

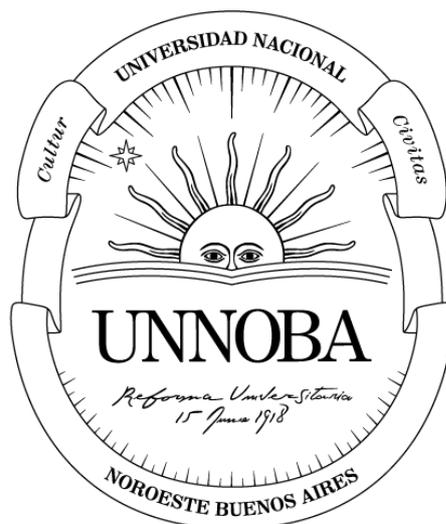
Formación de patrones espacio-temporales por  
inhibición lateral en procesos de diferenciación  
celular

---

María Belén García Contreras



Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos  
Aires



Instituto de Posgrado UNNOBA  
Maestría en Bioinformática y Biología de Sistemas

Tesis de Maestría

## **Formación de patrones espacio-temporales por inhibición lateral en procesos de diferenciación celular**

María Belén García Contreras

*Directora*      **Dra. Nara Guisoni**  
Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG)  
UNLP-CONICET

*Codirectora*    **Dra. Luciana Bruno**  
Instituto de Cálculo (IC)  
UBA-CONICET

2022

**María Belén García Contreras**

*Formación de patrones espacio-temporales por inhibición lateral en procesos de diferenciación celular*

Tesis de Maestría, 2022

Directoras: Dra. Nara Guisoni y Dra. Luciana Bruno

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

*Maestría en Bioinformática y Biología de Sistemas*

Instituto de Posgrado UNNOBA

# Resumen

En este trabajo se estudian los patrones espacio-temporales en arreglos de células que interactúan a través de inhibición lateral mediada por la vía de señalización de Notch. En primera instancia, se analiza un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales para las concentraciones de Notch y Delta para un sistema de dos células aisladas. En segundo lugar, se extiende el modelo a arreglos bidimensionales regulares y se estudian los patrones generados a partir de distintos valores de los parámetros de las funciones regulatorias. Por último, se incluye señalización a distancia a través de filopodios en un modelo de inhibición lateral para arreglos unidimensionales de células. En este caso, se utilizan dos variantes de un modelo multiescala, en los cuales se combinan ecuaciones diferenciales para las concentraciones de Notch y Delta, y modelos estocásticos para los filopodios. Aquí se estudian los patrones generados en distintos escenarios relacionados con los diferentes tipos de señalización y la dinámica de los filopodios.



# Agradecimientos

*Esta tesis está dedicada a Fausto, cuya presencia me motiva a crecer.*

A mis directoras, Nara y Luciana, por guiarme y acompañarme con dedicación y por su invaluable calidad humana.

A mis padres, Mabel y Javier, que me estimulan y acompañan incondicionalmente con amor en todo lo que emprendo.

A Leonel, mi compañero de vida, por su apoyo incondicional y amor que me impulsan día a día.

A mi amiga, Cristina, que me motivó a comenzar la maestría y me acompañó en todo el proceso.

A la UNNOBA y a los excelentes docentes que conocí en ella.

A la UNAHUR por haber financiado mis estudios.



# Índice general

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>El sistema biológico</b>	<b>3</b>
2.1	Inhibición lateral: la vía de señalización de Notch . . . . .	3
2.2	Inhibición lateral entre células vecinas . . . . .	4
2.2.1	Intestino de <i>Drosophila</i> . . . . .	5
2.3	Inhibición lateral con señalización a distancia . . . . .	6
2.3.1	Formación de las cerdas dorsales de la <i>Drosophila</i> . . . . .	8
2.3.2	Formación de células neurales del pez cebra . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Inhibición lateral entre dos células vecinas</b>	<b>11</b>
3.1	Modelado matemático de la inhibición lateral mediada por la vía de señalización de Notch . . . . .	11
3.2	Análisis de estabilidad lineal del modelo . . . . .	14
3.3	Integración numérica del modelo . . . . .	18
3.4	Diagramas de fases variando los parámetros de las funciones regulatorias	19
<b>4</b>	<b>Inhibición lateral en arreglos bidimensionales de células</b>	<b>25</b>
4.1	Implementación del modelo de inhibición lateral en arreglos regulares	25
4.1.1	Integración numérica del modelo . . . . .	26
4.2	Patrones obtenidos variando los parámetros de las funciones regulatorias	28
4.2.1	Variando los parámetros $a$ y $b$ . . . . .	28
4.2.2	Variando los exponentes de Hill . . . . .	31
<b>5</b>	<b>Inhibición lateral con señalización a distancia</b>	<b>37</b>
5.1	Modelo de inhibición lateral con filopodios . . . . .	37
5.2	Dinámica de los filopodios . . . . .	41
5.2.1	Modelo de Cohen . . . . .	41
5.2.2	Modelo con filopodios dinámicos . . . . .	42
5.3	Implementación de los modelos para inhibición lateral con filopodios	43
5.4	Patrones espacio-temporales de destinos celulares . . . . .	47
<b>6</b>	<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Apéndice 1: métodos</b>	<b>59</b>

7.1	Análisis de estabilidad lineal . . . . .	59
7.2	Métodos numéricos para resolución de ecuaciones diferenciales . . .	61
<b>8</b>	<b>Apéndice 2: programas desarrollados en la Tesis</b>	<b>63</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>65</b>

# Introducción

Un problema central en biología del desarrollo es entender cómo surgen los patrones espacio temporales [29]. Se han identificado algunos de los mecanismos claves que contribuyen de manera orquestada a generar un patrón a partir de un grupo de células inicialmente equivalentes. Entre estos fenómenos biológicos podemos mencionar la proliferación, la diferenciación y la migración celular, así como la adhesión diferenciada entre células y la apoptosis. También existen mecanismos que involucran moléculas señalizadoras que afectan a los procesos ya mencionados y tienen impacto en los patrones formados [13]. Uno de estos mecanismos de señalización que tiene mucha relevancia en los procesos de diferenciación es la inhibición lateral, en el cual una célula inhibe a las células con las cuales está en contacto a adoptar su mismo destino. Así, en la inhibición lateral, se amplifican diferencias en las concentraciones de ciertas proteínas en diferentes células, lo que resulta en diferencias fenotípicas entre estas [33]. Ejemplos de patrones generados por inhibición lateral durante el desarrollo de insectos son la formación de cerdas en la parte dorsal y de venas longitudinales en las alas [32]. Además, la inhibición lateral está involucrada en el control de la neurogénesis en insectos y vertebrados [1]. También en organismos adultos la inhibición lateral está presente. Por ejemplo, en el intestino de la *Drosophila melanogaster* la proliferación de una célula madre genera dos células hijas equivalentes cuyos destinos son definidos a través de la inhibición lateral [14, 7].

Uno de los modelos matemáticos más sencillos y populares para la inhibición lateral es la utilización de un conjunto de ecuaciones diferenciales no-lineales para los niveles de expresión de las proteínas relevantes [6]. Debido a que las proteínas involucradas en la inhibición lateral son proteínas de membrana, en general es necesario utilizar modelos espacialmente explícitos para que el vecindario de cada célula esté definido. De todas formas, el estudio del modelo matemático para inhibición lateral entre dos células ha mostrado ser de interés [6, 14]. Por un lado, el estudio de dos células tiene relevancia biológica, ya que en el intestino de la *Drosophila melanogaster* las células que participan de la inhibición lateral están organizadas en pequeños aglomerados de muy pocas células, siendo los aglomerados de dos células los más comunes [14, 7]. Por otro lado, del punto de vista puramente teórico, el análisis del modelo para dos células [36] permite obtener resultados analíticos y

numéricos que pueden ser relevantes para su utilización en arreglos espaciales más complejos.

Cuando se considera un arreglo bidimensional de células los modelos para inhibición lateral generan patrones espaciales de tipo “sal y pimienta” o “tablero de ajedrez”, en los cuales las células emisoras de la señal inhibitoria están rodeadas de células receptoras de esta señal. Estos modelos matemáticos logran explicar exitosamente diferentes sistemas experimentales [11, 12, 34]. Otro paso más a tener en cuenta si se pretende explicar con la inhibición lateral el espaciado de las cerdas en la parte dorsal de la *Drosophila* [5] o el patrón de diferenciación de neuronas en el pez cebra [16, 25], es considerar la existencia de largos filopodios que contactan células distantes. El desarrollo de tales modelos matemáticos, no solamente son capaces de generar los patrones de células observados experimentalmente, sino que contribuyeron a una mejor comprensión de los mecanismos biológicos involucrados en tales sistemas experimentales [5, 17, 16, 25].

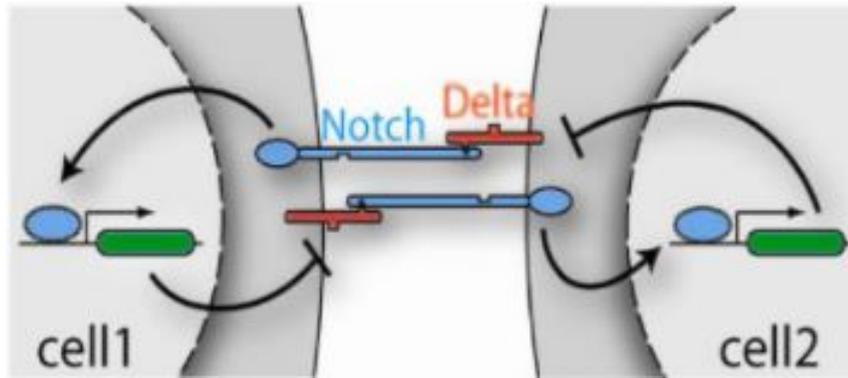
En la presente Tesis nuestro interés es estudiar la formación de patrones espacio temporales de destinos celulares utilizando modelos matemáticos para la inhibición lateral. Se presenta a continuación un resumen del contenido de cada capítulo. En el **capítulo 2** hacemos una discusión sobre los problemas biológicos relevantes para el desarrollo de la presente Tesis. El modelo matemático utilizado para la inhibición lateral es presentado en el **capítulo 3**. También discutimos con detalle el modelo para dos células, a través de resultados analíticos y numéricos. Además, se discuten los resultados presentados en la literatura para dos células cuando los parámetros de las funciones regulatorias son variados. En el **capítulo 4** estudiamos arreglos bidimensionales de células que interactúan por inhibición lateral. En particular, averiguamos el efecto de variar los parámetros de las funciones regulatorias y comparamos los resultados con los obtenidos para el sistema de dos células. En el **capítulo 5** estudiamos la inhibición lateral debido al contacto célula-célula y a la señalización a través de filopodios que conectan células distantes. Para modelar este sistema utilizamos dos versiones de un modelo multiescala, cuyos resultados son comparados. Finalmente, las conclusiones y perspectivas son presentadas en el **capítulo 6**.

# El sistema biológico

Un mecanismo importante que participa de la diferenciación celular y es capaz de generar diversos tipos de patrones espacio temporales es la inhibición lateral. A continuación describimos en detalle el mecanismo de inhibición lateral mediado por la vía de señalización de Notch y damos algunos ejemplos de sistemas biológicos en los que este mecanismo es clave. Luego, mostramos el rol que juegan los filopodios en el fenómeno de diferenciación celular por inhibición lateral en dos sistemas biológicos.

## 2.1 Inhibición lateral: la vía de señalización de Notch

La inhibición lateral es un proceso por el cual una célula instruye a las células con las cuales está en contacto para que adopten un destino diferente al propio. Se trata de un fenómeno común durante el desarrollo, por ejemplo en la selección de células precursoras neurales y musculares [4], pero también está presente en individuos adultos [14]. Un mediador bien caracterizado de la inhibición lateral es la vía de señalización de Notch, un sistema de señalización celular altamente conservado que está presente en la mayoría de los animales [33, 6]. Esta vía se activa por la interacción de dos proteínas de membrana de células en contacto: el receptor Notch en la célula que recibe la señal y un ligando en la célula emisora de la señal. En *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, se han identificado dos ligandos: Delta y Serrate [6, 4]. El receptor Notch está constituido por una porción intracelular y una región extracelular. La señalización de Notch se inicia cuando los receptores Notch de la superficie celular se unen a ligandos de otras células, tal como se ilustra en la figura 2.1 para el caso del ligando Delta. Esta unión induce la escisión proteolítica y la liberación del dominio intracelular de Notch. Una vez liberado, este ingresa al núcleo para inhibir la expresión del gen que codifica para la proteína Delta [32]. Por lo tanto, la activación de Notch conduce a una disminución de la expresión del ligando y con ello a una reducción de la capacidad de la célula para enviar señales inhibitorias [14]. Si pensamos que el receptor actúa como un intermediario entre los ligandos, este circuito se puede entender como de inhibición mutua entre los ligandos [9].

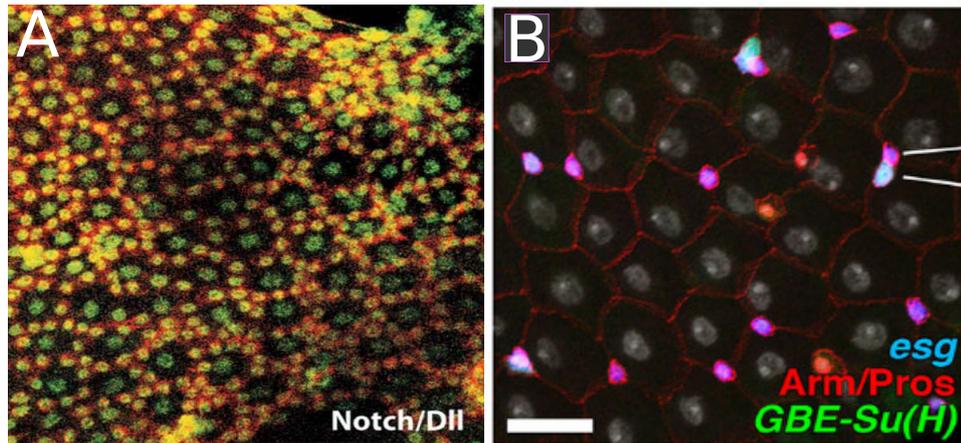


**Fig. 2.1:** El receptor Notch de una célula es activado por el contacto con el ligando Delta de la otra célula. La unión induce el clivaje proteolítico que libera el dominio intracelular de Notch que se transloca al núcleo donde inhibe la expresión de Delta.

Con la inhibición lateral, pequeñas variaciones estocásticas en los niveles de Notch y del ligando en células en contacto conducen a un circuito de retroalimentación que puede amplificar las diferencias entre estas. Cuando la inhibición lateral no funciona, por ejemplo en organismos mutantes, las células de un tejido se desarrollan con si fueran células aisladas. Este destino celular por defecto se denomina destino primario y el de las células que sufren inhibición lateral se denomina destino secundario [6]. Por lo tanto, las células con destino primario son las que presentan alta concentración de ligando y las de destino secundario las que tienen alta concentración de Notch. En lo que sigue de la Tesis nos referiremos al ligando Delta.

## 2.2 Inhibición lateral entre células vecinas

Usualmente la inhibición lateral involucra células vecinas y la señalización se da a través del contacto entre las membranas celulares, como ejemplificado en la figura 2.1. La activación de la señalización de Notch en un grupo de células inicialmente equivalentes genera diferentes patrones espacio temporales, con células con altos niveles de actividad Delta y bajos niveles de activación Notch (células con destino primario) dispersos entre células con bajos niveles de actividad Delta y altos niveles de activación Notch (correspondientes al destino secundario) [6]. Muchos procesos de desarrollo en biología utilizan la señalización Notch-Delta para construir un patrón ordenado de diferenciación celular. Algunos ejemplos son la formación de cerdas en la parte dorsal y de venas longitudinales en las alas de *Drosophila* [32, 18]; la cobertura sensorial para el ojo y las cerdas sensoriales de los insectos, el oído interno de los vertebrados y las escamas de las alas de las mariposas y polillas [27]. Además, la inhibición lateral está involucrada en el control de la neurogénesis en la *Drosophila melanogaster* y en vertebrados [1]. En todos estos casos la inhibición



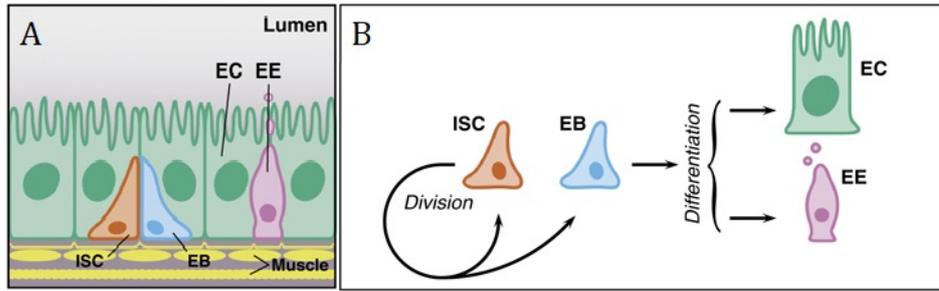
**Fig. 2.2:** Diferentes patrones formados por inhibición lateral. (A) Formación de las escamas del ala de mariposa *Heliconius erato*. En verde se marca el núcleo de las células y en rojo la expresión de Notch. Las células que tienen alta concentración de Notch se ven amarillas (combinación de verde y rojo) mientras que las que tienen baja expresión de Notch son vistas en verde. Imagen extraída de [28]. (B) Intestino medio de *Drosophila melanogaster*. Los núcleos son vistos en gris, las membranas en rojo y las células no diferenciadas que participan de la inhibición lateral en rosa o violeta claro. Imagen modificada extraída de [14].

lateral ocurre entre células que están dispuestas en un arreglo que involucra muchas células que participan de la señalización, lo que genera patrones tipo “sal y pimienta” o “tablero de ajedrez”, como el que se muestra en la figura 2.2-A. Por otro lado, en el intestino medio de la *Drosophila melanogaster* las células que participan de la inhibición lateral se encuentran en pequeños aglomerados, como se muestra en la 2.2-B. A continuación discutiremos con más detalle la inhibición lateral en el intestino medio de *Drosophila*.

### 2.2.1 Intestino de *Drosophila*

El intestino medio de la *Drosophila melanogaster* se ha estudiado ampliamente [19, 8]. Para mantener la homeostasis, este tejido debe equilibrar la proliferación celular y la diferenciación para conservar su integridad y función. Las células madre intestinales (ISC) se dividen continuamente para autorrenovarse y dar lugar a células progenitoras, llamadas enteroblastos (EB), que no se dividen sino que se diferencian directamente en los dos tipos de células intestinales funcionales: los enterocitos (EC) y las células enteroendocrinas (EE) [7, 14, 19], como puede verse en la figura 2.3.

En la presente Tesis tenemos interés en los pequeños aglomerados de células no diferenciadas, formados por ISCs y EBs (ver figura 2.2-B). Para estas células, el nivel de Notch activo es un indicador del destino celular: las células ISC presentan altos niveles de Delta (destino primario) mientras que las células con altos niveles de

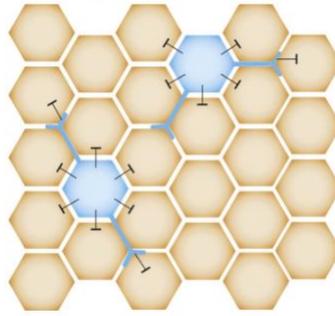


**Fig. 2.3:** (A) Composición del intestino medio de *Drosophila*. (B) ISCs pueden autorrenovarse y generar EBs, que son precursores de EEs y ECs. Imagen modificada extraída de [7].

Notch activado corresponden al destino EB (destino secundario). hijas equivalentes cuyo destino celular es decidido mediante inhibición lateral [7, 14]. Si consideramos los aglomerados de apenas dos células no diferenciadas (estos son los más frecuentes [7]), se esperaría que la inhibición lateral los lleve a tener destinos diferentes, del tipo ISC-EB, ya que una pequeña asimetría en la concentración de Notch o Delta en estas células sería amplificada por la inhibición lateral. Pero lo que se observa experimentalmente son los tres tipos de pares posibles: ISC-EB, ISC-ISC y EB-EB [7, 14]. Para explicar tal resultado, utilizando una combinación de resultados teóricos y experimentales, Guisoni et al. [14] proponen que la inhibición lateral depende del área de contacto entre las células, sugiriendo que la compactación de las células afecta la señalización: un área de contacto pequeña favorece la autorrenovación simétrica (pares ISC-ISC), mientras que los eventos EB-EB e ISC-EB ocurren para valores más altos de área de contacto [14]. Resultados similares para otro sistema experimental fueron encontrados por otros autores [31].

## 2.3 Inhibición lateral con señalización a distancia

Hasta aquí se discutió situaciones en que la inhibición lateral ocurre entre células vecinas. No obstante, algunos trabajos han sugerido que la distancia sobre la cual puede operar la inhibición lateral puede extenderse mediante filopodios o protusiones celulares capaces de abarcar varios diámetros celulares como se esquematiza en la figura 2.4. Por ejemplo, se ha encontrado un mecanismo mediado por filopodios en la médula espinal del embrión de pez cebra que podría controlar el patrón de diferenciación espacial y temporal a través de la inhibición lateral a larga distancia [16]. También se ha propuesto la inhibición lateral mediada por protrusiones para refinar los patrones de diferenciación de las cerdas dorsales durante el desarrollo de la *Drosophila* [5].

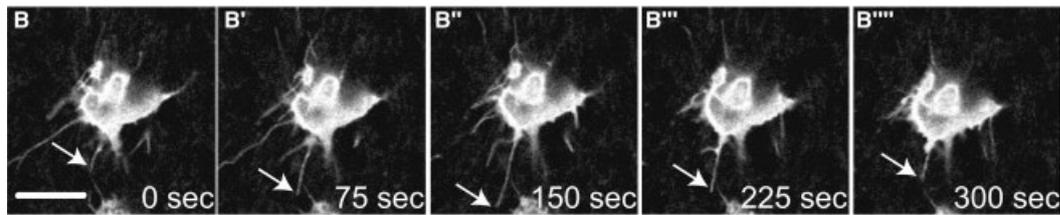


**Fig. 2.4:** La distancia sobre la cual puede operar la señalización mediada por contacto célula-célula puede extenderse mediante contactos a larga distancia mediados por filopodios. Imagen extraída de [33].

Los filopodios son proyecciones de la superficie celular que funcionan como antenas para que las células exploren su entorno dado que contienen receptores para diversas moléculas de señalización y moléculas de la matriz extracelular [24]. Tienen un rol importante en una serie de procesos celulares tales como la migración celular, la cicatrización de heridas, el crecimiento neuronal y el desarrollo embrionario [24, 5, 2].

Estas protrusiones de la membrana plasmática están compuestas principalmente por filamentos de actina paralelos, que son estructuras constituidas por monómeros de una proteína globular denominada actina-G. Dichas estructuras son polares con dos extremos que poseen diferentes afinidades por la actina G: uno positivo (+), donde se produce principalmente la adición de monómeros y otro negativo (-), donde se produce su disociación. Los monómeros que se ensamblan en el extremo + se transportan hacia atrás con el tiempo mediante un fenómeno conocido como flujo retrógrado [23], que es producido por la fuerza de empuje causada por la polimerización de actina y por la tracción generada por la actividad motora de las miosinas [3]. El haz de actina se alarga por la polimerización de los monómeros de actina en los extremos + y se retrae como consecuencia de la despolimerización y el flujo retrógrado; lo que hace que los filopodios presenten un comportamiento dinámico: se extienden y se retraen rápidamente, como se aprecia en la figura 2.5. Debido a la acción conjunta de la despolimerización de actina y del flujo retrógrado, la velocidad de crecimiento de los filopodios es usualmente menor que la velocidad de decrecimiento.

La dinámica de crecimiento de los filopodios está orquestada por diferentes actores que incluyen proteínas de señalización, proteínas de reticulación de actina, factores que regulan la nucleación y elongación del filamento de actina, proteínas motoras y proteínas que son capaces de formar túbulos en la membrana plasmática [24]. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas de capping y las forminas. Estas últimas comprenden una gran familia de proteínas que inducen la formación de filamentos



**Fig. 2.5:** Los filopodios son altamente dinámicos. Célula epitelial de la *Drosophila* con filopodios que crecen y se retraen. Imagen extraída de [5].

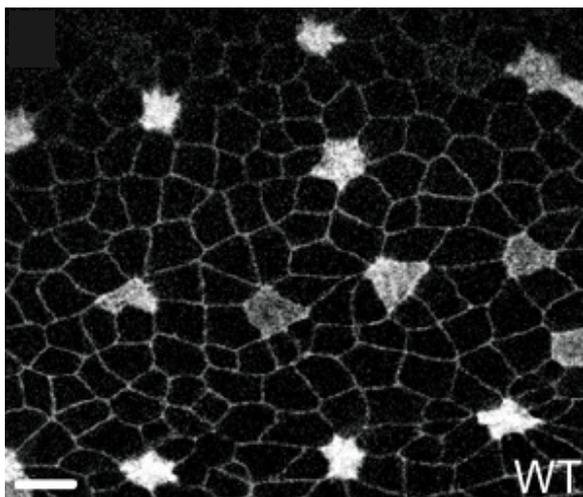
de actina. Estas proteínas se unen a los extremos + y aceleran la elongación de los filamentos a partir de la profilina-actina de manera procesiva y la proteína de protección que bloquea el crecimiento del filamento [10].

A continuación discutiremos en detalle los trabajos que proponen la existencia de filopodios asociados a inhibición lateral en el desarrollo de la *Drosophila notum* y de pez cebra.

### 2.3.1 Formación de las cerdas dorsales de la *Drosophila*

Las cerdas mecanosensoriales torácicas de *Drosophila* se originan a partir de células que se seleccionan de grupos de células epiteliales. Algunas células resultan precursores de órganos sensoriales, mientras que otras células adoptan un destino epidérmico. La formación del patrón de estas cerdas está regulado por la inhibición lateral mediada por Delta y Notch. Las células precursoras se caracterizan por tener alta concentración de Delta, mientras las células epiteliales presentan altos niveles de Notch activado [5]. El espaciado entre las células precursoras en la *Drosophila notum* se puede observar en la figura 2.6. Tal patrón espacial no puede ser obtenido considerando solamente la señalización apical entre células vecinas [32]. Por otro lado, este podría explicarse por la acción de filopodios que se extienden más allá de las células lindantes produciendo señalización intermitente entre células no vecinas [5].

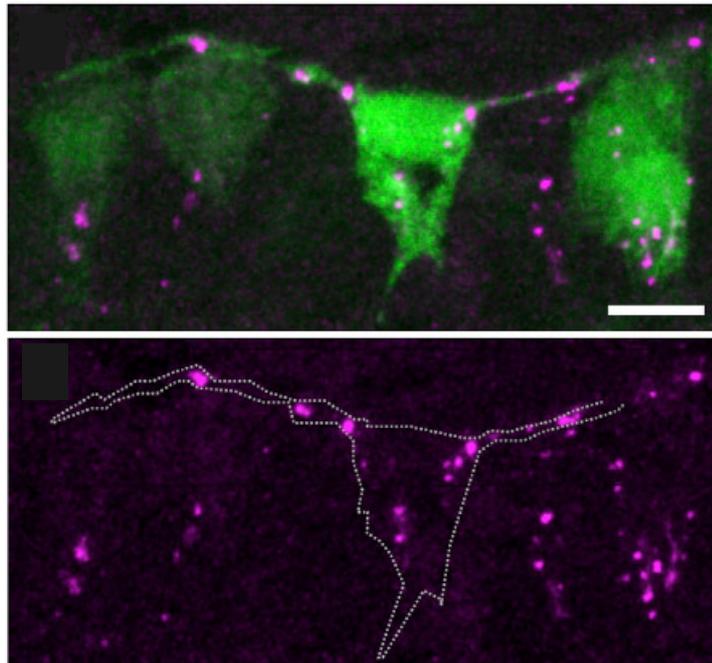
A partir de imágenes *in vivo* de las células epiteliales tomadas durante el desarrollo del *notum* de la *Drosophila*, Cohen y colaboradores [5] estudiaron los filopodios y caracterizaron su distribución, longitud y dinámica. Por otro lado, utilizaron clones cuyas células precursoras carecen de filopodios y mostraron que se obtiene un patrón desordenado. Los autores muestran que los cambios en la longitud y la dinámica de los filopodios conducen a cambios correspondientes en el espaciado de las cerdas. Concluyeron así que el desarrollo del patrón ordenado de cerdas observado experimentalmente depende de filopodios que se extienden y retraen dinámicamente formando contactos transitorios con células ubicadas a varios diámetros de células de distancia.



**Fig. 2.6:** Espaciado entre células precursoras de las cerdas dorsales en *Drosophila notum*. Las células precursoras se ven en color claro. Imagen extraída de [5].

### 2.3.2 Formación de células neurales del pez cebra

En un trabajo reciente Hadjivasiliou y colaboradores descubren una actividad protrusiva en las neuronas en diferenciación en la médula espinal del embrión pez cebra que afecta el patrón espacio-temporal de diferenciación neuronal [16]. Las neuronas nuevas extienden transitoriamente dos protuberancias a lo largo de la superficie basal del tubo neural antes del inicio del axón, una hacia delante y la otra hacia atrás como se muestra en la figura 2.7. Los autores muestran que estas protuberancias expresan la proteína Delta en altos niveles y las células cercanas experimentan altos niveles de Notch activo. Además, estudiando la diferenciación neuronal en mutantes con protuberancias más pequeñas, prueban que la reducción experimental de los filopodios produce patrones con distancias más cortas entre las neuronas en diferenciación. Estos datos sugieren que los filopodios podrían desempeñar un papel en el patrón de la diferenciación neuronal espinal del pez cebra.



**Fig. 2.7:** Desarrollo del pez cebra: las neuronas espinales en diferenciación alargan transitoriamente dos protuberancias basales largas a lo largo del eje la superficie de la medula espinal. Agregados de Delta en las protuberancias y en el cuerpo celular son vistos en color magenta. El marcador fluorescente verde indica la presencia de Delta citoplasmático. Imágenes extraídas de [16].

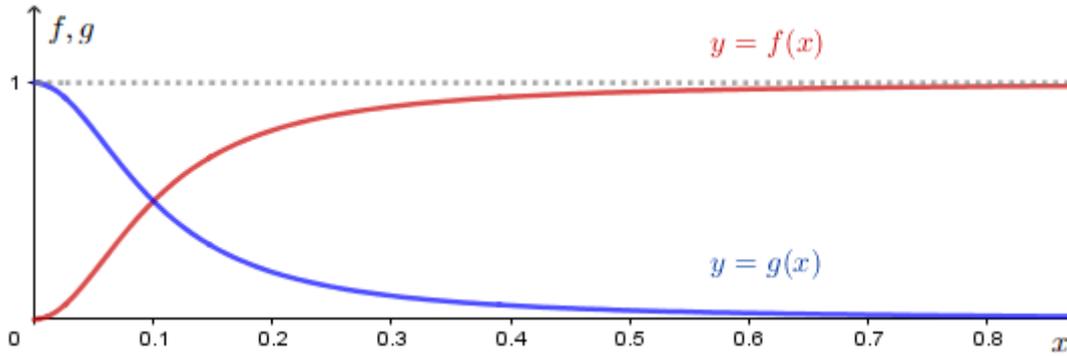
## Inhibición lateral entre dos células vecinas

En este capítulo se presenta el modelo de inhibición lateral para dos células utilizado en la tesis. Se calculan analíticamente los estados estacionarios posibles y se estudia su estabilidad. Se obtiene la solución numérica de las ecuaciones diferenciales que describen el modelo y se compara el curso temporal de las concentraciones de Notch y Delta para cada célula con los estados estacionarios encontrados analíticamente. Se presentan resultados de la literatura para el caso de dos células cuando los parámetros de las funciones regulatorias son variados.

### 3.1 Modelado matemático de la inhibición lateral mediada por la vía de señalización de Notch

En la presente Tesis utilizamos el modelo para inhibición lateral para dos células propuesto por Collier y colaboradores [6] que considera en forma simplificada la vía de señalización Notch/Delta discutida en la sección 2.1. Dicho modelo parte de los siguientes supuestos:

1. Las células interactúan sólo con aquellas con las que se encuentran en contacto directo.
2. La producción de Notch activado es una función creciente ( $f$ ) de la concentración de Delta en las células vecinas; mientras que la producción de Delta es una función del decreciente ( $g$ ) del nivel de Notch activado en la misma célula.
3. El nivel de actividad de Notch determina el destino celular. Aquellas células que poseen un bajo valor de Notch adoptan el destino primario, mientras que las células que adquieran un alto valor de Notch activo adoptan el destino secundario.
4. Notch y Delta poseen velocidades constantes de degradación.



**Fig. 3.1:** Figura ilustrativa de las funciones regulatorias. Los parámetros utilizados son  $a = 0,01$ ,  $b = 100$ ,  $k = h = 2$ .

El término de producción de Notch activado se define a través de una función de Hill activadora (creciente)  $f$  que depende de los niveles de Delta de las células vecinas. Por otro lado, en el término de producción de Delta interviene una función de Hill inhibitoria (decreciente)  $g$  que depende de la concentración de Notch activado en la propia célula. Estas funciones, conocidas como funciones regulatorias, están dadas por las siguientes fórmulas [6]:

$$\begin{aligned} f(x) &= \frac{x^k}{a + x^k} \\ g(x) &= \frac{1}{1 + bx^h}, \end{aligned} \quad (3.1)$$

donde  $k$  y  $h$  contribuyen a la no linealidad del sistema y los coeficientes  $a$  y  $b$  están relacionados con los umbrales adimensionales para la activación de Notch por Delta de la célula vecina ( $a_n$ ) y para la inhibición de Delta por Notch en la misma célula ( $b_n$ ), respectivamente, de la siguiente forma:  $a = a_n^k$  y  $b = b_n^{-h}$ <sup>1</sup>. En la figura 3.1 se muestran las funciones regulatorias  $f$  y  $g$  para un conjunto de parámetros.

La variación temporal de las concentraciones de las proteínas Notch y Delta de una célula  $i$  se describe con las siguientes ecuaciones diferenciales no-lineales:

<sup>1</sup>Si las funciones regulatorias son reescritas como [14]:

$$f(x) = \frac{x^k}{a_n^k + x^k} \quad g(x) = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{b_n}\right)^h},$$

se puede ver que  $f(a_n) = 0,5$  y  $g(b_n) = 0,5$ .

$$\begin{aligned}
\frac{\partial n_i}{\partial \tau} &= \alpha \cdot f(\bar{d}_i) - \mu \cdot n_i \\
\frac{\partial d_i}{\partial \tau} &= \beta \cdot g(n_i) - \rho \cdot d_i \\
\bar{d}_i &= \frac{1}{r} \sum_{i'=1}^r d_{i'}
\end{aligned} \tag{3.2}$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son las tasas de producción máximas de Notch y Delta respectivamente, mientras que  $\mu$  y  $\rho$  son las tasas de degradación. Además  $\bar{d}_i$  cuantifica el promedio de Delta de las  $r$  células vecinas a la célula  $i$ .

Con el fin de reducir el número de parámetros de las ecuaciones 3.2, se definen:  $v = \frac{\rho}{\mu}$ ,  $N_i = \frac{n_i \mu}{\alpha}$ ,  $D_i = \frac{d_i \rho}{\beta}$ ,  $\tau = \mu \cdot t$ . Resultando en las siguientes ecuaciones adimensionales:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial N_i}{\partial \tau} &= f(\bar{D}_i) - N_i \\
\frac{\partial D_i}{\partial \tau} &= v \cdot (g(N_i) - D_i)
\end{aligned}$$

Para un sistema de dos células aisladas las ecuaciones para las concentraciones de Notch y Delta son las siguientes, donde los subíndices 1 y 2 se refieren las distintas células:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial N_1}{\partial \tau} &= f(D_2) - N_1 \\
\frac{\partial D_1}{\partial \tau} &= v \cdot (g(N_1) - D_1) \\
\frac{\partial N_2}{\partial \tau} &= f(D_1) - N_2 \\
\frac{\partial D_2}{\partial \tau} &= v \cdot (g(N_2) - D_2)
\end{aligned} \tag{3.3}$$

## 3.2 Análisis de estabilidad lineal del modelo

Para realizar el análisis de estabilidad lineal del modelo para dos células (para una discusión general ver Apéndice, sección 7.1), se determinará en primer lugar los estados estacionarios del modelo planteado en las ecuaciones 3.3. Llamando  $N_1^*, N_2^*, D_1^*$  y  $D_2^*$  a las concentraciones de Notch y Delta de las células 1 y 2 en el estado equilibrio del sistema, en el cual  $\frac{\partial N_1^*}{\partial \tau} = \frac{\partial D_1^*}{\partial \tau} = \frac{\partial N_2^*}{\partial \tau} = \frac{\partial D_2^*}{\partial \tau} = 0$ , y reemplazando en 3.3 se desprende que:

$$\begin{aligned} N_1^* &= f(D_2^*) \\ D_1^* &= g(N_1^*) \\ N_2^* &= f(D_1^*) \\ D_2^* &= g(N_2^*) \end{aligned} \quad (3.4)$$

Aprovechando la simetría de las ecuaciones 3.4, en [6] se propone reescribirlas de esta forma:  $N_1^* = f(g(f(g(N_1^*)))$  y  $N_2^* = f(g(f(g(N_2^*)))$ . Con lo cual, las concentraciones de Notch en el estado de equilibrio se consiguen encontrando los puntos fijos de la siguiente ecuación:

$$x = f(g(f(g(x))), \quad (3.5)$$

con  $x = N_1^*, N_2^*$ . Además de la elegancia matemática de la ecuación 3.5, una de sus ventajas es que permite visualizar fácilmente cuántas soluciones de equilibrio existen: basta con determinar el número de intersecciones de la curvas  $y = x$  e  $y = f(g(f(g(x))))$ . Según lo discutido en el Apéndice, sección 7.1, para analizar la estabilidad de las soluciones se realizan pequeñas perturbaciones a las concentraciones de equilibrio ( $N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*$ ) y se estudia su evolución temporal. Si la perturbación crece con el tiempo, el punto de equilibrio es inestable, mientras que si decae, es estable. Si denotamos como  $N_1', D_1', N_2', D_2'$  a las perturbaciones tenemos que:

$$\begin{aligned} N_1 &= N_1^* + N_1' \\ D_1 &= D_1^* + D_1' \\ N_2 &= N_2^* + N_2' \\ D_2 &= D_2^* + D_2' \end{aligned} \quad (3.6)$$

Reemplazando en 3.3:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial N'_1}{\partial t} &= f(D_2^* + D'_2) - (N_1^* + N'_1) \\
 \frac{\partial D'_1}{\partial t} &= v \cdot (g(N_1^* + N'_1) - (D_1^* + D'_1)) \\
 \frac{\partial N'_2}{\partial t} &= f(D_1^* + D'_1) - (N_2^* + N'_2) \\
 \frac{\partial D'_2}{\partial t} &= v \cdot (g(N_2^* + N'_2) - (D_2^* + D'_2))
 \end{aligned} \tag{3.7}$$

Como las perturbaciones son muy pequeñas,  $g(N_i^* + N'_i)$  y  $f(D_i^* + D'_i)$  con  $i = 1, 2$  se pueden aproximar usando la aproximación de Taylor de primer orden sobre el punto fijo de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial N'_1}{\partial t} &\approx f(D_2^*) + f'(D_2^*)(D_2 - D_2^*) - (N_1^* + N'_1) \\
 \frac{\partial D'_1}{\partial t} &\approx v \cdot (g(N_1^*) + g'(N_1^*)(N_1 - N_1^*) - (D_1^* + D'_1)) \\
 \frac{\partial N'_2}{\partial t} &\approx f(D_1^*) + f'(D_1^*)(D_1 - D_1^*) - (N_2^* + N'_2) \\
 \frac{\partial D'_2}{\partial t} &\approx v \cdot (g(N_2^*) + g'(N_2^*)(N_2 - N_2^*) - (D_2^* + D'_2))
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

Utilizando las relaciones expresadas en las ecuaciones 3.4 y 3.6 en 3.8 se obtiene:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial N'_1}{\partial t} &\approx f'(D_2^*)D'_2 - N'_1 \\
 \frac{\partial D'_1}{\partial t} &\approx v \cdot (g'(N_1^*)N'_1 - D'_1) \\
 \frac{\partial N'_2}{\partial t} &\approx f'(D_1^*)D'_1 - N'_2 \\
 \frac{\partial D'_2}{\partial t} &\approx v \cdot (g'(N_2^*)N'_2 - D'_2)
 \end{aligned} \tag{3.9}$$

Podemos expresar el sistema 3.9 matricialmente de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} \frac{dN_1'}{dt} \\ \frac{dD_1'}{dt} \\ \frac{dN_2'}{dt} \\ \frac{dD_2'}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & f'(D_2) \\ vg'(N_1) & -v & 0 & 0 \\ 0 & f'(D_1) & -1 & 0 \\ 0 & 0 & vg'(N_2) & -v \end{pmatrix}_{(N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*)} \begin{pmatrix} N_1' \\ D_1' \\ N_2' \\ D_2' \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

La matriz de tamaño  $4 \times 4$  de la ecuación 3.10 queda escrita en términos de las funciones  $f$  y  $g$  evaluadas en las concentraciones de equilibrio de  $(N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*)$  y  $v$  que es la razón entre las tasas de degradación de Notch y Delta. Para analizar la estabilidad del equilibrio  $(N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*)$ , se analiza el signo de los autovalores de la dicha matriz, siendo este estable si y sólo si todos sus los autovalores poseen parte real negativa (para más detalle ver Apéndice, sección 7.1).

Tomando  $v = 1$  (valor utilizado en [6]) la matriz resultante es:

$$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & f'(D_2) \\ g'(N_1) & -1 & 0 & 0 \\ 0 & f'(D_1) & -1 & 0 \\ 0 & 0 & g'(N_2) & -1 \end{pmatrix}, \quad (3.11)$$

cuyo polinomio característico es:

$$p(\lambda) = (-1 - \lambda)^4 - f'(D_2) \cdot g'(N_1) \cdot f'(D_1) \cdot g'(N_2).$$

Este puede ser reescrito utilizando las relaciones 3.4 de la siguiente manera:

$$p(\lambda) = (-1 - \lambda)^4 - f'(g(f(g(N_1)))) \cdot g'(f(g(N_1))) \cdot f'(g(N_1)) \cdot g'(N_1).$$

Como la matriz 3.11 es calculada en el punto de equilibrio, podemos escribir:

$$p(\lambda) = (-1 - \lambda)^4 - f'(g(f(g(N^*)))) \cdot g'(f(g(N^*))) \cdot f'(g(N^*)) \cdot g'(N^*)$$

con  $N^* = N_1^*, N_2^*$ , ya que encontramos una expresión similar para  $N_2$ .

Así tenemos:

$$p(\lambda) = (-1 - \lambda)^4 - \omega,$$

$$\text{con } \omega = \frac{d}{dt} f(g(f(g(x))))_{x=x^*}.$$

Los autovalores, que se obtienen al buscar las raíces del polinomio característico son:

$$\lambda_1 = \sqrt[4]{\omega} - 1; \lambda_2 = -\sqrt[4]{\omega} - 1; \lambda_3 = -\sqrt[4]{\omega}i - 1; \lambda_4 = \sqrt[4]{\omega}i - 1.$$

Como  $\omega > 0$ ,  $\lambda_3$  y  $\lambda_4$  son números complejos con parte real negativa y  $\lambda_2$  es un número real negativo. Mientras que  $\lambda_1 < 0$  si  $\omega < 1$  y  $\lambda_1 > 0$  para  $\omega > 1$  de lo que se deducen las condiciones para definir la estabilidad de la solución, que se presenta en [6]:

- Si  $\frac{d}{dt}f(g(f(g(x))))_{x=x^*} < 1$  el punto fijo es estable.
- Si  $\frac{d}{dt}f(g(f(g(x))))_{x=x^*} > 1$  el punto fijo es inestable.

Donde  $x$  representa las concentraciones de Notch  $N_{1,2}$  y  $x^*$  el punto fijo  $N_{1,2}^*$ .

A partir de las ecuaciones 3.4 podemos escribir las soluciones de equilibrio del sistema solamente en función de  $N_1^*$  y  $N_2^*$ :

$$(N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*) = (N_1^*, g(D_1^*), N_2^*, g(N_2^*)).$$

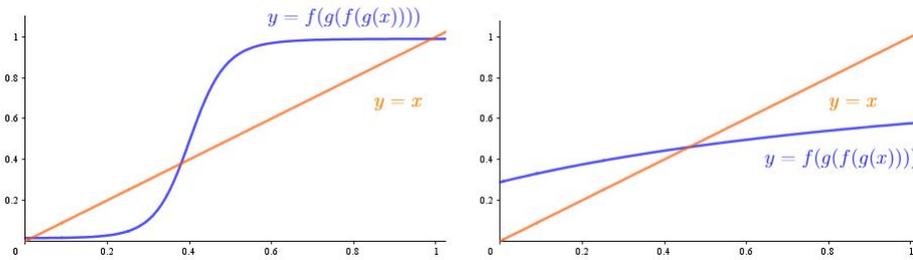
Cuando la ecuación 3.5 tiene solamente un punto fijo (es decir las curvas  $y = x$  e  $y = f(g(f(g(x))))$  se cruzan solamente una vez) este es estable [6] y tendremos un estado estacionario homogéneo con  $N_1^* = N_2^* = x_0$ , en el cual ambas células presentan la misma concentración de Notch en el estado estacionario:

$$(N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*) = (x_0^*, g(x_0^*), x_0^*, g(x_0^*)).$$

Cuando el estado estacionario homogéneo pasa a ser inestable, la ecuación 3.5 pasa a tener 3 puntos fijos (es decir las curvas  $y = x$  e  $y = f(g(f(g(x))))$  se cruzan tres veces) [6]. En esta situación hay tres soluciones posibles: la homogénea inestable  $x_0$  y dos heterogéneas estables  $x_1$  and  $x_2$ :

$$\begin{aligned} (N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*) &= (x_1^*, g(x_1^*), x_2^*, g(x_2^*)) \\ (N_1^*, D_1^*, N_2^*, D_2^*) &= (x_2^*, g(x_2^*), x_1^*, g(x_1^*)). \end{aligned} \tag{3.12}$$

En la figura 3.2 se exponen las dos situaciones discutidas. En el gráfico de la izquierda se observan tres soluciones, de las cuales hay dos estados estacionarios heterogéneos estables con  $N_1^* \neq N_2^*$  ( $(N_1^* \sim 0, N_2^* \sim 1)$  y  $(N_1^* \sim 1, N_2^* \sim 0)$ ) y un estado estacionario homogéneo inestable ( $N_1^* = N_2^* \sim 0,4$ ). Por otro lado, en el gráfico de la derecha se ve una única solución, lo que indica que dicho sistema presenta un único estado estacionario homogéneo ( $N_1 = N_2$ ) estable. Mostramos anteriormente que la estabilidad de los estados estacionarios depende de la derivada de  $f(g(f(g(x))))$ . Se puede observar cualitativamente en la figura 3.2 que la existencia de tres estados estacionarios implica en la inestabilidad del estado estacionario homogéneo, ya que necesariamente la pendiente de la curva en el centro tiene que ser grande para que



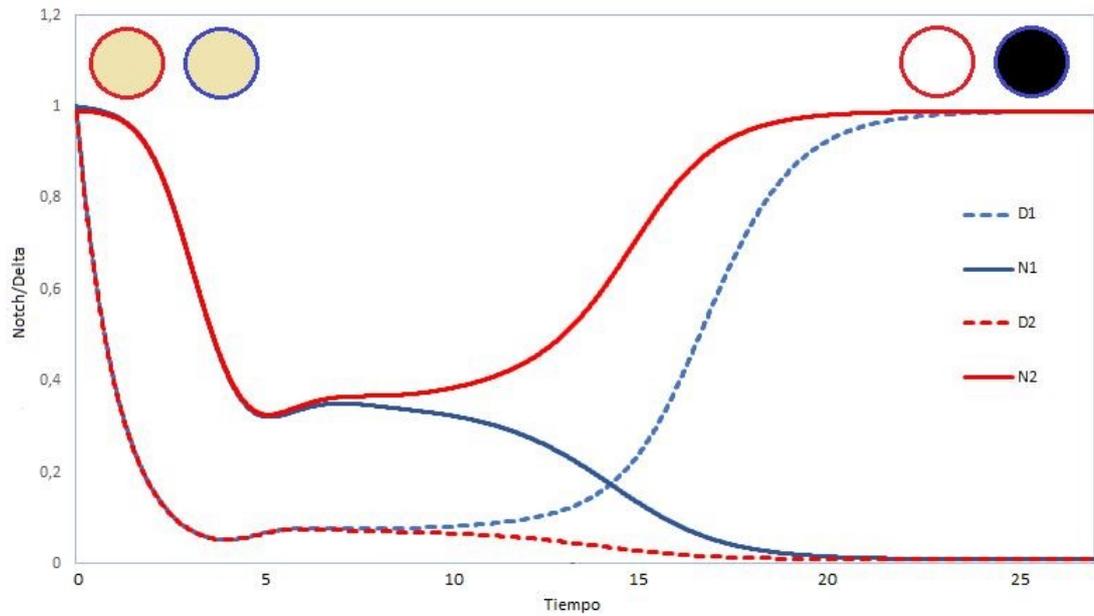
**Fig. 3.2:** Gráfico ilustrativo de las posibles intersecciones entre las curvas  $y = x$  e  $y = f(g(f(g(x))))$ . Parámetros utilizados:  $a = 0,01, b = 100, v = 1, k = h = 2$  (figura de la derecha);  $a = 0,05, b = 1, v = 1, k = 1, h = 2$  (figura de la izquierda).

existan tres puntos fijos. Por otro lado, cuando hay solamente una intersección entre  $y = x$  e  $y = f(g(f(g(x))))$ , la pendiente de  $f(g(f(g(x))))$  será menor y se cumplirá la condición de estabilidad.

El análisis de estabilidad lineal desarrollado aquí es una herramienta poderosa para determinar el comportamiento del modelo en el estado estacionario. Así, es posible determinar el número de estados de equilibrio existentes para los diferentes valores de los parámetros y definir su estabilidad. Para determinar la evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta hasta alcanzar el estado estacionario se integrará numéricamente las ecuaciones que definen el modelo, como veremos más adelante.

### 3.3 Integración numérica del modelo

Para obtener la solución numérica de las ecuaciones diferenciales 3.3 utilizamos el método de Euler (ver Apéndice 1 sección 7.2), a través del desarrollo de un programa en lenguaje R (el código está disponible en el Apéndice 2, capítulo 8). El paso de integración utilizado fue  $\Delta t = 0,001$ . Los resultados de la simulación pueden observarse en la figura 3.3. Inicialmente las dos células presentan concentraciones de Notch y Delta aproximadamente iguales. Las curvas sólidas representan las concentraciones de Notch de cada célula, mientras que las punteadas las de Delta, cuyos colores identifican las células. La célula 1 (contorno azul) finaliza con una alta concentración de Delta y una baja concentración de Notch, dirigiéndose así al destino primario. Mientras que la célula 2 (contorno rojo) termina con una concentración de Notch alta y baja de Delta por lo cual adquiere el destino secundario. Se observa que alrededor de  $t = 5$  es alcanzado el punto de equilibrio inestable en el cual las dos células tienen mismas concentraciones de Notch y Delta,  $\sim 0,4$  y  $0,1$ , respectivamente. Luego de eso, las concentraciones de Notch y Delta de las dos células empiezan a separarse hasta alcanzar los estados de equilibrio estables con  $N_1^* \approx 0, D_1^* \approx 1$  y  $N_2^* \approx 1$  y  $D_2^* \approx 0$ . El resultado de la simulación es consistente con



**Fig. 3.3:** Evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de dos células vecinas. Los parámetros utilizados son:  $a = 0,01$ ,  $b = 100$ ,  $v = 1$ ,  $k = h = 2$  y condiciones iniciales:  $n_1(0) = d_1(0) = 1$  y  $n_2(0) = d_2(0) = 0,99$ .

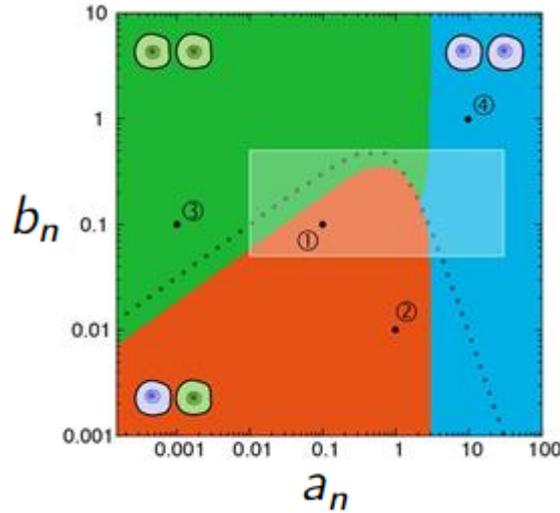
el análisis gráfico de la ecuación 3.5. En la figura 3.2 izquierda (realizada para los mismos valores de parámetros que la figura 3.3) se pueden ver las intersecciones de las curvas en  $x = 0$ ,  $x = 1$  y  $x \approx 0,4$ , que representan las soluciones posibles para Notch en el estado estacionario, de las cuales  $x = 0$ ,  $x = 1$  corresponden a los puntos de equilibrio estable y  $x \approx 0,4$  al punto de equilibrio inestable, según las condiciones presentadas en [6] y discutidas anteriormente.

### 3.4 Diagramas de fases variando los parámetros de las funciones regulatorias

En esta sección discutimos y reproducimos algunos resultados reportados anteriormente por otras autoras para un sistema de dos células con inhibición lateral [14, 36].

Como vimos anteriormente, las funciones regulatorias definidas por las ecuaciones 3.1 tienen cuatro parámetros:  $a$  y  $b$  (relacionados con los umbrales adimensionales para la activación de Notch por Delta de la célula vecina y para la inhibición de Delta por Notch en la misma célula) y los exponentes  $k$  y  $h$ . En [14] se propone una relación inversa entre el umbral de activación de Notch por Delta  $a_n$  y el área de contacto entre las células, ya que un área de contacto más grande reducirá el umbral de activación de Notch, al aumentar el número de receptores y ligandos disponibles.

Como consecuencia, la compactación de las células involucradas en la señalización incidiría en los patrones de destinos celulares generados por inhibición lateral.

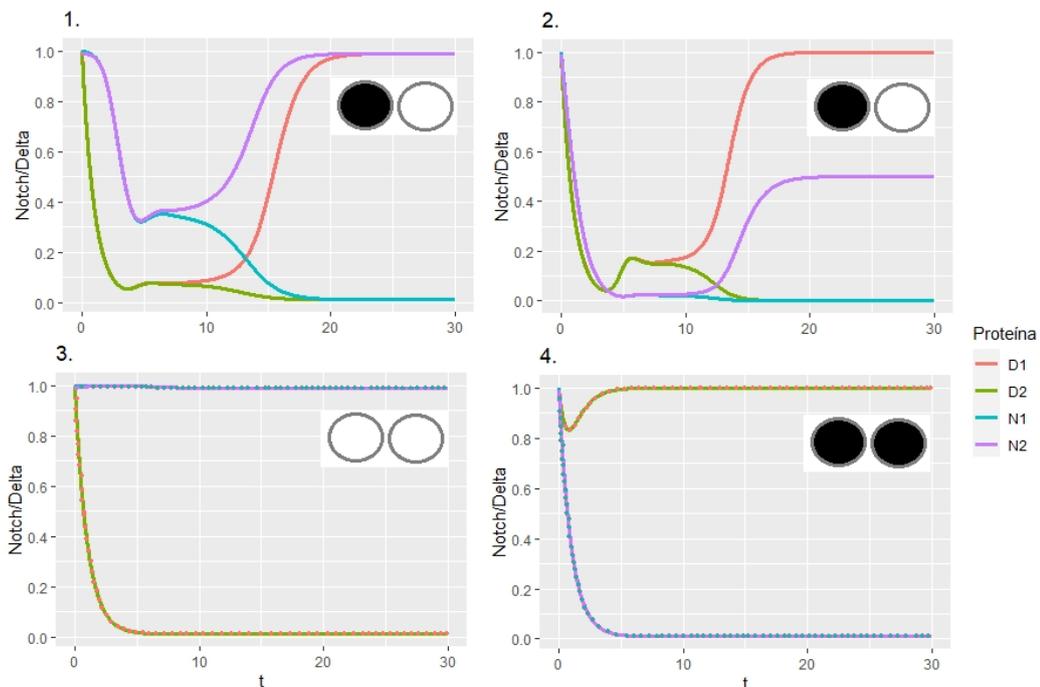


**Fig. 3.4:** Diagrama de fases para los destinos posibles para el sistema de dos células en función de los parámetros  $a_n$  y  $b_n$  para el intestino de la *Drosophila*. Los destinos posibles para la división de una célula madre (ISC) son enteroblasto (EB) o ISC. Como la división es asimétrica hay tres posibilidades para las dos células: destinos positivos simétricos (pares EB-EB, en verde), destinos negativos simétricos (pares ISC-ISC, en azul) y destinos asimétricos (pares ISC-EB, en naranja). La curva de puntos separa las regiones donde hay tres estados estacionarios posibles (parte inferior, en la cual la solución estable es la heterogénea) y un sólo estado estacionario (parte superior, en la cual la solución estable es la homogénea). Para concentraciones de Notch superiores a 0,1 la célula es considerada EB.  $k = h = 2$ . Extraído de [14].

En dicho trabajo se analiza el efecto que produce la variación de los valores de los umbrales  $a_n$  y  $b_n$  en un modelo para inhibición lateral para un sistema formado por dos células aisladas, manteniendo los coeficientes de  $r$  y  $h$  fijos. Cabe destacar que las funciones regulatorias que se utilizan en dicho trabajo son  $f(x) = \frac{x^k}{a_n^k + x^k}$  y  $g(x) = \frac{1}{1 + (\frac{x}{b_n})^h}$ . Con lo cual, la relación entre los parámetros utilizados por Guisoni y colaboradores ( $a_n$  y  $b_n$ ) y los que se utilizarán en la presente Tesis (ecuaciones 3.1, también utilizados por [6]), es la siguiente:  $a = a_n^k$  y  $b = b_n^{-h}$ .

Los parámetros  $a_n$  y  $b_n$  determinan el estado estacionario del sistema, pudiéndose obtener un resultado asimétrico (una célula con destino primario y la otra secundario) o simétrico (dos células con destino primario o ambas con destino secundario). En el intestino medio de la *Drosophila*, las células Notch negativas corresponden al destino ISC (destino primario) y las células Notch positivas a EB (destino secundario). Los pares positivos simétricos en el modelo equivaldrán a un evento de diferenciación simétrica (EB/EB), los pares negativos simétricos a la autorrenovación simétrica (ISC/ISC).

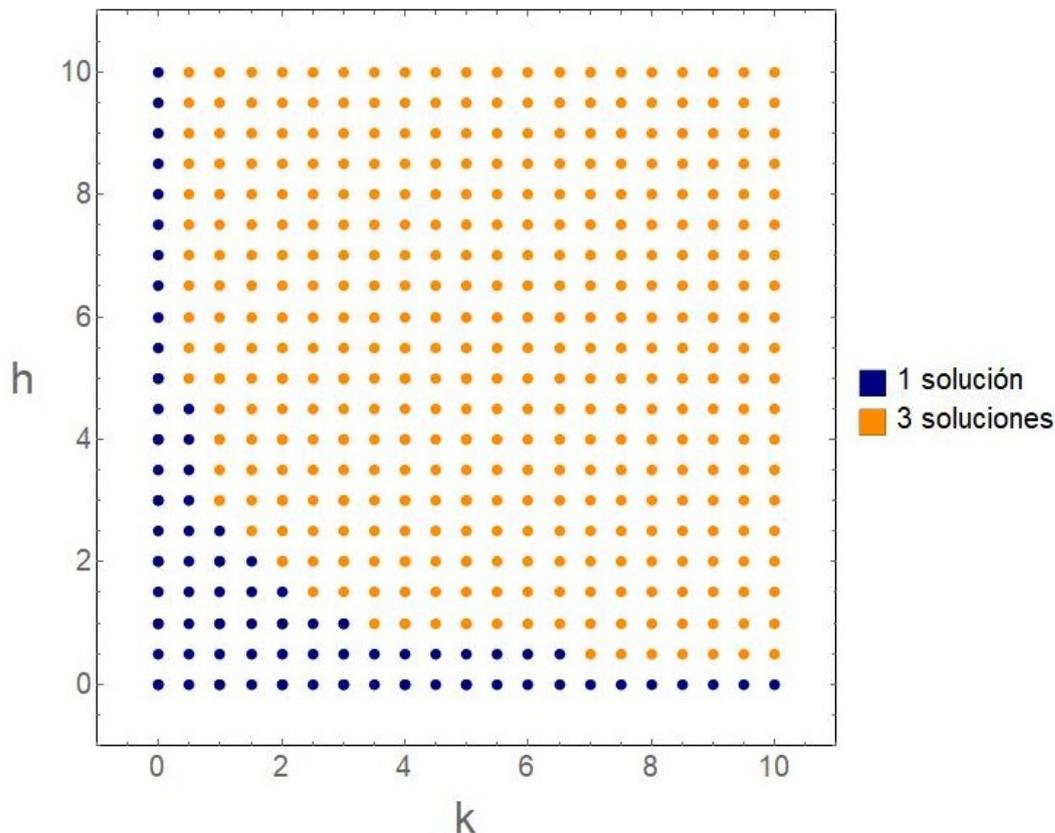
En la figura 3.4 se puede ver el espacio de parámetros  $(a_n, b_n)$  que favorece los distintos destinos. En el diagrama se puede observar que para un valor fijo de  $b_n$ , por ejemplo  $b = 0,1$ , pueden ocurrir tres situaciones distintas para los destinos de las dos células según el valor de  $a_n$ . Si  $a_n$  es muy alto no se produce la activación de Notch dado que para activarlo se requiere demasiada concentración de Delta de en célula vecina. En este caso se obtienen dos células con alto Delta y bajo Notch, o sea, dos células con destino ISC. Mientras que, si  $a_n$  es muy bajo, niveles muy bajos de Delta en la célula vecina son suficientes para activar Notch y altos niveles de Notch se traducen en bajos niveles de Delta en la misma célula. Con lo cual, ambas células terminarían con alto Notch activado y bajo Delta, indicativos del destino de EB para ambas células. Por otro lado, para un valor fijo de  $a_n$ , por ejemplo  $a_n = 0,1$ , un  $b_n$  alto implica un umbral de inhibición de Delta alto, lo que se traduce en niveles de Delta bajos en ambas células (destino EB). Finalmente, la región naranja corresponde al espacio de parámetros en el cual se obtienen destinos asimétricos (una célula ISC y otra EB).



**Fig. 3.5:** Evolución temporal de las concentraciones de Delta y Notch para dos células correspondientes a los puntos 1,2,3 y 4 de figura 3.4 para los cuales se obtienen destinos asimétricos para el punto 1 ( $a_n = 0,1$ ,  $b_n = 0,1$ ) y punto 2 ( $a_n = 1$ ,  $b_n = 0,1$ ): una célula blanca y la otra negra; y destinos simétricos para el punto 3 ( $a_n = 0,01$ ;  $b_n = 0,1$ ) con dos células blancas, y punto 4 ( $a_n = 10$ ,  $b_n = 1$ ) con dos células negras.

Asimismo, pueden notarse en la figura 3.4 cuatro puntos destacados. Hemos realizado las simulaciones correspondientes a cada uno de los casos reproduciendo los mismos resultados con los parámetros equivalentes a las funciones  $f$  y  $g$  definidas en las ecuaciones 3.1. Los resultados de las simulaciones pueden verse en la figura

3.5 donde se muestran las concentraciones de Delta y Notch de ambas células y los destinos resultantes: destinos asimétricos para los puntos 1 y 2, con una célula blanca y la otra negra; o destinos simétricos para los puntos 3 y 4, con dos células blancas y dos células negras, respectivamente.

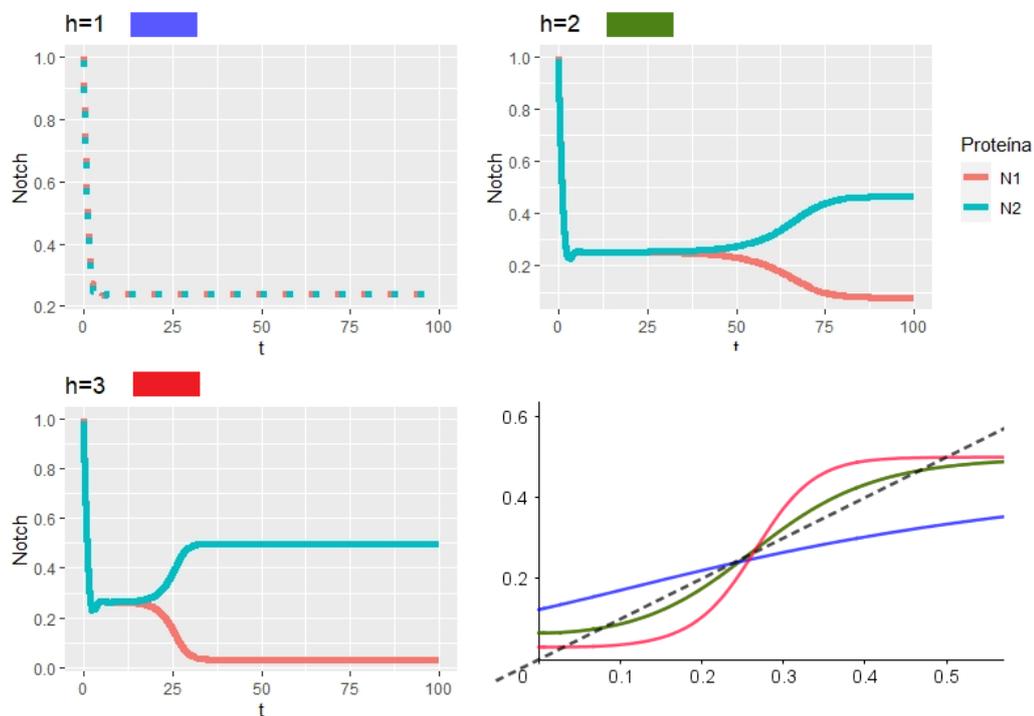


**Fig. 3.6:** Diagrama de fases para el número de soluciones posibles en el estado estacionario para el sistema de dos células en función de los exponentes de Hill de las funciones regulatorias. Los colores indican la cantidad de soluciones, según indicado. Se consideró  $a_n = 1$  y  $b_n = 0,3$ . Extraído de [36].

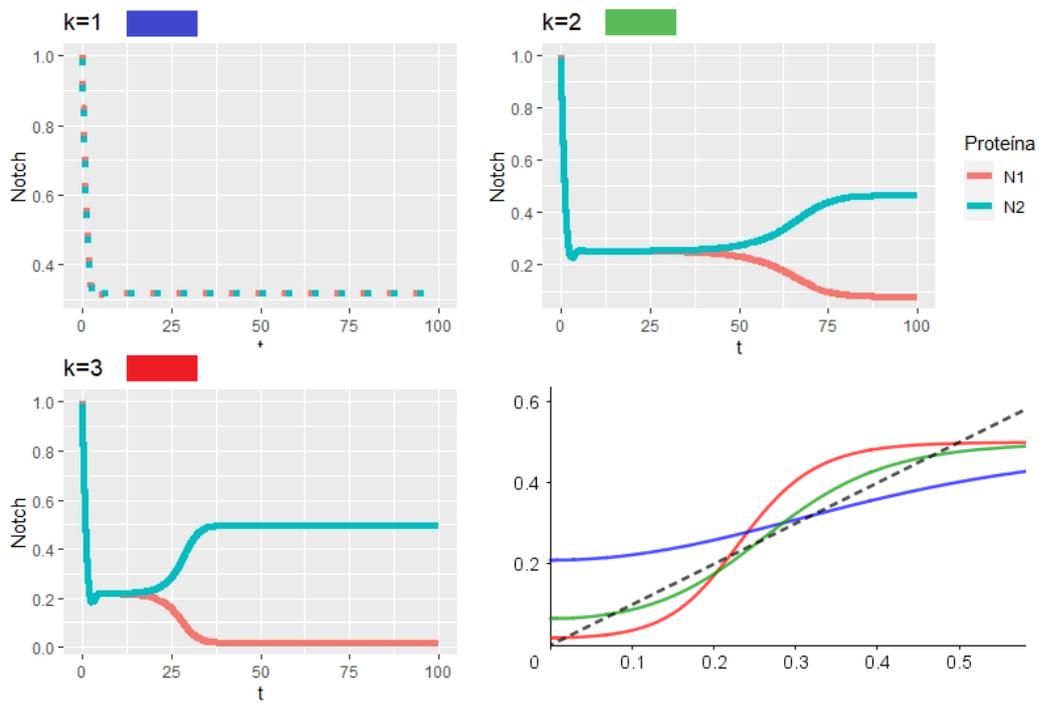
En [36] se analiza la dependencia del comportamiento del mismo sistema con los coeficientes de Hill  $k$  y  $h$ , utilizando las mismas funciones regulatorias que en [14]. Suarez [36] encuentra que al variar los valores de  $k$  y  $h$ , para  $a$  y  $b$  fijos, se pueden obtener una o tres soluciones para el estado estacionario, como se muestra en la figura 3.6. Para valores altos de los coeficientes de Hill (con  $k \neq 0$  y  $h \neq 0$ ) se obtienen tres soluciones mientras que para valores bajos hay solamente una.

Hemos realizado simulaciones utilizando los mismos valores de  $a_n$  y  $b_n$  para diferentes combinaciones de  $k$  y  $h$ , obteniendo los mismos resultados. En las figuras 3.7 y 3.8 se puede notar que los exponentes  $k$  y  $h$  modifican la curva  $y = fgfg(x)$  haciéndola más pronunciada para valores más altos de  $h$ , favoreciendo así la existencia de 3 soluciones. Se obtienen resultados similares para  $y = fgfg(x)$  al variar  $k$  y mantener  $h$  constante, aunque ambos parámetros no son completamente simétricos

[36], como se puede ver en la figura 3.6 (notar, por ejemplo, que mientras el punto  $k = 6$  y  $h = 0,5$  presenta 1 solución, el punto  $k = 0,5$  y  $h = 6$  corresponde a 3 soluciones).



**Fig. 3.7:** Paneles superiores e inferior izquierdo: evolución temporal de las concentraciones de Notch para dos células para distintos valores de  $h$  para  $k = 2$ ,  $a_n = 1$  y  $b_n = 0,3$ . Panel inferior derecho: Gráficos de las funciones  $y = fgfg(x, k, h)$  e  $y = x$  para los valores de parámetros mostrados en los otros paneles.



**Fig. 3.8:** Paneles superiores e inferior izquierdo: evolución temporal de las concentraciones de Notch para dos células para distintos valores de  $k$  para  $h = 2$ ,  $a_n = 1$  y  $b_n = 0,3$ . Panel inferior derecho: Gráficos de las funciones  $y = fgfg(x, k, h)$  e  $y = x$  para los valores de parámetros mostrados en los otros paneles.

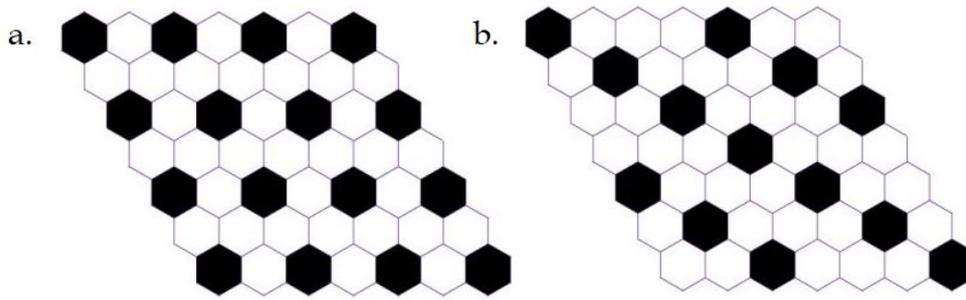
## Inhibición lateral en arreglos bidimensionales de células

En el presente capítulo se implementa el modelo para inhibición lateral en una red bidimensional regular de células. Por un lado, se muestra la presencia de diferentes patrones espacio-temporales para diferentes condiciones iniciales y condiciones de contorno. Por otro lado, se estudia el efecto que produce variar los valores de los parámetros  $a$  y  $b$  y los exponentes  $h$  y  $k$  de las funciones regulatorias y se comparan los resultados obtenidos con el sistema de dos células presentado anteriormente.

### 4.1 Implementación del modelo de inhibición lateral en arreglos regulares

Aplicamos el modelo para inhibición lateral descrito en la sección 3.1 a un conjunto de células en un arreglo hexagonal bidimensional, que representarían un tejido. Uno de los objetivos es estudiar los patrones espacio temporales de destinos celulares que se forman en estos sistemas. Consideramos dos tipos de arreglos: uno que modela tejidos donde los efectos de borde no son importantes (en los cuales hay muchas células, por ejemplo) y otro que representa un tejido aislado. Para modelar el primero usamos una matriz de  $7 \times 7$  con condiciones de contorno periódicas, es decir una matriz en la cual todas las células tienen exactamente 6 vecinas y no hay efectos de borde. Por otro lado, consideramos un arreglo formado por 49 células aisladas modelado por una matriz de  $7 \times 7$  en la cual, dependiendo de la ubicación de la célula en el arreglo, puede tener 2, 4 o 6 células vecinas (condiciones de contorno cerradas). Como se verá a continuación, el tamaño del sistema estudiado, aunque pequeño, fue adecuado ya que los resultados encontrados son generales y no tienen efecto de tamaño, siendo totalmente extrapolables a sistemas más grandes.

Para cada célula  $i$ , las ecuaciones que describen las concentraciones de Notch ( $N_i$ ) y Delta ( $D_i$ ) son las siguientes:



**Fig. 4.1:** La figura a. muestra el patrón obtenido para una matriz de  $7 \times 7$  con condiciones de contorno cerradas, mientras que en b. se observa el patrón que emerge para una matriz de  $7 \times 7$  con condiciones de contorno periódicas. Los parámetros considerados fueron  $a = 0,01$ ,  $b = 100$ ,  $v = 1$ ,  $k = h = 2$ , y las condiciones iniciales son  $D_i(0) = N_i(0)$  con valores alternados de 0,99 y 1.

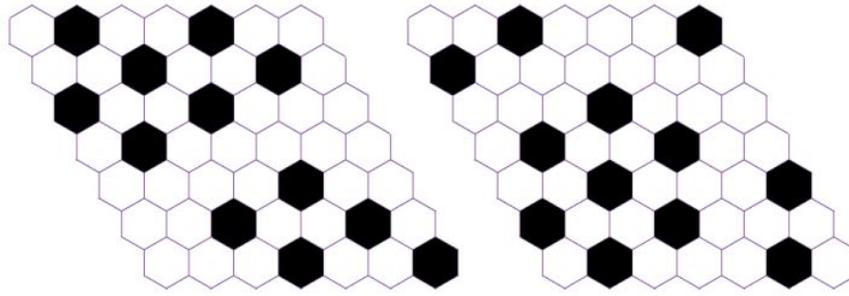
$$\begin{aligned}
 \frac{\partial N_i}{\partial \tau} &= f(\bar{D}_i) - N_i \\
 \frac{\partial D_i}{\partial \tau} &= v \cdot (g(N_i) - D_i) \\
 \bar{D}_i &= \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r d_j.
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

Donde  $\bar{D}_i$  denota el promedio de los niveles de actividad Delta en las  $r$  células adyacentes a la célula  $i$ . Las funciones regulatorias  $f$  y  $g$  son dadas por las ecuaciones 3.1. En el caso del arreglo con condiciones de contorno periódico,  $r = 6$  mientras que en el arreglo con condiciones de borde cerradas  $r$  puede valer 2, 3, 4 o 6 dependiendo de la posición de la célula.

#### 4.1.1 Integración numérica del modelo

Para resolver numéricamente las ecuaciones 4.1 utilizamos el método de Euler implementado en un programa en lenguaje R (el código puede consultarse en el Apéndice, capítulo 8). El paso de tiempo utilizado fue  $\Delta t = 0,01$ . En nuestras simulaciones todas las células del arreglo son inicialmente equivalentes con niveles iniciales de actividad Notch y Delta similares y cercanos a 1. Consideramos que una célula tiene destino primario si su concentración del Notch en el estado estacionario estable es inferior a 0,1 y la concentración de Delta supera a 0,9. Caso contrario, se trata de una célula con destino secundario.

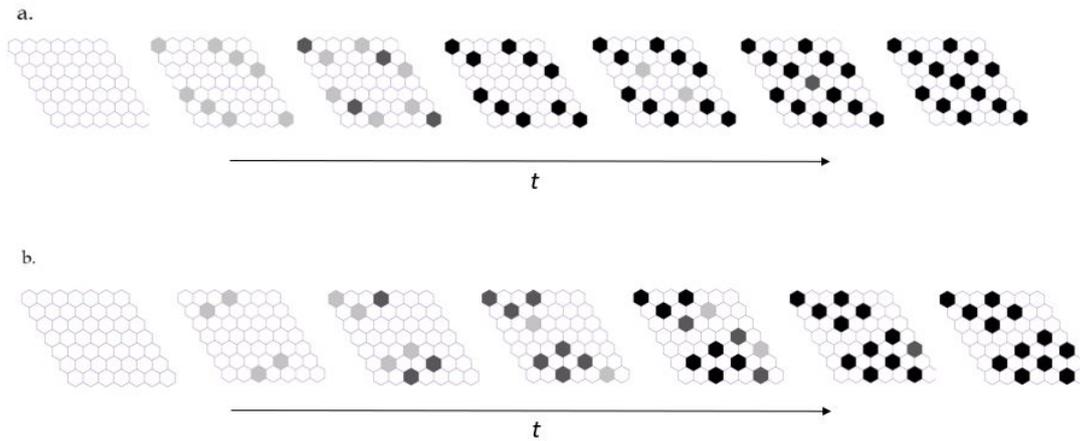
En la figura 4.1 pueden observarse los patrones en el estado estacionario del sistema derivados de dos simulaciones en las que se emplearon las mismas condiciones iniciales para ambas simulaciones y los mismos parámetros ( $a = 0,01$ ,  $b = 100$ ,  $v =$



**Fig. 4.2:** Patrones obtenidos para arreglos bidimensionales con condiciones de contorno periódicas con los mismos parámetros que en la figura 4.1. Las condiciones iniciales son levemente distintas en las dos simulaciones. En ambos casos  $D_i(0) = N_i(0)$ , pero en la figura de la izquierda estos valores tienen una distribución uniforme entre 0,9 y 1 mientras que en la figura de la derecha están uniformemente distribuidos entre 0,95 y 1.

1,  $h = k = 2$ ) en dos matrices de  $7 \times 7$ , una con condiciones de contorno cerradas y otra con periódicas. Las células coloreadas con negro adoptaron el destino primario y las células blancas el destino secundario. En estas simulaciones puede observarse que las células negras (con destino primario) se encuentran rodeadas de células blancas (con destino secundario) y no hay dos células vecinas que hayan adquirido el destino primario. La figura sugiere que las condiciones de contorno impactan en los patrones obtenidos tanto en la proporción de células con destino primario como en su disposición. Nótese que en el primer arreglo las células de las posiciones 1, 7 y 43 (si las enumeramos de 1 al 49 de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) no son vecinas en la primera matriz y si lo son en la segunda, debido a las diferentes condiciones de contorno, por eso en esta última sólo una de las tres se dirige al destino primario. Los patrones obtenidos coinciden con los patrones exhibidos en [6].

Por otro lado, variando las condiciones iniciales se obtienen patrones similares, pero debido a la posibilidad de existieren defectos estos no necesariamente son iguales, tal como se observa en la figura 4.2. Esto se debe a que en distintas partes del tejido comienzan a diferenciarse algunas células más temprano generando patrones que, a medida que avanzan, compiten con los patrones que se producen en otro sectores. Las células que quedan en el medio, se ven inhibidas por aquellas que se diferenciaron anteriormente y los patrones que habían comenzado a generarse se ven frustrados. Para comprenderlo mejor, ver la figura 4.3 donde se aprecia la evolución temporal de dos arreglos hexagonales de células con condiciones periódicas de contorno.



**Fig. 4.3:** Evolución temporal de dos arreglos hexagonales de células con condiciones periódicas de contorno. Los distintos tonos de gris indican los niveles de actividad de Notch. Aquellas con  $N < 0,1$  son negras, con  $0,1 < N < 0,19$  gris oscuro, si  $0,19 < N < 0,25$  gris claro y finalmente, si  $N > 0,25$  blancas. a) Condiciones iniciales iguales a la figura 4.1-izquierda, y b) condiciones iniciales iguales a la figura 4.2-izquierda.

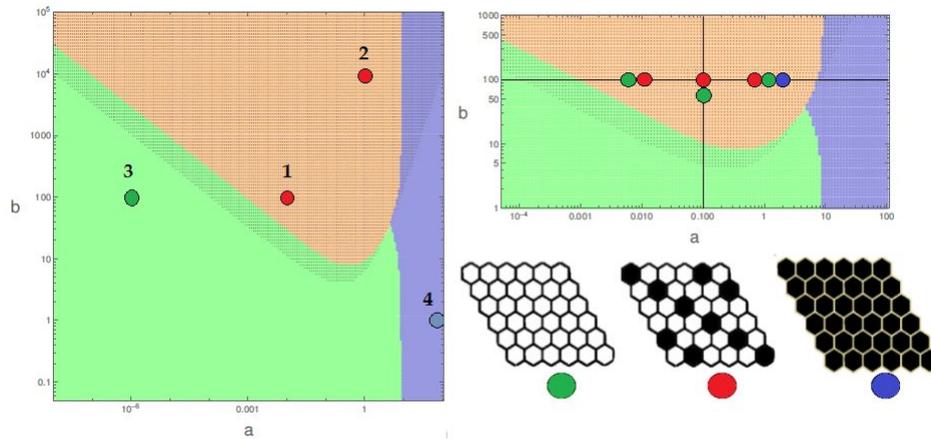
## 4.2 Patrones obtenidos variando los parámetros de las funciones regulatorias

Presentamos a continuación un estudio de los patrones encontrados en arreglos bidimensionales de células cuando se varían los parámetros  $a$ ,  $b$ ,  $k$  y  $h$

### 4.2.1 Variando los parámetros $a$ y $b$

Como vimos en la sección 3.4, en [14] se analiza el efecto que produce la variación de los valores  $a$  y  $b$  de las funciones regulatorias en un modelo para inhibición lateral para dos células aisladas. En la figura 4.4 puede verse a la izquierda un diagrama de fases con estos resultados (la figura 3.4 trae resultados equivalentes en función de los umbrales  $a_n$  y  $b_n$ ). Aquí, la región naranja denota el espacio de parámetros para los cuales se obtiene una célula con destino primario y otra con destino secundario (destino asimétrico), la región verde para dos células con destino secundario (destino simétrico) y la azul en la que ambas se dirigen al destino primario (destino simétrico).

Estudiamos el efecto que produce variar los parámetros  $a$  y  $b$  en el modelo de inhibición lateral en un arreglo bidimensional de células hexagonales, utilizando una matriz de  $7 \times 7$  con condiciones de contorno periódicas para  $h = k = 2$ . Para los parámetros  $a = 10^{-4}$  y  $b = 10000$ ,  $a = 1$  y  $b = 10000$ ,  $a = 10^{-6}$  y  $b = 100$  y  $a = 100$



**Fig. 4.4:** Diagrama de fase y patrones de destinos celulares generados para los distintos valores de los parámetros  $a$  y  $b$ . A la izquierda se muestra el diagrama de fases obtenido para el sistema de dos células aisladas. La región naranja corresponde a los parámetros para los cuales se obtiene una célula con destino primario y otra con destino secundario. En las regiones verde y celeste se obtienen células iguales que se dirigen al destino secundario y primario, respectivamente. La región sombreada muestra el espacio de parámetros en que se encuentran 3 estados estacionarios, mientras en la región sin sombras hay apenas un estado estacionario. A la derecha arriba se muestra una ampliación de una región de la figura de la izquierda. Los resultados de las simulaciones para el arreglo bidimensional se marcaron como puntos verdes, rojos o azules sobre los diagramas de fases. Los patrones bidimensionales en que todas las células adquirieron el destino secundario son identificados con los puntos verdes, aquellos en que se encontró un patrón tipo “sal y pimienta” con el punto rojo y aquellos en que todas las células presentaron destino primario con el punto azul, como se indica a la derecha abajo.

y  $b = 1$  que se visualizan en la figura 4.4 en los puntos 1,2,3 y 4, respectivamente, obtuvimos patrones de diferenciación concordantes con los expuestos en [14] para dos células aisladas. Así, en el arreglo bidimensional se obtienen patrones de células con destinos heterogéneos (puntos 1 y 2 rojos) y patrones de células con destinos homogéneos, siendo estos primario (punto 4 azul) y secundario (punto 3 verde).

Para seguir investigando el efecto de la variación de  $a$  y  $b$  en los arreglos bidimensionales, realizamos otras simulaciones en la región de parámetros en la cual los tres destinos posibles se encuentran cercanos (figura 4.4 a la derecha arriba), fijando uno de los parámetros y variando el otro. Con  $b = 100$  se obtienen destinos asimétricos para  $0,006 < a < 1,96$ . Para valores menores que  $a = 0,006$  ninguna célula adopta el destino primario, y para valores mayores que  $a = 1,96$  todas las células adquieren el destino primario. Recordemos que el parámetro  $a$  se encuentra en la expresión de la función reguladora  $f$  que está involucrado con la activación de Notch y es una función creciente que depende de la concentración de Delta en las células vecinas.

Bajos niveles de  $a$  suponen que bajos niveles de Delta en las células vecinas son capaces de activar Notch e inhibir la producción de Delta en la propia célula. A me-

didada que aumenta  $a$  se requieren valores mayores de Delta en las células adyacentes para inhibir la expresión Delta en la célula. Esto explicaría el hecho que valores bajos de  $a$  conduzcan a patrones en que todas las células tienen altos niveles de Notch y bajos niveles de Delta (destino secundario), mientras que valores altos de  $a$  produzcan patrones con todas las células con altos niveles de Delta y bajos niveles de Notch activado (destino primario). Asimismo, para  $a = 0,01$ , se obtienen destinos asimétricos si  $b > 81$ .

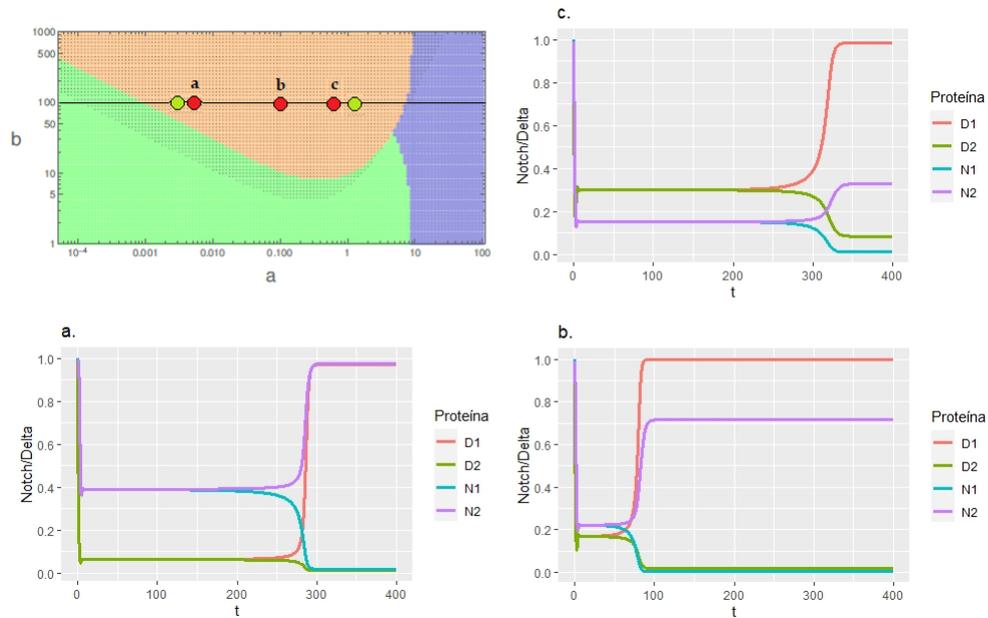
Cabe preguntarse entonces si estos parámetros serían variables en un tejido real. Guisoni y colaboradores [14] proponen una relación entre el umbral de activación de Notch por Delta y el área de contacto entre las células, ya que un mayor área de contacto supone un aumento en la cantidad de receptores disponibles para unirse a los ligandos de las células vecinas, reduciendo así el umbral de activación de Notch. Para entenderlo recordemos que  $a_n$  y  $b_n$  son los umbrales adimensionales para la activación de Notch por Delta en la celda vecina y la inhibición de Delta por Notch en la misma célula respectivamente y están dados por las siguientes ecuaciones [14]:

$$a_n = \frac{K_n \cdot \mu}{\beta}$$

$$b_n = \frac{K_d \cdot \rho}{\alpha}$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son las tasas de producción máximas de Notch y Delta respectivamente,  $\mu$  y  $\rho$  las tasas de degradación de Notch y Delta respectivamente,  $K_n$  es el umbral de activación de Notch por Delta en las células vecinas y  $K_d$  el umbral de inhibición de Delta por Notch en la misma célula. Salvo  $K_n$ , que depende directamente de la interacción entre las células, no se espera que los otros parámetros varíen en células con la misma identidad. Por lo tanto, no es de esperar que haya variabilidad en el umbral  $b_n$ , mientras que  $a_n$  podría ser variable en diferentes pares de células que participen de inhibición lateral.

Como se puede ver por los resultados de nuestras simulaciones mostradas en la figura 4.4, el espacio de parámetros para los cuales se obtienen destinos asimétricos disminuye para un tejido en comparación con lo ocurrido con el sistema de dos células. Además, a medida que nos acercamos a los bordes de la región con patrón de diferenciación tipo “sal y pimienta”, los patrones tardan más en formarse, con un marcado incremento en el tiempo de las simulaciones como se ve en la figura 4.5.



**Fig. 4.5:** A la izquierda arriba se muestra el diagrama de fases en función de  $a$  y  $b$  obtenido para el sistema de dos células aisladas. Los paneles a, b y c muestran la evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de dos células vecinas en un arreglo hexagonal para  $h = k = 2$ ,  $b = 100$  y valores de  $a$  indicados por los puntos rojos en el diagrama de fases. Punto a con  $a = 0,006$ , punto b con  $a = 0,1$  y punto c con  $a = 0,5$ .

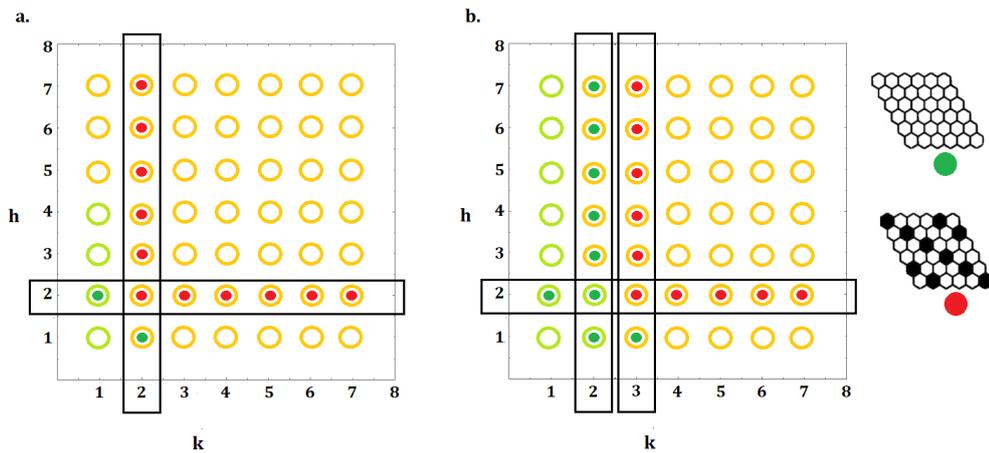
## 4.2.2 Variando los exponentes de Hill

La dependencia del comportamiento del sistema de dos células con los exponentes de Hill  $k$  y  $h$  fue analizado anteriormente [36]. En esta sección estudiamos los patrones formados al variar los valores de los exponentes de Hill para valores fijos de los parámetros de  $a$  y  $b$  en un arreglo bidimensional y compararemos los resultados con los obtenidos para el sistema de dos células. Los resultados de la comparación pueden observarse en la figura 4.6 que presenta dos diagramas de fases en función de los exponentes  $h$  y  $k$  para diferentes pares de valores fijos de los umbrales de activación e inhibición  $a$  y  $b$ . Los puntos sólidos indican los patrones estables obtenidos para el sistema bidimensional, siendo rojo un patrón del tipo “sal y pimienta” y verde un patrón homogéneo de células con destino secundario. Los círculos sin relleno denotan el resultado para el sistema con dos células, verde significa que ambas células se dirigen al destino secundario (células blancas) y naranja indica una célula con destino primario y otra con destino secundario (una célula blanca y una negra). Analicemos los resultados de la figura 4.6-a (parámetros  $a = 0,01$  y  $b = 100$ ) para el arreglo bidimensional de células, es decir los puntos llenos. Cuando el exponente  $h = 2$  es mantenido fijo, sólo para el caso de  $k = 1$  se produce un patrón homogéneo de células blancas (con destino secundario). Para  $h = 2$  y  $2 \leq k \leq 7$  se obtiene en patrón tipo “sal y pimienta”. En forma similar, si fijamos  $k = 2$  y variamos  $h$ , sólo

emergen patrones homogéneos de células con destino secundario para  $h = 1$ . Estos resultados coinciden con los obtenidos con el sistema de dos células en casi todos los casos, salvo para  $k = 2$  y  $h = 1$  cuando el sistema de dos células presenta destinos heterogéneos. Por otro lado, en la figura 4.6-b (parámetros  $a = 0,0001$  y  $b = 100$ ) las simulaciones para el arreglo bidimensional de células arrojaron un patrón de células homogéneo con células de destino secundario para  $k = 2$  independientemente del valor de  $h$ . Este resultado no coincide con el sistema de dos células para el cual se obtienen destinos asimétricos para  $h \leq 3$ . En cambio, si  $k = 3$  para el caso del arreglo bidimensional de células se obtienen un patrón del tipo “sal y pimienta” para  $2 \leq h \leq 7$  coincidiendo en casi todos los casos con el sistema de dos células, salvo cuando  $h = 1$  cuando el sistema de dos células presenta destinos heterogéneos.

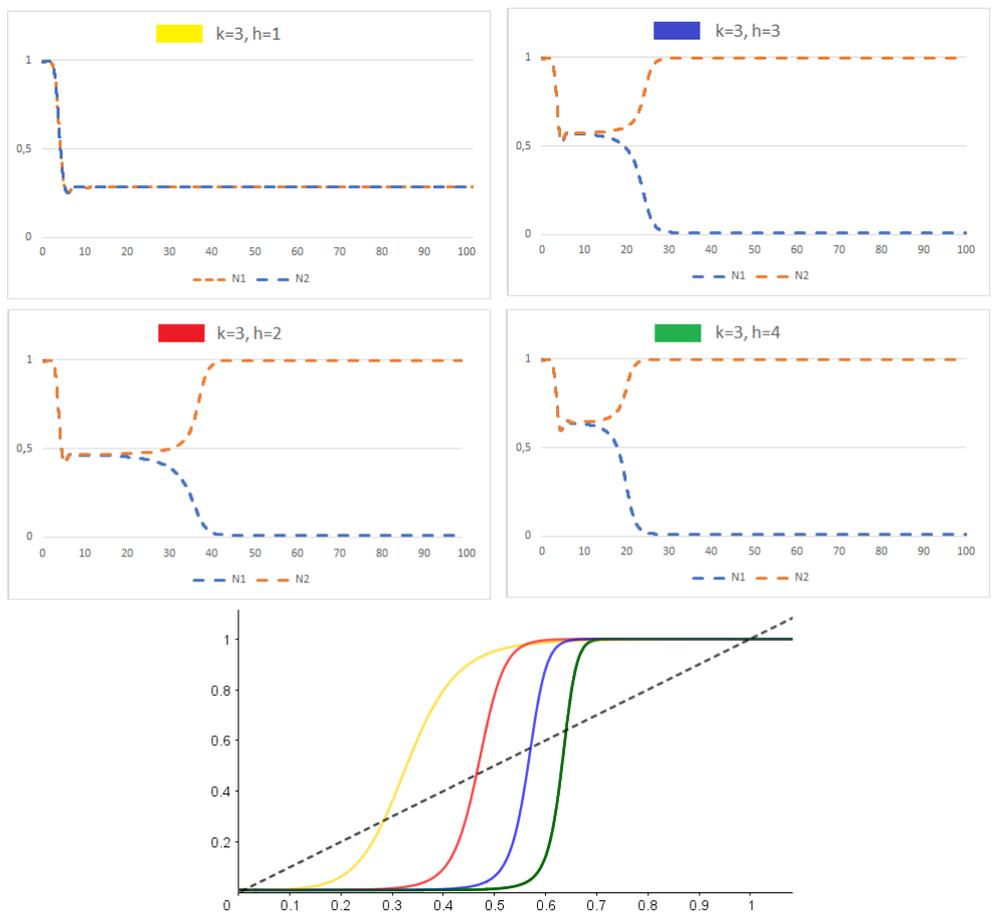
Es importante destacar que los efectos de  $h$  y  $k$  sobre los patrones no resultan equivalentes. En la figura 4.6 puede apreciarse que el patrón pasa de ser homogéneo a heterogéneo a medida que  $k$  toma valores más grandes. No necesariamente ocurre lo mismo cuando variamos  $h$ , por ejemplo para el caso  $k = 1$  en la figura 4.6-b. Nótese además que en figura 4.6-b para el caso del arreglo bidimensional de células (círculos sólidos) la combinación  $k = 2$  y  $h = 3$  resulta en un patrón de células blancas, mientras que si intercambiamos los valores de los exponentes, es decir, tomamos  $k = 3$  y  $h = 2$  se deriva en un patrón del tipo “sal y pimienta”. Esto puede deberse a que, si bien ambos exponentes modifican la forma de la curva  $y = f(g(f(g(x))))$ , lo que tiene efecto en el número de estados estacionarios, un aumento de  $k$  produce que mayor efecto en la pendiente de la curva que un aumento de  $h$ , como vimos en los paneles inferiores derechos de las figuras 3.7 y 3.8 (sección 3.4).

En las figuras 4.7 y 4.8 se muestra la variación temporal de las concentraciones de Notch de dos células vecinas del arreglo bidimensional ( $N1$  y  $N2$ ) y el gráfico de la curva  $y = f(g(f(g(x))))$  que nos permite inspeccionar gráficamente las concentraciones de equilibrio del sistema de dos células. El punto de equilibrio inestable corresponde al mínimo local en de la curva para el cual  $N1 = N2$  para los arreglos bidimensionales de células, mientras que para el sistema de dos células este corresponde a la intersección del medio de la curva  $y = f(g(f(g(x))))$  y la recta  $y = x$ . Podemos observar que para todos los casos analizados para los cuales la solución del sistema bidimensional presenta células con destinos finales distintos, los cambios en los valores de los exponentes  $h$  y  $k$  afectan la concentración de Notch correspondiente al estado de equilibrio homogéneo inestable de forma opuesta. Mientras el aumento de  $h$  conlleva a un aumento de la concentración de Notch en el estado estacionario homogéneo inestable, el aumento de  $k$  ocasiona una disminución de la concentración de Notch en el estado estacionario homogéneo inestable. Además, las concentraciones del estado estacionario inestable encontradas para el sistema bidimensional son muy similares al valor obtenido para el caso de dos células. Por

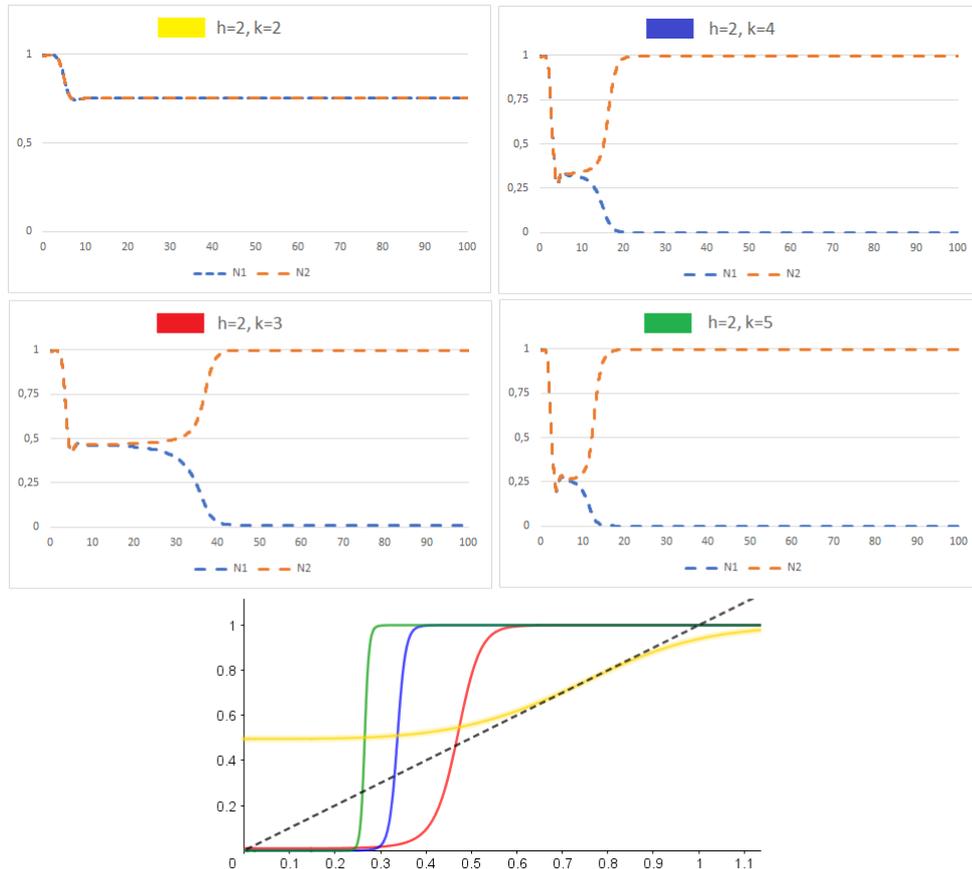


**Fig. 4.6:** Diagramas de fase en función de los exponentes  $k$  y  $h$  en donde se puede ver qué soluciones adopta el sistema de dos células aisladas (círculos sin relleno) y el arreglo bidimensional de células (círculos sólidos) para los parámetros (a)  $a = 0,01$  y  $b = 100$  (b)  $a = 0,0001$  y  $b = 100$ . Verde significa un patrón homogéneo, en que todas las células se dirigen al destino secundario (células blancas) y naranja un patrón tipo “sal y pimienta”, con destinos asimétricos (células blancas y negras).

último, en las figuras 4.7 y 4.8 puede observarse que el aumento de los valores de  $k$  y  $h$  reduce el tiempo necesario para que surja el patrón final. Este resultado se puede entender si recordamos que en el sistema de dos células el aumento en la derivada de la curva  $y = f(g(f(g(x))))$  implica un cambio en la pendiente y por lo tanto un incremento de la inestabilidad de este punto [6].



**Fig. 4.7:** Concentración de Notch de dos células vecinas en función del tiempo en el arreglo hexagonal para diferentes combinaciones de los parámetros  $k$  y  $h$ , como indicado, para  $a = 0,0001$ ,  $b = 100$ . Panel inferior: curva  $y = f(g(f(g(x))))$  para  $k = 3$  y los distintos valores de  $h$  mostrados en los paneles superiores:  $h = 1$  (amarillo),  $h = 2$  (rojo),  $h = 3$  (azul),  $h = 4$  (verde) y recta  $y = x$  punteada. Las intersecciones entre la curva  $y = f(g(f(g(x))))$  y  $y = x$  dan las concentraciones de Notch en los estados estacionarios para dos células.



**Fig. 4.8:** Concentración de Notch de dos células vecinas en función del tiempo en el arreglo hexagonal para diferentes combinaciones de los parámetros  $k$  y  $h$ , como indicado, para  $a = 0,0001$ ,  $b = 100$ . Panel inferior: curva  $y = f(g(f(g(x))))$  para  $h = 2$  y los distintos valores de  $k$  mostrados en los paneles superiores:  $k = 2$  (amarillo),  $k = 3$  (rojo),  $k = 4$  (azul),  $k = 5$  (verde) y recta  $y = x$  punteada. Las intersecciones entre la curva  $y = f(g(f(g(x))))$  y  $y = x$  dan las concentraciones de Notch en el/los estado/s estacionario/s para dos células.



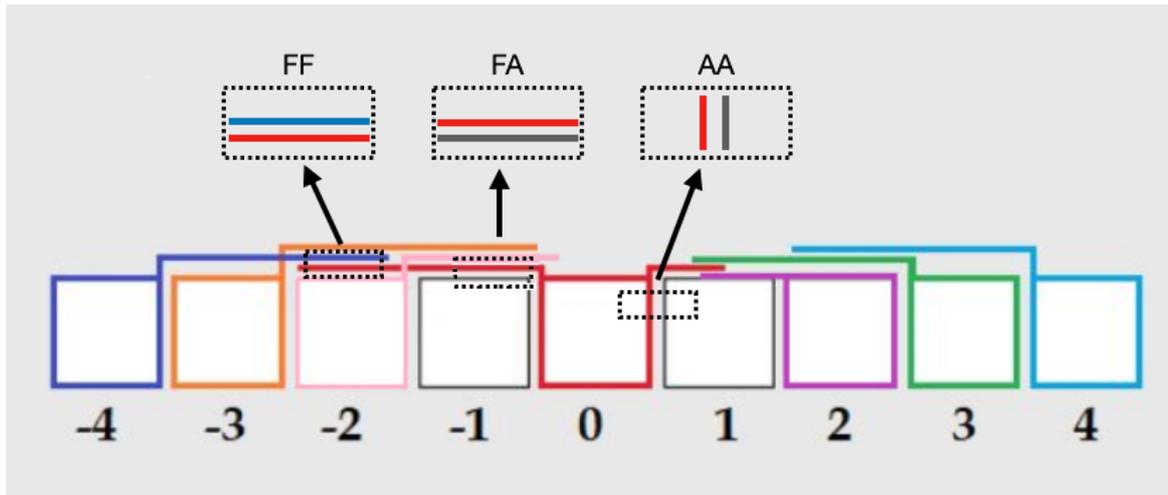
# Inhibición lateral con señalización a distancia

En este capítulo se estudia la formación de patrones al considerar la inhibición lateral para Notch/Delta cuando también hay comunicación celular a través de filopodios. Para eso utilizamos dos versiones de un modelo multi-escala en una dimensión: las ecuaciones diferenciales representan la variación de las concentraciones de Notch y Delta en el tiempo, mientras que la dinámica de los filopodios es dada por dos modelos estocásticos. El desarrollo presentado a continuación usa como punto de partida modelos previos propuestos en la literatura [5, 16]. Se comparan las dos versiones del modelo multiescala para estudiar el efecto que produce considerar la dinámica de crecimiento y decrecimiento los filopodios sobre los patrones celulares. Luego, se estudia cómo varían los resultados al considerar distintos pesos en la contribución de cada mecanismo de comunicación celular.

## 5.1 Modelo de inhibición lateral con filopodios

El modelo de inhibición lateral con filopodios está definido por las mismas ecuaciones diferenciales vistas anteriormente (sección 4.1) que describen la variación temporal de Notch y Delta para células en contacto. La diferencia radica en la evaluación del número de células en contacto, ya que en este caso la producción de Notch en una célula es inhibida por Delta de las células vecinas y de aquellas más distantes que realizan contactos con la primera a través de filopodios.

Se consideran tres tipos de contactos celulares distintos. Por un lado, al igual que en el modelo anterior, la señal se transmite entre las primeras células vecinas con uniones apicales por el contacto entre las membranas celulares. A este mecanismo lo llamamos señalización Apical-Apical (AA). Por otro lado, consideramos la señalización a través de extensiones celulares, estas son: Apical-Filopodio (AF) mediante la cual los filopodios ejercen inhibición debido al contacto con la región apical de la célula, y Filopodio-Filopodio (FF) en el cual la señal se transmite por el contacto entre filopodios de células distintas. En la figura 5.1 podemos ver que la célula que está en la posición 0 se encuentra en contacto AA con las células de las posiciones  $-1$  y  $1$  y se comunica a través del contacto entre filopodios con todas las otras células mostradas en la figura a excepción de la célula 4.



**Fig. 5.1:** Esquema ilustrativo de los diferentes tipos de contacto celular para una célula individual. Considérese la célula 0: los recuadros señalados por FF, FA y AA señalan ejemplos de contacto Filopodio-Filopodio, Filopodio-Apical y Apical-Apical, respectivamente.

De forma general, las concentraciones de Notch y Delta en una célula  $i$  son dadas por las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial N_i}{\partial \tau} &= f(\hat{D}_i) - N_i \\
 \frac{\partial D_i}{\partial \tau} &= v \cdot (g(N_i) - D_i) \\
 \hat{D}_i &= \alpha \cdot D_{AA}^i + \beta \cdot D_{AF}^i + \gamma \cdot D_{FF}^i
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

$\hat{D}_i$  está definida por la suma de los niveles de Delta en las células con las cuales la célula  $i$  interactúa, siendo  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  los pesos de las contribuciones de las señalizaciones  $AA$ ,  $AF$  y  $FF$ , respectivamente. Consideramos que estos valores pueden estar relacionados con la extensión del contacto entre las células involucradas, ya que esta tendría impacto en la inhibición que reciben y proveen las células debido a la cantidad de ligandos y receptores disponibles para la señalización [14].  $D_{AA}^i$ ,  $D_{AF}^i$  y  $D_{FF}^i$  representan el promedio de las concentraciones de Delta en las células que participan de cada tipo de contacto celular con la célula  $i$ . El uso del promedio está motivado, por un lado, porque estamos trabajando con concentraciones normalizadas con  $0 \leq D \leq 1$  y por otro lado, para no sobreponderar los mecanismos de señalización en los que intervienen los filopodios, ya que estos pueden involucrar contacto con muchas células. En todos los casos consideraremos que la inhibición es proporcional a la región de contacto entre las células y sus filopodios, según

corresponda. A continuación explicamos en mayor detalle cómo se calculan  $D_{AA}^i$ ,  $D_{AF}^i$  y  $D_{FF}^i$ .

$D_{AA}^i$  denota el promedio simple de las concentraciones de Delta en las células adyacentes  $j$  a la célula  $i$  (en las posiciones  $-1$  y  $1$  en el ejemplo mostrado en la figura 5.1) dado que, al tratarse de un arreglo regular, la región de contacto con las dos células vecinas es igual:

$$D_{AA}^i = \frac{1}{2} \sum_j D_j \quad (5.2)$$

donde  $j = i - 1, i + 1$ , ya que estamos considerando un arreglo unidimensional.

Para estimar  $D_{FF}^i$  es necesario destacar que consideramos que la longitud máxima que puede alcanzar un filopodio es de dos diámetros celulares (ver sección 5.3), motivo por el cual una célula  $i$  puede establecer contactos  $FF$  con las células que se encuentran en las posiciones  $j = i \pm 4, i \pm 3, i \pm 2$ . Cabe destacar que, al asumir que los filopodios emergen del borde de la célula (ver sección 5.2), no hay superposición entre los filopodios de la célula  $i$  e  $i \pm 1$  (o entre la célula  $0$  y las células  $1$  y  $-1$  en la figura 5.1). Por tal motivo, no consideramos la interacción  $FF$  entre dichas células. Por lo tanto, denotamos como  $D_{FF}^i$  al promedio de las contribuciones de las 6 células con las cuales puede ocurrir un contacto  $FF$ , que a su vez es proporcional a la longitud de contacto entre los filopodios. De este modo:

$$D_{FF}^i = \frac{1}{6} \sum_j l_{ij}^{FF} \cdot D_j \quad (5.3)$$

donde  $j = i \pm 4, i \pm 3, i \pm 2$ .

En la ecuación 5.3  $D_j$  es el nivel de Delta en la célula  $j$  y  $l_{ij}^{FF}$  es la longitud de contacto entre los filopodios de la célula  $i$  y la célula  $j$ . Si definimos  $l(Fi_k)$  y  $l(Fd_k)$  como las longitudes de los filopodios izquierdo y derecho de la célula  $k$ , y consideramos que la célula  $j$  está a la derecha de la célula  $i$ ,  $l_{ij}^{FF}$  puede valer 0 si los filopodios no se superponen, el mínimo entre  $l(Fi_j)$  y  $l(Fd_i)$  ( $\min\{l(Fi_j), l(Fd_i)\}$ ) si la superposición abarca la extensión máxima del filopodio más corto o un valor intermedio entre 0 y  $\min\{l(Fi_j), l(Fd_i)\}$ . Para el caso general, si hay contacto entre filopodios, es decir si  $l_{ij}^{FF} \neq 0$ , las ecuaciones que describen  $l_{ij}^{FF}$  para cada célula  $i$  son:

$$\begin{aligned}
l_{i,i-4}^{FF} &= l(Fd_{i-4}) + l(Fi_i) - 3 \\
l_{i,i-3}^{FF} &= \min\{l(Fd_{i-3}) + l(Fi_i) - 2, 2\} \\
l_{i,i-2}^{FF} &= \min\{l(Fd_{i-2}) + l(Fi_i) - 1, 1\} \\
l_{i,i+4}^{FF} &= l(Fi_{i+4}) + l(Fd_i) - 3 \\
l_{i,i+3}^{FF} &= \min\{l(Fi_{i+3}) + l(Fd_i) - 2, 2\} \\
l_{i,i+2}^{FF} &= \min\{l(Fi_{i+2}) + l(Fd_i) - 1, 1\}
\end{aligned} \tag{5.4}$$

Finalmente, los filopodios también pueden administrar inhibición a las células con las cuales hacen contacto directo (señalización  $AF$ ). Consideraremos que la inhibición que proveen es proporcional a la región de contacto entre el filopodio y la pared celular. Dada la restricción mencionada acerca de la longitud máxima que tienen los filopodios (de dos diámetros celulares), esta interacción solo puede ocurrir entre la célula  $i$  y sus vecinas  $j$ , con  $j = i \pm 1, i \pm 2$ . Por lo tanto, la contribución a la concentración de Delta por la interacción  $AF$  se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$D_{AF}^i = \frac{1}{4} \sum_j l_{ij}^{AF} \cdot D_j \tag{5.5}$$

con  $j = i \pm 1, i \pm 2$ .

Las distancias  $l_{ij}^{AF}$  pueden tomar los siguientes valores:  $l_{ij}^{AF} = 0$  si el filopodio no entra en contacto con la pared de la célula,  $l_{ij}^{AF} = 1$  si el contacto abarca toda la región apical ó  $0 < l_{ij}^{AF} < 1$  si la longitud de contacto es menor que un diámetro celular. Si  $l_{ij}^{AF} \neq 0$ , la expresión de  $l_{ij}^{AF}$  para cada célula está dada por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
l_{i,i-2}^{AF} &= l(Fd_{i-2}) - 1 \\
l_{i,i-1}^{AF} &= \min\{l(Fd_{i-1}), 1\} \\
l_{i,i+1}^{AF} &= \min\{l(Fi_{i+1}), 1\} \\
l_{i,i+2}^{AF} &= l(Fi_{i+2}) - 1.
\end{aligned} \tag{5.6}$$

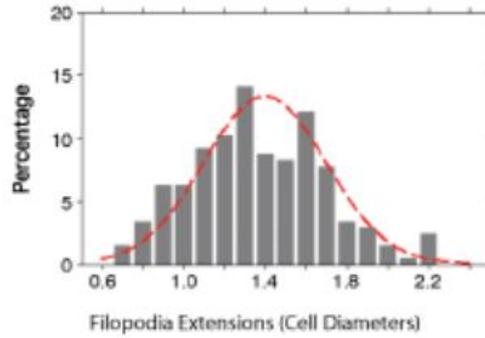
## 5.2 Dinámica de los filopodios

La dinámica de filopodios es considerada a través de dos modelos matemáticos distintos que se discuten a continuación. El primero no tiene en cuenta explícitamente la dinámica de crecimiento y decrecimiento de los filopodios, mientras que el segundo sí.

### 5.2.1 Modelo de Cohen

Cohen y colaboradores proponen un modelo para inhibición lateral con señalización a distancia para la formación de cerdas dorsales en *Drosophila* [5]. Estos autores construyen un modelo de señalización Delta-Notch basado en el marco matemático propuesto en [6] con un ruido aditivo. Además, consideran que la inhibición recibida por una célula está provista por las células adyacentes y también por aquellas con las cuales ésta se comunica a través de filopodios. Los autores no contemplan la señalización  $AF$ . Así, establecen que la señal total que recibe una célula en el modelo estará dada por la suma de las señales recibidas través de los mecanismo  $AA$  y  $FF$ , los cuales son ponderados equitativamente, aunque no se explica en el trabajo el motivo por el cual se pesa de la misma manera la contribución de ambos mecanismos de señalización. Estas consideraciones las podemos expresar en la ecuación 5.1 reemplazando  $\alpha = \gamma$  y  $\beta = 0$  de lo que se obtiene que  $\hat{D} = \alpha \cdot D_{AA} + \alpha \cdot D_{FF}$ . Cohen y colaboradores consideran que cuando existe contacto entre dos filopodios la señalización será proporcional a Delta de las dos células en cuestión, independientemente de la longitud del contacto.

Para el caso del modelo unidimensional estos autores consideran una fila de células adyacentes a las que le asignan un filopodio a la derecha y uno a la izquierda. Estos tienen una vida media y una longitud característica derivadas de los datos experimentales publicados en el mismo trabajo. Los autores refieren una vida media de 500 s para los filopodios y longitudes dadas por una distribución que es ajustada por una curva normal con media  $\mu = 1,4$  diámetros celulares y desviación estándar  $\sigma = 0,3$  en unidades de diámetros celulares [5], como se puede ver en la figura 5.2. Los procesos de crecimiento y decrecimiento de los filopodios no son modelados explícitamente. Las longitudes de los filopodios son actualizadas con cierta probabilidad en todos los pasos de simulación, siguiendo un proceso de Poisson, de forma tal que la vida media de los filopodios sea igual a la determinada experimentalmente.



**Fig. 5.2:** Se muestra la distribución de longitudes obtenida experimentalmente para los filopodios medidos en 60 células durante el proceso de formación de cerdas dorsales de *Drosophila Notum*. La línea roja punteada muestra la distribución normal, derivada de estos datos (media  $\mu = 1,4$ , desviación estándar  $\sigma = 0,3$ , en unidades de diámetros celulares). Extraído de [5].

### 5.2.2 Modelo con filopodios dinámicos

Proponemos a continuación un modelo estocástico que tiene en cuenta en forma explícita el crecimiento y el decrecimiento de los filopodios ya que, como vimos en la sección 2.3, estos son estructuras dinámicas.

De manera similar al Modelo de Cohen, consideramos un modelo unidimensional en el que cada célula extiende dos filopodios, uno hacia la izquierda y otro hacia la derecha y que éstos emergen de los borde de la célula. Las protrusiones crecen y decrecen con velocidades constantes  $V_c$  y  $V_d$ , respectivamente. Considerando un filopodio cuya longitud máxima es  $\Delta l$ , se tiene que:

$$\begin{aligned} V_c &= \frac{\Delta l}{\Delta t_c} \\ V_d &= \frac{\Delta l}{\Delta t_d} \end{aligned} \tag{5.7}$$

donde  $\Delta t_c$  y  $\Delta t_d$  son las duraciones promedio de los procesos de crecimiento y decrecimiento, respectivamente. Estos tiempos cumplen que:

$$\Delta t_c + \Delta t_d = t_{prom} \tag{5.8}$$

siendo  $t_{prom}$  el tiempo de vida promedio que abarca el proceso de crecimiento y decrecimiento.

Como discutimos en la sección 2.3, la velocidad de crecimiento de los filopodios es menor que la de decrecimiento, por lo tanto consideramos que  $V_d = \xi \cdot V_c$ , con  $\xi > 1$ .

Reemplazando las relaciones 5.7 en 5.8 y considerando una longitud promedio  $l_{prom}$  se deducen las siguientes expresiones para las velocidades:

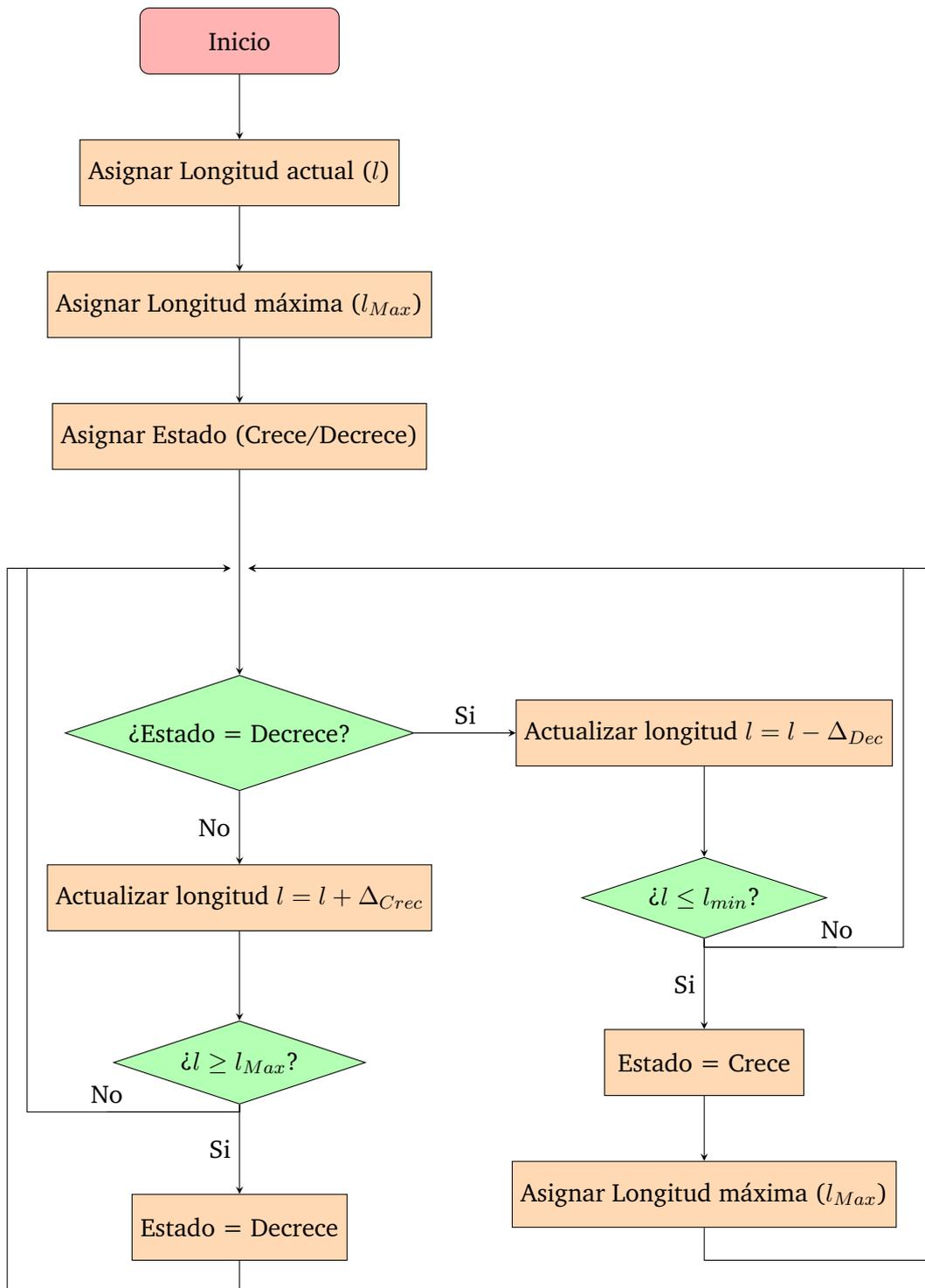
$$\begin{aligned} V_c &= \frac{l_{prom}}{t_{prom}} \cdot \frac{\xi + 1}{\xi} \\ V_d &= \frac{l_{prom}}{t_{prom}} \cdot (\xi + 1) \end{aligned} \quad (5.9)$$

Los valores de longitud y tiempo de vida de los filopodios pueden ser muy variables y dependen del sistema biológico que se considere [5, 30, 20, 26]. Para incorporar la variabilidad de longitudes en las simulaciones numéricas, cada filopodio puede tomar un valor distinto de longitud máxima, como es considerado en publicaciones tales como [5, 15].

En la implementación numérica del modelo, se actualizan las longitudes de todas las protrusiones en cada paso de tiempo. Cada filopodio crece hasta alcanzar su longitud máxima previamente determinada a partir de una distribución compatible con resultados experimentales. Luego, comienzan a retraerse hasta alcanzar la longitud mínima que es la misma para todos los filopodios. Una vez alcanzada la longitud mínima se sorteá una nueva longitud máxima y la protrusión comienza a crecer nuevamente. La dinámica de crecimiento y decrecimiento está esquematizada en la figura 5.3.

### 5.3 Implementación de los modelos para inhibición lateral con filopodios

En esta sección nos interesa comparar los dos modelos presentados anteriormente: el Modelo con filopodios dinámicos, que contempla los tres mecanismos de señalización ( $AA$ ,  $FF$  y  $AF$ ) y que considera la dinámica de crecimiento de los filopodios explícitamente; y el Modelo de Cohen, que no tiene en cuenta la señalización  $AF$  y cuya dinámica de filopodios es modelada según un proceso de Poisson. Para hacer la comparación hacemos dos modificaciones en el Modelo de Cohen presentado en la sección 5.2.1: 1) consideramos que la señalización  $FF$  es proporcional a la región de contacto entre los filopodios, tal como proponemos en el Modelo con filopodios



**Fig. 5.3:** Diagrama de flujo que esquematiza la dinámica de crecimiento de los filopodios en el Modelo con filopodios dinámicos.

dinámicos; y 2) no consideramos ruido aditivo en el modelo para la inhibición lateral.

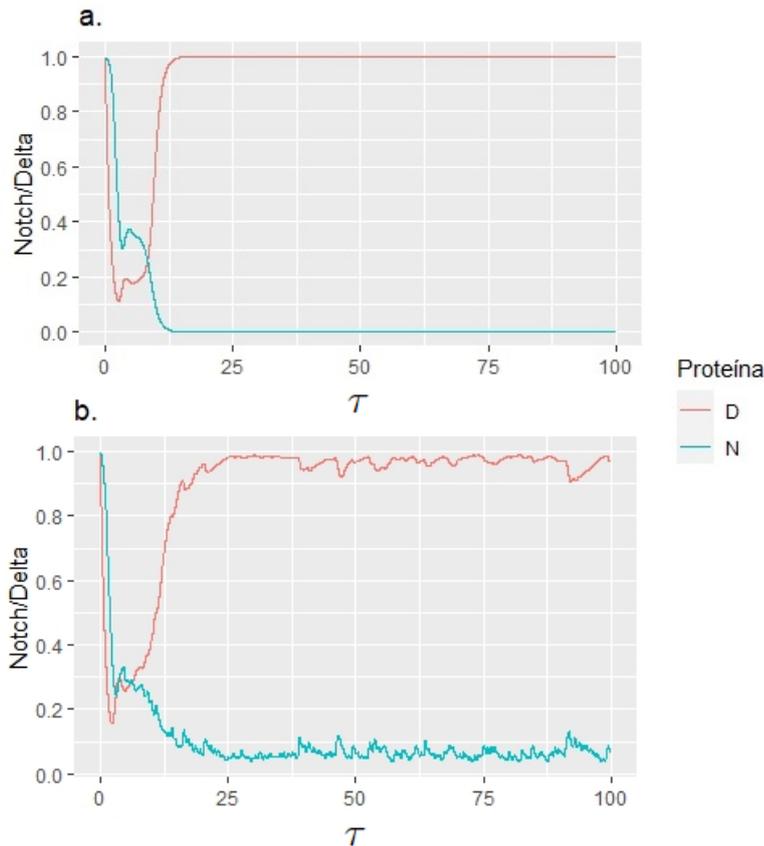
Para definir la escala temporal de los modelos usamos el criterio utilizado por Cohen y colaboradores [5]. Estos refieren que el modelo generaba un patrón estable parecido al observado en el sistema experimental después de  $\tau = 5000$  pasos de tiempo de simulación. Teniendo en cuenta que el patrón experimental se estabilizaba después de 7,5 horas, los autores consideran que cada paso de tiempo  $\tau$  equivale a 5 s. Para ambos modelos, la longitud máxima de cada filopodio es definida por la distribución de los datos experimentales de la Figura 5.2, es decir estas son sorteados de una distribución normal de media  $\mu = 1,4$  y desvío estándar  $\sigma = 0,3$ , en unidades de diámetros celulares. Todos los filopodios poseen una longitud mínima igual a 0,6 radios celulares, que es la mínima extensión obtenida experimentalmente en el trabajo de Cohen y colaboradores, tal como se aprecia en la figura 5.2 y que resulta consistente con el hecho de que los filopodios comienzan a crecer desde el borde de la célula.

En el Modelo de Cohen para que el tiempo de vida promedio de los filopodios sea igual al valor experimental, 500 s (igual a  $100\tau$ ), cada filopodio tiene una nueva longitud sorteada con tasa  $F_{rate} = 0,01\tau^{-1}$ .

Por otro lado, en la implementación del Modelo de filopodios dinámicos, se consideró que los filopodios se retraen dos veces más rápido de lo que se extienden ( $V_d = 2 \cdot V_c$ ), en acuerdo con los datos descritos en [16]. Las velocidades de crecimiento y decrecimiento se calcularon considerando las medidas experimentales presentadas por Cohen y colaboradores [5]: el tiempo vida promedio de un filopodio es de  $100\tau$  y la longitud promedio es 1,4 diámetros celulares. Empleando las ecuaciones 5.9 se obtiene  $V_c = 0,021$  y  $V_d = 0,042$  en unidades de diámetros celulares dividido  $\tau$ . Todos los filopodios crecen hasta obtener su longitud máxima, luego se retraen hasta alcanzar la longitud mínima. Cuando esto ocurre se sortea una nueva longitud máxima y vuelven a crecer, como esquematizado en la figura 5.3.

Ambos modelos fueron implementados a una matriz unidimensional de 100 células con condiciones de contorno periódicas. En todos los casos realizamos 20 simulaciones de cada implementación. Las mismas se llevaron a cabo resolviendo numéricamente las ecuaciones diferenciales de los modelos para las concentraciones de Notch y Delta de cada célula (ecuaciones 5.1), utilizando el método de Euler tomando un paso de tiempo de  $\Delta t = 0,01\tau$ . Verificamos que la solución numérica convergía al disminuir el paso de tiempo y observar que los resultados no cambiaban. En cada paso de tiempo también realizamos la simulación de Monte Carlo de los modelos estocásticos para filopodios. En el Apéndice (capítulo 8) están disponibles los programas desarrollados en lenguaje R para ambos modelos.

Como discutimos en la sección 2.3, durante la formación de las cerdas dorsales de la *Drosophila* las células precursoras son las que tienen alta concentración de Delta,



**Fig. 5.4:** Simulaciones en 1 dimensión: evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de una célula identificada como precursora. Panel a: simulación donde sólo opera la señalización apical (referencia 5 en la tabla 5.1). Panel b: Modelo de filopodios dinámicos (referencia 2 en la tabla 5.1). Parámetros:  $a = 0,01$ ,  $b = 100$ ,  $k = h = 3$ .

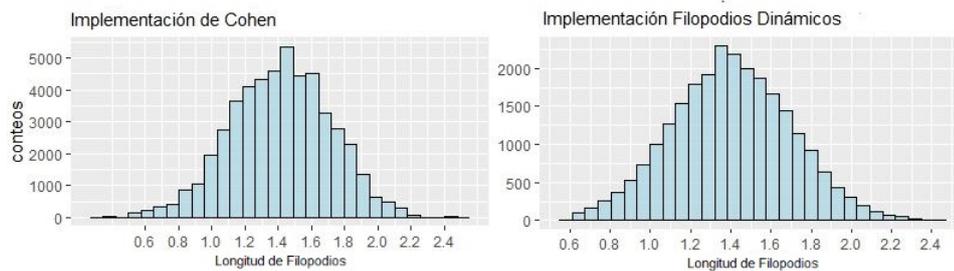
mientras las células epiteliales tienen alta concentración de Notch activado [5]. Así, para determinar la identidad de las células en las simulaciones, consideramos que una célula precursora es aquella que posee una concentración de Delta superior a  $D = 0,8$  y una concentración de Notch inferior a  $N = 0,2$ . En caso contrario, la célula es considerada célula epitelial.

También realizamos simulaciones en 1 dimensión para un Modelo sin filopodios, donde solamente está presente la interacción AA (referencia 5 en la tabla 5.1). En la figura 5.4 mostramos el comportamiento típico de las concentraciones de Delta y Notch de una célula precursora obtenidas con el modelo sin filopodios (panel a) y con el Modelo de filopodios dinámicos (panel b). Se puede observar un comportamiento medio similar en ambos casos. Sin embargo, nótese la presencia de fluctuaciones en la figura 5.4-b que no fueron observadas en 5.4-a. Estas se deben a que los filopodios presentes en las simulaciones de la figura 5.4-b tienen un comportamiento dinámico que afecta las concentraciones de Delta y Notch en las células.

Referencia	Pesos	Modelo
1	$\hat{D} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,5 \cdot D_{FF}$	F. Dinámicos.
2	$\hat{D} = 0,33 \cdot D_{AA} + 0,33 \cdot D_{AF} + 0,33 \cdot D_{FF}$	F. Dinámicos.
3	$\hat{D} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,35 \cdot D_{AF} + 0,15 \cdot D_{FF}$	F. Dinámicos.
4	$\hat{D} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,5 \cdot D_{FF}$	Cohen
5	$\hat{D} = D_{AA}$	Sin filopodios

**Tab. 5.1:** Peso de las contribuciones de las señalizaciones AA, AF y FF para distintos casos considerados.

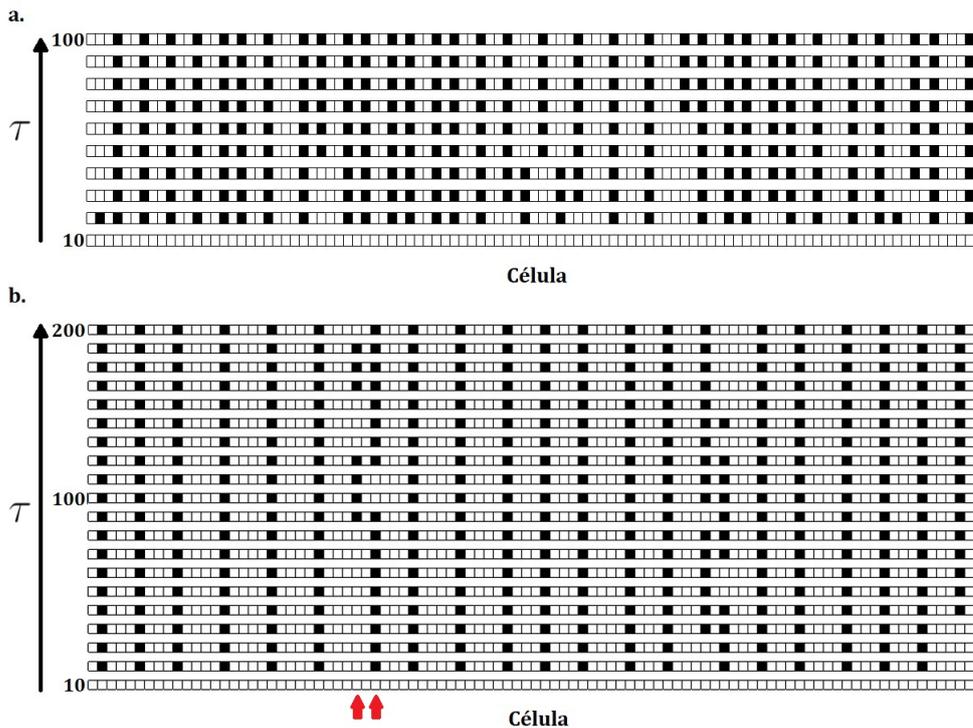
Para verificar que las implementaciones de los modelos para inhibición lateral con filopodios funcionaban correctamente, la figura 5.5 compara el histograma con longitudes de filopodios para la implementación del Modelo de Cohen (panel izquierdo) y longitudes máximas para el Modelo de filopodios dinámicos (panel derecho). Podemos ver que ambas implementaciones generan histogramas de longitudes equivalentes, lo que es esperado dado que en los dos casos se utilizó la distribución de longitudes experimentales mostrada en la figura 5.2 para el sorteo de longitudes máximas de cada filopodio.



**Fig. 5.5:** Longitudes máximas de filopodios generadas mediante las implementación del Modelo de Cohen (panel izquierdo) y del Modelo de filopodios dinámicos (panel derecho).

## 5.4 Patrones espacio-temporales de destinos celulares

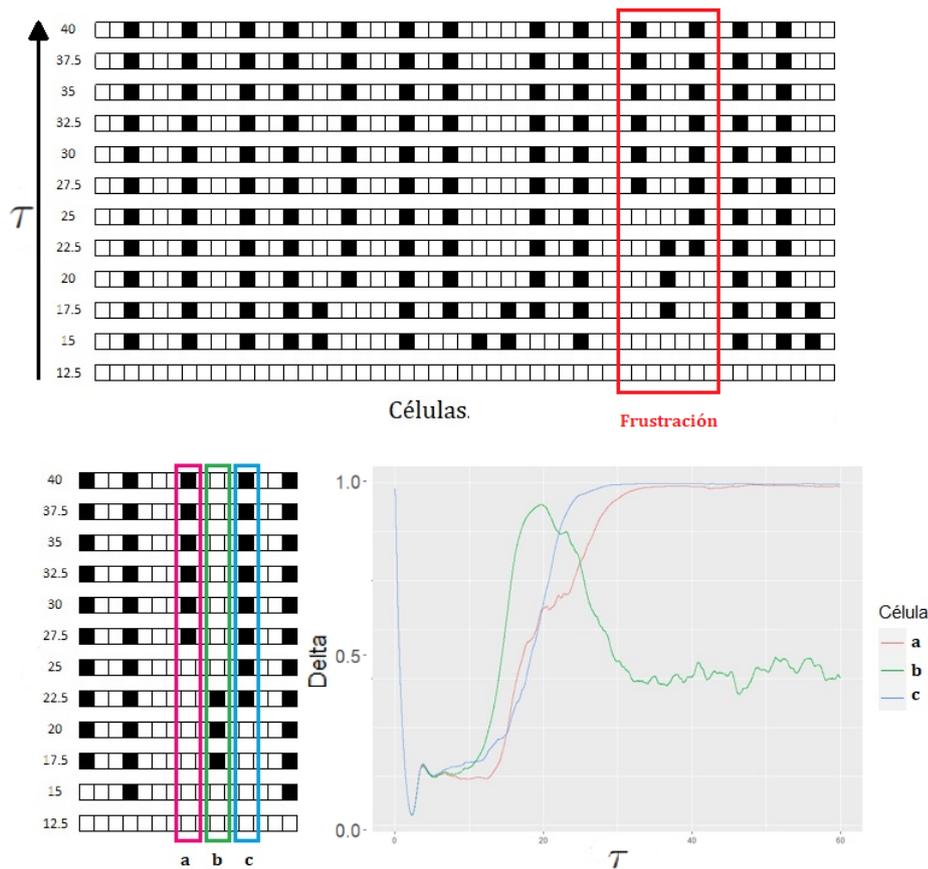
En primer lugar, realizamos algunos análisis sobre los patrones espacio-temporales generados antes de llegar a un patrón estacionario estable. Luego comparamos el Modelo de Cohen y el Modelo de filopodios dinámicos para estudiar el efecto que produce considerar la dinámica de crecimiento y decrecimiento los filopodios sobre los patrones celulares. Posteriormente, considerando el Modelo de filopodios dinámicos estudiamos cómo varían los resultados al considerar distintos pesos en la contribución de cada mecanismo de señalización con el objetivo de determinar si la señalización a través del contacto  $AF$ , no considerada en el Modelo de Cohen, incide



**Fig. 5.6:** Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel a.: Modelo de filopodios dinámicos (referencia 1 en la tabla 5.1). Panel b.: Modelo de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1). Las flechas rojas indican dos células cuyos destinos cambian con el tiempo. En ambos casos las configuraciones son mostradas cada  $10 \tau$ . Parámetros:  $a = 0,1, b = 100, k = h = 3, D_{total} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,5 \cdot D_{FF}$ .

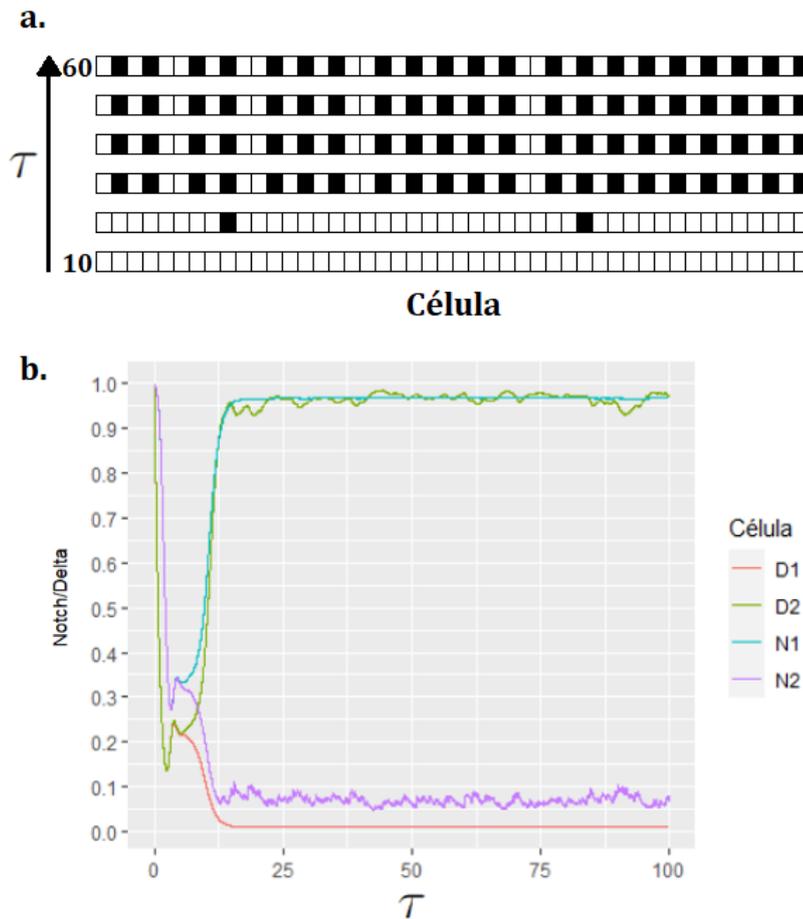
en los patrones obtenidos. En todas las figuras mostradas las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco.

Para estudiar cómo los patrones espacio-temporales de destinos celulares son afectados por las distintas dinámicas de filopodios, implementamos el Modelo de Cohen y el Modelo de filopodios dinámicos considerando solamente los mecanismos de señalización  $AA$  y  $FF$ , a los cuales se les asignó el mismo peso (0,5), en acuerdo con lo realizado en [5]. En la figura 5.6 estudiamos la estabilización de los patrones con el tiempo para los dos modelos mencionados. Para el Modelo de filopodios dinámicos (figura 5.6-a) podemos observar que el patrón se estabiliza a partir de  $\tau = 70$ , mientras que para el Modelo de Cohen (5.6-b), aun considerando un tiempo de observación más alto, no se obtiene un patrón estable. Se puede observar en el panel b, que aunque la mayor parte de las células supera rápidamente los umbrales para considerarse células precursoras, algunas pocas, por ejemplo las que se encuentran en las posiciones 29 y 31 (indicadas con flechas rojas) no estabilizan sus concentraciones de Delta y Notch a lo largo del tiempo debido a la represión mutua que ejercen una sobre la otra.



**Fig. 5.7:** Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares para el Modelo de filopodios dinámicos con pesos iguales para las señalizaciones AA, AF y FF (referencia 2 en la tabla 5.1). Panel superior: patrones en los distintos pasos de simulación ( $\tau$ ) con una situación de frustración señalada. El panel inferior izquierdo muestra un aumento de la región de interés, con las células a, b y c identificadas por color. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel inferior derecho: concentración de Delta para las células a, b y c en función del tiempo. Parámetros:  $a = 0,1$ ,  $b = 100$ ,  $k = h = 3$ .

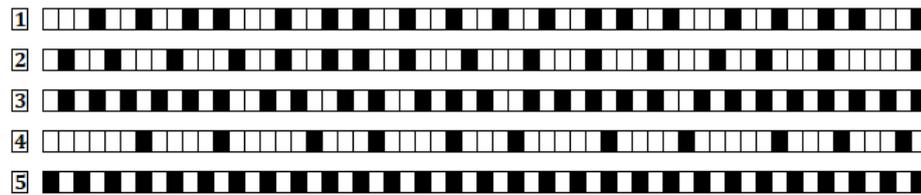
No obstante, el Modelo de filopodios dinámicos no siempre se estabiliza fácilmente. Esto puede observarse en la figura 5.7 en la que mostramos una implementación con las tres señalizaciones con igual peso (referencia 2 en la tabla 5.1), en la cual podemos identificar un mecanismo de frustración, indicado en el panel superior. En el panel inferior mostramos las concentraciones de Delta en las tres células involucradas, identificadas con las letras a, b y c. Se puede ver que la célula b incrementa su concentración de Delta con el tiempo, hasta que para  $\tau = 17,5$  logra superar el umbral  $D = 0,8$  y pasa a ser identificada como célula precursora. El aumento en las concentraciones de Delta en las células a y c parecen inhibir la célula b y el patrón que habían comenzado a generarse se ve frustrado, emergiendo uno nuevo que parece estable a partir de  $\tau = 27,5$ .



**Fig. 5.8:** Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares para el Modelo de filopodios dinámicos con mayor peso para la señalización AA (referencia 3 en la tabla 5.1). Panel a.: patrones en los distintos pasos de simulación ( $\tau$ ). Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel b.: concentración de Delta y Notch para dos células adyacentes en función del tiempo. Parámetros:  $a = 0,1$ ,  $b = 100$ ,  $k = h = 3$ .

En la figura 5.8 mostramos otra implementación del Modelo de filopodios dinámicos en la cual la interacción AA tiene mayor peso que las demás (referencia 3 en la tabla 5.1). Se puede observar que para esta situación el patrón se estabiliza rápidamente y las distancias entre células precursoras es mayormente de un diámetro celular, similar a lo ocurrido cuando se contempla sólo la interacción AA. De hecho, la evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de dos células adyacentes es similar a la observada para el sistema de dos células aisladas estudiado en el capítulo 3. Una situación más compleja se observó cuando los tres mecanismos de señalización tienen igual peso (figura 5.7), ya que se puede ver que las células precursoras se encuentran más distantes, el patrón tarda más en estabilizarse y notamos eventos de frustración como se mencionó anteriormente.

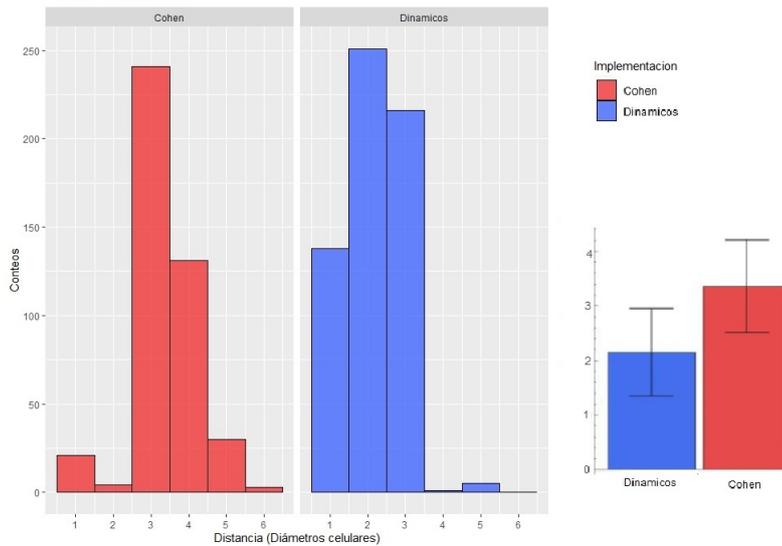
En la figura 5.9 podemos apreciar los patrones espaciales obtenidos para una simulación en el estado estacionario de los modelos discutidos en el presente capítulo



**Fig. 5.9:** Patrón espacial de destino celular en estado estacionario obtenido para distintas simulaciones. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Los patrones 1, 2 y 3 corresponden al Modelo de filopodios dinámicos, el patrón 4 al Modelo de Cohen, mientras que en el patrón 5 solo hay señalización apical. Las contribuciones de los mecanismos de señalización corresponden a lo indicado en la Tabla 5.1.

con diferentes pesos para las señalizaciones AA, AF y FF, tal como se indica en la tabla 5.1. Notamos que las distancias promedio entre las células precursoras son muy variables al comparar las diferentes simulaciones. En particular, las distancias obtenidas con el Modelo de filopodios dinámicos (simulaciones 1, 2 y 3) son menores que las encontradas con el Modelo de Cohen (simulación 4). Por otro lado, en la simulación 5, cuando sólo está presente la interacción AA, la distancia entre las células precursoras es de un diámetro celular, lo que corresponde al llamado patrón “sal y pimienta” discutido en los capítulos 3 y 4.

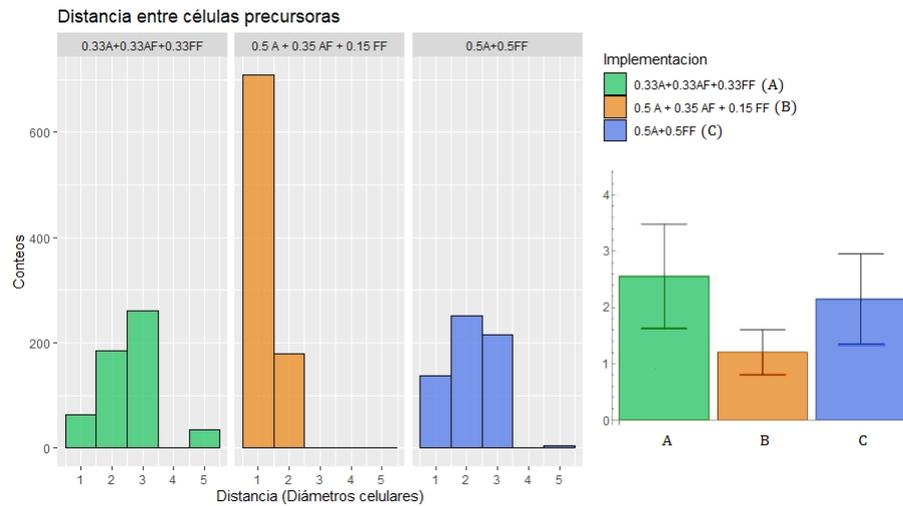
Para comparar de manera cuantitativa los distintos patrones espaciales de destino celular encontrados una vez alcanzado el régimen estacionario medimos la distancia entre dos células precursoras sucesivas y construimos histogramas. En la figura 5.10 se muestran los histogramas de distancia entre células precursoras para 20 realizaciones del Modelo de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1) y del Modelo de filopodios dinámicos sin interacción AF (referencia 1 en la tabla 5.1). Para estos parámetros, la única diferencia entre los modelos es la dinámica de crecimiento de filopodios. Puede notarse que el Modelo de Cohen favorece la aparición de distancias más grandes entre células precursoras lo cual resulta consistente con el hecho que los filopodios tienen la máxima longitud durante todo su tiempo de vida, mientras que en el Modelo de filopodios dinámicos la longitud de los filopodios varía durante su tiempo de vida. Como la señalización FF (presente en ambos modelos) es proporcional al solapamiento entre filopodios, lo que depende de la longitud de los mismos, el resultado es esperable. La comparación de los valores medios (panel derecho de la figura 5.10) muestra que la diferencia observada no es significativa para la cantidad de datos analizados. Además, en ambos casos mostrados en la figura 5.10 podemos ver que la incorporación de las interacciones FF favorece un mayor espaciamiento entre las células precursoras en comparación con los patrones en el que sólo hay señalización AA en cuyo caso la distancia entre células precursoras es 1 diámetro celular como se muestra en el patrón 5 de la figura 5.9.



**Fig. 5.10:** Comparación entre el Modelo de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1) y el Modelo de Filopodios dinámicos sin interacción AF (referencia 1 en la tabla 5.1). Izquierda: distancia entre células precursoras en el estado estacionario. Fueron consideradas 20 realizaciones de cada modelo. Derecha: Valores medios de los datos mostrados en la figura izquierda. La barra indica desvío estándar. Implementación de Cohen (histograma rojo): Distancia  $3,4 \pm 0,9$ ; Implementación de filopodios dinámicos (Histograma Azul): Distancia  $2,2 \pm 0,8$ . Los valores se expresan en media  $\pm$  desviación estándar.

También realizamos simulaciones del Modelo de filopodios dinámicos variando los pesos de la contribución de cada mecanismo de señalización, según las referencia 1, 2 y 3 de la tabla 5.1. Los resultados de las comparaciones para estas tres situaciones en el estado estacionario pueden apreciarse en la figura 5.11. El efecto de reducir el peso de la contribución tipo  $FF$  en el modelo respecto de los otros tipos de señalización reduce de manera significativa la distancia entre células precursoras, resaltando la importancia de esta vía de señalización a distancia. Notamos que aunque las distancias promedios de las tres implementaciones son distintas, sólo hay diferencia significativa entre la implementación de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1) mostrada en la figura 5.10, y la implantación de filopodios dinámicos con  $\hat{D} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,35 \cdot D_{AF} + 0,15 \cdot D_{FF}$  (referencia 3 en la tabla 5.1). En el Modelo de Cohen vemos que las células precursoras se encuentran a mayor distancia, mientras en el Modelo de filopodios dinámicos en cuestión el espaciado entre células precursoras es menor, en consonancia con lo discutido más arriba. Esto puede deberse a dos causas. Por un lado, considerar de forma explícita la dinámica de crecimiento de los filopodios hace que la mayor parte del tiempo las células envíen señales a células más cercanas, ya que los filopodios en crecimiento y decrecimiento tienen distancias más cortas. Por otro lado, al otorgar más peso a la señalización AA y AF para el caso analizado ( $\hat{D} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,35 \cdot D_{AF} + 0,15 \cdot D_{FF}$ ), las células tienen mayor influencia sobre las células adyacentes que sobre el resto. En conjunto estos factores favorecen el surgimiento de patrones con espaciado menor

entre células precursoras. Cabe mencionar que si consideramos que la distribución de Notch y Delta en las membranas es relativamente homogénea y que la región de contacto apical entre dos células vecinas debería ser mayor que la superficie de contacto entre la membrana y el filopodio, y aun más grande que entre filopodios lo que implica que la disponibilidad de ligandos y receptores para la señalización es mayor. En este sentido, consideramos que un modelo que otorgue mayor peso a la señalización AA podría ser más realista que uno que pondere equitativamente a todos los mecanismos de comunicación entre células.



**Fig. 5.11:** Comparación entre distintas implementaciones del Modelo de Filopodios dinámicos (referencias 2, 3 y 1 en la tabla 5.1). Izquierda: histograma con distancia entre células precursoras en el estado estacionario. Fueron consideradas 20 realizaciones de cada modelo. Derecha: Valores medios de los datos mostrados en la figura izquierda. La barra indica el desvío estándar. Implementación A (histograma verde): Distancia  $2,5 \pm 0,9$ ; Implementación B (Histograma naranja): Distancia  $1,2 \pm 0,4$ ; Implementación C (Histograma azul): Distancia  $2,2 \pm 0,8$ . Los valores se expresan en media  $\pm$  desvío estándar.

En esta sección hemos estudiamos la influencia de la interacción entre células a través de filopodios que extienden la distancia sobre la cual puede operar la inhibición lateral. Los resultados obtenidos sugieren que las interacciones a través de filopodios, ya sea por contacto *AF* o *FF* favorecen un mayor espaciamento entre las células precursoras, mientras que las interacciones *AA* favorecen una menor distancia. Además cuanto mayor es el peso que se le otorgue a la interacción *AA*, el sistema se comporta de manera más parecida a lo ocurrido para el sistema de células aisladas. Por otro lado, al contemplar la dinámica de crecimiento y decrecimiento de filopodios el espaciado entre células precursoras se reduce debido a que el tiempo en el cual una célula se encuentra en contacto con células más distantes es menor. Nos parece importante llamar la atención de que los resultados presentados en la presente sección son preliminares. Para responder a varias de las preguntas que hicimos será necesario realizar más simulaciones y también considerar otros valores de parámetros.



## Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se estudiaron los patrones espacio-temporales de destino en células que interactúan a través de inhibición lateral mediada por la vía de señalización de Notch.

Como primer paso, estudiamos en forma analítica y numérica un modelo para inhibición lateral entre dos células que se basa en ecuaciones diferenciales para las concentraciones de las dos proteínas relevantes. Revisitamos y logramos reproducir resultados de otras autoras para este sistema [14, 36]. A continuación mostramos que los patrones estables obtenidos para arreglos bidimensionales de células dependen de los parámetros  $a$  y  $b$ , que se relacionan con los umbrales de activación de Notch por Delta de las células vecinas y de inhibición de Delta por Notch de la misma célula; y de los exponentes  $k$  y  $h$  de las funciones regulatorias. Encontramos que para valores de  $k$  y  $h$  fijos, el sistema bidimensional se estabiliza en un patrón de células con destinos heterogéneos u homogéneos dependiendo de los valores de los parámetros  $a$  y  $b$ . Los resultados obtenidos para los valores analizados sugieren que el espacio de parámetros para los cuales se obtiene patrones heterogéneos en un tejido disminuye con respecto al espacio de parámetros para el cual se produce el destino asimétrico en el sistema de dos células. Por otro lado, comprobamos que a medida que nos acercamos a la frontera que separa las regiones del espacio de parámetros con destinos celulares heterogéneos y homogéneos, el sistema tarda más en estabilizarse, permaneciendo más tiempo en el punto fijo inestable. Queda para el futuro considerar redes irregulares y que el parámetro  $a$ , que está relacionado con el área de contacto entre las células [14], sea determinado a partir de la superficie de contacto de una célula con sus vecinas. En este caso, en cada simulación se podría utilizar valores diferentes del parámetro  $a$ , según la compactación de cada región.

Por otro lado, comprobamos que para valores de  $a$  y  $b$  fijos, variaciones en los valores de los exponentes  $k$  y  $h$  también se traducen en cambios en los destinos de las células del sistema. Mostramos que los efectos que producen dichos coeficientes no son completamente equivalentes. Al igual que en el sistema de dos células, en los casos analizados para el arreglo bidimensional de células el patrón pasa de ser homogéneo a heterogéneo a medida que  $k$  toma valores más grandes, lo que no siempre ocurre al aumentar el valor de  $h$ . Esto podría explicarse porque  $k$  produce mayores efectos en el cambio de la pendiente de la curva  $y = f(g(f(g(x))))$ , lo que se traduce en un

cambio en el número de soluciones estacionarias del sistema. Asimismo, notamos que el incremento de valores de  $k$  y  $h$  reduce el tiempo necesario para que emerja el patrón final.

Finalmente, estudiamos los patrones que surgen al considerar la comunicación celular a través de filopodios en un arreglo unidimensional de células. En trabajos previos [5, 16, 25, 15] la variabilidad en la señalización por inhibición lateral relacionada a la existencia de filopodios en las células resultó fundamental para reproducir y explicar los patrones espacio-temporales de diferenciación observados experimentalmente. Sin embargo, en el modelo propuesto por Cohen y colaboradores, aunque fueron tenidos en cuenta los datos de longitud y tiempo de vida de filopodios medidos experimentalmente, la dinámica de crecimiento y decrecimiento de estas proyecciones no fue considerada [5].

Para estudiar los efectos de la presencia de filopodios implementamos dos modelos para inhibición lateral con señalización a distancia. En ambos casos, combinamos el modelo de ecuaciones diferenciales para Notch y Delta en cada célula y un modelo estocástico para los filopodios. El primer modelo fue basado en el trabajo de Cohen y colaboradores, en el que están presentes la comunicación apical-apical y filopodio-filopodio; y la dinámica de los filopodios es contemplada por un modelo de Poisson. El segundo modelo considera en forma explícita el crecimiento y el decrecimiento de los filopodios y agrega la señalización apical-filopodio a las ya mencionadas. Los patrones obtenidos en ambos casos difieren de los que fueron derivados en arreglos de células en los que sólo estaba presente la señalización entre células adyacentes, lo que infiere que la incorporación de filopodios amplía el rango de inhibición de las células, como fue descrito por otros autores [5, 16]. Comparamos de manera cuantitativa el espaciado entre células precursoras en los patrones emergentes de ambas implementaciones. Queda para el futuro mejorar la estadística de las simulaciones realizadas para determinar si las diferencias encontradas son estadísticamente significantes. Los resultados sugieren que considerar la dinámica de crecimiento y decrecimiento de los filopodios favorece la aparición de distancias más chicas entre células precursoras. Esto resulta esperable dado que, al estar en constante crecimiento y retracción, el tiempo en el que los filopodios están en su máxima longitud es menor que en la implementación del modelo de Cohen. En este los filopodios se encuentran en su máxima longitud durante todo su tiempo de vida, por lo que su rango espacial de inhibición es mayor. Finalmente notamos que reducir la contribución de la comunicación a través del contacto entre filopodios reduce de manera significativa la distancia entre células precursoras, lo que resalta la importancia de este mecanismo de comunicación. Sin embargo, en un tejido real la región de contacto apical entre dos células vecinas debería ser mayor que la superficie de contacto entre la membrana y el filopodio, y más grande aún que entre filopodios. En el caso de que la disponibilidad de ligandos y receptores para

la señalización sea homogénea en las membranas y protrusiones, esto implicaría que las interacciones que dependen de los filopodios deberían contribuir menos a la señalización total. En tal circunstancia, sería más certero otorgar mayor peso a la señalización entre células vecinas que la que se provee a través de contactos filopodiales.

Del punto de vista experimental sería muy interesante tener medidas de la disponibilidad de Notch y Delta en las membranas y protrusiones, además de saber qué otros ingredientes pueden interferir en esta señalización. En este sentido se ha propuesto que el coeficiente de difusión de Delta es más alto en los filopodios que en el cuerpo de la célula [21], lo que significaría que el contacto entre filopodios podría generar una mayor señalización que entre células vecinas. Así, dos escenarios para la inhibición lateral podrían ser identificados: uno para áreas de contacto relativamente grandes y/o para coeficientes de difusión bajos (por ejemplo en los contactos epiteliales), caso en que la señalización debería ser proporcional al área de contacto entre las células. Por otro lado, para regiones de contacto relativamente pequeñas y/o rápida difusión (por ejemplo en filopodios), la señalización podría ser independiente del área de contacto pero depender de la escala de la difusión de ligandos y receptores [22].



## Apéndice 1: métodos

### 7.1 Análisis de estabilidad lineal

La dinámica no lineal permite tener información sobre los estados estacionarios de un sistema dinámico, y en particular sobre el comportamiento en el tiempo hacia estos estados, en función de los parámetros del sistema. En el caso de un sistema de ecuaciones no lineales, como el que nos interesa en la presente tesis, es útil linealizar el sistema, para a continuación estudiar la estabilidad (local) de sus estados estacionarios o puntos de equilibrio [35].

Consideremos el siguiente sistema no lineal:

$$\begin{cases} x' = f(x, y) \\ y' = g(x, y) \end{cases} \quad (7.1)$$

Sea  $(x_e, y_e)$  un punto de equilibrio del sistema, es decir un punto para el cual  $f(x_e, y_e) = g(x_e, y_e) = 0$ . Si  $(x, y)$  es un punto cercano al punto de equilibrio,  $(u, v) = (x, y) - (x_e, y_e)$  denota una pequeña perturbación al mismo.  $x$  y  $y$  pueden ser expresados en función de  $u$  y  $v$  de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} u = x - x_e &\Leftrightarrow x = u + x_e \\ v = y - y_e &\Leftrightarrow y = v + y_e \end{aligned} \quad (7.2)$$

Como  $x_e$  e  $y_e$  son constantes,  $u' = x'$  y  $v' = y'$ . Entonces, el sistema 7.1 puede ser escritos en términos de  $u$  y  $v$  de la siguiente manera:

$$\begin{cases} u' = f(u + x_e, v + y_e) \\ v' = g(u + x_e, v + y_e) \end{cases} \quad (7.3)$$

Ahora se procede a aproximar las funciones 7.3 utilizando la mejor aproximación lineal que está dada por el polinomio de Taylor de primer grado:

$$\begin{aligned} u' &= f(u + x_e, v + y_e) \approx f(x_e, y_e) + \left[ \frac{\partial f}{\partial x}(x_e, y_e) \right] u + \left[ \frac{\partial f}{\partial y}(x_e, y_e) \right] v \\ v' &= g(u + x_e, v + y_e) \approx g(x_e, y_e) + \left[ \frac{\partial g}{\partial x}(x_e, y_e) \right] u + \left[ \frac{\partial g}{\partial y}(x_e, y_e) \right] v \end{aligned} \quad (7.4)$$

Como  $(x_e, y_e)$  es un punto de equilibrio,  $f(x_e, y_e) = g(x_e, y_e) = 0$ . Reemplazando en 7.4 se obtiene que:

$$\begin{aligned} u' &\approx \left[ \frac{\partial f}{\partial x}(x_e, y_e) \right] u + \left[ \frac{\partial f}{\partial y}(x_e, y_e) \right] v \\ v' &\approx \left[ \frac{\partial g}{\partial x}(x_e, y_e) \right] u + \left[ \frac{\partial g}{\partial y}(x_e, y_e) \right] v \end{aligned} \quad (7.5)$$

El sistema 7.5 puede ser escrito matricialmente de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} u' \\ v' \end{pmatrix} \approx \underbrace{\begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial x}(x_e, y_e) & \frac{\partial f}{\partial y}(x_e, y_e) \\ \frac{\partial g}{\partial x}(x_e, y_e) & \frac{\partial g}{\partial y}(x_e, y_e) \end{pmatrix}}_A \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} \quad (7.6)$$

La matriz  $A = \begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial x}(x_e, y_e) & \frac{\partial f}{\partial y}(x_e, y_e) \\ \frac{\partial g}{\partial x}(x_e, y_e) & \frac{\partial g}{\partial y}(x_e, y_e) \end{pmatrix}$  se llama matriz Jacobiana en el punto fijo  $(x_e, y_e)$ . El siguiente sistema es una linealización del sistema 7.1 en el punto de equilibrio  $(x_e, y_e)$ :

$$\begin{pmatrix} u' \\ v' \end{pmatrix} = A \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} \quad (7.7)$$

La estabilidad de la solución de equilibrio  $(x_e, y_e)$  del sistema lineal 7.7 se puede establecer analizando los autovalores  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  de  $A$ . Esto se debe a que la solución general del sistema 7.7 puede ser escrita como:

$$\begin{aligned} u(t) &= e^{\lambda_1 t} u_1 \\ v(t) &= e^{\lambda_2 t} v_1 \end{aligned} \quad (7.8)$$

donde  $(u_1, v_1)$  son los autovectores de  $A$ .

Observemos que al aumentar el tiempo  $t$  los términos  $e^{\lambda_1 t}$  y  $e^{\lambda_2 t}$  disminuyen solo si  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son negativos, haciendo que la solución general se acerca al origen, por lo que  $(x_e, y_e)$  se trata de un punto de equilibrio estable. En cambio si alguno de los autovalores es positivo la solución se aleja del punto de equilibrio a medida que crece  $t$ . Esto permite establecer el siguiente criterio para analizar la estabilidad del

punto de equilibrio [35]: si  $\lambda_1 \in \mathbb{R} > 0$  o  $\lambda_2 \in \mathbb{R} > 0$ , el equilibrio es inestable. Mientras que si  $\lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R} < 0$  o son números complejos con parte real negativa, se trata de un punto de equilibrio estable. Si alguno de los autovalores de anula el equilibrio es estable sólo si el otro autovalor es negativo.

## 7.2 Métodos numéricos para resolución de ecuaciones diferenciales

El método de Euler es un método numérico sencillo que permite aproximar las soluciones de ecuaciones diferenciales ordinarias a partir de un valor inicial dado. Consideremos el siguiente problema de valores iniciales para la función  $y$  diferenciable:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dx} = f(x, y) \\ y(x_0) = y_0 \end{cases} \quad (7.9)$$

Supongamos que queremos aproximar el valor de  $y(x_f)$  (Con  $x_f > x_0$ ). Para ello dividimos el intervalo  $[x_0, x_f]$  en  $n$  pasos de longitud  $h = \frac{x_f - x_0}{n}$  con  $n \in \mathbb{N}$ . El valor de la solución en el primer paso  $x_1 = x_0 + h$  se puede aproximar a mediante la recta tangente al gráfico de la función  $y$  que pasa por el punto  $(x_0, y_0)$ , cuya pendiente es la derivada de la función evaluada en el punto  $(x_0, y_0)$ . Es decir:

$$y(x_1) \approx y_0 + f(x_0, y_0) \cdot h \quad (7.10)$$

Para construir el siguiente valor en  $x_2 = x_1 + h$  se procede de la misma forma:

$$y(x_2) \approx y_1 + f(x_1, y_1) \cdot h \quad (7.11)$$

siendo  $y_1$  el valor aproximado de  $y(x_1)$ , calculado en el paso anterior.

En forma general, para un punto  $k$  tenemos:

$$y(x_k) \approx y_{k-1} + f(x_{k-1}, y_{k-1}) \cdot h \quad k \in [x_0, x_f] \quad (7.12)$$

La aproximación buscada se obtiene cuando  $k = x_f$ .

El método resultara más preciso a medida que tomamos pasos  $h$  más pequeños.



## Apéndice 2: programas desarrollados en la Tesis

Los códigos de los programas desarrollados para la tesis se encuentran escritos en lenguaje R y están disponibles en el siguiente enlace:

<https://drive.google.com/drive/folders/1jCNvdp8d0lwLxy9oT1IjX5gWfGyW5y1h?usp=sharing>



# Bibliografía

- [1] Paul Beatus y Urban Lendahl. „Notch and neurogenesis“. En: *Journal of neuroscience research* 54.2 (1998), págs. 125-136 (vid. págs. 1, 4).
- [2] Maik C. Bischoff, Sebastián Lieb, Renate Renkawitz-Pohl y Sven Bogdan. „Filopodia-based contact stimulation of cell migration drives tissue morphogenesis“. En: *Nature Communications* 12.721 (2021) (vid. págs. 7).
- [3] Thomas Bornschlög, Stéphane Romero, Christian Vestergaard y Patricia Bassereau. „Filopodial retraction force is generated by cortical actin dynamics and controlled by reversible tethering at the tip“. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.47 (2013), 18928–18933 (vid. págs. 7).
- [4] Sarah J Bray. „Notch signalling in context“. En: *Nature reviews Molecular cell biology* 17.11 (2016), págs. 722-735 (vid. págs. 3).
- [5] Michael Cohen, Marios Georgiou, Nicola L Stevenson, Mark Miodownik y Buzz Baum. „Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition“. En: *Developmental cell* 19.1 (2010), págs. 78-89 (vid. págs. 2, 6-9, 37, 41-43, 45, 46, 48, 56).
- [6] Joanne R Collier, Nicholas AM Monk, Philip K Maini y Julian H Lewis. „Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of delta-notch intercellular signalling“. En: *Journal of theoretical Biology* 183.4 (1996), págs. 429-446 (vid. págs. 1, 3, 4, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 20, 27, 33, 41).
- [7] Joaquín De Navascués, Carolina N Perdigoto, Yu Bian et al. „Drosophila midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells“. En: *The EMBO journal* 31.11 (2012), págs. 2473-2485 (vid. págs. 1, 5, 6).
- [8] Bruce A Edgar. „Intestinal stem cells: no longer immortal but ever so clever. . .“ En: *The EMBO Journal* 31.11 (2012), págs. 2441-2443. eprint: <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.1038/emboj.2012.133> (vid. págs. 5).
- [9] James E Ferrell Jr. „Bistability, bifurcations, and Waddington’s epigenetic landscape“. En: *Current biology* 22.11 (2012), R458-R466 (vid. págs. 3).
- [10] „Formin and capping protein together embrace the actin filament in a ménage à trois“. En: *O* (vid. págs. 8).
- [11] Pau Formosa-Jordan, Marta Ibañes, Saúl Ares y José María Frade. „Regulation of neuronal differentiation at the neurogenic wavefront“. En: *Development* 139.13 (2012), págs. 2321-2329 (vid. págs. 2).

- [12] Pau Formosa-Jordan y David Sprinzak. „Modeling Notch signaling: a practical tutorial“. En: *Notch Signaling*. Springer, 2014, págs. 285-310 (vid. pág. 2).
- [13] Nara Guisoni, Paula Bergero y Luis Diambra. „Sonic Hedgehog y el origen de las formas biológicas“. En: *Ciencia hoy* 30.175 (2021), págs. 31-38 (vid. pág. 1).
- [14] Nara Guisoni, Rosa Martinez-Corral, Jordi Garcia-Ojalvo y Joaquín de Navascués. „Diversity of fate outcomes in cell pairs under lateral inhibition“. En: *Development* 144.7 (2017), págs. 1177-1186 (vid. págs. 1, 3, 5, 6, 12, 19, 20, 22, 28-30, 38, 55).
- [15] Zena Hadjivasiliou, Ginger L Hunter y Buzz Baum. „A new mechanism for spatial pattern formation via lateral and protrusion-mediated lateral signalling“. En: *Journal of the Royal Society Interface* 13.124 (2016), pág. 20160484 (vid. págs. 43, 56).
- [16] Zena Hadjivasiliou, Rachel E Moore, Rebecca McIntosh et al. „Basal protrusions mediate spatiotemporal patterns of spinal neuron differentiation“. En: *Developmental cell* 49.6 (2019), págs. 907-919 (vid. págs. 2, 6, 9, 10, 37, 45, 56).
- [17] Ginger L Hunter, Li He, Norbert Perrimon et al. „A role for actomyosin contractility in Notch signaling“. En: *BMC biology* 17.1 (2019), págs. 1-15 (vid. pág. 2).
- [18] S.S. Huppert, T.L. Jacobsen y M.A. Muskavitch. „Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for Drosophila wing vein morphogenesis“. En: *Development* 124.17 (sep. de 1997), págs. 3283-3291. eprint: <https://journals.biologists.com/dev/article-pdf/124/17/3283/1129623/3283.pdf> (vid. pág. 4).
- [19] Huaqi Jiang y Bruce A. Edgar. „Intestinal stem cells in the adult Drosophila mid-gut“. En: *Experimental Cell Research* 317.19 (2011). Special Issue - Gastroenterology, págs. 2780-2788 (vid. pág. 5).
- [20] James D Jontes, JoAnn Buchanan y Stephen J Smith. „Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo“. En: *Nature neuroscience* 3.3 (2000), págs. 231-237 (vid. pág. 43).
- [21] Itzhak Khait, Yuval Orsher, Ohad Golan et al. „Quantitative analysis of Delta-like 1 membrane dynamics elucidates the role of contact geometry on Notch signaling“. En: *Cell reports* 14.2 (2016), págs. 225-233 (vid. pág. 57).
- [22] Rhet A Kovall, Brian Gebelein, David Sprinzak y Raphael Kopan. „The canonical Notch signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and force“. En: *Developmental cell* 41.3 (2017), págs. 228-241 (vid. pág. 57).
- [23] Aneil Mallavarapu y Tim Mitchison. „Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.“ En: *J Cell Biol* 146.5 (1999), 1097–1106 (vid. pág. 7).
- [24] Pieta Mattila y Pekka Lappalainen. „Filopodia: molecular architecture and cellular functions“. En: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9.6 (2008), 446–454 (vid. pág. 7).
- [25] Rachel Moore y Paula Alexandre. „Delta-Notch Signaling: The Long and The Short of a Neuron’s Influence on Progenitor Fates“. En: *Journal of Developmental Biology* 8.2 (2020), pág. 8 (vid. págs. 2, 56).
- [26] Nikki R Paul, Jennifer L Allen, Anna Chapman et al. „ $\alpha 5 \beta 1$  integrin recycling promotes Arp2/3-independent cancer cell invasion via the formin FHOD3“. En: *Journal of Cell Biology* 210.6 (2015), págs. 1013-1031 (vid. pág. 43).

- [27]Gregory J Podgorski, Mayank Bansal y Nicholas S Flann. „Regular mosaic pattern development: a study of the interplay between lateral inhibition, apoptosis and differential adhesion“. En: *Theoretical Biology and Medical Modelling* 4.1 (2007), pág. 43 (vid. pág. 4).
- [28]Robert D Reed. „Evidence for Notch-mediated lateral inhibition in organizing butterfly wing scales“. En: *Development Genes and Evolution* 214.1 (2004), págs. 43-46 (vid. pág. 5).
- [29]Aline Xavier da Silveira dos Santos y Prisca Liberali. „From single cells to tissue self-organization“. En: *The FEBS Journal* 286.8 (2019), pág. 1495 (vid. pág. 1).
- [30]Daniela Senra, Alejandra Páez, Geraldine Gueron, Luciana Bruno y Nara Guisoni. „Following the footprints of variability during filopodia growth“. En: *European Biophysics Journal* <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01473-6> (2020) (vid. pág. 43).
- [31]Oren Shaya, Udi Binshtok, Micha Hersch et al. „Cell-cell contact area affects notch signaling and notch-dependent patterning“. En: *Developmental cell* 40.5 (2017), págs. 505-511 (vid. pág. 6).
- [32]Oren Shaya y David Sprinzak. „From Notch signaling to fine-grained patterning: Modeling meets experiments“. En: *Current opinion in genetics & development* 21.6 (2011), págs. 732-739 (vid. págs. 1, 3, 4, 8).
- [33]Marika Sjöqvist y Emma R Andersson. „Do as I say, Not (ch) as I do: Lateral control of cell fate“. En: *Developmental biology* 447.1 (2019), págs. 58-70 (vid. págs. 1, 3, 7).
- [34]David Sprinzak, Amit Lakhanpal, Lauren LeBon et al. „Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states“. En: *Nature* 465.7294 (2010), págs. 86-90 (vid. pág. 2).
- [35]Steven H Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos with student solutions manual: With applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. CRC press, 2018 (vid. págs. 59, 61).
- [36]Daniela Suárez. *La inhibición lateral en la selección del destino celular: ¿qué nos pueden decir los modelos?* Trabajo de Diploma, Licenciatura en Física Física, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Directoras: Nara Guisoni y Alejandra Carrea, 2021 (vid. págs. 1, 19, 22, 23, 31, 55).



# Índice de figuras

2.1	El receptor Notch de una célula es activado por el contacto con el ligando Delta de la otra célula. La unión induce el clivaje proteolítico que libera el dominio intracelular de Notch que se transloca al núcleo donde inhibe la expresión de Delta. . . . .	4
2.2	Diferentes patrones formados por inhibición lateral. (A) Formación de las escamas del ala de mariposa <i>Heliconius erato</i> . En verde se marca el núcleo de las células y en rojo la expresión de Notch. Las células que tienen alta concentración de Notch se ven amarillas (combinación de verde y rojo) mientras que las que tienen baja expresión de Notch son vistas en verde. Imagen extraída de [28]. (B) Intestino medio de <i>Drosophila melanogaster</i> . Los núcleos son vistos en gris, las membranas en rojo y las células no diferenciadas que participan de la inhibición lateral en rosa o violeta claro. Imagen modificada extraída de [14]. . .	5
2.3	(A) Composición del intestino medio de <i>Drosophila</i> . (B) ISCs pueden autorrenovarse y generar EBs, que son precursores de EEs y ECs. Imagen modificada extraída de [7]. . . . .	6
2.4	La distancia sobre la cual puede operar la señalización mediada por contacto célula-célula puede extenderse mediante contactos a larga distancia mediados por filopodios. Imagen extraída de [33]. . . . .	7
2.5	Los filopodios son altamente dinámicos. Célula epitelial de la <i>Drosophila</i> con filopodios que crecen y se retraen. Imagen extraída de [5]. . . . .	8
2.6	Espaciado entre células precursoras de las cerdas dorsales en <i>Drosophila notum</i> . Las células precursoras se ven en color claro. Imagen extraída de [5]. . . . .	9
2.7	Desarrollo del pez cebra: las neuronas espinales en diferenciación alargan transitoriamente dos protuberancias basales largas a lo largo del eje la superficie de la medula espinal. Agregados de Delta en las protuberancias y en el cuerpo celular son vistos en color magenta. El marcador fluorescente verde indica la presencia de Delta citoplasmático. Imágenes extraídas de [16]. . . . .	10
3.1	Figura ilustrativa de las funciones regulatorias. Los parámetros utilizados son $a = 0,01$ , $b = 100$ , $k = h = 2$ . . . . .	12

3.2	Gráfico ilustrativo de las posibles intersecciones entre las curvas $y = x$ e $y = f(g(f(g(x))))$ . Parámetros utilizados: $a = 0,01$ , $b = 100$ , $v = 1$ , $k = h = 2$ (figura de la derecha); $a = 0,05$ , $b = 1$ , $v = 1$ , $k = 1$ $h = 2$ (figura de la izquierda). . . . .	18
3.3	Evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de dos células vecinas. Los parámetros utilizados son: $a = 0,01$ , $b = 100$ , $v = 1$ , $k = h = 2$ y condiciones iniciales: $n_1(0) = d_1(0) = 1$ y $n_2(0) = d_2(0) = 0,99$ . . . . .	19
3.4	Diagrama de fases para los destinos posibles para el sistema de dos células en función de los parámetros $a_n$ y $b_n$ para el intestino de la <i>Drosophila</i> . Los destinos posibles para la división de una célula madre (ISC) son enteroblasto (EB) o ISC. Como la división es asimétrica hay tres posibilidades para las dos células: destinos positivos simétricos (pares EB-EB, en verde), destinos negativos simétricos (pares ISC-ISC, en azul) y destinos asimétricos (pares ISC-EB, en naranja). La curva de puntos separa las regiones donde hay tres estados estacionarios posibles (parte inferior, en la cual la solución estable es la heterogénea) y un sólo estado estacionario (parte superior, en la cual la solución estable es la homogénea). Para concentraciones de Notch superiores a 0,1 la célula es considerada EB. $k = h = 2$ . Extraído de [14]. . . . .	20
3.5	Evolución temporal de las concentraciones de Delta y Notch para dos células correspondientes a los puntos 1,2,3 y 4 de figura 3.4 para los cuales se obtienen destinos asimétricos para el punto 1 ( $a_n = 0,1$ , $b_n = 0,1$ ) y punto 2 ( $a_n = 1$ , $b_n = 0,1$ ): una célula blanca y la otra negra; y destinos simétricos para el punto 3 ( $a_n = 0,01$ ; $b_n = 0,1$ ) con dos células blancas, y punto 4 ( $a_n = 10$ , $b_n = 1$ ) con dos células negras. . . . .	21
3.6	Diagrama de fases para el número de soluciones posibles en el estado estacionario para el sistema de dos células en función de los exponentes de Hill de las funciones regulatorias. Los colores indican la cantidad de soluciones, según indicado. Se consideró $a_n = 1$ y $b_n = 0,3$ . Extraído de [36]. . . . .	22
3.7	Paneles superiores e inferior izquierdo: evolución temporal de las concentraciones de Notch para dos células para distintos valores de $h$ para $k = 2$ , $a_n = 1$ y $b_n = 0,3$ . Panel inferior derecho: Gráficos de las funciones $y = fgfg(x, k, h)$ e $y = x$ para los valores de parámetros mostrados en los otros paneles. . . . .	23
3.8	Paneles superiores e inferior izquierdo: evolución temporal de las concentraciones de Notch para dos células para distintos valores de $k$ para $h = 2$ , $a_n = 1$ y $b_n = 0,3$ . Panel inferior derecho: Gráficos de las funciones $y = fgfg(x, k, h)$ e $y = x$ para los valores de parámetros mostrados en los otros paneles. . . . .	24

4.1	La figura a. muestra el patrón obtenido para una matriz de $7 \times 7$ con condiciones de contorno cerradas, mientras que en b. se observa el patrón que emerge para una matriz de $7 \times 7$ con condiciones de contorno periódicas. Los parámetros considerados fueron $a = 0,01$ , $b = 100$ , $v = 1$ , $k = h = 2$ , y las condiciones iniciales son $D_i(0) = N_i(0)$ con valores alternados de 0,99 y 1. . . . .	26
4.2	Patrones obtenidos para arreglos bidimensionales con condiciones de contorno periódicas con los mismos parámetros que en la figura 4.1. Las condiciones iniciales son levemente distintas en las dos simulaciones. En ambos casos $D_i(0) = N_i(0)$ , pero en la figura de la izquierda estos valores tienen una distribución uniforme entre 0,9 y 1 mientras que en la figura de la derecha están uniformemente distribuidos entre 0,95 y 1.	27
4.3	Evolución temporal de dos arreglos hexagonales de células con condiciones periódicas de contorno. Los distintos tonos de gris indican los niveles de actividad de Notch. Aquellas con $N < 0,1$ son negras, con $0,1 < N < 0,19$ gris oscuro, si $0,19 < N < 0,25$ gris claro y finalmente, si $N > 0,25$ blancas. a) Condiciones iniciales iguales a la figura 4.1-izquierda, y b) condiciones iniciales iguales a la figura 4.2-izquierda.	28
4.4	Diagrama de fase y patrones de destinos celulares generados para los distintos valores de los parámetros $a$ y $b$ . A la izquierda se muestra el diagrama de fases obtenido para el sistema de dos células aisladas. La región naranja corresponde a los parámetros para los cuales se obtiene una célula con destino primario y otra con destino secundario. En las regiones verde y celeste se obtienen células iguales que se dirigen al destino secundario y primario, respectivamente. La región sombreada muestra el espacio de parámetros en que se encuentran 3 estados estacionarios, mientras en la región sin sombras hay apenas un estado estacionario. A la derecha arriba se muestra una ampliación de una región de la figura de la izquierda. Los resultados de las simulaciones para el arreglo bidimensional se marcaron como puntos verdes, rojos o azules sobre los diagramas de fases. Los patrones bidimensionales en que todas las células adquirieron el destino secundario son identificados con los puntos verdes, aquellos en que se encontró un patrón tipo “sal y pimienta” con el punto rojo y aquellos en que todas las células presentaron destino primario con el punto azul, como se indica a la derecha abajo. . . . .	29
4.5	A la izquierda arriba se muestra el diagrama de fases en función de $a$ y $b$ obtenido para el sistema de dos células aisladas. Los paneles a, b y c muestran la evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de dos células vecinas en un arreglo hexagonal para $h = k = 2$ , $b = 100$ y valores de $a$ indicados por los puntos rojos en el diagrama de fases. Punto a con $a = 0,006$ , punto b con $a = 0,1$ y punto c con $a = 0,5$ .	31

4.6	Diagramas de fase en función de los exponentes $k$ y $h$ en donde se puede ver qué soluciones adopta el sistema de dos células aisladas (círculos sin relleno) y el arreglo bidimensional de células (círculos sólidos) para los parámetros (a) $a = 0,01$ y $b = 100$ (b) $a = 0,0001$ y $b = 100$ . Verde significa un patrón homogéneo, en que todas las células se dirigen al destino secundario (células blancas) y naranja un patrón tipo “sal y pimienta”, con destinos asimétricos (células blancas y negras). . . . .	33
4.7	Concentración de Notch de dos células vecinas en función del tiempo en el arreglo hexagonal para diferentes combinaciones de los parámetros $k$ y $h$ , como indicado, para $a = 0,0001$ , $b = 100$ . Panel inferior: curva $y = f(g(f(g(x))))$ para $k = 3$ y los distintos valores de $h$ mostrados en los paneles superiores: $h = 1$ (amarillo), $h = 2$ (rojo), $h = 3$ (azul), $h = 4$ (verde) y recta $y = x$ punteada. Las intersecciones entre la curva $y = f(g(f(g(x))))$ y $y = x$ dan las concentraciones de Notch en los estados estacionarios para dos células. . . . .	34
4.8	Concentración de Notch de dos células vecinas en función del tiempo en el arreglo hexagonal para diferentes combinaciones de los parámetros $k$ y $h$ , como indicado, para $a = 0,0001$ , $b = 100$ . Panel inferior: curva $y = f(g(f(g(x))))$ para $h = 2$ y los distintos valores de $k$ mostrados en los paneles superiores: $k = 2$ (amarillo), $k = 3$ (rojo), $k = 4$ (azul), $k = 5$ (verde) y recta $y = x$ punteada. Las intersecciones entre la curva $y = f(g(f(g(x))))$ y $y = x$ dan las concentraciones de Notch en el/los estado/s estacionario/s para dos células. . . . .	35
5.1	Esquema ilustrativo de los diferentes tipos de contacto celular para una célula individual. Considérese la célula 0: los recuadros señalados por FF, FA y AA señalan ejemplos de contacto Filopodio-Filopodio, Filopodio-Apical y Apical-Apical, respectivamente. . . . .	38
5.2	Se muestra la distribución de longitudes obtenida experimentalmente para los filopodios medidos en 60 células durante el proceso de formación de cerdas dorsales de <i>Drosophila Notum</i> . La línea roja punteada muestra la distribución normal, derivada de estos datos (media $\mu = 1,4$ , desviación estándar $\sigma = 0,3$ , en unidades de diámetros celulares). Extraído de [5]. . . . .	42
5.3	Diagrama de flujo que esquematiza la dinámica de crecimiento de los filopodios en el Modelo con filopodios dinámicos. . . . .	44
5.4	Simlaciones en 1 dimensión: evolución temporal de las concentraciones de Notch y Delta de una célula identificada como precursora. Panel a: simulación donde sólo opera la señalización apical (referencia 5 en la tabla 5.1). Panel b: Modelo de filopodios dinámicos (referencia 2 en la tabla 5.1). Parámetros: $a = 0,01$ , $b = 100$ , $k = h = 3$ . . . . .	46

5.5	Longitudes máximas de filopodios generadas mediante las implementación del Modelo de Cohen (panel izquierdo) y del Modelo de filopodios dinámicos (panel derecho). . . . .	47
5.6	Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel a.: Modelo de filopodios dinámicos (referencia 1 en la tabla 5.1). Panel b.: Modelo de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1). Las flechas rojas indican dos células cuyos destinos cambian con el tiempo. En ambos casos las configuraciones son mostradas cada $10 \tau$ . Parámetros: $a = 0,1, b = 100, k = h = 3. D_{total} = 0,5 \cdot D_{AA} + 0,5 \cdot D_{FF}$ .	48
5.7	Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares para el Modelo de filopodios dinámicos con pesos iguales para las señalizaciones AA, AF y FF (referencia 2 en la tabla 5.1). Panel superior: patrones en los distintos pasos de simulación ( $\tau$ ) con una situación de frustración señalada. El panel inferior izquierdo muestra un aumento de la región de interés, con las células a, b y c identificadas por color. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel inferior derecho: concentración de Delta para las células a, b y c en función del tiempo. Parámetros: $a = 0,1, b = 100, k = h = 3$ .	49
5.8	Estabilización de los patrones espacio-temporales de destinos celulares para el Modelo de filopodios dinámicos con mayor peso para la señalización AA (referencia 3 en la tabla 5.1). Panel a.: patrones en los distintos pasos de simulación ( $\tau$ ). Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Panel b.: concentración de Delta y Notch para dos células adyacentes en función del tiempo. Parámetros: $a = 0,1, b = 100, k = h = 3$ . . . . .	50
5.9	Patrón espacial de destino celular en estado estacionario obtenido para distintas simulaciones. Las células precursoras son mostradas en color negro y las epiteliales en blanco. Los patrones 1, 2 y 3 corresponden al Modelo de filopodios dinámicos, el patrón 4 al Modelo de Cohen, mientras que en el patrón 5 solo hay señalización apical. Las contribuciones de los mecanismos de señalización corresponden a lo indicado en la Tabla 5.1. . . . .	51
5.10	Comparación entre el Modelo de Cohen (referencia 4 en la tabla 5.1) y el Modelo de Filopodios dinámicos sin interacción AF (referencia 1 en la tabla 5.1). Izquierda: distancia entre células precursoras en el estado estacionario. Fueron consideradas 20 realizaciones de cada modelo. Derecha: Valores medios de los datos mostrados en la figura izquierda. La barra indica desvío estándar. Implementación de Cohen (histograma rojo): Distancia $3,4 \pm 0,9$ ; Implementación de filopodios dinámicos (Histograma Azul): Distancia $2,2 \pm 0,8$ . Los valores se expresan en media $\pm$ desviación estándar. . . . .	52

5.11 Comparación entre distintas implementaciones del Modelo de Filopodios dinámicos (referencias 2, 3 y 1 en la tabla 5.1). Izquierda: histograma con distancia entre células precursoras en el estado estacionario. Fueron consideradas 20 realizaciones de cada modelo. Derecha: Valores medios de los datos mostrados en la figura izquierda. La barra indica el desvío estándar. Implementación A (histograma verde): Distancia  $2,5 \pm 0,9$ ; Implementación B (Histograma naranja): Distancia  $1,2 \pm 0,4$ ; Implementación C (Histograma azul): Distancia  $2,2 \pm 0,8$ . Los valores se expresan en media  $\pm$  desvío estándar. . . . . 53

# Índice de cuadros

5.1	Peso de las contribuciones de las señalizaciones AA, AF y FF para distintos casos considerados. . . . .	47
-----	---	----



# Declaración.

Declaro que la tesis de maestría ha sido completamente desarrollada por mi persona, María Belén García Contreras, bajo la dirección y ayuda de las Dras. Nara Guisoni y Luciana Bruno.

La totalidad de los códigos de las simulaciones escritos en lenguaje R han sido desarrollados por mi.

*Buenos Aires, Argentina. Diciembre 2022*

---

María Belén García Contreras

