tumor. Esta robustez es la capacidad de mantener el funcionamiento estable a pesar de diversas perturbaciones. Diversos enfoques para el tratamiento contra el cáncer han tenido poco éxito, por lo cual lograr una cura universal está aún muy lejana.

Los sistemas complejos son exitosos, pues son robustos frente a una amplia gama de excitaciones externas e internas. Por lo general, este tipo de características robustas se habilitan con controles de retroalimentación, redundancia modular y la estabilidad estructural.

Para entender a los tumores cancerígenos como sistemas complejos robustos es necesario tomar un enfoque de análisis de sistemas. Un desafío crucial es la inducción de los tumores hacia la apoptosis sin provocar mutaciones adicionales, para manipular su robustez sistémica y así desarrollar terapias contra el cáncer [40]. Este es un gran desafío porque las células cancerígenas son muy robustas y mutan para mantener sus mecanismos de retroalimentación, lo que permite mantener sus funciones celulares, su sistema de reproducción y su resistencia a los fármacos.

Hoy en día, las infraestructuras que permiten nuestra civilización en el siglo XXI se pueden describir como sistemas de sistemas. La complejidad



de los sistemas de información, las fábricas, las redes eléctricas está creciendo considerablemente. Para asegurar la integridad de las infraestructuras vitales para la humanidad, es necesario un abordaje de análisis de sistemas complejos.

La complejidad entre sistemas físicos a grandes escalas y los sistemas biológicos es comparable (ver Figura 1.2). Por esto se espera que estudiando el cáncer podamos entender sus mecanismos de robustez, sensibilidad y adaptabilidad para usarlos en diseñar mejores sistemas de ingeniería.

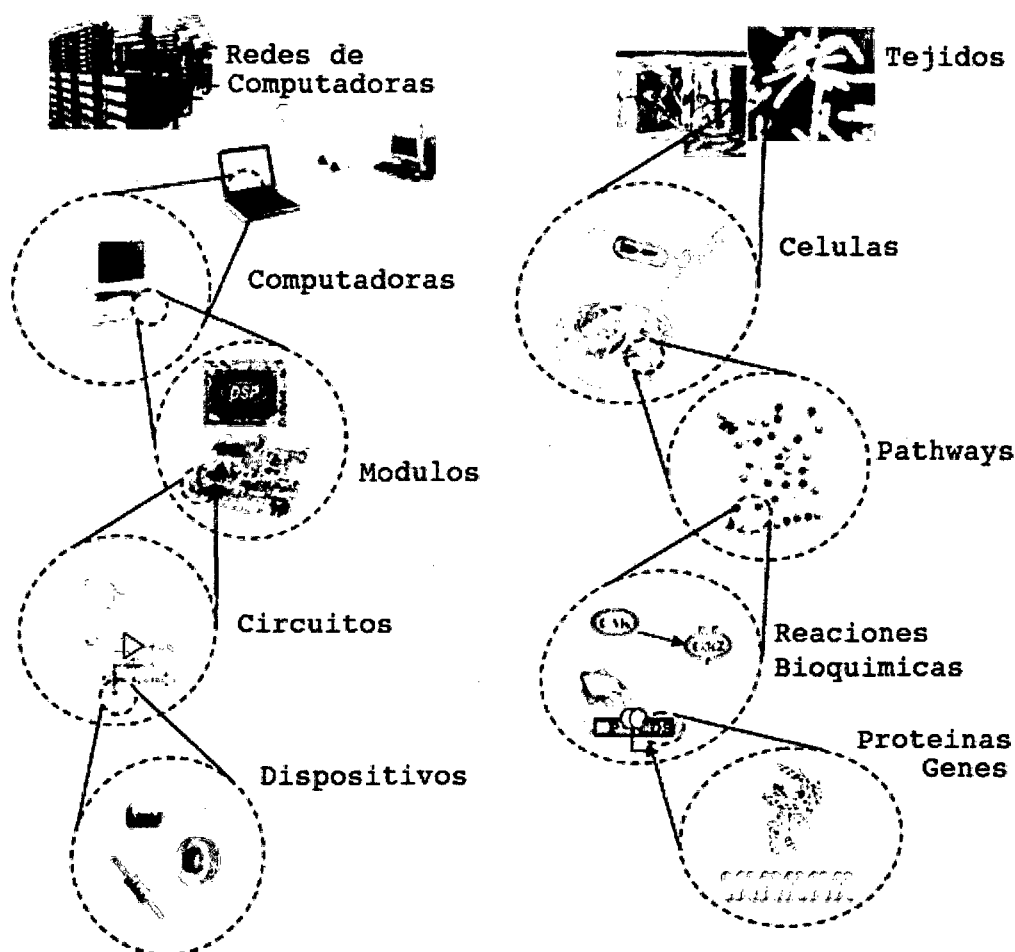


Figura 1.2: Una jerarquía comparable entre la biología de sistemas y la ingeniería informática. (Andrianantoandro et al, 2006)

Finalmente, se puede decir que el cáncer es un problema muy complejo [33], su estudio a la manera tradicional experimental, no ha dado mayores resultados.

Hoy en día, con nuevas técnicas y mayor poder computacional se abre un frente de posibilidades para el estudio del problema del cáncer.

#### **1.4.2.2. Biología de sistemas**

La biología de sistemas tiene por objeto encontrar las leyes que rigen los sistemas biológicos, de cómo pueden ser tan robustos a las perturbaciones y a la vez sensibles a ciertos estímulos. Se puede decir que la tarea fundamental de la biología de sistemas es desarrollar modelos simplificados que puedan reproducir las características más importantes del sistema. De este modo se espera que la biología de sistemas genere las reglas para construir topologías (arquitecturas) de redes de procesos biomoleculares robustos.

Los métodos desarrollados y los resultados de la biología de sistemas van a contribuir al desarrollo de la Biología de Sintética. Esta es una área nueva que modifica los sistemas biológicos para usarlos en procesos industriales.

#### **1.4.3. Propósito**

El propósito de la presente tesis es la aplicación del análisis de sensibilidad en el estudio de la red principal de la proteína tumor supresor p53, para encontrar el grado de influencia de cada parámetro en la dinámica del sistema. Es decir cómo las variaciones en los valores de los parámetros afectan el periodo, retraso y extremos.

#### **1.4.4. Motivación**

La motivación del presente trabajo radica en entender y descubrir los mecanismos de autorregulación de las redes bioquímicas. Ello permitirá su

extrapolación en el desarrollo de aplicaciones en la salud como es el tratamiento del cáncer y en otras áreas. El cáncer es un problema de salud en el Perú y es una de las enfermedades más terribles en el mundo, por ello es muy estudiada a nivel mundial. Se ha visto que la mayoría de cánceres presentan un defecto en la red del p53 [36], por esto es necesario analizar las interacciones de la red del p53.

## 1.5. Limitaciones

La red del p53 es una red muy compleja, con cientos de proteínas que se relacionan entre sí. A la fecha se han publicado diversos modelos con diferente grado de detalle. Así, es necesario tener una restricción para el estudio de la red regulatoria del p53, por lo cual la tesis se enfoca con las siguientes delimitaciones:

- Se compara 2 modelos, el de Chickarmane y el propuesto en este trabajo.
- Se tiene en cuenta para el desarrollo del modelo solo la red principal del p53.
- Se trabaja con la proteína p53 en sus estados activo e inactivo y con la proteína Mdm2 en posición citoplasmática y nuclear.
- Se analiza la sensibilidad en 5 regiones de estudio apartadas del espacio paramétrico original en cada modelo.
- Se considera para el estudio una muestra de 100 conjuntos de parámetros por cada una de las 5 regiones de estudio del espacio paramétrico, en cada modelo de estudio.
- No se considerará el circuito de activación acoplados de conmutación ATM-ATMP y CHK1-CHK2, tampoco se considerará el circuito de reparación del daño genético.

- No se considera el análisis de plano de fase, ni el análisis de bifurcación.

## **1.6. Viabilidad**

### **1.6.1. Viabilidad técnica**

Se usaron 10 computadoras quadcore durante 6 meses. Se utilizaron los programas de Octave, Python, NumPy y R, en el sistema operativo Ubuntu.

### **1.6.2. Viabilidad económica**

El costo estimado durante 6 meses para la realización del proyecto son: Por el uso de las 10 computadoras 2.5 mil soles por pago de consumo de electricidad.

## **1.7. Resumen de capítulos**

La presente tesis consta de 6 capítulos que se describen a continuación:

- El Capítulo 1, discute conceptos referentes a la importancia de los osciladores y la necesidad del análisis estadístico de sensibilidad. También explica el interés de la ingeniería por la biología. Finalmente se explica cómo se relacionan las nuevas áreas de investigación de la biología de sistemas y los sistemas complejos.
- El Capítulo 2, expone los conceptos básicos de las redes regulatorias oscilatorias. La construcción de redes son ilustradas con ejemplos de algunas reacciones que juegan un rol importante en la regulación de diversos procesos biológicos.

- El Capítulo 3, explica la teoría del análisis de sensibilidad, global y local. También, se explica la propuesta de un método cualitativo de sensibilidad.
- El Capítulo 4 se expone los métodos de análisis estadístico como de agrupamiento y bootstrap.
- El Capítulo 5, refiere a las simulaciones y resultados obtenidos de las oscilaciones de dos modelos de la red principal p53, para los cuales se desarrollaran el análisis estadístico de sensibilidad.
- Finalmente, el Capítulo 6 expone las principales conclusiones y recomendaciones.

## Capítulo 2

# Redes Regulatorias Oscilatorias

Las oscilaciones están presentes en los sistemas biológicos (ciclo circadiano, la red del p53, etc.). Los osciladores no lineales son más robustos que los lineales. Los osciladores no lineales tienden a ser autónomos y son a menudo importantes para poner una escala de tiempo (o secuencia) bien regulada de los eventos biológicos. Por contraste, los generadores de pulso responden al estímulo con el solo inicio de la actividad y son provocados repetidamente. Además, las estructuras de la red y los parámetros cinéticos que son requeridos para regular estos comportamientos son diferentes. Por ejemplo, los osciladores pueden surgir de un solo lazo de realimentación negativo, mientras que los generadores de pulsos presentan la excitabilidad a menudo como consecuencia de una inhibición y de una la realimentación positiva, que es crucial en la activación.

Muchos de estos sistemas oscilatorios consisten en la interacción de lazos positivos y negativos, así como en una combinación de estos. Las oscilaciones juegan un papel importante en muchos procesos celulares dinámicos. El estudio de oscilaciones en biología celular provee de información valiosa acerca de la organización de los procesos celulares.

Una propuesta inicial de Novak [1] sobre las redes oscilatorias sostiene que las características necesarias para el comportamiento adecuado de un oscilador son: la retroalimentación negativa, un retardo, la no linealidad de las reacciones y los tiempos adecuados de culminación de procesos. Se ha propuesto en trabajos previos [4, 5, 6, 7] que la arquitectura de la red antes que el valor de los parámetros determinan la operatividad y las características dinámicas del sistema. Se tiene claro que para los sistemas oscilatorios una retroalimentación negativa es suficiente para generar oscilaciones. Sin embargo, Tsai *et al.* [8] demostró numéricamente que agregando un lazo de retroalimentación positiva se aumenta la robustez y sintonización del sistema. Este resultado ha sido corroborado experimentalmente [9, 10]. Por otro lado, se ha mostrado numéricamente [15] que parámetros específicos pueden llevar a un sistema a comportarse oscilatoriamente o actuar como integrador (acumula la respuesta de una señal).

## 2.1. Bases teóricas

El presente trabajo hace uso de conceptos de osciladores autónomos y de procesos bioquímicos, que son necesarios para comprender la red de regulación p53.

### 2.1.1. Osciladores autónomos

Los osciladores son sistemas dinámicos que se caracterizan por tener una periodicidad en su comportamiento. Es necesario hacer una distinción entre las diferentes clase de osciladores; osciladores de ciclo limite (OCL), osciladores de no ciclo limite (ONCL).

Se utilizará el término de oscilador de no ciclo límite (ONCL) para describir cualquier sistema autónomo, en el cual cualquier condición inicial se repita periódicamente. En otras palabras el periodo de su órbita no está aislado y no exhibe un comportamiento transitorio. Las condiciones iniciales y los parámetros determinan la trayectoria de oscilación.

La órbita periódica de los osciladores de ciclo límite es aislada y cerrada [26], significa que ésta es determinada solamente por los parámetros del sistema. La forma y posición del ciclo límite en el diagrama espacio estado es independiente de las condiciones iniciales, siempre y cuando las condiciones iniciales se encuentren en la región de atracción de órbita periódica. Los ciclos límites estables se aproximan de manera asintótica de cualquier condición inicial dentro de esta región de atracción, a menos que las condiciones iniciales se encuentran exactamente en la trayectoria límite de ciclo. Los OCL son gobernados por EDOS (ecuaciones diferenciales ordinarias) no lineales [26],

Muchos sistemas biológicos oscilatorios son modelados como OCL, como el reloj ciclo circadiano. Una propiedad intrínseca de los OCL es su capacidad de volver a la condición original después de una perturbación en una o muchas variables de estado. Esta propiedad hace a los OCL una opción para modelar sistemas biológicos. Por ejemplo el ciclo circadiano, el cual exhibe una robustez a perturbaciones con respecto a la amplitud y al periodo [50]. Los modelos cuantitativos son muy importante para el estudio de los sistemas incluyendo a los oscilatorios [2, 3]

Un ejemplo de un sistema dinámico, es el sistema predador-presa. En este sistema se observa que existen ciertos lazos de retroalimentación del tipo positivo y negativo (ver Figura 2.5).

Algo característico del sistema predador-presa, es que la presa tiene un crecimiento potencial en su población por su alto nivel de reproducción (conejos)



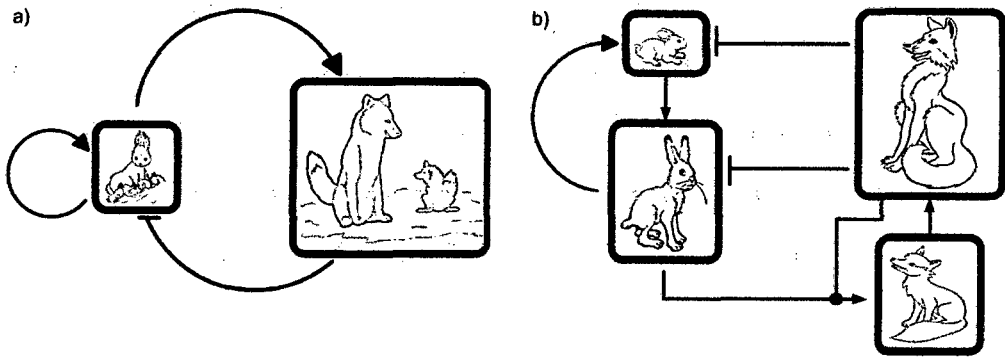


Figura 2.1: Esquema de modelos dinámicos con diferente grado de detalle. (a) Modelo simplificado conejo-zorro (b) modelo más detallado considerando crías y adultos en las especies de conejo y zorro.

en tanto la tasa de reproducción de los predadores (zorros) es mucho mas lenta. Las presas sirven de alimento a los predadores que tiene incidencia en su reproducción, pero si el nivel de consumo de los predadores es alto, por lo cual la taza de mortalidad de las presas es muy alta y por encima de su tasa de natalidad. Lo que conlleva a una reducción de la población de las presas lo que implica una escasez de comida para los predadores entonces cae el nivel de reproducción de los depredadores y aumenta la mortalidad por inanición. A traves de estos procesos se vuelve al estado inicial de las especies repitiéndose esto cíclicamente (ver Figura 2.6). Este sistema se conoce como oscilador predador presa Lotka Volterra cuyas ecuaciones son:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= x(\alpha - \beta y) \\ \frac{dy}{dt} &= -y(\gamma - \delta x)\end{aligned}\tag{2.1}$$

Donde,  $x$  es el número de presas,  $y$  es el número de predadores,  $\frac{dy}{dt}$  y  $\frac{dx}{dt}$  representan la tasa de crecimiento de las especies en el tiempo,  $t$  representa el tiempo,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  son parámetros que describen la integración de ambas especies.

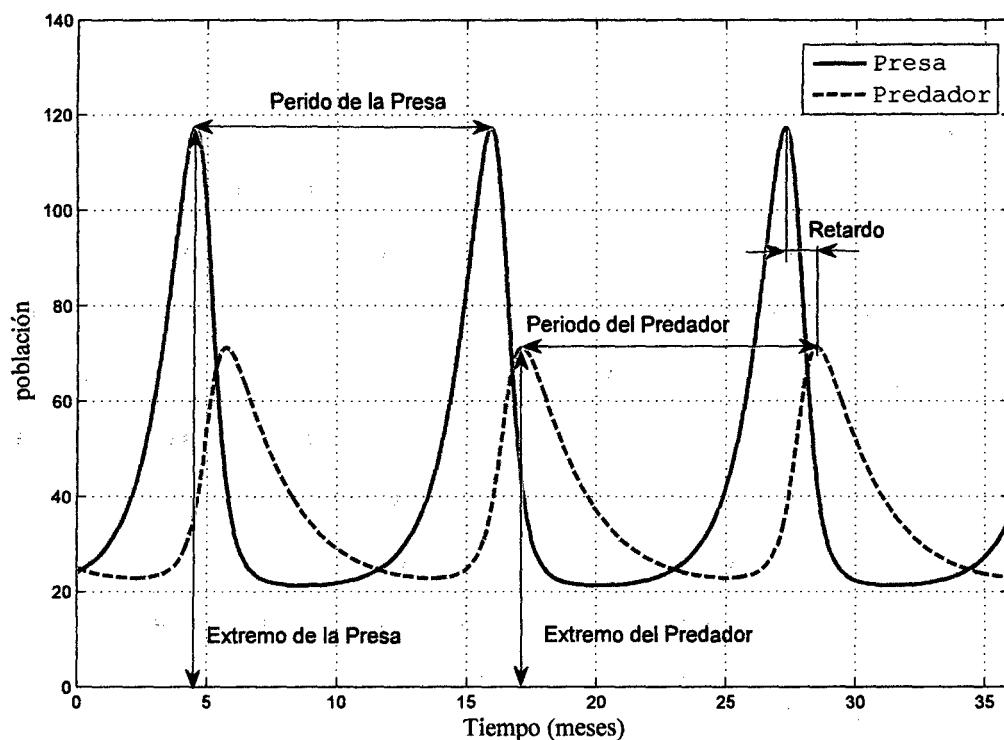


Figura 2.2: Gráfica de la simulación de un oscilador predador presa de la ecuación Lotka-Volterra

#### 2.1.1.1. Red regulatoria p53 de oscilación

En el desarrollo de modelos del núcleo de la red tumor supresor p53, se consideraron diversos tipos de retroalimentación, para reproducir las oscilaciones de las concentraciones de p53 y Mdm2 observadas experimentalmente. Dichos lazos están conformados por retroalimentación negativa con retardo y la retroalimentación negativa-positiva, que usan en el modelado.

El sistema del p53 comparte varias características con sistemas oscilatorios, específicamente con una clase de sistemas dinámicos llamados osciladores de ciclo límite [26]. Los componentes de los osciladores de ciclo límite cambian su concentración o ubicación con un patrón regular repetitivo. En general, los cambios son resistentes a las pequeñas fluctuaciones de la trayectoria temporal

basal. En términos matemáticos, esta trayectoria se conoce como un ciclo límite estable (Figura 2.3.a).

El sistema del p53 también comparte características con el sistema generador de pulsos. En estos sistemas, el estado basal está fuera del ciclo límite y se conoce como un estado de equilibrio estable. Pequeñas fluctuaciones del estado de equilibrio estable pueden converger inmediatamente al punto de equilibrio estable (Figura 2.3.b). Sin embargo, las fluctuaciones del estado de equilibrio que son de tamaño suficiente se amplifican, por lo general a través de una fuerte respuesta positiva. El sistema es excitado y experimenta un gran cambio en las concentraciones de componentes, en relación con la perturbación inicial, antes de que converja al estado de equilibrio (Figura 2.3.b). Se ha propuesto anteriormente que para obtener oscilaciones robustas es necesario agregar un lazo de retroalimentación positiva al lazo de retroalimentación positiva [16, 17].

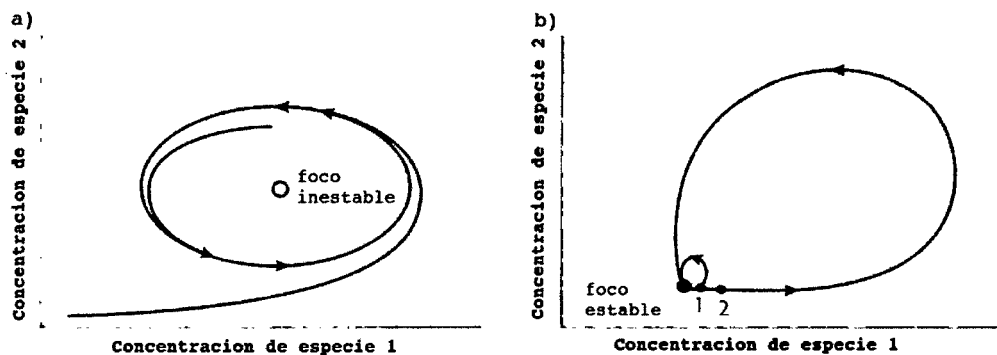


Figura 2.3: Trayectoria de oscilador y generador de pulso a) las trayectorias que conforma una oscilación siguen un camino ciclico llamado ciclo limite(ciclo azul) b) las concentraciones de las proteínas de un generador de pulso permanecen estable en un punto fijo, para pequeños cambios el sistema se estabiliza rápidamente(trayectoria violeta) pero para cambios mayores el sistema toma un trayectoria distante hasta estabilizarse (trayectoria roja).

### 2.1.2. Procesos bioquímicos celulares

Los procesos bioquímicos celulares, son procesos que ocurren dentro de una célula (metabólico, genético, señalamiento y mecanoquímico), donde diferentes

tipos de mediciones son realizadas por proteínas y/o redes de proteínas (ver tabla 2.2). Esta información colectada es procesada para luego tomar decisiones que regulan diversos procesos celulares mediante la expresión de genes (actuadores), cuya complejidad de estos procesos puede ser comparada con lo que ocurren en una mega fábrica.

*Tabla 2.1: Procesos químicos que se realizan en las células.*

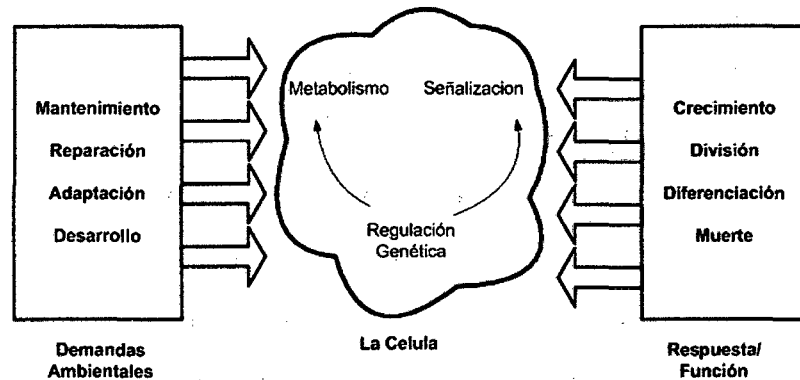
Procesos Bioquímicos	Propósitos de las Reacciones	Mecanismo
Metabólico	Conversión de comida en energía, producción de bloques de construcción	conversión enzimática de metaboloides.
Genético	Replicación de ADN, control de procesos metabólicos según las necesidades celulares, producción de enzimas.	transcripción y traslación.
Señalamiento	Regulación de genética y metabólica en respuesta a las señales extracelulares, diferenciación celular.	fosfororilización
mecano-químico	Transporte de moléculas, quimotaxis	movimiento de energía.

### 2.1.2.1. Redes regulatorias celulares

Las células son probablemente el ejemplo más completo del tráfico de señales en todos los niveles. Ellas están compuestas de millones de moléculas que actúan coherentemente de forma precisa con intercambio de energía e información su medioambiente.

Las funciones celulares son resultado de la interacción molecular, pero no se puede reducir como si se tratara de una propiedad innata o inherente de las moléculas. La organización estructural es generalmente fácil de reconocer a través de la observación (por ejemplo, microscopía). La organización funcional de un sistema se realiza a través de moléculas y esta limitada por la organización celular estructural (Figura 2.8). La búsqueda de principios universales o mecanismos de la biología molecular y celular es en gran medida el estudio de la organización

funcional. En un contexto particular, el rol de una célula puede ser para crecer, para especializarse, para reproducirse, o morir. Todos estos procesos requieren la transferencia de información a través de redes bioquímicas.

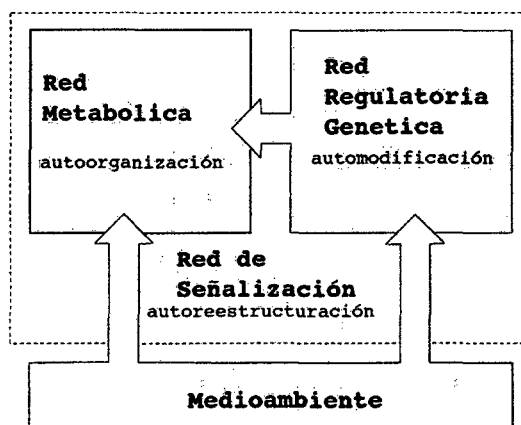


*Figura 2.4: Esquema de la organización funcional de la célula.*

Todos estos procesos moleculares están controlados por las instrucciones embebidas en los genes y toman lugar en diferentes tiempos y espacios involucrando la dirección de las proteínas que actúan como unas nanomáquinas para manejar la dinámica celular. La red celular puede dividirse en 3 mayores sub-redes autorreguladas (Figura 2.9):

- Red metabólica encargada del metabolismo, crea energía en forma de moléculas de ATP() que es usada en el proceso de fosforilización. En este proceso se produce ADP() que es reciclada para nuevamente crear moléculas de ATP.
- Red regulatoria genética encargada de direccionar la creación de proteínas y el uso de nutrientes para producir los bloques de construcción de la célula. Los genes se transcriben a partir del núcleo y se ven afectados positivamente por una secuencia del activador ascendente y negativamente. Ambas secuencias pueden ser ordenados por los complejos de proteínas.

- Red de señalización encargada de transmitir los estímulos externos al núcleo celular, a través de una interacción de proteínas que llevan el mensaje químico.



*Figura 2.5: Las interacciones que toman lugar entre los tres tipos de redes bioquímicas presentes en la célula.*

### 2.1.3. Modelado de reacciones bioquímicas

Estas soluciones se dividen principalmente si tratan con modelos determinísticos o estocásticos. Para la representación gráfica de los circuitos de las redes regulatorias se usó el Markup language [55]. A continuación se explican las reacciones bioquímicas básicas y otras más complejas como las cinéticas de conmutación de Michaelis–Menten, Goldbeter–Koshland y Hill.

### 2.1.3.1. Reacciones bioquímicas básicas

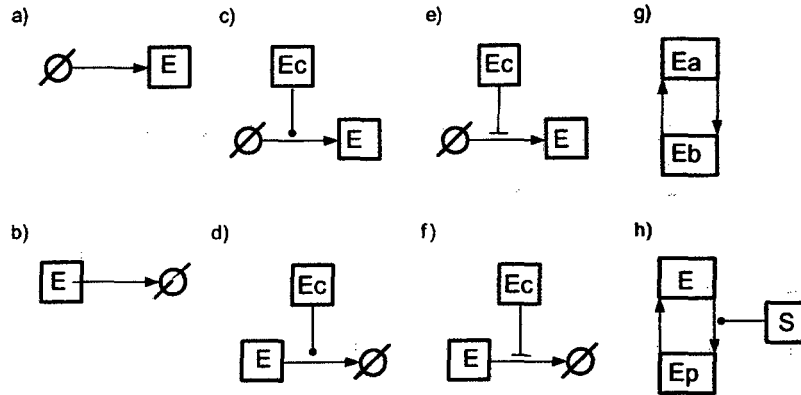


Figura 2.6: Esquema de reacciones bioquímicas básicas a) Transcripción basal b) Degradación natural c) promoción de la transcripción, d) promoción de la degradación, e) inhibición de la transcripción, f) inhibición de la degradación, g) reacción reversible, h) promoción de la fosforilización (activación).

Tabla 2.2: Reacciones bioquímicas básicas

Imagen.	Descripción de la Reacción	Cinética
a)	Transcripción natural de E	$\frac{d[E]}{dt} = +K_b$
b)	Degradación natural	$\frac{d[E]}{dt} = -K_d[E]$
c)	Transcripción de E por Ec	$\frac{d[E]}{dt} = +K_s[Ec]$
d)	Degradación de E por Ec	$\frac{d[E]}{dt} = -K_s[E][Ec]$
e)	Inhibición de la transcripción de E por Ec	$\frac{d[E]}{dt} = +K_{c1} \frac{[Ec][E]}{k_{mc1} + [Ec]}$
f)	Inhibición de la degradación de E por Ec	$\frac{d[E]}{dt} = -K_{c2} \frac{[Ec][E]}{k_{mc2} + [Ec]}$
g)	Reacción reversible	$\frac{d[E]}{dt} = +K_{act}[E] - k_{rev}[E_p]$ $\frac{d[E_p]}{dt} = -K_{act}[E] + k_{rev}[E_p]$
h)	Activación de E a Ep por S	$\frac{d[E]}{dt} = k_{rev} \frac{[E_p]}{k_{m2} + [E_p]} - K_{AS} \frac{[S][E]}{k_{m1} + [E]}$ $\frac{d[E_p]}{dt} = K_{AS} \frac{[S][E]}{k_{m1} + [E]} - k_{rev} \frac{[E_p]}{k_{m2} + [E_p]}$

### 2.1.3.2. Ecuación de Michaelis-Menten

Es un proceso donde el sustrato S se convierte en producto P que es catalizado por la enzima E. La enzima y el sustrato forman un complejo de sustrato-enzima ES que se degrada en el producto P y la enzima E. La dinámica de la cinética se puede presentar de la siguiente forma:  $E + S \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$  Donde  $k_f$ ,  $k_r$ , and  $k_{cat}$  son las velocidades de la reacción. Se supone que la reacción enzimática es irreversible, y que el producto no se liga con la enzima después de la reacción.

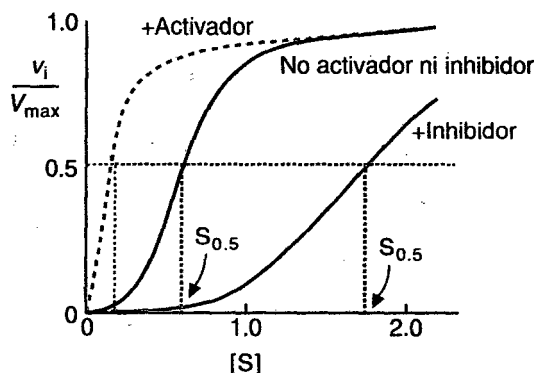


Figura 2.7: Forma de la sigmoide para diferente tipo de configuración del conmutador de Michaelis-Menten.

Las ecuaciones cinéticas son:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_f[E][S] + k_r[ES]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_f[E][S] + [k_r + k_{cat}][ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_f[E][S] - [k_r + k_{cat}][ES] = -E$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES]$$

Siguiendo la aproximación de la reacción que está en estado estacionario, donde la concentración del complejo enzima-sustrato (ES) es pequeña y se mantiene casi constante a lo largo de la reacción enzimática:



$$\frac{d[ES]}{dt} = k_f[E][S] - k_r[ES] - k_{cat}[ES] = 0, \text{ asi: } [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_r + k_{cat}}$$

$$\text{Se define: } K_m = \frac{k_r + k_{cat}}{k_f}, \text{ Entonces: } [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (1)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Donde  $E_0$  es la concentración total de enzima,  $V_{max}$  es la velocidad máxima y  $k_2$  se denomina con frecuencia  $k_{cat}$ .

### 2.1.3.3. Función de Goldbeter – Koshland

Esta función describe una solución para un estado estable de sistema biológico de 2 fases. Este sistema cambia de fase por la acción de 2 enzimas con efectos contrarios, así la proteína  $Z$  pasa a su forma fosforilada  $Z_p$  y viceversa, este proceso se describe donde  $X$  e  $Y$  son las enzimas, así la cinética de Goldbeter–Koshland se describe como:  $Z_p \xrightleftharpoons[Y \uparrow k_2]{X \downarrow k_1} Z$  y la función de Goldbeter–Koshland como:

$$x = \frac{R}{R_T} = G(v_1, v_2, J_1, J_2) = \frac{2v_1 J_2}{B + \sqrt{B^2 - 4(v_2 - v_1)v_1 J_2}}. \quad (2.2)$$

Donde:

$$v_1 = k_1[X]; \quad v_2 = k_2[Y]; \quad J_1 = \frac{K_{M1}}{[Z]_0}; \quad J_2 = \frac{K_{M2}}{[Z]_0} \text{ y } B = v_2 - v_1 + J_1 v_2 + J_2 v_1$$

### 2.1.3.4. Ecuación de Hill

Muchas enzimas muestran un comportamiento mucho más complicado que es considerado en la derivación de la ecuación de Michaelis-Menten. Las velocidades de reacción correspondientes pueden ser descritas por la ecuación de

Hill. Se describe la fracción de la macromolécula saturada por el ligando (ión o molécula que se une a un átomo de metal central para formar un complejo de coordinación) como una función de la concentración de ligando, sino que se utiliza para determinar el grado de cooperatividad de la unión del ligando a la enzima o receptor.

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_A)^n + [L]^n} \quad (2.3)$$

Donde :

- $\frac{d[S]}{dt}$  Es la fracción del aumento del producto S.
- $[L]$  Es la concentración del reactivo L
- $K_d$  Es la constante de disociación aparente deriva de la ley de acción de masas (constante de equilibrio de disociación)
- $K_A$  Es la concentración del ligando que produce la ocupación media (media ligando concentración de ocupación de los sitios de unión), que también es la constante de disociación microscópico.
- $n$  Es el coeficiente de Hill que describe la cooperatividad (o posiblemente otras propiedades bioquímicas, dependiendo del contexto en el que se utiliza la ecuación de Hill)

Cuando sea apropiado, el valor del coeficiente de Hill describirá la cooperatividad de la unión del ligando de la siguiente manera:

- $n > 1$  Implica la unión Positiva de cooperación : Una vez que una molécula de ligando se une a la enzima, su afinidad por otras moléculas de ligando aumenta.

- $n < 1$  Implica la unión negativa de cooperación : Una vez que una molécula de ligando se une a la enzima, su afinidad por otras moléculas de ligando disminuye.
- $n = 1$  Implica la unión no cooperativa : La afinidad de la enzima por una molécula de ligando no depende de si o no otras moléculas de ligando están ya obligado.

### 2.1.3.5. Sistemas de retroalimentación en reacciones bioquímicas

La retroalimentación significa que el componente de respuesta influye en su propia producción o degradación. La retroalimentación como positivo o negativo, dependiendo si la respuesta es amplificada o suprimida. La retroalimentación positiva se puede realizar a través de la aceleración de la producción y la inhibición de la degradación. En tanto que La retroalimentación negativa, debilita la señal de respuesta a través de La inhibición de la producción y la aceleración de la degradación.

En la naturaleza en diferentes mecanismos de retroalimentación hay circuitos bioquímicos que actúan como dispositivos electrónicos tales como (Figura 2.12):

- Los conmutadores (Figura 2.12a y Figura 2.12b) tienen múltiples estados de equilibrio, funcionan como control lógico, interacción de señal y memoria.
- Los controladores (Figura 2.12c) son sistemas con entradas y salidas no lineales, sirven para regulación continua de la retroalimentación.
- Los osciladores (Figura 2.12d y Figura 2.12e) son sistemas de ciclo límite sirven como relojes para transcripción periódica de la señal a través de sincronización y/o llevado de la señal.

- Los filtros amplificadores (Figura 2.12e Figura 2.12g) amplifican la señal de potencia intermedia.
- Los filtros de ruido (Figura 2.12f) regulan las señales de ruido.

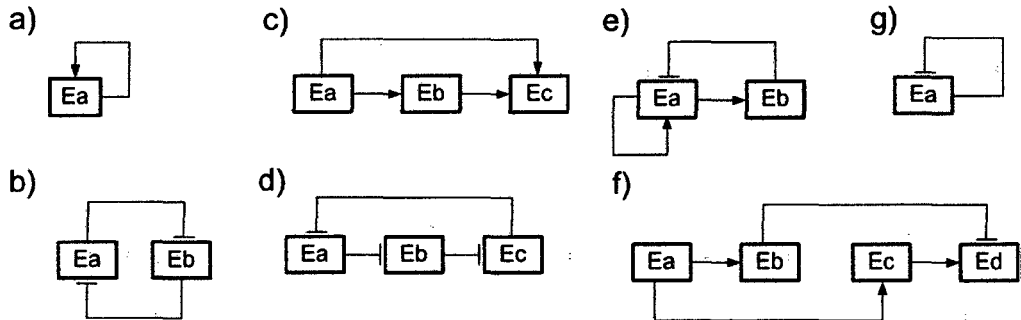


Figura 2.8: a) conmutadores, b) controladores, c) osciladores, d) Filtros Amplificadores e) Filtros de ruido

## 2.2. Antecedentes del proyecto

Una serie de aportes importantes en el estudio de la dinámica de la Red del p53 se han dado en últimos 10 años ( ver en la tabla 2.1).

Tabla 2.3: Últimas publicaciones relevantes de la red oscilatoria p53-Mdm2

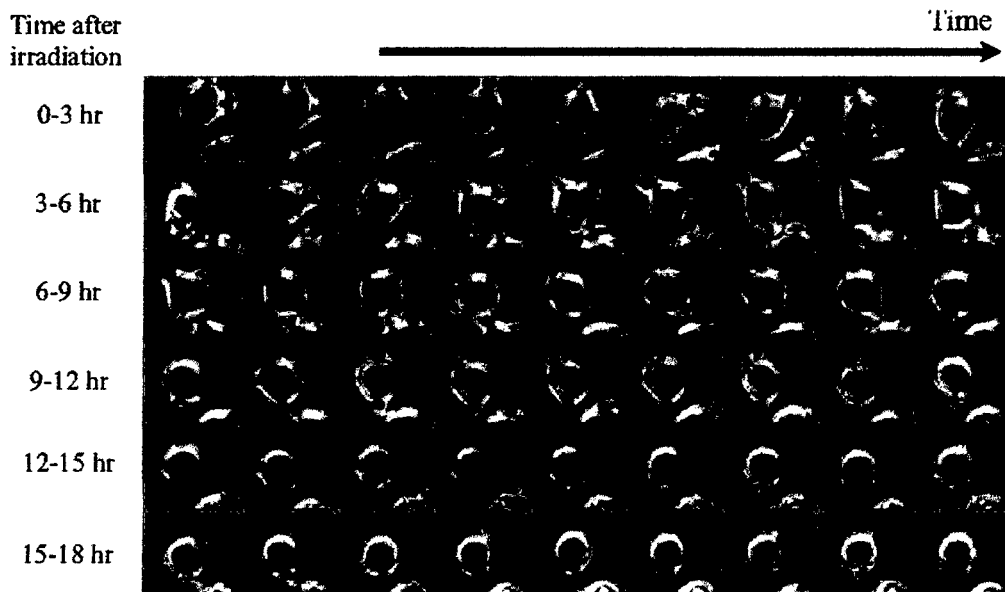
Artículo Científico	Autor principal	Año
p53 Dynamics Control Cell Fate	Galit Lahav	2012
The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells	Galit Lahav	2009
Recurrent Initiation: A Mechanism for Triggering p53 Pulses in Response to DNA Damage	Galit Lahav	2008
Oscillations and variability in the p53 system	Uri Alon	2006
Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells	Uri Alon	2004

### 2.2.1. Resumen del estado del arte de la red p53

El principal regulador del p53 es el Mdm2, que forma un lazo de retroalimentación negativo con el p53. Lahav et al. [3] al analizar la variación de las concentraciones de las proteínas p53 y Mdm2, en respuesta a un daño en la célula, observó oscilaciones donde el número de dichas oscilaciones era proporcional al daño recibido por la célula. La altura y duración de cada oscilación era fija y no dependía de la intensidad de daño recibido por la célula. Además se observó que las curvas de oscilación del p53 y Mdm2 presentan siempre un cierto retardo. Se cree que las oscilaciones reflejan esfuerzos repetitivos de la red p53 por reparar la célula y que la red p53 cuenta el número de oscilaciones, más allá de un determinado número de oscilaciones decide efectuar la apoptosis (muerte celular).

Uri Alon y Arnold Levine [45] mostraron que en poblaciones de células el p53 y el Mdm2 presentan oscilaciones amortiguadas en respuesta a un daño celular por radiación gamma. Se ha encontrado experimentalmente por análisis de fluorescencia ligado a las proteínas p53 y Mdm2, que el 60% de las células expuestas a radiación gamma, mostraron oscilaciones no amortiguadas con periodos de  $5.5 \pm 1.5$  y retardo de  $2 \pm 0.5$ , pero con mayor variación de las amplitudes que del periodo [18]. En este caso la altura y duración de cada oscilación era proporcional al daño recibido por la célula.

Usualmente la proteína p53 durante condiciones normales mantiene niveles bajos de concentración. Principalmente a través de un lazo de realimentación negativa con el Mdm2. El p53 regula positivamente el Mdm2 activando su transcripción. A su vez el Mdm2 regula el p53 negativamente promoviendo su ubiquitinación y degradación. Bajo varias condiciones de tensión, el p53 es activado a través de diversos mediadores activación. La mayoría de estos mediadores producen la modificación de postranslacional del p53 que afecta la interacción de p53 - Mdm2.



*Figura 2.9: Evolución de las oscilaciones de p53-Mdm2 a través de las imágenes de microscopio de fluorescencia, la evolución de la concentraciones de p53 se muestran en rojo mientras que las de Mdm2 se muestran en verde, cada foto se muestra en un lapso de 20 minutos.*

El p53 es catalizado en respuesta a muchas formas de la tensión celular, incluyendo varias clases de daño del ADN [46]. La presencia de la tensión es detectada y transmitida al p53 por el movimiento de transductores de señal que transcripcionalmente modifican el p53 activándolo y afectando su estabilidad. Luego de la activación, el p53 regula la transcripción de cientos de genes [47]. Éstos genes cifran proteínas con un amplio rango de funciones, incluyendo la de inhibición de la evolución del ciclo celular, la activación de la apoptosis y la regulación del p53 directamente o a través de transductores de señal de retroalimentación negativa [47] (Figura 2.2).

La activación el p53 regula la transcripción de numerosos genes (ver Figura 2.2). Algunas señales del p53 actúan como reguladores de retroalimentación, modificando la actividad de las quinazas y la estabilidad del p53. Las otras señales del p53 son reguladores de respuesta que provocan resultados celulares específicos, incluyendo la detención del ciclo celular y la apoteosis.

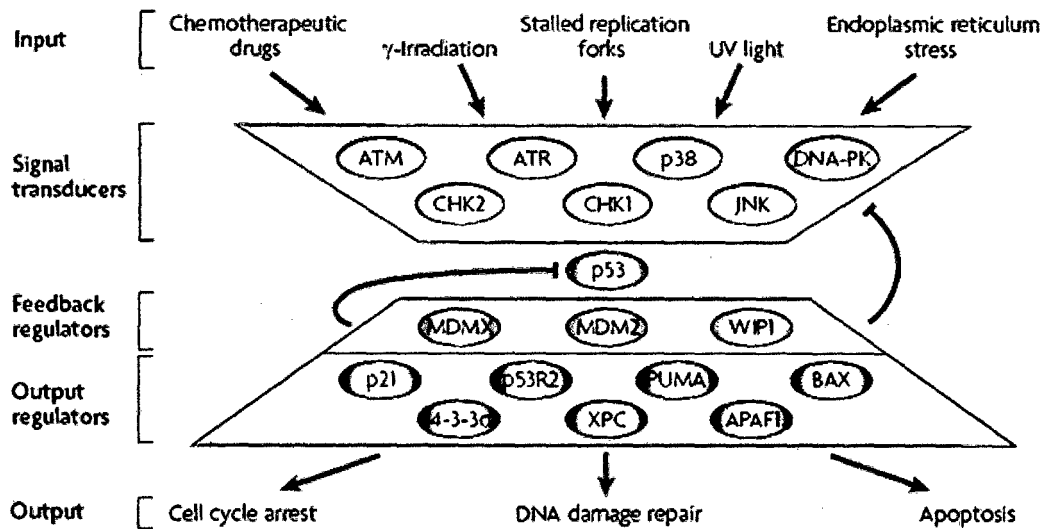


Figura 2.10: Red de la proteína p53. Las señales de estrés genético (entradas) son detectadas y translucidas al p53 a través de algunas quinazas (transductores de señal). Los nombres de las proteínas mostradas son los siguientes: APAF1 (apoptotic protease-activating factor), ATM(ataxia telangiectasia mutated), ATr(ataxia telangiectasia and rad3 related), CHK (checkpoint kinase), DNA-PK, DNA-dependent protein kinase), JNK (JUN N-terminal kinase), p53r2 (p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2-like protein) y Uv (radiación ultravioleta).

### 2.2.1.1. Reparación del daño genético

El daño del ADN inicia una serie de pulsos del p53. La explicación más simple de estos pulsos es que son oscilaciones intrínsecas del lazo de realimentación negativa del p53-Mdm2. Sin embargo, resultados recientes [REF], muestran que este mecanismo simple es insuficiente para explicar los pulsos del p53. Lahav muestra que las pulsaciones del p53 son impulsadas por las pulsaciones exteriormente sobre las quinazas de señalización de activación, ATM(ataxia telangiectasia mutated) - CHK2(checkpoint kinase). También en la reacción negativa entre el p53 y el ATM, vía Wip1, es esencial para mantener la forma uniforme de los pulsos del Lahav et al. [3]. Por lo cual los, pulsos de p53 resulten de la iniciación repetida por ATM, que es reactivado por el daño del ADN persistente. Estos estudios muestran que la dinámica del p53 en respuesta al daño genético es formada por una combinación de dos retroalimentaciones negativas, incluyendo

la reacción negativa entre p53 - MDM2 y la reacción negativa entre p53, ATM y CHK2 mediados por el WIP1 (Figura 2.4). Un cuidadoso análisis de la dinámica de estas dos retroalimentaciones, reveló que los reguladores de activación ATM y el CHK2 mostraban las oscilaciones que son requeridas por la dinámica del p53 [2].

El daño en el ADN produce la autofosforilización rápida y la activación del ATM. El ATM fosforiliza el CHK2 que fosforiliza el p53, colaborando más directamente en la estabilización del p53. Después del daño de ADN causado por la irradiación-gama, la función del p53 y Mdm2 se repite. Lahav mostró en los experimentos de células individuales, que las células individuales muestran varios pulsos del p53 de amplitud y de duración fija [45]. La apariencia de las oscilaciones amortiguadas resulta al determinar el promedio de los pulsos de una población de células.

Sin embargo un estudio in vivo reciente mostró pulsos de la actividad del p53 en de un ratón transgénico, esto sugiere que la dinámica no está limitada al cultivo de células cancerígenas [48].

Un estudio reciente mostró que el Wip1 también estabilizaba el Mdm2 desfosforilandolo sobre Ser395[30]. Ya que los parámetros cinéticos exactos de las interacciones dentro del sistema aún no son conocidos. Un modelo más complicado incluye las interacciones directas entre Wip1 y p53 [17] y entre Wip1 y Mdm2 [30], puede dar el mismo aumento del comportamiento dinámico que resulta del modelo simplificado de Lahav. Lahav mostró la recurrente activación del ATM y el CHK2 resultaba en un pulso completo del p53 [2], fuera de su estado fundamental, esto sugiere que podría ser un mecanismo estabilización que controlaría los ritmos del p53. El hecho de que un lazo de realimentación negativo simple puede generar fluctuaciones sostenidas, pero no la excitabilidad. Esto sugiere la existencia de una realimentación positiva en la red que controla niveles del p53.



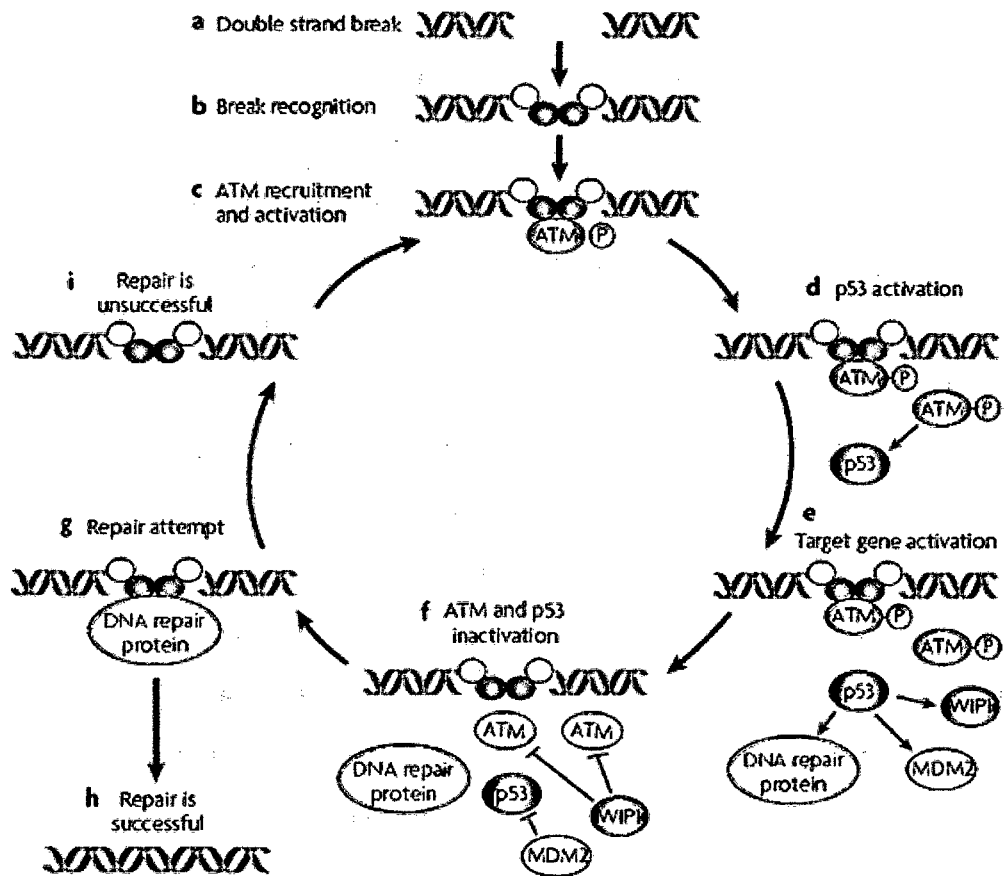
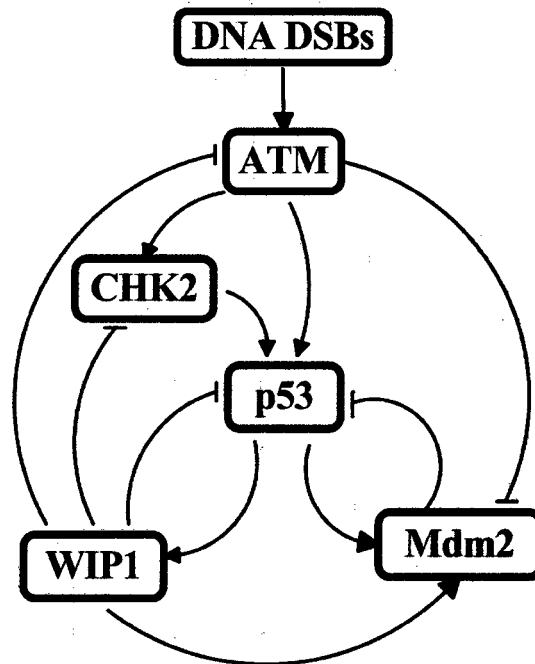


Figura 2.11: Modelo del rol potencial de los pulsos de ATM en la reparación del ADN. a) Cuando el rompimiento del ADN ocurre, b) varias proteínas forman un complejo en el sitio de rompimiento, c) luego, el ATM es activado por las proteínas de reconocimiento de rompimiento. d) Una vez activado, el ATM estabiliza el p53 y provoca su acumulación. e) El p53 luego cataliza la expresión de algunos genes, incluyendo genes de reparación del ADN y del inhibidor del ATM, el WiP1. f) La inhibición del ATM por el WiP1 podría resultar en la disociación del ATM de la ruptura, g) permitiendo el acceso al rompimiento. h) Aquí la reparación del ADN es exitosa, por lo cual el ATM no sería activado otra vez, y ya no activaría el p53. i) Si el rompimiento del ADN no es reparado, una nueva secuencia de activación del ATM comenzaría, resultando en un nuevo pulso del ATM y el p53.

Algunas realimentaciones positivas han sido identificadas en la red del p53[33], pero estudios adicionales son requeridos para determinar si éstos o la realimentación positiva aún oculta son importantes en el desarrollo de la respuesta del p53 para el daño en el ADN. Queda como pregunta: ¿el sistema de p53 funciona como un oscilador de ciclo de límite o como un generador de pulso? Como explica Lahav una posible razón de los pulsos del ATM [2] son los pulsos

que son importantes para la reparación correcta del daño del ADN, y los pulsos del p53 son solamente un fenómeno superficial de este comportamiento. Después de la activación del ATM, ocurre un pulso del p53 [2], resultando en la transcripción de algunos genes de transcripción incluyendo proteínas de reparación del ADN y los reguladores de reacción negativa. El WIP1 es un regulador negativo que tiene un papel importante en inhibir el ATM [49], resultando en un pulso de activación del ATM [2]. Lahav hipotetiza que la inhibición del ATM podría resultar en la disociación del ATM al daño genético, así permite que las proteínas accedan a la reparación del daño de la cadena de ADN[1] (Figura 2.3).

El lazo de retroalimentación negativa entre el p53 y el Mdm2 se compone de la interacción entre dos ramas con diferente tiempo de respuesta: una rama positiva lenta (de transcripción) y una rama negativa rápida (de interacción proteína-proteína), ver Figura 6A. Modelos matemáticos predicen que este tipo de retroalimentación puede exhibir un comportamiento oscilatorio [48], el cual sería una explicación simple para los pulsos reiterados. Lahav [47] observó que las oscilaciones eran intrínsecas al lazo p53/Mdm2 (Figura 6A). Otros modelos incluyen características adicionales, tales como una retroalimentación positiva del p53 [13], o suponer una constante alta para los niveles de activación de las proteínas de señalización (ATM y CHK2) del daño del ADN, para tener oscilaciones sostenidas [14,46]. Otra propuesta, de Uri Alon y sus colegas [3], sugiere que el p53 podría depender de las oscilaciones de los elementos de señalización (ATM y CHK2) referidos al daño del ADN (Figura 2.4).



*Figura 2.12: Circuito del oscilador del p53-Mdm2 con los conmutadores acoplados de ATM-CHK2 y el regulador Wip1. En respuesta al daño en el ADN, el ATM es activado, y activa el CHK2, ambos catalizan el p53 afectando su interacción con uno de sus genes de señalización que es el Mdm2. P53 también cataliza la transcripción del fosfato que Wip1 regula negativamente el circuito entero mediante la desfosforilización del ATM, CHK2, p53 y Mdm2. Las líneas sólidas representan las interacciones proteína a proteína.*

### 2.3. Formulación del un modelo de oscilador de la red p53

La red de regulación p53 es altamente compleja e incluye varios cientos de genes y procesos [19, 20]. De estos procesos se conoce solo una parte de las reacciones, pero se desconoce el valor real de los parámetros y su rango, ya que en las condiciones naturales estos parámetros tienden a variar. Es necesario tener un modelo simplificado de la red principal del p53, que pueda tener una adecuada interacción con la red de activación (ATM y CHK2), así como con sus reguladores (Mdm2 y Wip1) y la reparación del daño genético.

### 2.3.1. Modelos de la red p53-Mdm2 básicos

Para el estudio de la red principal del p53 se tomo como base dos modelos sencillos, uno desarrollado por Chickarmane [17] y otro por Ciliberto [25], considerando los datos experimentales de Zatorsky et al. [18], se propone un modelo similar a otros modelos [16, 22, 23]. En el modelo de Chickarmane y el propuesto el sistema se comporta como oscilador para ATM fosforilado, es decir cuando el sistema esta activado funciona como oscilador. En tanto que para ATM no fosforilado, el sistema debe estar en estado estable (homeostasis), es decir el sistema mantiene las concentraciones de las especies constantes, de tal manera que la concentración del Mdm2 sea mayor a la del p53.

#### 2.3.1.1. Modelo de Chickarmane

En el modelo de Chickarmane[17] son consideradas 2 especies: p53 y Mdm2. Este modelo de oscilador se activa por respuesta a la fosforilación del ATM, lo que convierte ATM en  $ATM_p$ . la mayor concentración de  $ATM_p$  promueve la acumulación del p53. Así mismo el p53 promueve su auto transcripción (retroalimentación positiva). Además el p53 promueve la transcripción del Mdm2, el cual promueve la degradación del p53 (retroalimentación negativa).

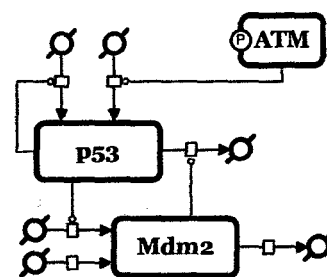


Figura 2.13: Diagrama de la red del p53 del modelo de Chickarmane.

Tabla 2.4: Especies de estudio de la red p53-Mdm2 en el modelo de Chickarmane

Nombre de la Especie	variable	concentración
p53 total(inactivo y activo)	p53	[p53]
Mdm2 nuclear	Mdm2	[Mdm2]

Las ecuaciones del modelo del oscilador p53 de Chickarmane son:

$$\frac{d[p53]}{dt} = a_0[ATM_p] + a_1 \frac{[p53]^4}{k_1 + [p53]^4} - (g_1[Mdm2] + g_2)[p53] \quad (2.4a)$$

$$\frac{d[Mdm2]}{dt} = a_2 + a_3 \frac{[p53]^4}{k_2 + [p53]^4} - g_3[Mdm2] \quad (2.4b)$$

Tabla 2.5: Reacciones de la red p53-Mdm2 del Modelo de Chickarmane

Núm.	Descripción de la Reacción	Cinética
Re1.	Transcripción del p53 por ATM <sub>p</sub>	$a_0[ATM_p]$
Re2.	Auto Transcripción del p53	$a_1 \frac{[p53]^4}{k_1 + [p53]^4}$
Re3.	Degradación del p53	$(g_1[Mdm2] + g_2)[p53]$
Re4.	Transcripción basal del Mdm2	$a_2$
Re5.	Transcripción del Mdm2 por p53	$a_3 \frac{[p53]^4}{k_2 + [p53]^4}$
Re6.	Degradación natural de Mdm2	$g_3[Mdm2]$

### 2.3.1.2. Modelos de Ciliberto

El modelo de la red p53 de Ciliberto [25] considera 4 especies: p53 inactivo, p53 activo (fosforilado), Mdm2 citoplasmático y Mdm2 nuclear. El sistema se comporta como oscilador cuando aparece daño genético ( $DMG > 0$ ). En tanto que para cuando no hay daño genético ( $DMG = 0$ ), el sistema debe estar en estado estable (homeostasis), es decir mantener las concentraciones de las especies constantes, de tal manera que la concentración del Mdm2 sea mayor a la del p53.

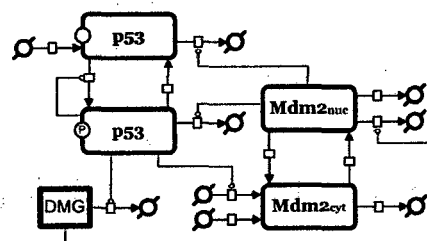


Figura 2.14: Diagrama de la red del p53 del modelo de Ciliberto.

Tabla 2.6: Especies variables de la red p53-Mdm2 en el modelo de Ciliberto

Nombre de la Especie	variable	concentración
p53 inactivo	p53	$[p53]$
p53 activo	p53 <sub>p</sub>	$[p53_p]$
p53 inactivo y activo	p53 <sub>total</sub>	$[p53_{total}]$
Mdm2 citoplasmático	Mdm2 <sub>cit</sub>	$[Mdm2_{cit}]$
Mdm2 nuclear	Mdm2 <sub>nuc</sub>	$[Mdm2_{nuc}]$

Las ecuaciones del modelo del oscilador p53 de Ciliberto son:

$$\begin{aligned} \frac{d[p53]}{dt} &= k_{1s53} + k_{2s53} \frac{[p53_p]^4}{J_{s53}^4 + [p53_p]^4} + k_{in}[p53_p] \\ &\quad - k_{1ac}[p53] - k_{2ac} \frac{[p53_p]^4}{J_{ac}^3 + [p53_p]^3} \\ &\quad - (k_{1d53} + k_{2d53}FGK)[p53] \end{aligned} \quad (2.5a)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[p53_p]}{dt} &= k_{1ac}[p53] + k_{2ac} \frac{[p53_p]^4}{J_{ac}^3 + [p53_p]^3} - k_{in}[p53_p] \\ &\quad - (k_{1d53} + k_{2d53}FGK)[p53_p] \end{aligned} \quad (2.5b)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Mdm2_{cit}]}{dt} &= k_{1s2} + k_{2s2} \frac{[p53_p]^4}{J_{s2}^4 + [p53_p]^4} + k_o[Mdm2_{nuc}] \\ &\quad - k_i[Mdm2_{cit}] - k_{2d2}[Mdm2_{cit}] \end{aligned} \quad (2.5c)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Mdm2_{nuc}]}{dt} &= k_i[Mdm2_{cit}] - k_o[Mdm2_{nuc}] \\ &\quad - k_{1d2}(1 + [DMG])[Mdm2_{nuc}] \end{aligned} \quad (2.5d)$$

Donde  $FGK = G([Mdm2_{nuc}], \theta, J/[p53_{total}])$  es la función de Goldbeter-Koshland.

Tabla 2.7: Detalle de las reacciones de la red p53-Mdm2 en el modelo de Ciliberto.

Núm.	Descripción de la Reacción	Cinética
Re1.	Trascrición basal del p53	$k_{1s53}$
Re2.	Activación natural de p53	$k_{1ac}[p53]$
Re3.	Activación natural de p53 por p53 <sub>p</sub>	$k_{2ac} \frac{[p53_p]^4}{J_{s3}^3 + [p53_p]^3}$
Re4.	Desactivación natural	$k_{in}[p53_p]$
Re5.	Degradación natural y por Mdm2 <sub>nuc</sub> del p53	$(k_{1d53} + k_{2d53}FGk)[p53]$
Re6.	Degradación natural y por Mdm2 <sub>nuc</sub> del p53 <sub>p</sub>	$(k_{1d53} + k_{2d53}FGk)[p53_p]$
Re7.	Trascrición del Mdm2 <sub>cit</sub> por p53 <sub>p</sub>	$k_{1s2} + k_{2s2} \frac{[p53_p]^4}{J_{s2}^4 + [p53_p]^4}$
Re8.	Entrada de Mdm2 <sub>cit</sub> al Núcleo	$k_i[Mdm2_{cit}]$
Re9.	Salida de Mdm2 <sub>nuc</sub> del Núcleo	$k_o[Mdm2_{nuc}]$
Re10.	Degradación natural de Mdm2 <sub>cit</sub>	$k_{2d2}[Mdm2_{cit}]$
Re11.	Degradación natural de Mdm2 <sub>nuc</sub>	$k_{1d2}(1 + [DMG])[Mdm2_{nuc}]$

### 2.3.2. Propuesta de modelo de la red p53-Mdm2

El modelo de la red p53 – Mdm2 que se propone consta de cuatro especies de proteínas las mismas que el modelo de Zatorsky pero se diferencia a los anteriores, en que las oscilaciones comienzan cuando el ATM-p promueve la activación de p53(R3) [52] y ATM-p promueve la degradación de Mdm2 Nuclear(R14)[51]. Así la estructura del modelo

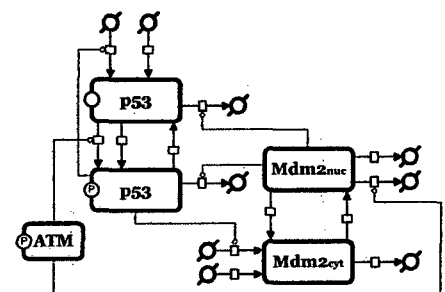


Figura 2.15: Diagrama de la red p53 propuesta.



consta de un lazo de retroalimentación positivos(reacciones 2 3 4 y 9) y un lazo de retroalimentación negativo (reacciones 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10) y el p53 activo promueve la transcripción de mdm2 citoplasmático(R9)[53] y la transcripción de p53[17], el Mdm2 al pasar a la forma nuclear promueve la degradación del p53 inactivo(R6) y activo(R7)[54]. Las reacciones están detalladas a continuación.

$$\begin{aligned} \frac{d[p53]}{dt} = & k_{1s53} + k_{2s53} \frac{[p53_p]^4}{J_{s53}^4 + [p53_p]^4} + k_{in} \frac{[p53_p]}{k_{m2} + [p53_p]} \\ & - a_f \frac{[ATM_p][p53]}{k_{m1} + [p53]} - k_{1ac}[p53] - (g_{in} + g_{in1}[Mdm2_{nuc}])[p53] \end{aligned} \quad (2.6a)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[p53_p]}{dt} = & a_f \frac{[ATM_p][p53]}{k_{m1} + [p53]} + k_{1ac}[p53] \\ & - k_{in} \frac{[p53_p]}{k_{m2} + [p53_p]} - (g_{ac} + g_{ac1}[Mdm2_{nuc}])[p53_p] \end{aligned} \quad (2.6b)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Mdm2_{cit}]}{dt} = & k_{1s2} + k_{2s2} \frac{[p53_p]^3}{J_{s2}^3 + [p53_p]^3} + k_o[Mdm2_{nuc}] \\ & - k_i[Mdm2_{cit}] - k_{2d2}[Mdm2_{cit}] \end{aligned} \quad (2.6c)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Mdm2_{nuc}]}{dt} = & k_i[Mdm2_{cit}] - k_o[Mdm2_{nuc}] \\ & - k_{1d2}[Mdm2_{nuc}] - k_{3d2} \frac{[ATM_p][Mdm2_{nuc}]}{k_{md} + [ATM_p]} \end{aligned} \quad (2.6d)$$

Tabla 2.8: Reacciones de la red p53-Mdm2 en el Modelo propuesto

Núm.	Descripción de la Reacción	Cinética
Re1.	Trascripción basal del p53	$k_{1s53}$
Re2.	Trascripción de p53 por p53 <sub>p</sub>	$k_{2s53} \frac{[p53_p]^4}{J_{s53}^4 + [p53_p]^4}$
Re3.	Activación natural y de p53	$k_{1ac}[p53]$
Re4.	Activación de p53 por ATM <sub>p</sub>	$a_f \frac{[ATM_p][p53]}{k_{m1} + [p53]}$
Re5.	Desactivación natural	$k_{in} \frac{[p53_p]}{k_{m2} + [p53_p]}$
Re6.	Degradación natural y por Mdm2 <sub>nuc</sub> del p53	$(g_{in} + g_{in1}[Mdm2_{nuc}])[p53]$
Re7.	Degradación natural y por Mdm2 <sub>nuc</sub> del p53 <sub>p</sub>	$(g_{ac} + g_{ac1}[Mdm2_{nuc}])[p53_p]$
Re8.	Trascripción basal del Mdm2 <sub>cit</sub>	$k_{1s2}$
Re9.	Trascripción del Mdm2 <sub>cit</sub> por p53 <sub>p</sub>	$k_{2s2} \frac{[p53_p]^3}{J_{s2}^3 + [p53_p]^3}$
Re10.	Entrada de Mdm2 <sub>cit</sub> al Núcleo	$k_i[Mdm2_{cit}]$
Re11.	Salida de Mdm2 <sub>nuc</sub> del Núcleo	$k_o[Mdm2_{nuc}]$
Re12.	Degradación natural de Mdm2 <sub>cit</sub>	$k_{2d2}[Mdm2_{cit}]$
Re13.	Degradación natural de Mdm2 <sub>nuc</sub>	$k_{1d2}[Mdm2_{nuc}]$
Re14.	Degradación de Mdm2 <sub>nuc</sub> por ATM <sub>p</sub>	$k_{3d2} \frac{[ATM_p][Mdm2_{nuc}]}{k_{md} + [ATM_p]}$

## Capítulo 3

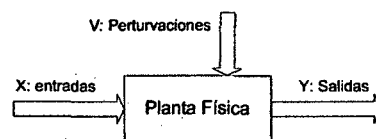
# Análisis de Sensibilidad

Los sistemas biológicos protegen su información genética y su modo de vida contra las perturbaciones. Así mismo, también son capaces de adaptarse a los cambios, sensar y procesar señales internas y externas, también reaccionar con precisión al tipo o fuerza de perturbación. La sensibilidad caracteriza la habilidad de organismos vivos para un adecuada reacción sobre ciertos estímulos. La sensibilidad es comúnmente definida como la razón de cambio entre una propiedad debido al cambio de una variable.

El análisis de sensibilidad se puede abordar de manera cuantitativa o cualitativa. En el análisis de sensibilidad el interés es saber como los parámetros de las velocidades de las reacciones influyen en la dinámica de la concentración de las especies (proteínas).

### 3.1. Definición de sensibilidad

La sensibilidad es la cuantificación de como la incertidumbre en la salida de un modelo numérico puede proporcionar diferentes fuentes de incertidumbre en la entrada del modelo según Saltelli et al[41]. Generalmente el análisis de sensibilidad es considerado de manera local, cómo la variación de la salida entre



*Figura 3.1: Esquema de un planta física.*

la variación de una entrada así:  $S_j = \frac{\partial Y}{\partial X_j}$ , donde Y es la salida y  $X_j$  es un factor de entrada. Pero el interés radica en la sensibilidad paramétrica que es:  $S_i = \frac{\partial Y}{\partial P_i}$  y donde  $P_i$  es un parámetro, en este contexto el análisis de sensibilidad es orientado a determinar que factor necesita más una mejor determinación y la identificación de los procesos críticos el circuito de funcionamiento.

#### 3.1.1. Sensibilidad local

El análisis de sensibilidad local se da cuando un parámetro se varía a la vez dentro de un pequeño intervalo alrededor de su valor nominal. Esto se repite con la misma perturbación para todos los parámetros. El enfoque de la sensibilidad local es posible cuando la variación alrededor del punto medio de los factores de entrada es pequeña. En general, la entrada-salida de relación se supone que es lineal, pero que en la realidad los sistemas biológicos son no lineales.

#### 3.1.2. Sensibilidad global

El objetivo en el análisis de sensibilidad global es cuantificar la incertidumbre en la salida por variación del valor de cada factor de entrada. Por

las distribuciones que representan el grado de conocimiento de cada parámetro proporciona la entrada para el análisis. El análisis de sensibilidad se considera global cuando a) se varían los parámetros simultáneamente y b) la sensibilidad se mide en todo el rango del parámetro [41].

## 3.2. Análisis de control metabólico

Uno de los métodos que se han desarrollado para el estudio de la sensibilidad de reacciones bioquímicas es el análisis de control metabólico (ACM) [11] cuyos resultados se han extendido a sistemas oscilatorios [12]. Otros métodos han sido propuestos para estudiar sistemas oscilatorios como del ciclo circadiano [13, 14].

El ACM fue desarrollado originalmente para describir el control en las vías metabólicas, pero posteriormente se amplió para describir la señalización y las redes genéticas. El coeficiente de control referente a los procesos metabólicos respecto a los parámetros de las reacciones es:

$$C_{v_i}^J = \left( \frac{dJ}{dp} \frac{p}{J} \right) / \left( \frac{dv_i}{dp} \frac{p}{v_i} \right) = \frac{d \ln J}{d \ln v_i}$$

El análisis de control metabólico (ACM) es un método matemático para describir procesos metabólicos, de señalización y rutas genéticas. El ACM cuantifica cómo las variables, tales como los flujos y las concentraciones de las especies, dependen de los parámetros de red. En particular, el ACM es capaz de describir cómo las propiedades dependientes de la red (llamados coeficientes de control) dependen de las propiedades locales llamados elasticidades [12].

Sin embargo este método analítico cuantitativo no ilustra como las propiedades del sistema de periodo, extrema y retardo varían independientemente del tiempo.

### 3.3. Método desarrollado

Se ha desarrollado un método numérico sencillo para medir la sensibilidad global de osciladores con respecto a sus parámetros. El método consiste en hallar las características del sistema de periodo, extremo y retardo (Figura 3.2)

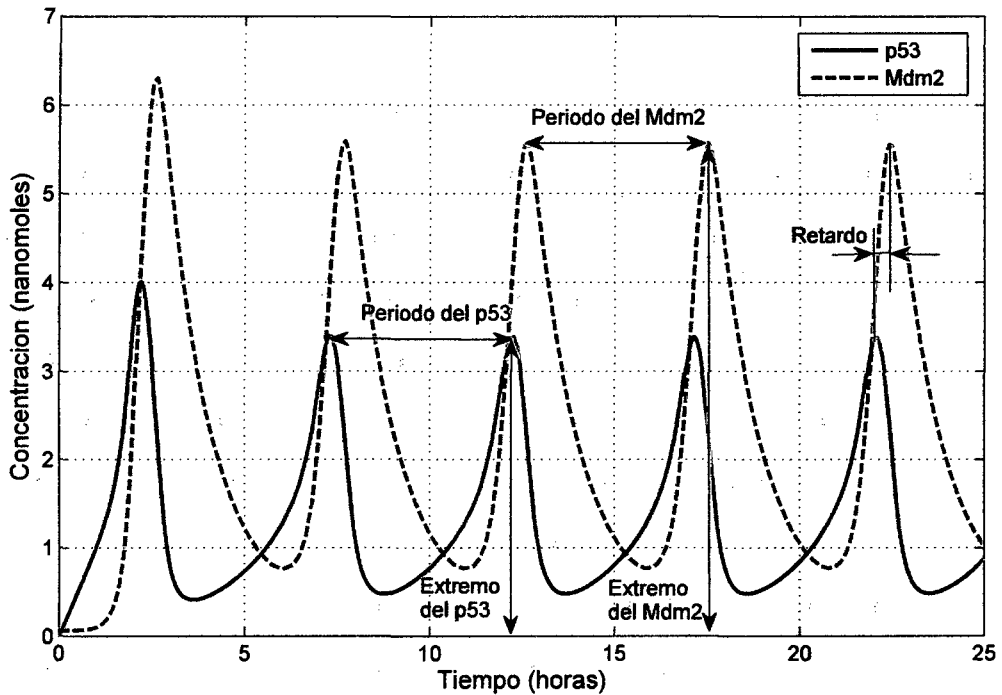


Figura 3.2: Indicación de las propiedades del oscilador p53-mdm2 en la simulación del modelo de Chickarmane.

Tabla 3.1: Propiedades de la dinámica del sistema de la red p53-Mdm2

Propiedad	Descripción	variable
Extremo del p53	Concentración periódica más alta (pico) de p53.	E[p53]
Extremo del Mdm2	Concentración periódica más alta (pico) de Mdm2.	E[Mdm2]
Período de p53	Tiempo de repetición de picos de [p53].	P[p53]
Período de Mdm2	Tiempo de repetición de picos de [mdm2].	P[Mdm2]
Retardo	Tiempo entre el pico [p53] y [Mdm2].	Retardo

Se considera una variación desde 0.1 hasta 10 veces el valor nominal del parámetro es considerado. Lo que en escala logarítmica se traduce de una variación desde -1 hasta 1 veces el valor relativo nominal.

En la variación del valor del parámetro desde 0.1 hasta 10 (de -1 a 1 en escala logarítmica) se tomo una secuencia de 51 puntos igualmente distribuidos para los cuales se ha simulado el sistema y cuya respuesta se muestran en la Figura 3.3. En esta figura que está en 3D vemos como varía la respuesta del sistema ante la variación del valor parámetro  $a_0$ .

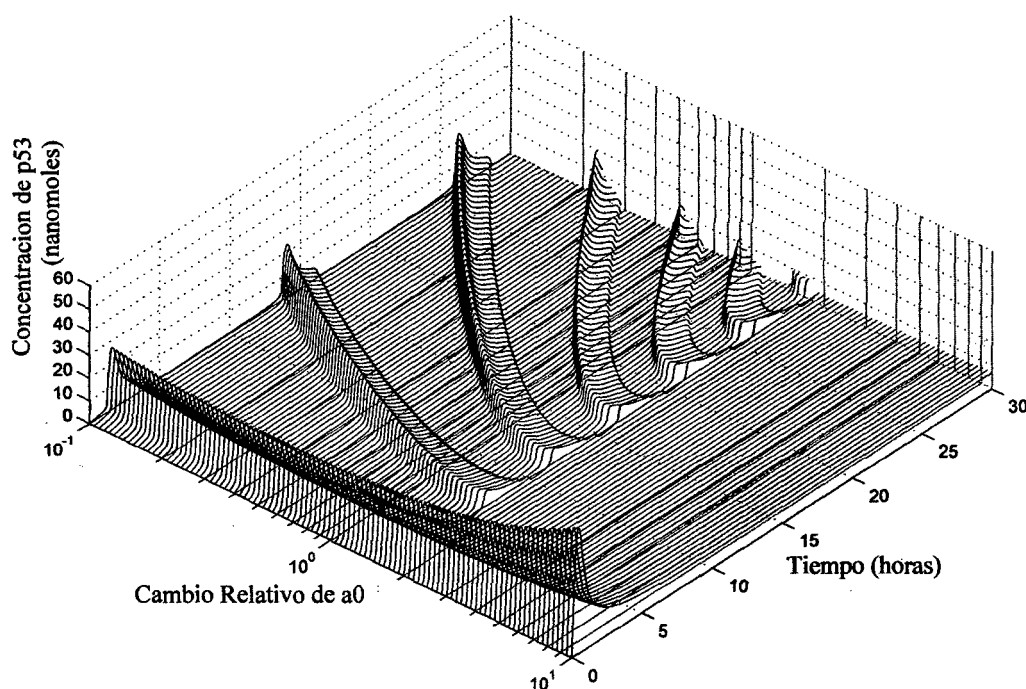


Figura 3.3: Respuesta ante la variación del parámetro de 0.1 veces a 10 veces el valor nominal de  $a_0$

Para la variación del valor del parámetro  $a_0$  hemos identificado las características del sistema (periodo, extremo y retardo) las cuales se han graficado en la Figura 3.4.b, en la cual se ve que el sistema tiene un rango de operación menor al rango en estudio. Luego se procede a calcular el área sombreada mostrada en la Figura 3.5 y posteriormente se divide esta área por el rango en el cual se producen las oscilaciones.

Para el primer punto (de los 200) en el modelo de Chickarmane, al igual que para el parámetro  $a_0$  se ha calculado la variación de los otros parámetros, los

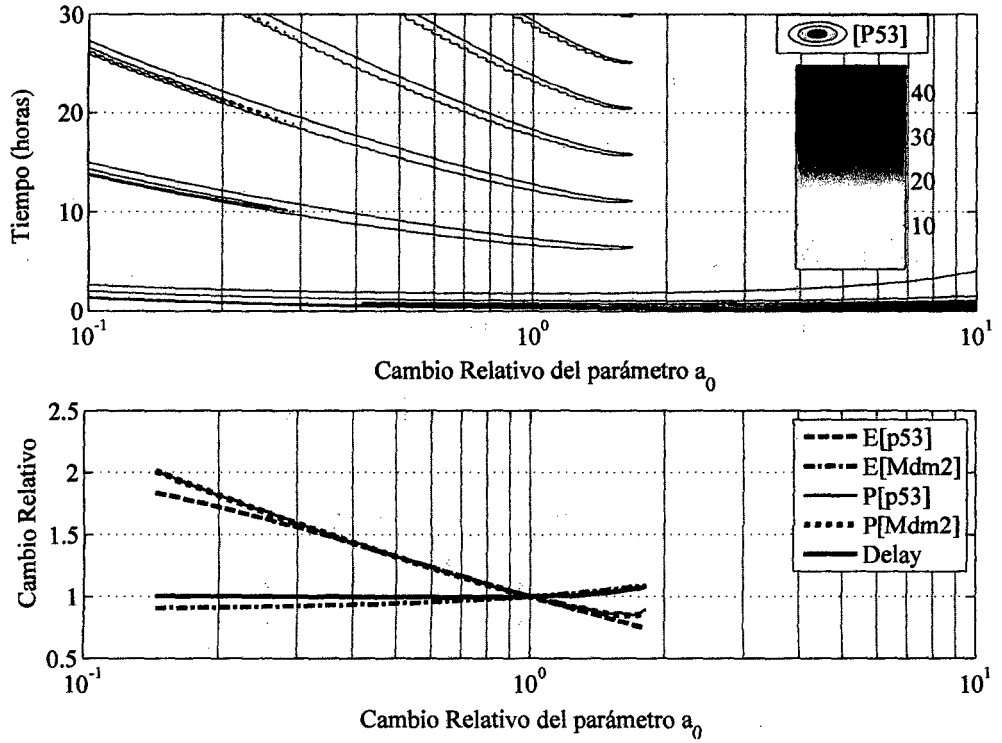


Figura 3.4: a) Respuesta del sistema ante la variación del parámetro  $a_0$  desde 0.1 hasta 10 veces su valor nominal. b) Dependencia de las características del sistema con respecto a la variación del parámetro  $a_0$ .

cuales han mostrado diferentes rangos de oscilación, ver Figura 3.6.a, así mismo también se ha calculado la dependencia de las características del sistema ante las variaciones de los valores de los demás parámetros, con lo cual usando el método propuesto se calcula el valor de la sensibilidad global de las características (periodo, extremo y retardo) respecto a dichos parámetros (ver Figura 3.6.b)

Así varía el mantenimiento de la oscilación del sistema (modelos de Chickarmane y el propuesto) ante la variación de los parámetros (ver Figuras 3.6.a y 3.7)



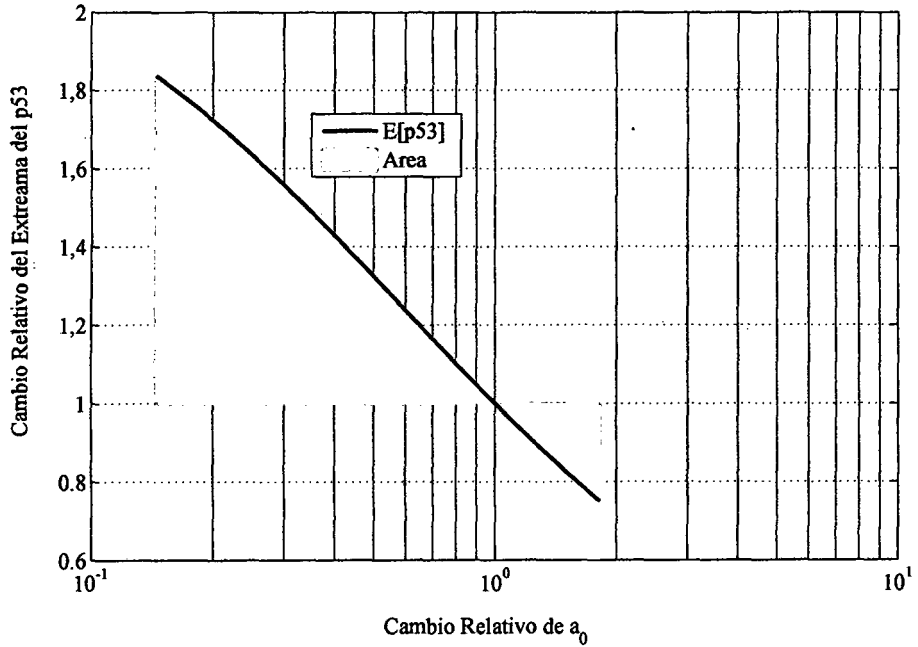


Figura 3.5: Zona de interés (intervalo donde el sistema oscila) en el método propuesto para calcular la sensibilidad global, el intervalo de  $[.1;1]$  es donde esta la cota inferior de oscilacion y el intervalo  $[1;10]$  es donde esta la cota superior de oscilacion.

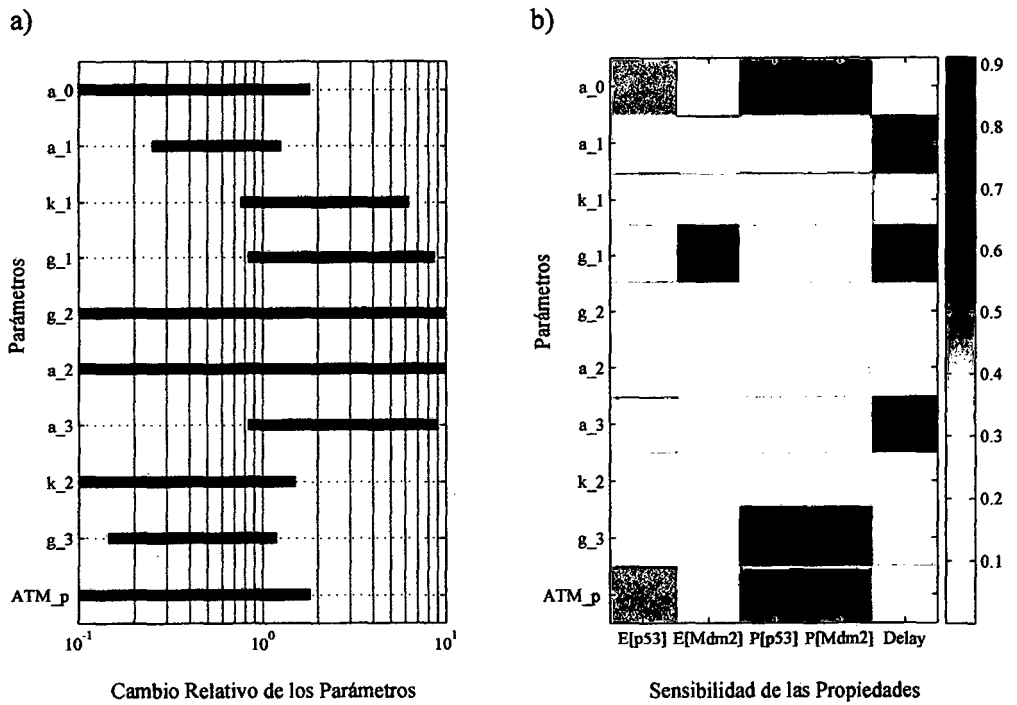


Figura 3.6: a) Rangos de los valores de los parámetros normalizados dentro de los cuales el sistema oscila. b) Sensibilidades globales de las características del sistema con respecto a los parámetros.

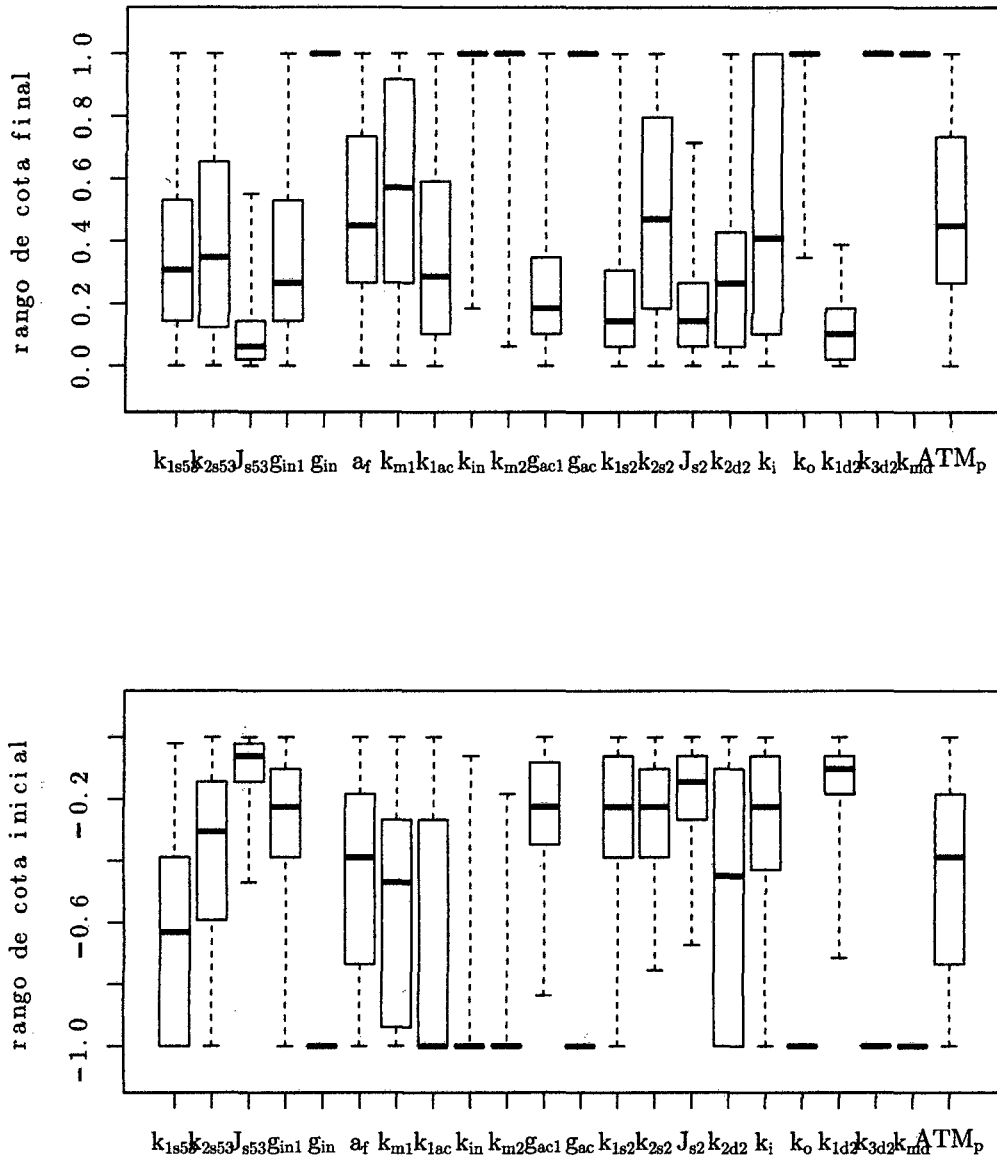


Figura 3.7: Boxplot de las cotas inferiores y superiores donde se mantienen oscilacion del sistema propuesto ante la variacion relativa valor de los parametros. a) Boxplot de las cotas inferiores en el intervalo  $[.1;1]$  b) Boxplot de las cotas superior en el intervalo  $[1;10]$

# Capítulo 4

## Análisis Estadístico

### 4.1. Descripción del trabajo

En el presente trabajo se realizan comparaciones mediante análisis estadístico de la sensibilidad para múltiples parámetros en dos modelos, el Chickarmane y el propuesto. El procedimiento para el análisis estadístico que se uso es el siguiente:

- Se generó números aleatorios alrededor de puntos originales en el rango de 0.1 a 10 veces el valor original para cada valor nominal de los parámetros del modelo de Chickarmane y el propuesto. Luego se procede a la solución numérica de las ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOS) y la búsqueda de que conjuntos de parámetros que cumplen las condiciones iniciales de estado estacionario con contracción de  $[Mdm2]$  mayor que del  $[p53]$ .
- Para ambos modelos se hallaron 5 zonas diferentes de operación. Alrededor de cada zona de operación se buscaron 100 conjuntos de parámetros que cumplan ciertas condiciones de periodo y retardo.

- Con una colección de centenares de conjuntos de parámetros, se analizó como afectan el cambio de los parámetros sobre el periodo, los extremos y el retardo. Para luego resumir en una matriz de sensibilidad para cada conjunto.
- Con los resultados en matrices de sensibilidad, se usaron técnicas estadísticas de agrupamiento para poder identificar que parámetros están o no, la mayor parte de las veces, relacionados a producir mayor sensibilidad de una o algunas características de un oscilador, como son periodo, extremos y retardo.
- Otra técnica para poder hallar de forma más precisa el nivel de un parámetro que afecte a la sensibilidad del sistema, es el de BootStrap. El método de BootStrap puede reconstruir en base a los datos obtenidos la curva de distribución de la sensibilidad y hallar una mediana global con la cual se puede ponderar el grado de influencia de un parámetro en el modelo del sistema.

## 4.2. Herramientas estadísticas

En esta sesión para el análisis de los resultados, se describirá brevemente unas técnicas de análisis estadístico como los de: intervalo de confianza, boxplot, agrupamiento y el método de BootStrap

### 4.2.1. Intervalo de confianza

El intervalo de confianza indica el rango de la probabilidad de donde se encuentra la media de la población. De una población con media  $\mu$  y desviación típica  $\sigma$  se pueden tomar muestras de sus elementos, así se tiene:

$P[\mu_1 \leq \mu \leq \mu_2] = 1 - \alpha$ , luego se tiene:

$$P\left[\bar{x} - z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right] = 1 - \alpha, \text{ ver (Figura 4.1):}$$

de lo cual se obtendrá el intervalo de confianza:

$(\bar{x} - z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \bar{x} + z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}})$ , para hallar este intervalo

se usan los valores de  $z_{\alpha/2}$  ver la (Tabla 4.1)

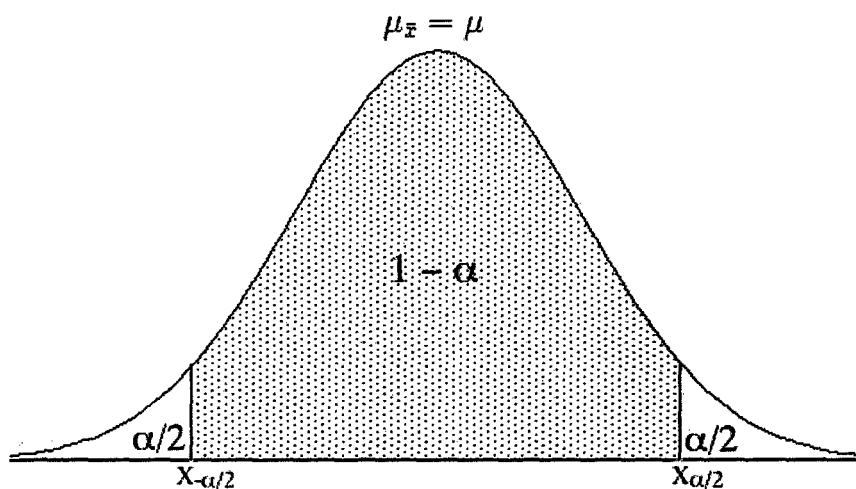


Figura 4.1: Intervalo de confianza en una distribución gaussiana.

Tabla 4.1: valores de interval confianza

$\frac{\alpha}{2}$	z.1	z.05	z.025	z.01	z.005	z.0005
Z	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291
Intevalo de Confianza (%)	80	90	95	98	99	99.9

### 4.2.2. Boxplot

El boxplot es una representación gráfica de la distribución de una población. Así el boxplot esta basado en cuartiles  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  y el Rango Inter Cuartilico (RIC), mediante el cual se visualiza un conjunto de datos. Está compuesto por un rectángulo, la çajaz dos brazos, las "T". Donde  $Q_1$  (valor que agrupa hasta 25 % de los datos)  $Q_2$  o mediana (hasta el 50 % de los datos),  $Q_3$  (hasta el 75 % de los datos) y  $RIC = Q_3 - Q_1$ . Hay que calcular los límites superior e inferior,  $Li$  y  $Ls$ , para identificar a los valores atípicos, que son aquellos inferiores a  $Q_1 - 1.5 * RIC$  o superiores a  $Q_3 + 1.5 * RIC$ .

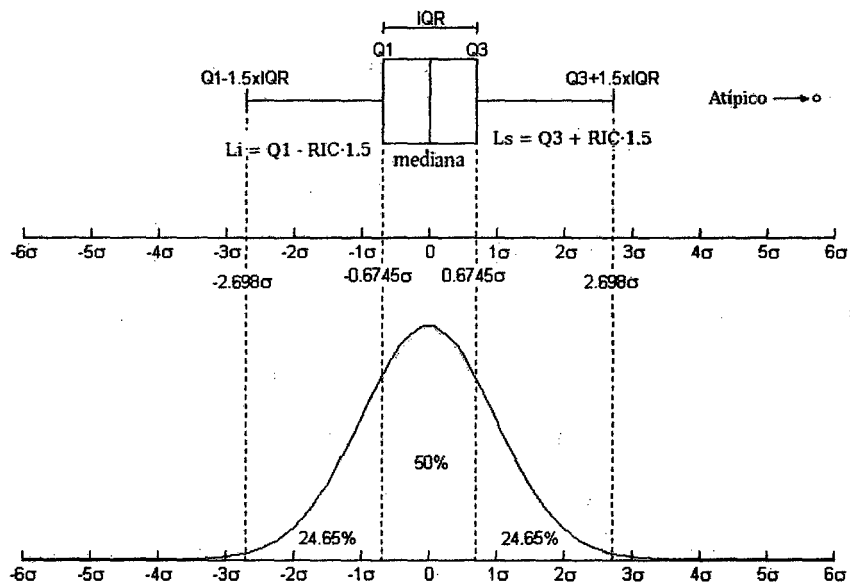
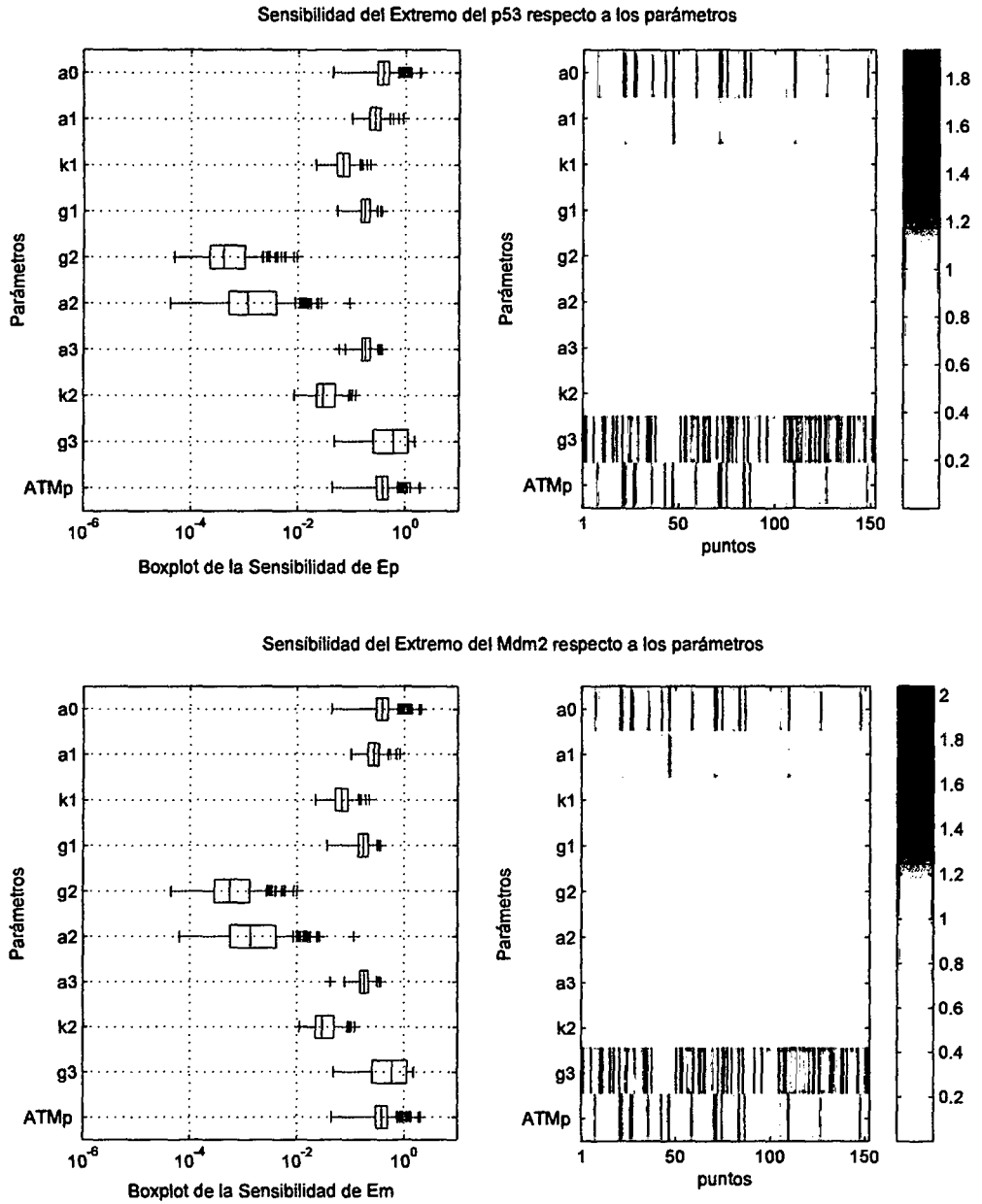


Figura 4.2: Relación del boxplot con la curva de distribuciones.

Con los datos obtenidos del análisis de sensibilidad se elaboraron unas figuras donde se utilizó el boxplot en relación al grado de sensibilidad de los parámetros, lo cual se aprecia en las figuras 4.3 y 4.4.



*Figura 4.3: Izquierda: boxplot del valor de las sensibilidades para los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane. Derecha: representación de la distribución del valor de las sensibilidades para los valores de los parámetros obtenidos para los 150 conjuntos de parámetros a) Boxplot del extrema p53 b) Boxplot del extrema Mdm2. La barra de la derecha muestra el valor de la sensibilidad asociada a la escala de grises.*

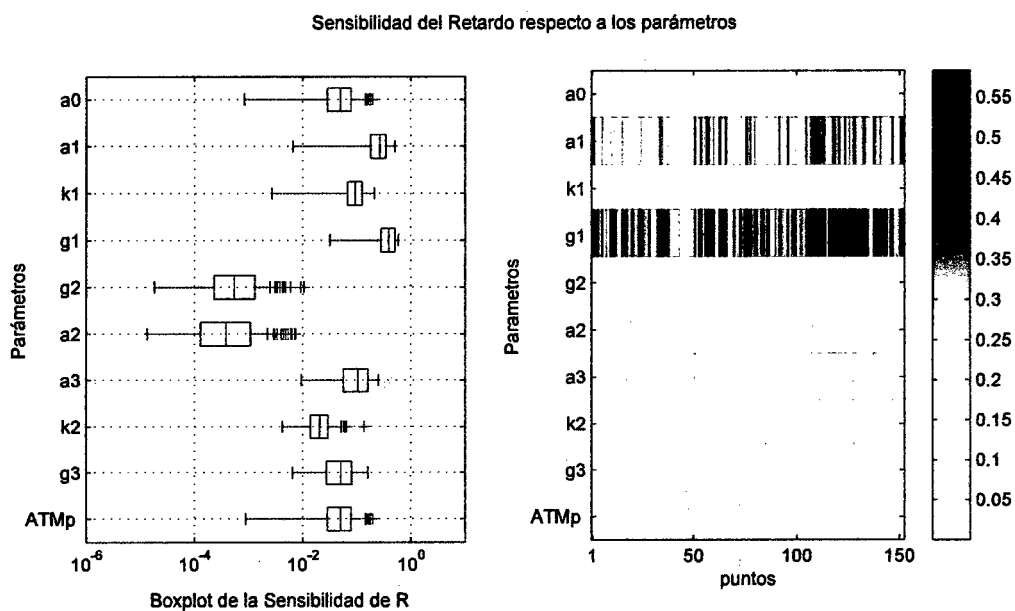
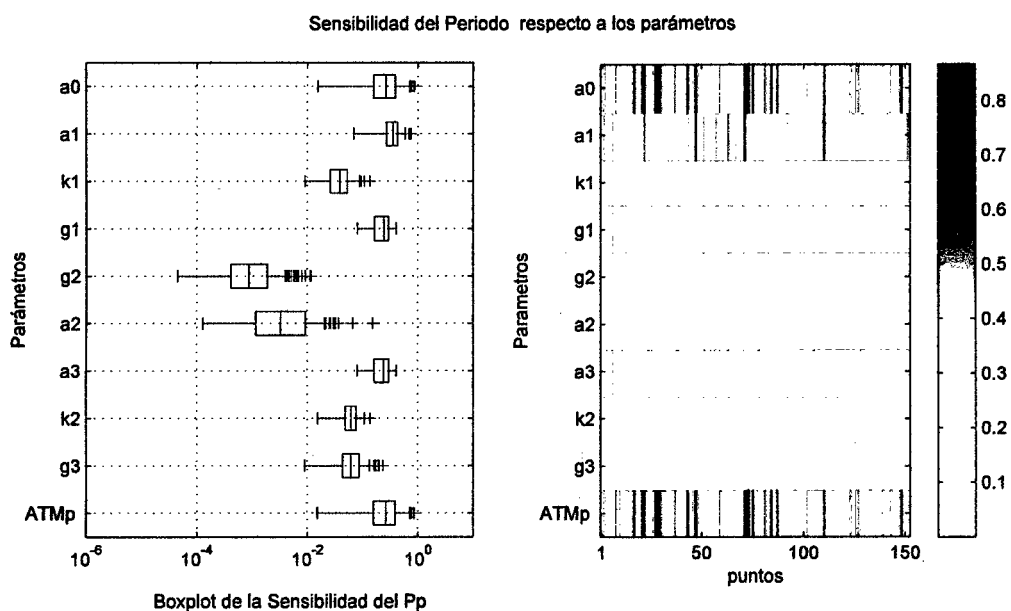


Figura 4.4: Izquierda: boxplot del valor de las sensibilidades para los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane. Derecha: representación de la distribución del valor de las sensibilidades para los valores de los parámetros obtenidos para los 150 conjuntos de parámetros. a) Periodo b) Retardo.



### 4.2.3. Conceptos de agrupamiento

El método de agrupamiento (clustering), que es una de las técnicas de análisis multivariado, es una de las técnicas se usan ampliamente en el análisis de datos y minería de datos. Existen numerosos métodos para observaciones de grupos.

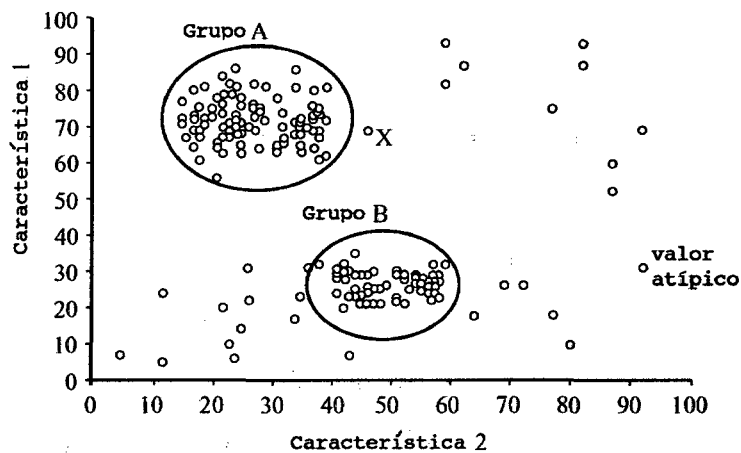


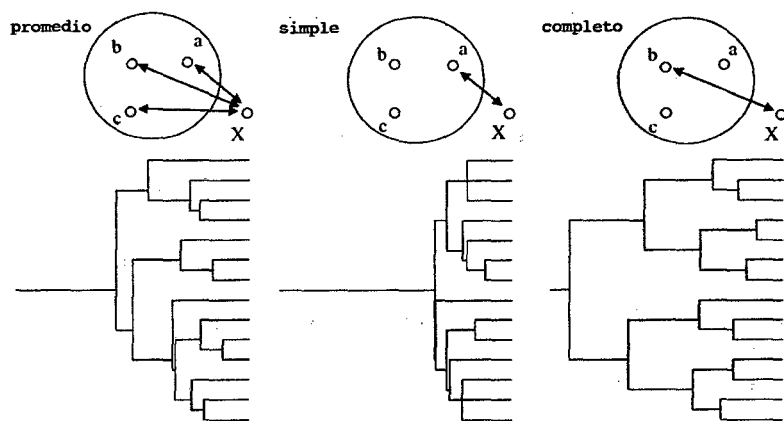
Figura 4.5: Formación de los grupos

El agrupamiento de aglomeración jerárquica es un ejemplo de un método jerárquico para agrupar observaciones. Este método utiliza un enfoque de abajo hacia arriba de la agrupación, ya que comienza con cada observación como un miembro de un grupo separado y se juntan progresivamente grupos cercanos hasta que todas las observaciones son un miembro de un solo clúster al final. La principal limitación de la agrupación de aglomeración jerárquica es que normalmente se limita a conjuntos de datos pequeños (a menudo menos de 10.000 observaciones[24] ) y la velocidad para generar el árbol jerárquico puede ser lenta para un mayor número de observaciones.

Para ilustrar el proceso de agrupamiento jerárquico de aglomeración, se utilizan el conjunto de datos numéricos de variables, las variables se miden en la misma escala, sin embargo, donde las variables se miden en diferentes escalas

que deben ser normalizados a una gama comparable (por ejemplo, de 0 a 1). Esto es para evitar que cualquiera de una o más variables que tengan un peso desproporcionado y generen un sesgo en el análisis.

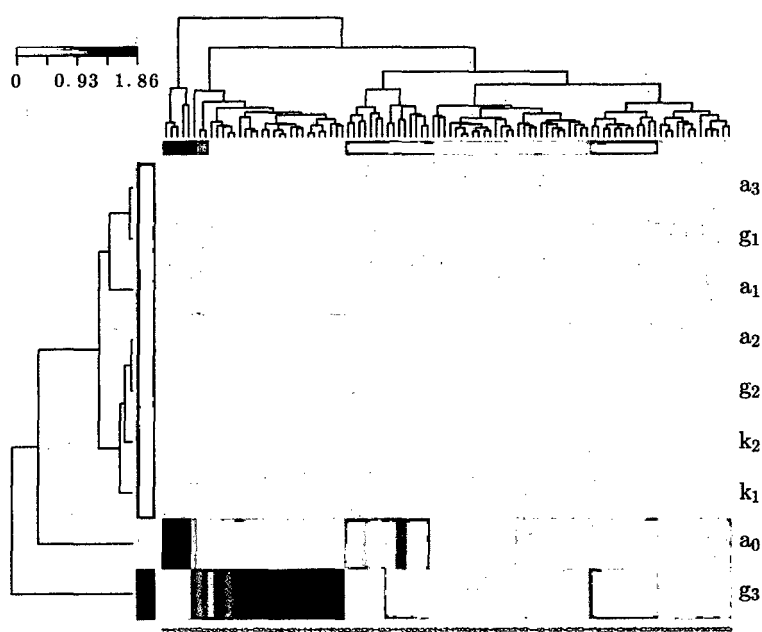
Primero, se calcula la distancia entre todas las combinaciones de observaciones (diferencia entre el valor de las variables). El método para la evaluación de la distancia entre el valor de las variables se debe establecer antes de la agrupación. Las dos distancias más cercanas se identifican y se fusionan en un solo grupo. Estas dos observaciones a partir de ahora se considerarán un solo grupo. Luego, todas las observaciones (menos los dos que se han fusionado en un grupo), junto con el grupo recién creado se comparan para ver que la observación o clúster deben unirse en el siguiente grupo. Ahora estamos analizando tanto las observaciones y grupos individuales. La distancia entre una observación y un grupo se determina con base en una regla de aglomeración predefinida.



*Figura 4.6: Diferencia entre los metodos de agrupamiento*

Las reglas de enlace son usadas para encontrar la distancia entre una observación (o grupo) y un grupo ya identificado. En la figura se ve que ya se han identificados 2 grupos: grupo A y grupo B. Ahora se quiere saber si la observación X es miembro del grupo A o del B, hay varias maneras de determinar la distancia entre una observación y un grupo identificados. Las reglas de aglomeración por

enlace promedio, simple o completa, que se aprecia en la figura enlace promedio es el promedio de las distancias entre la observación y todos los elementos del grupo en consideración. El enlace simple esta determinado por la menor distancia entre la observación y los miembros de del grupo de consideración, mientras el enlace completo esta determinado por la mayor distancia entre la observación y todos los elementos del grupo en consideración. En este trabajo se utilizó el método de agrupamiento jerárquico promedio para agrupar tanto los juegos de parámetros y los parámetros del modelo que muestran sensibilidades globales similares.



*Figura 4.7: Formación de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parámetros para B0 en el modelo de Chickarmane*

En la Figura 4.7, se muestra el agrupamiento de la sensibilidad del periodo [p53] se divide la muestra de parámetros (eje horizontal) en 10 grupos (Figura A.5), para encontrar grupos pequeños cuyas sensibilidades sean las que más difieren de toda la muestra. También dividamos los parámetros (eje vertical) en 3 grupos que corresponden a los grupos de parámetros que tienen baja, mediana y alta influencia en la sensibilidad, viendo la variación de las sensibilidades, se

puede observar que el parámetro  $g_3$  (asociado con degradación natural de Mdm2) en general es el más influyente. Luego también se aprecia que el parámetro  $a_0$  asociado con la transcripción del p53 debido a  $ATM_p$  presenta las mayores sensibilidades.

Los demás parámetros tienen menor sensibilidad como  $a_1$  (auto retroalimentación positiva de p53),  $a_3$  (transcripción de Mdm2 por p53) y  $g_1$  (la degradación de p53 por Mdm2) tienen aún importancia. Por último se tiene  $k_1$  y  $k_2$  (constantes de disociación de in Hill),  $a_2$  (transcripción basal de Mdm2 b) y  $g_2$  (degradación natural de p53) como los parámetros menos influyentes.

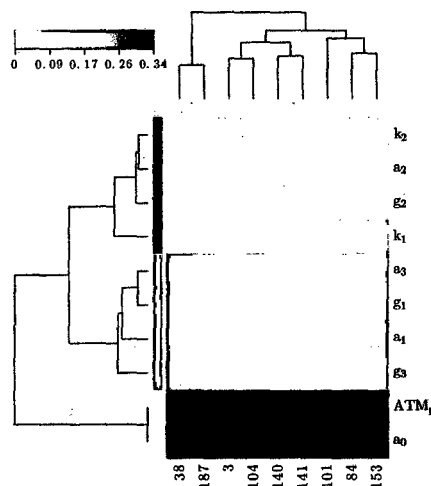


Figura 4.8: Un grupo formado de los 200 conjuntos de parámetros  $B_0$  en el modelo de Chickarmane

Viendo los resultados para el modelo propuesto el agrupamiento de las sensibilidades globales para el periodo de [p53] que se aprecia en la Figura 4.9, para todos los 100 conjuntos de parámetros encontrados alrededor de  $B_0$ , los parámetros que presentan la mayor influencia son  $k_{1s53}$  (producción basal de p53) y  $k_{3d2}$  (Mdm2<sub>nuc</sub> degradación de Mdm2<sub>nuc</sub> por  $ATM_p$ ). Comparando estos resultados del modelo propuesto respecto al modelo de Chickarmane, Figura 4.8, se observa una gran variabilidad de las sensibilidades de las propiedades para cada juego de parámetros.

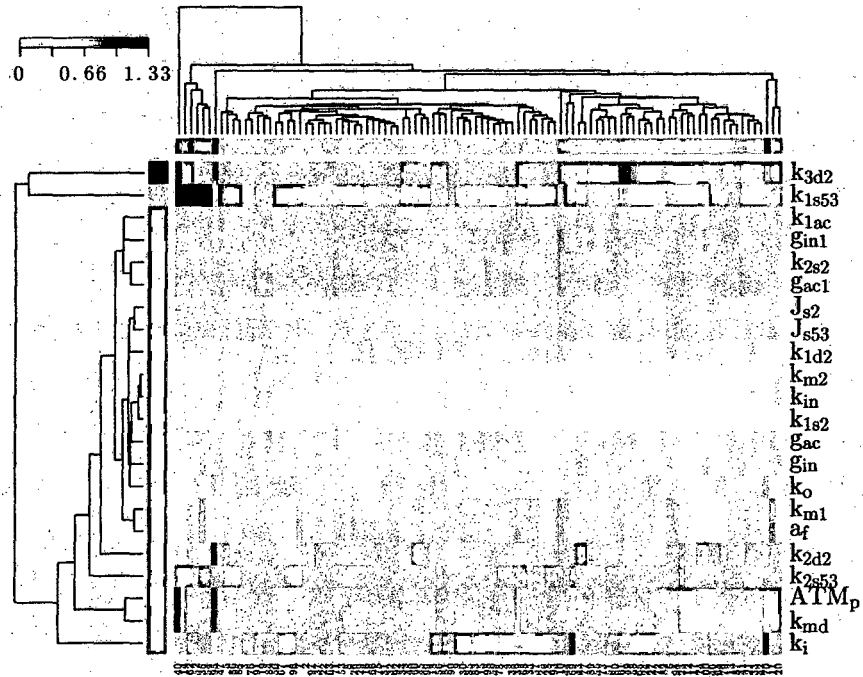


Figura 4.9: Formacion de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parametros pars B0 en el modelo propuesto

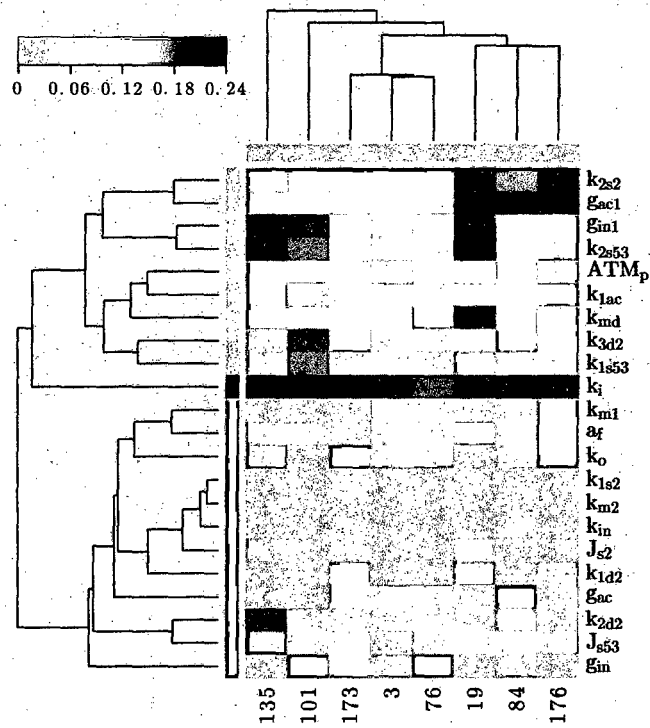
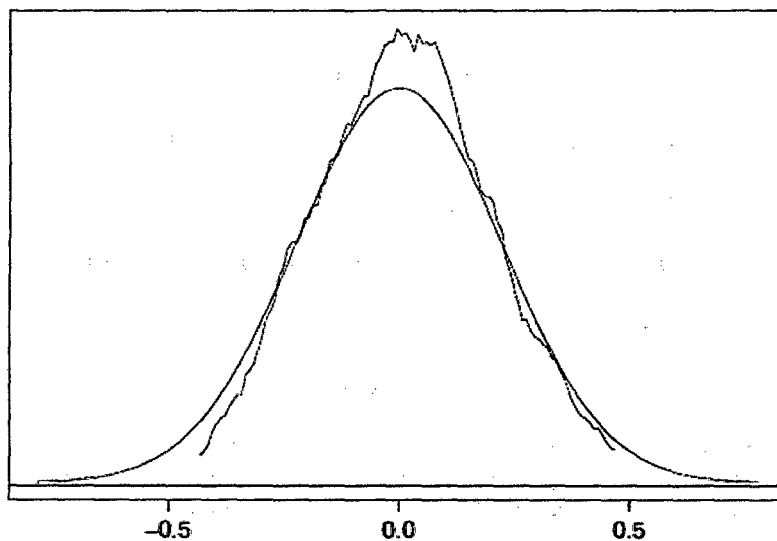


Figura 4.10: Un grupo formado de los 200 conjuntos de parametros pars B0 en el modelo de propuesto.

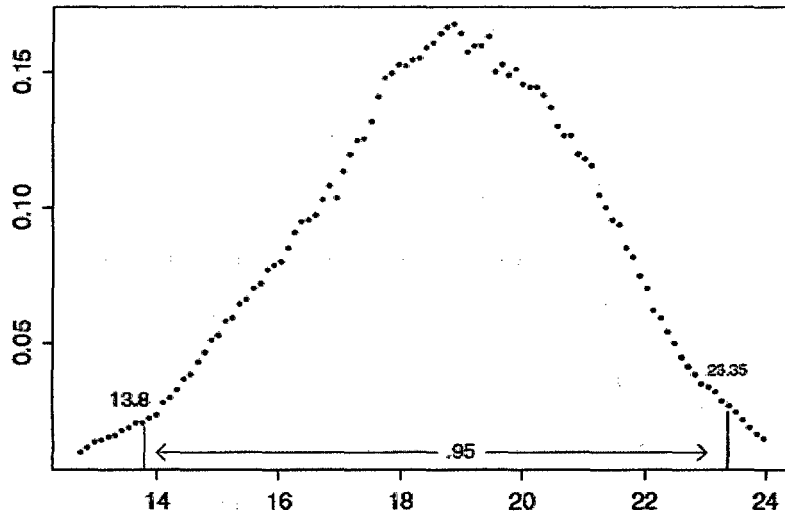
#### 4.2.4. Técnica de Bootstrap



*Figura 4.11: La figura muestra dos curvas de probabilidades, la curva simétrica de línea curva, es la curva que teóricamente debería conseguirse para una distribución de una muestra basada en 20 observaciones. La curva con ragged es la curva de la aproximación de bootstrap basada en 20 observaciones aleatoriamente muestreadas de la curva normal.*

La prueba de hipótesis (cálculo de intervalos de confianza) con una muestra del método T Student dado que el teorema del límite central sostiene que el método T Student tiene un mejor rendimiento mientras que el tamaño de la muestra se hace más grande. Es decir, que la probabilidad de error tiende a cero a medida que el tamaño de la muestra tiende a infinito. Pero para situaciones reales que se necesitan alrededor de 200 observaciones para obtener una muestra de control satisfactoria sobre la probabilidad de un error de tipo I, o la cobertura de probabilidad exacta al calcular los intervalos de confianza. Al comparar las medias de población de dos grupos de individuos, el uso de T Student es conocido por ser insatisfactorio cuando los tamaños de las muestras son pequeños o incluso moderadamente grande. De hecho, podría ser insatisfactorio no importando lo grande que los tamaños de las muestras resultan ser debido a que bajo las condiciones generales que no converge a la respuesta correcta.

La idea básica detrás de los métodos de bootstrap es utilizar los datos



*Figura 4.12: La figura muestra una aproximación de la curva de probabilidad de la muestra basada en 1000 muestras de bootstrap generadas de la data. El 95% de la muestra de bootstrap esta en el intervalo de 13.8 y 23.35 que es usado para el intervalo de confianza par ala media poblacional.*

obtenidos de un estudio para aproximar las distribuciones de la toma de muestras utilizados para calcular intervalos de confianza y la prueba de hipótesis. Cuando se trabaja con medias, por ejemplo, una versión de bootstrap utiliza los datos para estimar la curva de probabilidad asociada con  $T$ . Esto está en contraste con la estrategia estándar de suponer que debido a la normalidad esta curva de probabilidad tiene una forma específica que está completamente determinada solamente por el tamaño de la muestra. La otra versión usada en esta técnica es la denominada bootstrap percentil, estima la distribución muestral de la media de la muestra en su lugar.

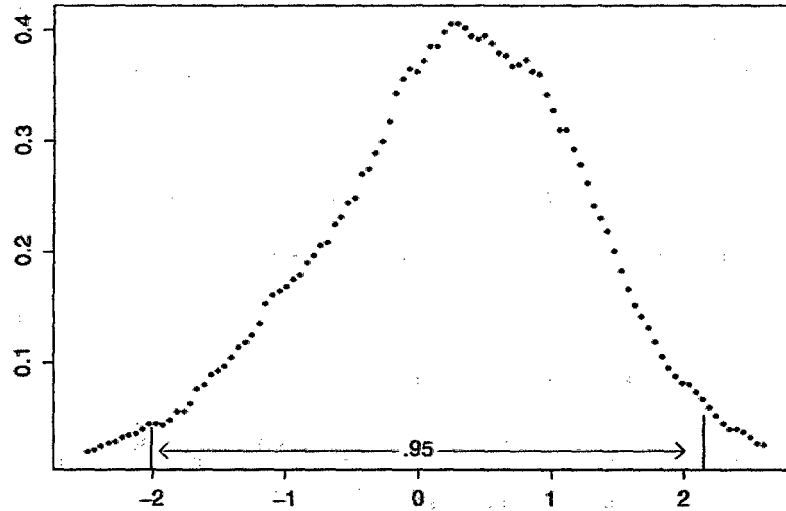


Figura 4.13: El bootstrap estima la muestra de distribución de  $T$  basada en la data. El 95% de la muestra de bootstrap está en el intervalo de  $-2.01$  y  $2.14$  que es usado para el intervalo de confianza para la media poblacional.

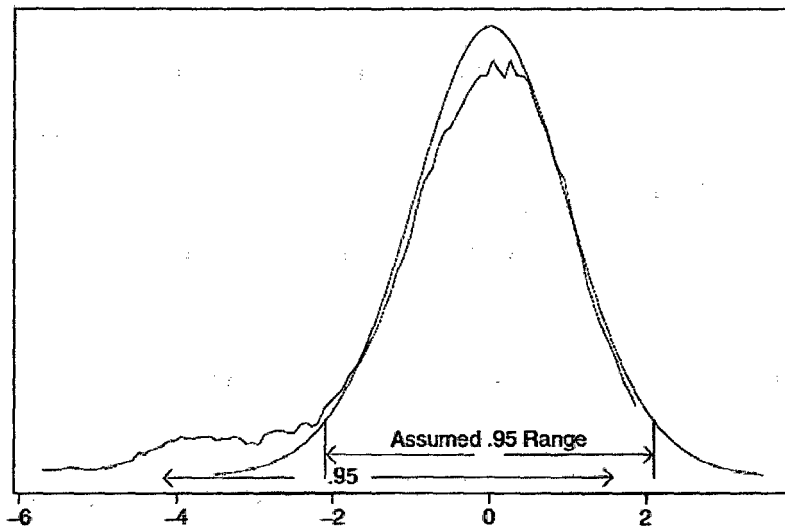


Figura 4.14: La figura muestra como se aplica la aproximación de bootstrap sobre la curva de probabilidad  $T$ .



# Capítulo 5

## Simulaciones y Resultados

En este trabajo se encontraron centenares de conjuntos de parámetros para ambos modelos donde sus características de periodo y retardo se asemejan a los resultados experimentales [18]. Estos centenares conjuntos de parámetros fueron hallados a partir de valores numéricos aleatorios en el rango de 0.1 a 10 de valor nominal cada conjunto de parámetros en las tablas S1 y S2, que se incluye en el anexo.

Para obtener los 100 conjuntos de parámetros alrededor de los conjuntos de parámetros base (B0,...,B5) tuvieron que simular y resolver más de un millón de conjuntos de parámetros. Se resolvieron las ecuaciones diferenciales mediante métodos determinísticos y se considera válida una parametrización si el periodos de  $5.5 \pm 0.3$  y retardo de  $2 \pm 0.3$ . Además, hemos considerado que en el estado inactivado de las redes (que corresponde a  $ATM_p = 0$ ) ambas señales no presentan oscilaciones y que para cada modelo, se seleccionaron 100 conjuntos de parámetros (cuya distribución se muestra en las figuras. S1 y S2). Para el análisis de los resultados obtenidos es necesario evaluar más de un millón de ensayos .

Se usó el método de agrupación jerárquica promedio [24] para agrupar los dos conjuntos de parámetros. Donde se utilizó la vinculación media, donde se calculó la distancia media entre todos los miembros de la agrupación y la observación. Los parámetros de modelo que muestran sensibilidades globales similares.

## 5.1. Simulación

La simulación correspondiente al primer punto (tabla 5.1) de operación hallado correspondiente al modelo de Chickarmane (periodo=5.49hrs y retardo=2.01hrs), se ilustra en las Figura 5.1

Tabla 5.1: Valores de los parámetros del primer punto hallado en el modelo de Chickarmane

$a_0$	$a_1$	$k_1$	$g_1$	$g_2$
0.0845	52.1866	14.7136	0.6738	0.0086
$a_2$	$a_3$	$k_2$	$g_3$	$ATM_p$
0.0064	15.5017	23.1525	0.3007	69.3601

Para el modelo de Chickarmane se han hallado 200 nuevos puntos (Figura 5.2) dentro del rango de 0.1 a 10 veces el valor nominal de los parámetros del punto original del modelo de Chickarmane.

La simulación (figura 5.3) correspondiente al primer punto (tabla 5.2) de operación hallado para el modelo propuesto (periodo=5.51 hrs y retardo=1.99hrs) tiene como valores de sus parámetros:

Tabla 5.2: valores de los parámetros del modelo propuesto en el primer punto encontrado

$k_{1s53}$	$k_{2s53}$	$J_{s53}$	$g_{in1}$	$g_{in}$	$a_f$	$k_{m1}$	$k_{1ac}$	$k_{in}$	$k_{m2}$	$g_{ac1}$
0.34	6263	0.003	39.56	3.90	0.07	994.46	0.20	0.11	4010	0.02
$g_{ac}$	$k_{1s2}$	$k_{2s2}$	$J_{s2}$	$k_{2d2}$	$k_i$	$k_o$	$k_{1d2}$	$k_{3d2}$	$k_{md}$	$ATM_p$
0.001	0.92	1.88	0.003	0.53	0.66	0.001	0.52	0.007	542.91	0.02

Para el modelo propuesto se han hallado 200 puntos de operación (Figura 5.4) dentro del rango de 0.1 a 10 veces del valor nominal del primer punto hallado.

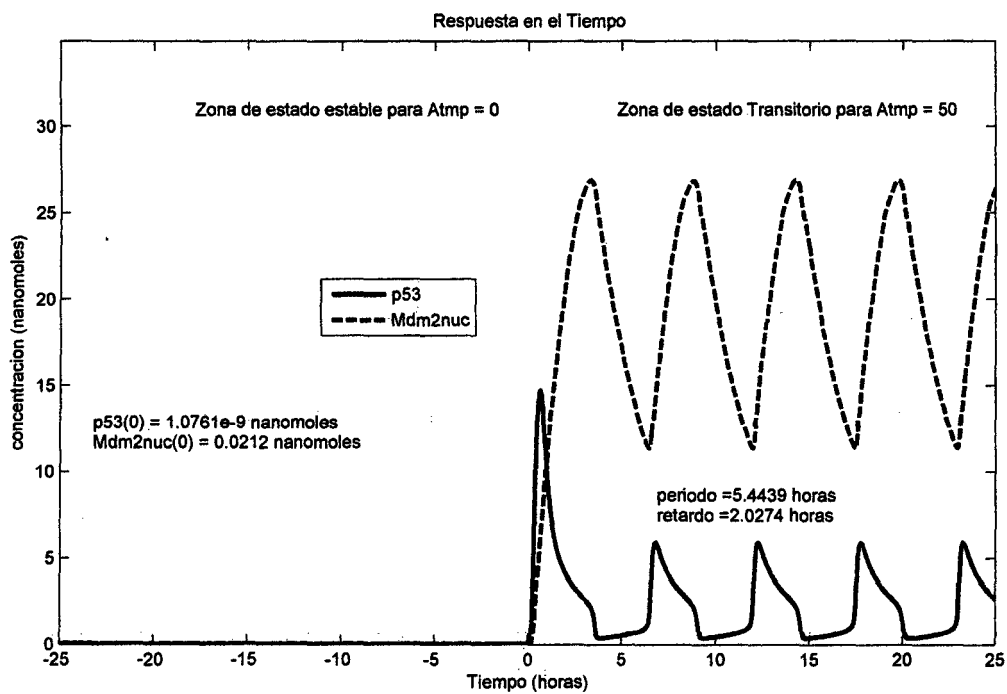


Figura 5.1: Simulación del Modelo de Chickarmane con el primer valor encontrado cumpliendo condiciones de periodo y retardo.

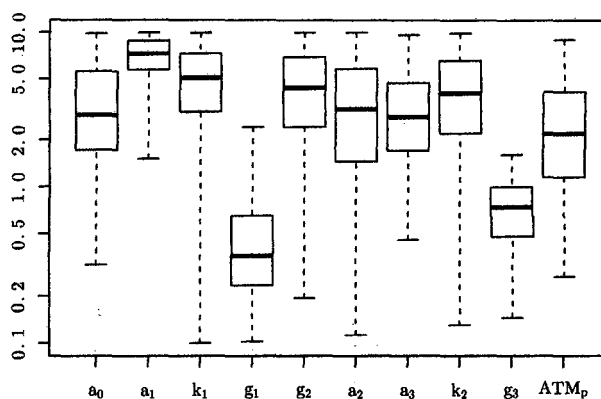


Figura 5.2: Boxplot de los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo de Chickarmane para los 200 conjuntos de parámetros

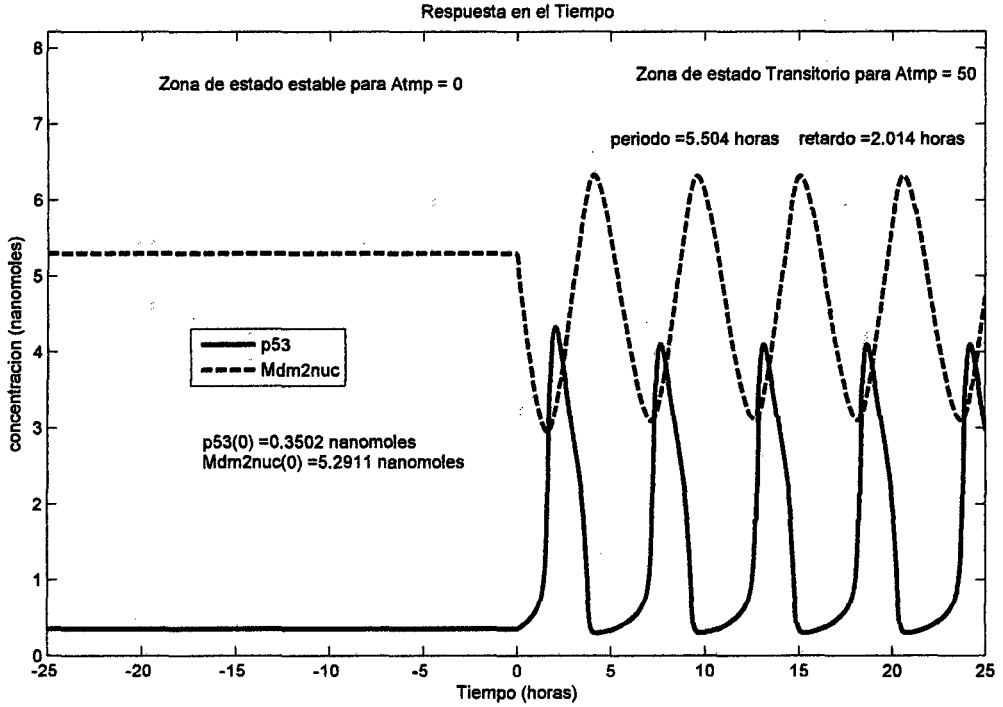


Figura 5.3: Simulación del Modelo propuesto.

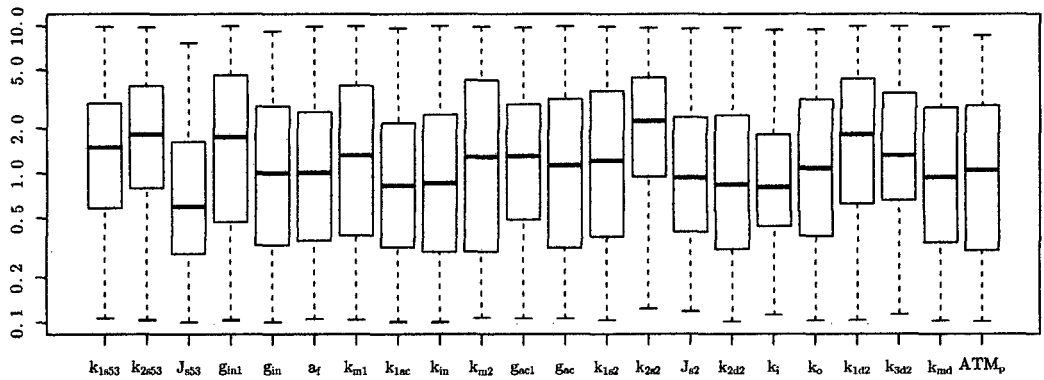


Figura 5.4: boxplot de los valores normalizados de los puntos de operación hallados en el modelo propuesto para los 200 conjuntos de parámetros.

## 5.2. Resultados

Se encontró que el parámetro relacionado con la retroalimentación positiva p53 (autopromoción), en el modelo de Chickarmane y el propuesto, tiene una alta sensibilidad en el extremos, periodo y retardo, para todos los conjuntos de parámetros. En tanto que el parámetro asociado a la tasa de producción basal del Mdm2 tiene una baja sensibilidad en las oscilaciones. Se observó que la sensibilidad de los parámetros varía mucho más conforme aumenta la complejidad del modelo de la red. También se observó que ambos modelos el de Chickarmane y el propuesto presentan robustez de la oscilación ante ciertos conjuntos de parámetros.

Resumiendo los resultados de las correlaciones (Figura A.7 y Figura A.8), las sensibilidades de los parametros más influyentes se muestran en las tabla 5.1 para el modelo de Chickarmane y en la tabla 5.2 para el modelo propuesto.

*Tabla 5.3: Influencia de los parametros en las propiedades dinamicas del sistema de la red p53-Mdm2 en el modelo de Chickarmane.*

Parametro	proceso involucrado	Ep	Em	P	R
a0,ATM	trascricion p53 por ATMp	6	0	6	0
a1	auto promocion p53	6	6	6	6
g2	degradacion p53 natural	0	0	0	0
g1	degradacion p53 por Mdm2	0	6	0	6
a2	trascricion basal Mdm2	0	0	0	0
a3	trascricion Mdm2 por p53	0	0	0	6
g3	degradacion natural de Mdm2	0	0	6	0

De los resultados del análisis de sensibilidad global en el modelo de Chickarmane, se ha podido observar lo siguiente:

1. Para todas las características (periodo, extremo y retardo) los parámetros que tienen la menor influencia son: g2 y a2 (Figura A.7)

Tabla 5.4: Influencia de los parámetros en las propiedades dinámicas del sistema de la red p53-Mdm2 en el Modelo propuesto.

Parametro	proceso involucrado	Ep	Em	P	R
af	Activacion de p53 por ATMp	4	5	0	0
k2s53	auto promocion p53	6	6	6	6
gac, gin	degradacion natural de p53 <sub>p</sub> y p53	0	0	0	0
gac1	degradacion p53 <sub>p</sub> por Mdm2 <sub>nuc</sub>	0	5	0	5
gin1	degradacion p53 por Mdm2 <sub>nuc</sub>	4	4	0	4
k1s2	trascricion basal Mdm2	0	0	0	0
k2s2	trascricion Mdm2 por p53 <sub>p</sub>	0	4	0	6
k1d2	degradacion natural Mdm2 <sub>nuc</sub>	0	0	0	0
k2d2	degradacion natural Mdm2 <sub>cit</sub>	0	0	0	0
k1s53	trascricion basal p53	6	0	4	0
ki	Estrada de Mdm2 <sub>cit</sub> al nucleo	0	0	5	5
ATMp	Senal del daño	0	4	5	5
k3d2	degradacion de Mdm <sub>nuc</sub> por ATMp	0	0	0	0

2. Para los periodos del p53 y del Mdm2 el parámetro más influyente es el g3 (Figura A.7.c).
3. Para el extremo del p53 los parámetros más influyentes son: a0, a1 y ATMp, aunque existen algunos conjuntos de parámetros en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.a).
4. Para el extremo del Mdm2 los parámetros más influyentes son: a1 y g1 aunque existen algunos conjuntos de parámetros en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.b).
5. Para el retardo entre el p53 y el Mdm2, los parámetros más influyentes son: a1, k1, g1 y a3 aunque existen algunos conjuntos de parámetros en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.d).

De los resultados del análisis de sensibilidad global en el modelo propuesto, se ha podido observar lo siguiente:

1. Para todas las características (periodo, extremo y delay) los parámetros que

tienen la menor influencia en la variación de las características del sistema son:  $k_{in}$ ,  $k_{m2}$ ,  $k_{1s2}$ ,  $k_o$  y  $k_{1d2}$  (Figura A.7).

2. Para los casos de los perdidos ( $p53$  y  $mdm2$ ) el parámetro más influyente es el  $k_{1s53}$  y  $k_{3d2}$  (Figura A.7.g), sin embargo su influencia no es determinante.
3. Para el extremo del  $p53$  los parámetros más influyentes son:  $k_{2s53}$  y  $k_{1ac}$ ; aunque existen algunos conjuntos de puntos en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.a), sin embargo su influencia no es determinante.
4. Para el extremo del  $Mdm2$  los parámetros más influyentes son:  $k_{2s53}$ ,  $gac1$  y  $k_{2s2}$ ; aunque existen algunos conjuntos de parámetros en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.b), sin embargo su influencia no es determinante.
5. Para el retardo entre el  $p53$  y el  $Mdm2$  los parámetros más influyentes son:  $k_{2s53}$ ,  $gac1$ ,  $k_{2s2}$ , y  $k_i$ ; aunque existen algunos conjuntos de parámetros en los cuales su influencia es menor (Figura A.7.h), sin embargo su influencia no es determinante.

De los resultados del análisis de sensibilidad global para ambos modelos se ha podido observar lo siguiente:

1. Se encontró que el parámetro relacionado con la retroalimentación positiva  $p53$  (autopromoción), en el modelo de Chickarmane(a1) y el propuesto( $k_{2s53}$ ), tiene una alta sensibilidad en los Extremos, periodo y retardo, para todos los conjuntos de parámetros.
2. Se observo que la sensibilidad de los parámetros varia mucho más conforme aumenta la complejidad del modelo de la red.

3. Se ha observado que hay ciertos parámetros que tienen poca repercusión en la variación de la característica del sistema ( $g_2$  para el modelo de Chickarmane y  $k_{1s2}$  para el modelo propuesto, estos parámetros indican la tasa de producción basal del Mdm2). En tanto que otros parámetros generan alta o baja sensibilidad dependiendo del arreglo de valores de los parámetros. De esta manera los parámetros que controlan las características del sistema influyen según los valores de los conjuntos de los parámetros (ver tablas 5.3 y 5.4).
4. Adicionalmente se observó que ambos modelos el de Chickarmane y el propuesto presentan robustez de la oscilación ante ciertos conjuntos de parámetros (ver figuras 3.6.a y 3.7)
5. Finalmente, hemos podido observar que el modelo de Chickarmane tiene pocos parámetros ( $a_0$ , ATM,  $g_2$  y  $g_1$ ) con influencia apreciable en la variación de las características del sistema (ver tabla 5.3). En tanto que para el modelo propuesto muchos más parámetros ( $a_f$ ,  $k_{2s53}$ ,  $g_{ac1}$ ,  $g_{in1}$ ,  $k_{2s2}$ ,  $k_{1s53}$ ,  $k_i$  y  $ATM_p$ ) tienen una influencia pequeña en la variación de las características del sistema (ver tabla 5.4). Así los parámetros más influyentes están asociados a procesos de retroalimentación, los cuales juegan un rol importante en la dinámica del sistema (ver tablas 5.3 y 5.4).



# Capítulo 6

## Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados muestran que es necesario considerar el rol de los parámetros y no sólo la estructura de la arquitectura cuando se quiere modelar sistemas oscilatorios complejos.

### Conclusiones

1. Se encontró que el parámetro relacionado con la retroalimentación positiva  $p53$  (autopromoción), en el modelo de Chickarmane y el propuesto, tiene una alta sensibilidad en el extremo, periodo y retardo, para todos los conjuntos de parámetros.
2. Se observó que la sensibilidad de los parámetros varía mucho más conforme aumenta la complejidad del modelo de la red.
3. Se ha observado que hay ciertos parámetros que tienen poca repercusión en la variación de la característica del sistema ( $g2$  para el modelo de Chickarmane y  $k1s2$  para el modelo propuesto, estos parámetros indican

la tasa de producción basal del Mdm2), en tanto que otros parámetros generan alta o baja sensibilidad dependiendo del arreglo de valores de los parámetros. De esta manera los parámetros que controlan las características del sistema influyen según los valores de los conjuntos de los parámetros (ver s 5.3 y 5.4).

4. Adicionalmente se observó que ambos modelos el de Chickarmane y el propuesto presentan robustez de la oscilación ante ciertos conjuntos de parámetros.
5. Finalmente, hemos podido observar que el modelo de Chickarmane tiene pocos parámetros( $a_0$ ,  $ATM$ ,  $g_2$  y  $g_1$ ) con influencia apreciable en la variación de las características del sistema (ver tabla 5.3). En tanto que para el modelo propuesto muchos más parámetros( $a_f$ ,  $k_{2s53}$ ,  $gacl$ ,  $gin1$ ,  $k_{2s2}$ ,  $k_{1s53}$ ,  $k_i$  y  $ATMp$ ) tienen una influencia pequeña en la variación de las características del sistema(ver tabla 5.4). Así los parámetros mas influyentes están asociados a procesos de retroalimentacion, los cuales juegan un rol importante en la dinámica del sistema (ver tablas 5.3 y 5.4).

Los modelos computacionales son una gran herramienta para el estudio de la dinámica de sistemas biológicos [1], en este caso el de la red p53, que no sólo ha servido para la simulación de su respuesta, sino también para el análisis de la sensibilidad del sistema, así nos ha permitido entender mejor la dinámica de los osciladores de la red del p53 estudiados. Concluyendo los resultados muestran la importancia de considerar también los conjuntos de parámetros aparte de la estructura de la arquitectura de la red para sistemas oscilatorios.

## Recomendaciones

1. En vista de los múltiples puntos de operación, y de sus correspondiente análisis de sensibilidad, es necesario usar herramientas estadísticas para poder encontrar relaciones entre los parámetros y las características (periodo, extremo y retardo).
2. En el corto, plazo hallar familias de conjuntos de parámetros que produzcan sensibilidades parecidas ante la variación de dichos parámetros, para así encontrar si existe alguna relación o interdependencia entre parámetros y las características del sistema (periodo, extremo y retardo).
3. En el mediano plazo, estudiar la robustez de los diferentes modelos de osciladores del p53.
4. En el largo plazo, estudiar cómo influye la topología en la sensibilidad y robustez del sistema.

# Bibliografía

- [1] Novák J, Tyson J (2008) Design principles of biochemical oscillators *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:981-991.
- [2] Sneppen K, Krishna S, Semsey S (2010) Simplified Models of Biological Networks *Annu Rev Biophys* 39:43-59.
- [3] Tiana G, Krishna S, Pigolotti S, Jensen MH, Sneppen K (2007) Oscillations and temporal signalling in cells *Phys Biol* 4:R1-R17.
- [4] Wagner A (2005) Circuit topology and the evolution of robustness in two-gene circadian oscillators *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11775-11780.
- [5] Ma W, Trusina A, El-Samad H, Lim WA, Tang C (2009) Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation *Cell* 138:760-773
- [6] Cotterell J, Sharpe J (2010) An atlas of gene regulatory networks reveals multiple three-gene mechanisms for interpreting morphogen gradients *Mol Syst Biol* 6:425.
- [7] Shinar G, Feinberg M (2010) Structural Sources of Robustness in Biochemical Reaction Networks *Nature* 327:1389-1391.
- [8] Tsai TY, et al. (2008) Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops *Science* 321:126-129.
- [9] Tigges M, Marquez-Lago TT, Stelling J, Fussenegger M (2009) A tunable synthetic mammalian oscillator *Nature* 457:309-312.
- [10] Stricker J, et al. (2008) A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator *Nature* 456:516-519.
- [11] Ingalls BP (2010) *in Control Theory and Systems Biology*, eds Iglesias PA, Ingalls BP (The MIT Press, Cambridge), pp 145-168.
- [12] Ingalls BP, Sauro HM (2003) Sensitivity analysis of stoichiometric networks: an extension of metabolic control analysis to non-steady state trajectories *J Theor Biol* 222:23-36.

- [13] Wilkins AK, Barton PI, Tidor B (2007) The Per2 negative feedback loop sets the period in the mammalian circadian clock mechanism *PLoS Comp Biol* 3:2476-2486.
- [14] Taylor SR, Gunawan R, Petzold LR, Doyle III FJ (2008) Sensitivity measures for oscillating systems: application to mammalian circadian gene network *IEEE Trans Auto Cont* 53:177-188.
- [15] Conrad E, Mayo AE, Ninfa AJ, Forger DB (2008) Rate constants rather than biochemical mechanism determine behaviour of genetic clocks *J R Soc Interface* 5:S9-S15.
- [16] Zhang T, Brazhnik P, Tyson JJ (2007) Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis *Cell Cycle* 6:85-94.
- [17] Chickarmane V, Ray A, Sauro HM, Nadim A (2007) A model for p53 dynamics triggered by DNA damage *SIAM J Appl Dyn Syst* 6:61-78.
- [18] Geva-Zatorsky N, et al. (2006) Oscillations and variability in the p53 system *Mol Syst Biol* 2:2006.0033.
- [19] Kohn KW, Pommier Y (2005) Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off/on switch of p53 in response to DNA damage *Biochem Biophys Res Commun* 331:816-827.
- [20] Levine AJ, Hu W, Feng Z (2006) The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Diff* 13:1027:1036.
- [21] Batchelor E, Mock CS, Bhan I, Loewer A, Lahav G (2008) Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage *Mol Cell* 30:277-289.
- [22] Zhang X, Lui F, Cheng Z, Wang W (2009) Cell fate decision mediated by p53 pulses *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12245-12250.
- [23] Jolma IW, Ni XY, Rensing L, Ruoff P (2010) Harmonic oscillations in homeostatic controllers: dynamics of the p53 regulatory system *Biophys J* 98:743-752.
- [24] Myatt GJ (2007) *Making Sense of Data* (Wiley-Interscience, New Jersey).
- [25] Ciliberto A, Novak B, Tyson JJ (2005) Steady states and oscillations in the p53/Mdm2 network. *Cell Cycle*. 4(3):488-93.
- [26] Steven H. Strogatz (1994) *Nonlinear Dynamics and Chaos*, (Addison Wesley publishing company).
- [27] Michael Elowitz, Stanislas Leibler (2000) A Synthetic Oscillatory Network of Transcriptional Regulators. *Nature*. Jan 20;403(6767):335-8.

- [28] Withacre JM, Rohlfshagen P, Bender A, Yao X (2011), Evolutionary Mechanics: new engineering principles for the emergence of flexibility in a dynamic and an uncertain world. *arXiv* falta:1101.4103v1.
- [29] Olaf Wolkenhauer. (2009) *Systems Biology - Dynamic Pathway Modelling*
- [30] Bernhard Å. Palsson (Jun 30, 2011) *Systems Biology: Simulation of Dynamic Network States* (Cambridge University Press)
- [31] Carlo Cosentino and Declan Bates (2011) *Feedback Control in Systems Biology* (CRC Press)
- [32] Pablo A. Iglesias and Brian P. Ingalls (2009) *Control Theory and Systems Biology* (The MIT Press)
- [33] Hiroaki Kitano (2004) Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy *Nature Reviews Cancer* 4 , 227-235
- [34] E Goss N, et al (2013) Planning cancer control in Latin America and the Caribbean *The Lancet Oncology* , Volume 14, Issue 5, Pages 391 - 436
- [35] Francis J. Doyle III and Jorg Stelling(2006) Systems interface biology *Journal of the Royal Society Interface* . vol. 3, p. 603â616
- [36] Lane, D.P.(1992) p53: guardian of the genome. *Nature* 358 , 15â16
- [37] Bode, A.M., and Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer* Vol. 4, 793-805
- [38] Jin, Y, Guo, H and Meng, Y (2012) A Hierarchical Gene Regulatory Network for Adaptive Multirobot Pattern Formation *IEEE TRANSACTIONS ON SYSTEMS MAN AND CYBERNETICS PART B-CYBERNETICS*, 42 (3). 805 - 816. ISSN 1083-4419
- [39] Peipei Zhou, Shuiming Cai, Zengrong Liu, Luonan Chen, Ruiqi Wang (2013) Coupling switches and oscillators as a means to shape cellular signals in biomolecular systems *Chaos, Solitons & Fractals* Vol. 50, May 2013, Pages 115â126
- [40] O.Wolkenhauer et al.(2009) Advancing systems biology for medical applications. *IET Systems Biology* Vol 3, Iss. 3,131-136.
- [41] Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., Cariboni, J., Gatelli, D., Saisana, M., Tarantola, S., (2008). *Global Sensitivity Analysis, The Primer* . John Wiley and Sons.
- [42] Levine AJ, Oren M.2009 The first 30 years of p53: growing ever more complex *Nat Rev Cancer* 9(10):749-58
- [43] Proctor, C. J. and Gray, D. A. (2008) Explaining oscillations and variability in the p53âMDM2 system. *BMC Syst. Biol* .2, 75 .

- [44] Lu, X., Nguyen, T. A. and Donehower, L. A.(2005) Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D. *Cell Cycle* 4, 1060â1064
- [45] Galit Lahav, Nitzan Rosenfeld, Alex Sigal, Naama Geva-Zatorsky, Arnold J Levine, Michael B Elowitz Uri Alon (2004) Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat. Gen.* , 36:147-150
- [46] Horn, H. F. Vousden, K. H.(2007) Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306â1316 .
- [47] Riley, T., Sontag, E., Chen, P. Levine, A. (2008)Transcriptional control of human p53-regulated genes.*Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402â412 .
- [48] Hamstra, D.A., Bhojani, M.S., Griffin, L.B., Laxman, B., Ross, B.D., and Rehemtulla, A.(2006) Real-time evaluation of p53 oscillatory behavior in vivo using bioluminescent imaging.*Cancer Res.* 66, 7482â7489.
- [49] Shreeram, S. et al.(2006) Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol. Cell* 23, 757â764 .
- [50] J. C. Dunlap.(2004) Chronobiology - Biological Timekeeping. *Sinauer Associates, Inc.,Sunderland, MA,* .
- [51] Stommel JM, Wahl GM (2004) Accelerated Mdm2 auto-degradation induced by DNAdamage inases is required for p53 activation. *EMBO . J* 23:1547 -1556.
- [52] Prives C. (1998)Signaling to p53: breaking the Mdm2 -p53 circuit. *Cell* 95:5-8
- [53] Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R (2002) p53 stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 4:462 -467
- [54] Eric Batchelor, Alexander Loewer and Galit Lahav(2009). The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells.*Nature Reviews Cancer*; 9: 371-377
- [55] Funahashi, A.; Matsuoka, Y.; Jouraku, A.; Morohashi, M.; Kikuchi, N.; Kitano, H. (2008) CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks *Proceedings of the IEEE* Volume 96, Issue 8 Page(s):1254 - 1265

# Apéndice A

## Título Anexo 1

### A.1. Descripción de los parámetros

Tabla A.1: Descripción de los parámetros de la red p53 en el modelo de Ciliberto

Parámetros	Descripción	Parámetros	Descripción
$a_0$	Taza de transcripción de p53 por ATMp	$a_2$	Taza de transcripción natural de Mdm2
$a_1$	Taza de incidencia de la reacción de Hill en la autotranscripción de p53	$a_3$	Taza de incidencia de la reacción de Hill en la transcripción de Mdm2
$k_1$	Coefficiente de Hill en la autotranscripción de p53	$k_2$	Coefficiente de Hill en la transcripción de Mdm2
$g_1$	Taza de degradación de p53 por mdm2	$g_3$	Taza de degradación natural de Mdm2
$g_2$	Taza de degradación natural de p53	$ATM_p$	Máxima concentración de Atmp



Tabla A.2: Descripción de los parámetros de la red p53 en el modelo propuesto.

Parámetros	Descripción	Parámetros	Descripción
$k_{1s53}$	Taza de la transcripción natural de p53	$g_{ac}$	Taza de degradación natural de $p53_{ac}$
$k_{2s53}$	Taza de incidencia de la reacción de Hill en la auto-transcripción de p53	$k_{1s2}$	Taza de la transcripción natural de $Mdm2_{cit}$
$J_{s53}$	Coefficiente de Hill en la transcripción de $p53_{in}$	$k_{2s2}$	Taza de incidencia de la reacción de Hill en la transcripción de $Mdm2_{cit}$
$g_{in1}$	Taza de degradación de $p53_{in}$ por Mdm2	$J_{s2}$	Coefficiente de Hill en la transcripción de $Mdm2_{cit}$
$g_{in}$	Taza de degradación natural de $p53_{in}$	$k_{2d2}$	Taza de degradación natural de $Mdm2_{cit}$
$a_f$	Taza de incidencia de la reacción de Michaelis–Menten en la activación de $p53_{in}$ por $ATM_p$	$k_i$	taza de entrada de $Mdm2_{cit}$ al núcleo
$k_{m1}$	Constante de Michaelis–Menten en la activación de $p53_{in}$ por $ATM_p$	$k_o$	Taza de salida de $Mdm2_{nuc}$ del núcleo
$k_{1ac}$	Taza de activación natural de $p53_{in}$	$k_{1d2}$	Taza de degradación natural de $Mdm2_{nuc}$
$k_{in}$	Taza de incidencia de la desactivación enzimática de $p53_{ac}$	$k_{3d2}$	Taza de degradación natural de $Mdm2_{cit}$
$k_{m2}$	Constante de desactivación enzimática de $p53_{ac}$	$k_{md}$	Constante de Michaelis–Menten en la degradación de $Mdm2_{nuc}$ por $ATM_p$
$g_{ac1}$	Taza de degradación de $p53_{ac}$ por $Mdm2_{nuc}$	$ATM_p$	Máxima concentración de $ATM_p$

## A.2. Valores nominales de los parámetros

Tabla A.9: Valores nominales de los parámetros encontrados el modelo de Ciliberto.

	B0	B1	B2	B3	B4	B5
$a_0$	2e-2	2.84	8.20	4.64	7.92	9.3e-1
$a_1$	15	50.62	1000.73	1232.12	3898.42	16.68
$k_1$	80	3.6e-1	2.43	23212.52	46211.97	1.31
$g_1$	7.5e-1	6e-3	248.50	1e-2	9e-3	76.47
$g_2$	1e-3	8.9e-1	1.65e-6	1.14e-6	2e-2	9.7e-1
$a_2$	5e-2	7.75	7.9e-4	9.32e-5	44.85	1.15e-4
$a_3$	15	9850.78	496.33	3908.36	14145.98	1.1e-1
$k_2$	80	1.1e-1	22862.44	15620.49	16714.32	8.3e-1
$g_3$	7.5e-1	1.35	1.2e-2	3.5e-1	0.41	4.7e-1
$ATM_p$	50	50	50	50	50	50

Tabla A.4: Valores nominales de los parámetros del molde propuesto.

	B0	B1	B2	B3	B4	B5
$k_{1s53}$	4.96	2.66e+1	4.42e-1	1.43e+3	1.19e-2	3.41e-1
$k_{2s53}$	3.28e+1	1.4e+2	7.88e+2	3.36e+3	1.43	6.26e+3
$J_{s53}$	7.85e-1	3.27e-3	8.77e-3	4.95e+1	1.49e-2	2.66e-3
$g_{in1}$	2.73	6.12e+2	8.35e-2	1.43	1.89e+3	3.95e+1
$g_{in}$	1.62	1.48e-2	1.37e+1	1.74e-3	1.10e-2	3.90
$a_f$	2.50	1.17e+2	1.51e+2	1.77e+3	1.54e+3	6.58e-2
$k_{m1}$	8.86	1.34e-1	4.66e-2	1.85e-2	2.93e+3	9.94e+2
$k_{1ac}$	8.13	4.27	4.96e-1	6.32e+3	2.76e-1	1.95e-1
$k_{in}$	5.59e-1	3.87e+2	6.22e-4	6.89e-2	2.18e-1	1.14e-1
$k_{m2}$	11.3	9.62e+3	7.57e+3	1.63e+3	6.07e+1	4.01e+3
$g_{ac1}$	2.08	3.23e+2	4.54e+2	1.17	2.45e+2	1.58e-2
$g_{ac}$	0.602	1.15e-3	3.56e-2	4.67e-3	7.07e-2	3.09e+2
$k_{1s2}$	4.10e-3	9.20e-1	4.07e-1	1.08e-4	1.71e+00	1.24e-1
$k_{2s2}$	7.14	1.88	2.33e+1	2.53e+2	1.53e+2	4.51e+1
$J_{s2}$	5.00e-1	3.54e-3	5.04e-3	6.16e+1	1.17e-2	2.40e-3
$k_{2d2}$	0.254	5.33e-1	8.25e-4	3.21e-3	7.53e-1	1.68e-1
$k_i$	0.763	6.65e-1	1.03	3.65e-1	1.24e-3	3.49e+2
$k_o$	0.0437	1.35e-3	2.04e-4	2.10e-1	1.78e-1	3.81e-4
$k_{1d2}$	0.0129	5.17e-1	1.15	1.67e-5	7.47e-1	2.90e-4
$k_{3d2}$	0.755	6.89e-3	1.35e+2	1.85	1.25e-2	8.28e-1
$k_{md}$	4.41	5.43e+2	1.42e+1	2.26	2.85e+2	3.35e+3
$ATM_p$	7.67	2.06e-2	4.40e-2	2.72e+3	7.00e+1	4.73e+3

### A.3. Boxplot de las sensibilidades

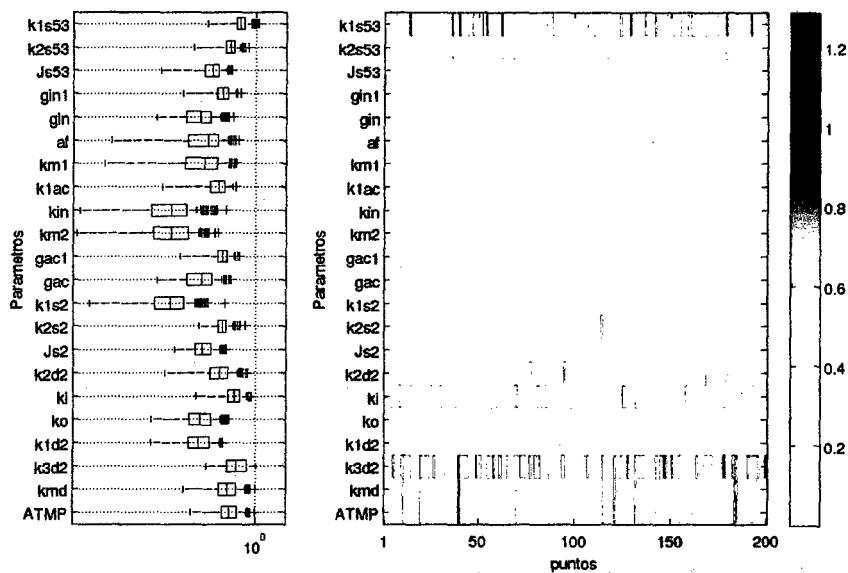


Figura A.1: Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades.

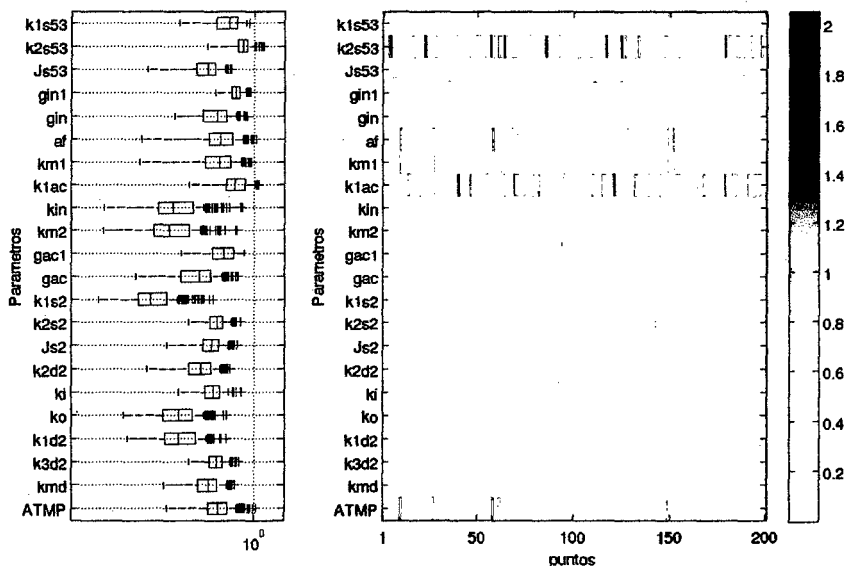


Figura A.2: Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades.

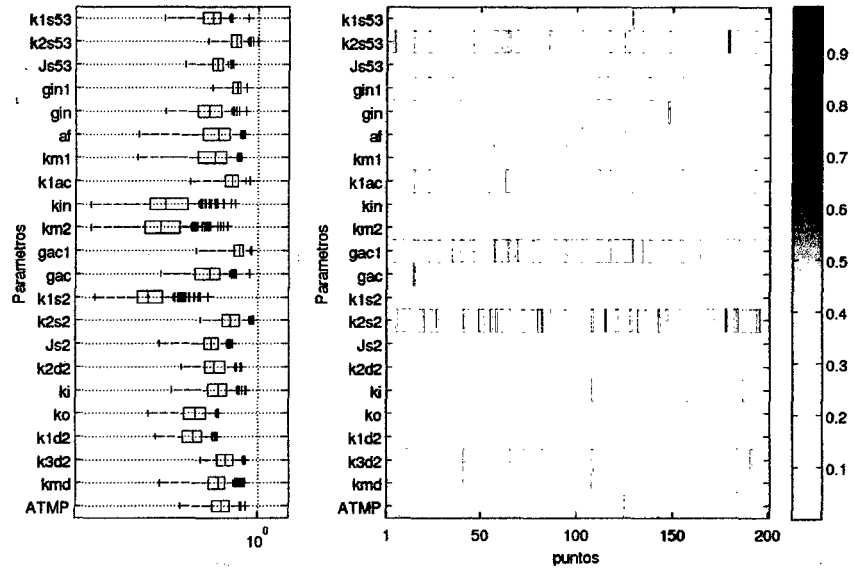


Figura A.3: Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades.

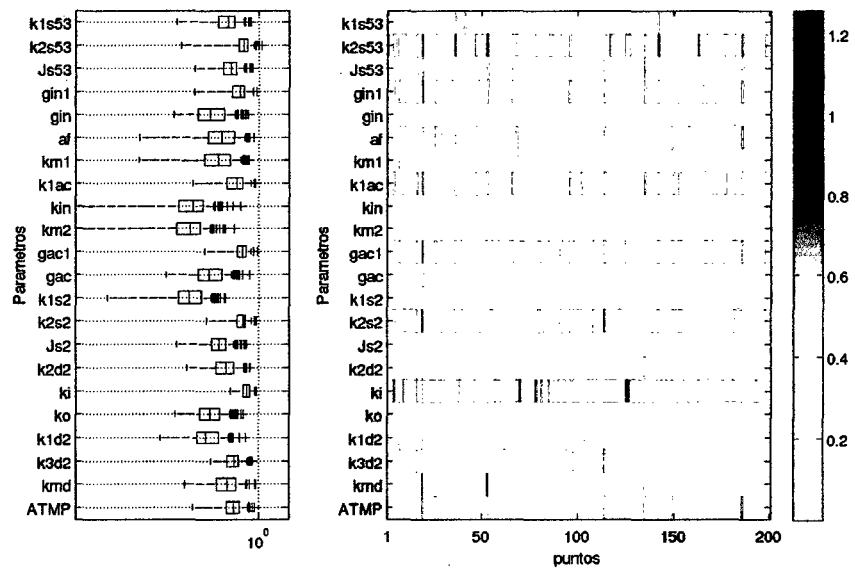


Figura A.4: Izquierda: boxplot de la sensibilidad del periodo en los 200 conjuntos parámetros de operación hallados en el modelo propuesto. Derecha: representación de la distribución de las sensibilidades.

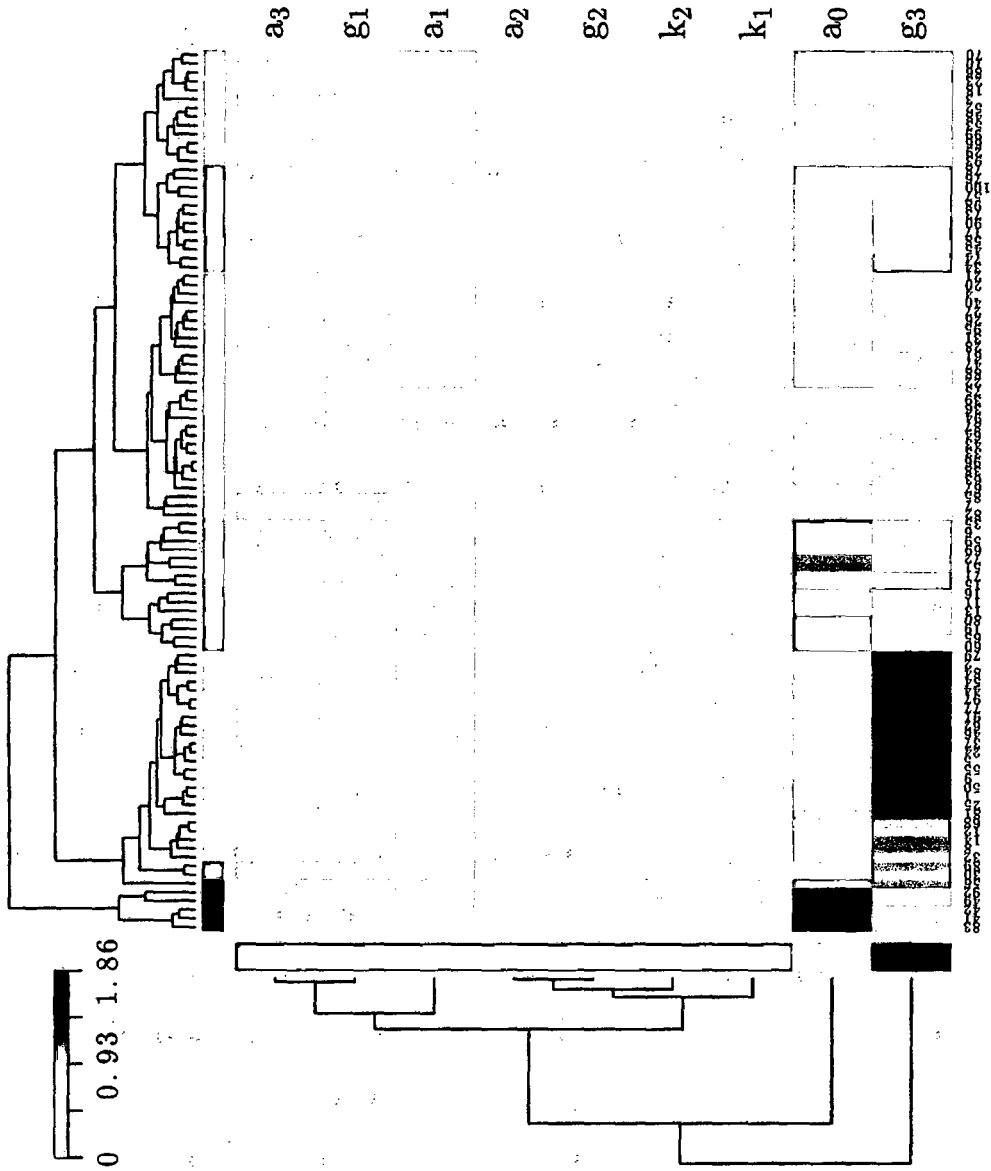


Figura A.5: Formación de los grupos para las sensibilidades de los 100 conjuntos de parámetros para  $B_0$  en el modelo de Chickármane

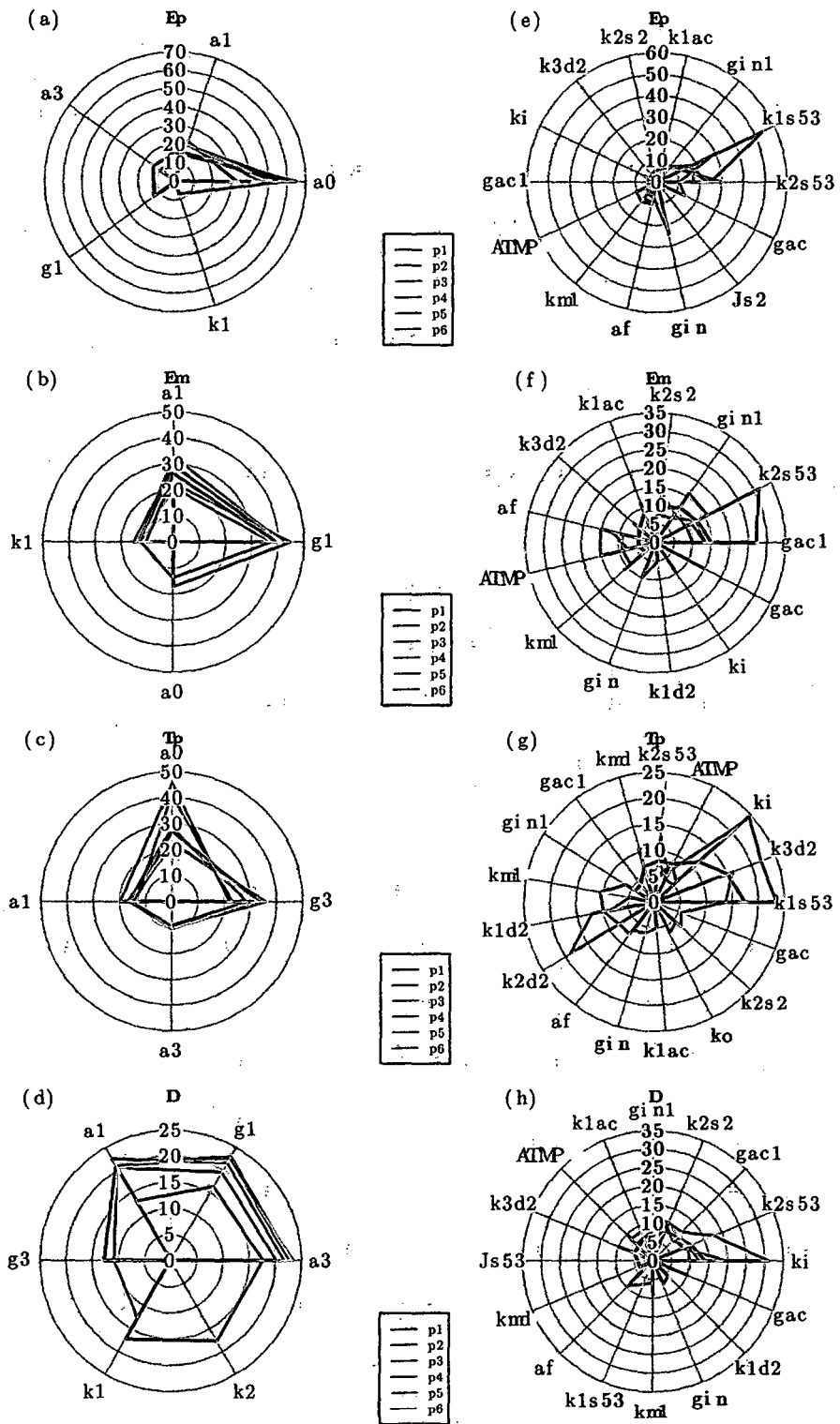


Figura A.6: Medias de las sensibilidad de los parámetros que corresponden a los 6 bases de conjuntos de parámetros (B1-B6) considerando los parámetros que contribuyen en al menos 70% del monto total. Izquierda Modelo de Chickarmane y Derecha modelo propuesto. (a,b) extrema de p53, (c,d) extrema de Mdm2, (e,f) periodo p53 and (g,h) retardo.

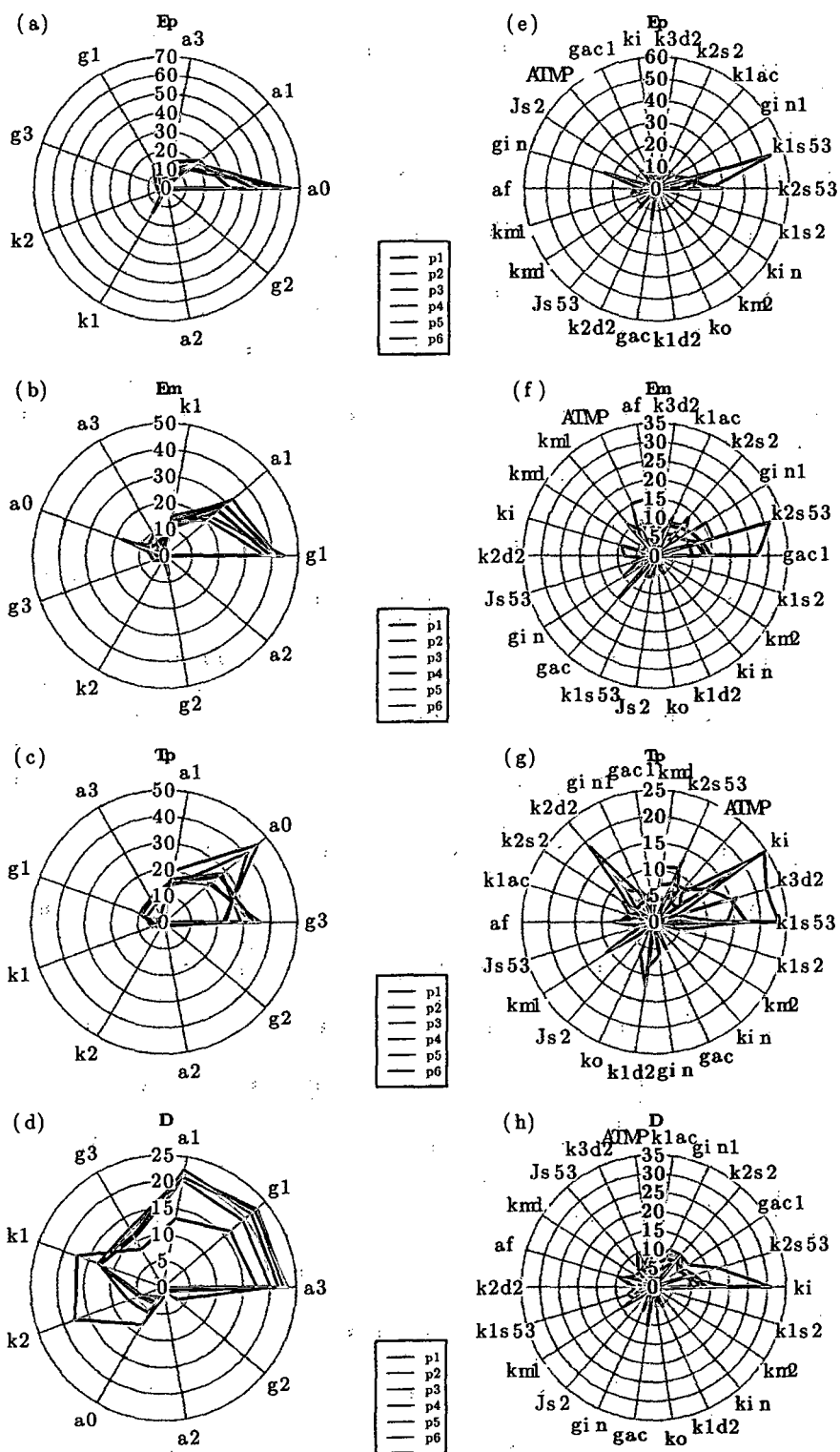


Figura A.7: Médias de las sensibilidad de los parametros que corresponden a los 6 bases de conjuntos de parámetros (B1-B6) considerando los parámetros que contribuyen en 100% del monto total. Izquierda Modelo de Chickarmane y Derecha modelo propuesto. (a,b) extrema de p53, (c,d) extrema de Mdm2, (e,f) periodo p53 and (g,h) retardo.



## A.4. Códigos para las simulaciones

*Listing A.1: Código en Octave para la generación de números aleatorios.*

```

rang=log10([.1 10]);% rango de la escala logarítmica
Np=5e5; encuentra el número mínimo de puntos
qq=1e3;para cambiar el SEED cada 10mil puntos
NN=round(Np/qq);
matrisrandon=[];
L=length(vector);numero de parametros
%-----(cambia el SEED)-----
for j=1:10
  for i=1:NN
    RandStream.setDefaultStream(RandStream('mt19937ar','seed',
      ,sum(1e5*clock)));
    pause(.1)%pausa
    matrisrandon(1+qq*(i-1):qq*i,:)=rand(qq,L);%genera la
      matriz randon con diferente SEED
  end
end
% pasando a escala logarítmica
datarand=rang(1)+(rang(2)-rang(1))*matrisrandon;
nprueba=10.^datarand;
clear datarand
save(NameDATAF,'dataf','-ASCII')

```

*Listing A.2: Código en R-cran del oscilador de Lotka Volterra*

```

# definición del modelo
library(deSolve)
LotVmod <- function (Time, State, Pars) {
  with(as.list(c(State, Pars)), {
    dx = x*(alpha - beta*y)
    dy = -y*(gamma - delta*x)
    return(list(c(dx, dy)))
  })
}

# valores de los parámetros
Pars <- c(alpha = 2, beta = .5, gamma = .2, delta = .6)

# valores de las concentraciones iniciales
State <- c(x = 10, y = 10)

# definición del tiempo de muestreo
Time <- seq(0, 100, by = 1)
out <- as.data.frame(ode(func = LotVmod, y = State, parms = Pars,
  times = Time))

matplot(out[,-1], type = "l", xlab = "time", ylab = "population")
legend("topright", c("Conejos", "Zorros")

```

Listing A.3: Código en R-cran del modelo de Chickarmane.

```

# valores de los parámetros
parameters <- c(a0= 1/50,a1= 15,k1= 80,g1= 0.75,g2= 0.001,a2=
  0.05,a3= 15,k2= 80,g3=0.75,ATMp= 50)

#valores iniciales de las especies
state <- c(p53 = 1, Mdm2 = 1)

# definicion del modelo
sauro<-function(t, state, parameters) {
  with(as.list(c(state, parameters)),{
    # rate of change

    dp53 <- a0*ATMp+a1*p53^4/(k1+p53^4)-(g1*Mdm2+g2)*p53
    dMdm2 <- a2+a3*p53^4/(k2+p53^4)-g3*Mdm2

    # return the rate of change
    list(c(dp53, dMdm2))
  }) # end with(as.list ...)
}

# definiendo el tiempo de muestreo
times <-seq(0,50,by=0.01)
library(deSolve)

require(deSolve)
out <- ode(y = state, times = times, func = sauro, parms =
  parameters)
head(out)

#par(oma = c(0, 0, 3, 0))
plot(out, type = "l", xlab = "time", ylab = "-")
plot(out[, "p53"], out[, "Mdm2"], pch = ".")
#mtext(outer = TRUE, side = 3, "Sauro1 model", cex = 1.5)

```

Listing A.4: Código en R-cran del modelo Propuesto

```

# estados iniciales
vector0<-c(0.206532319,0.143671600,0.393541152,5.291089492)

# valores de los parámetros
parameters <- c(k1s53= 1.176,k2s53=6.3178,Js53=0.9,gin1=0.6211,
  gin=2.5455,af=15.9681,km1=13.9,k1ac=2.8234,kin=0.67,km2=8.12,
  gac1=1.7945,gac=0.2413,k1s2=0.0112,k2s2=2.2945,Js2=0.64,k2d2
  =0.0667,ki=2.4233,ko=0.028,k1d2=0.5636,k3d2=0.3,kmd=2.5,ATMp
  =5)

#valores iniciales de las especies
state <- c(p53in=0.239792383603449,p53ac= 0.383307902081888,
  Mdm2cyt=0.196744455519198,Mdm2nuc=0.805900879888743)

# Definiendo modelo
alex<-function(t, state, parameters) {
  with(as.list(c(state, parameters)),{
    # tasa de cambio

    dp53in <- k1s53+k2s53*p53ac^4/(Js53^4+p53ac^4)-af*ATMp*p53in/(
      km1+p53in)-k1ac*p53in+kin*p53ac/(km2+p53ac)-(gin+gin1*Mdm2nuc
      )*p53in
    dp53ac <- af*ATMp*p53in/(km1+p53in)+k1ac*p53in-kin*p53ac/(km2+
      p53ac)-(gac+gac1*Mdm2nuc)*p53ac
    dMdm2cyt <- k1s2+k2s2*p53ac^3/(Js2^3+p53ac^3)-ki*Mdm2cyt+ko*
      Mdm2nuc-k2d2*Mdm2cyt
    dMdm2nuc <- ki*Mdm2cyt-ko*Mdm2nuc-(k1d2+k3d2*ATMp/(kmd+ATMp))*
      Mdm2nuc

    # return the rate of change
    list(c(dp53in, dp53ac, dMdm2cyt, dMdm2nuc))
  }) # end with(as.list ...)
}

# definiendo el tiempo y el paso de simulación
times <-seq(0,50,by=0.01)

require(deSolve)
out <- ode(y = state, times = times, func = alex, parms =
  parameters)
head(out)

#par(oma = c(0, 0, 3, 0))
plot(out, type = "l", xlab = "time", ylab = "-")

plot(out[, "p53in"],out[, "p53ac"], pch = ".")
plot(out[, "p53ac"], out[, "Mdm2cyt"], pch = ".")
plot(out[, "Mdm2cyt"], out[, "Mdm2nuc"], pch = ".")
plot(out[, "p53in"+out[, "p53ac"], out[, "Mdm2nuc"], pch = ".")

#mtext(outer = TRUE, side = 3, "model", cex = 1.5)

```

## A.5. Respuesta oscilatorias

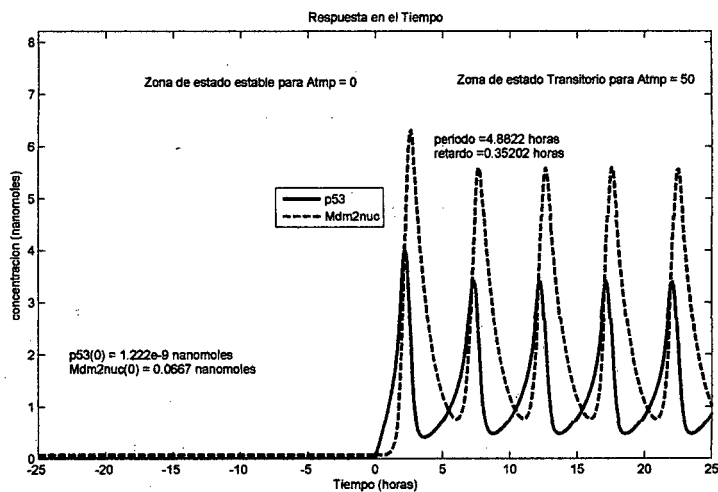


Figura A.8: Simulación para máxima concentración de ATMP del Modelo de Chickarmane con el valor original de parámetros.

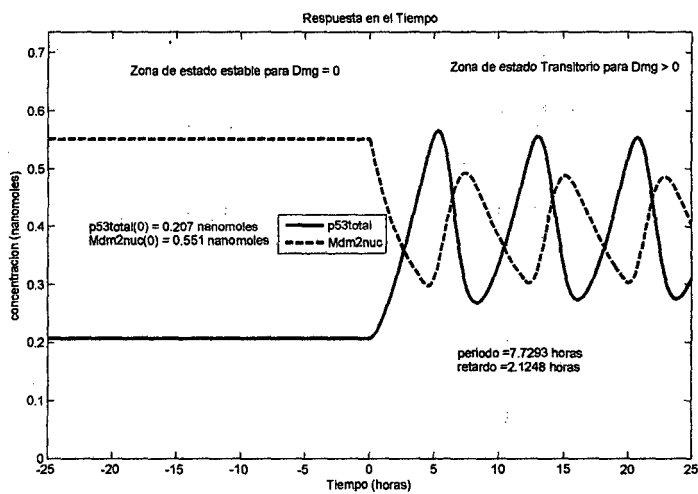


Figura A.9: Simulación para máxima concentración de ATMp del Modelo de Ciliberto.