

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO - FÍSICA

Estados sincronizados en la dinámica de
Circuitos genéticos oscilatorios

Directores:

Dr. Fernando FALO FORNIÉS
Dr. Jesús GÓMEZ GARDEÑES

Autora:


Pilar GIL FERNÁNDEZ

4 de septiembre de 2023

Índice

1. Introducción	1
2. Modelo teórico del reloj de segmentación	2
2.1. Conceptos previos. Expresión génica	2
2.1.1. Circuitos genéticos	3
2.1.2. Factores de transcripción	3
2.2. Modelización del oscilador celular	4
2.3. Mecanismo de interacción intercelular Delta-Notch	6
3. Estudio de ecuaciones diferenciales con retardo	7
3.1. Análisis de estabilidad de DDEs	7
3.2. Ejemplo de resolución. Ecuación lineal	8
4. Simulación de un oscilador celular	9
4.1. Dinámica del sistema. Emergencia del ciclo límite	10
4.1.1. Búsqueda de la solución estacionaria	10
4.1.2. Estabilidad de la solución estacionaria	10
4.1.3. Bifurcación de Hopf mediada por el retardo	11
4.2. Dependencia de la frecuencia de oscilación con el retardo	12
5. Sincronización entre dos células	13
5.1. Planteamiento teórico del modelo de interacción	13
5.2. Medida de la sincronización. Parámetros de orden	15
5.2.1. Parámetro de orden basado en series temporales	15
5.2.2. Parámetro de orden basado en series de frecuencia	15
5.3. Influencia del retardo intercelular τ_c en la sincronización	16
6. Sincronización de un tejido multicelular	20
7. Conclusiones	23
Referencias	24
A. Resolución numérica de DDEs	26
A.1. Algoritmo de integración de DDEs	26
A.2. Estudio del error para un caso analítico	27
B. Cuestiones de la simulación	29
B.1. Valores de parámetros del modelo del oscilador unicelular	29
B.2. Estimación de las escalas temporales del modelo	30
B.3. Influencia de los parámetros en las oscilaciones de una célula	30
C. Estudio ampliado de R para la interacción entre dos células	31

Códigos del TFG

A lo largo del trabajo se han desarrollado códigos tanto en C como en Python para la simulación del modelo. Los programas principales se pueden consultar en el siguiente repositorio de GitHub: enlace al proyecto: https://github.com/piipsx/TFG_Fisica_PilarGil.git 

Listado de acrónimos

ACRÓNIMO	NOMBRE COMPLETO
PSM	Mesodermo presomítico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-m	ARN mensajero
ARN-p	ARN polimerasa
FT	Factor de transcripción
ODE	Ecuación diferencial ordinaria
DDE	Ecuación diferencial con retardo
PVI	Problema de valor inicial
RK	Método de integración Runge-Kutta
NICD	Dominio intracelular Notch
CI	Concentración inicial
FFT	Transformada de Fourier rápida

Tabla 1: *Acrónimos en la memoria según su orden de aparición.*

1. Introducción

La coordinación temporal y espacial de eventos a escalas celulares es esencial para el funcionamiento adecuado de los seres vivos. Gran número de estos procesos como el ciclo de contracción de las células musculares cardíacas, los relojes circadianos o los circuitos neuronales rítmicos [1] se corresponden con sistemas biológicos que presentan una variación periódica en el estado de una célula o tejido. Dichos sistemas reciben el nombre de **osciladores biológicos**.

Uno de los osciladores biológicos más fascinantes, el **reloj de segmentación**, juega un papel fundamental en el desarrollo de los embriones en vertebrados, ya que genera oscilaciones de genes específicos que controlan la formación de las somitas, poblaciones de células que dan lugar a la formación de la anatomía segmentada del adulto como las vértebras, los músculos, la dermis de la piel y algunas partes del sistema circulatorio [2]. Este proceso recibe el nombre de **somitogénesis** y tiene lugar en un tejido no segmentado denominado mesodermo presomítico (PSM), situado en el extremo posterior del embrión. Los métodos tradicionales de genética del desarrollo han revelado los complejos circuitos moleculares que regulan este procesos pero tienen limitaciones para predecir y comprender las dinámicas espacio-temporales emergentes [3]. Cada vez más se recurre a la biofísica para construir modelos que capturen la dinámica del sistema y proporcionen descripciones más simplificadas y genéricas.

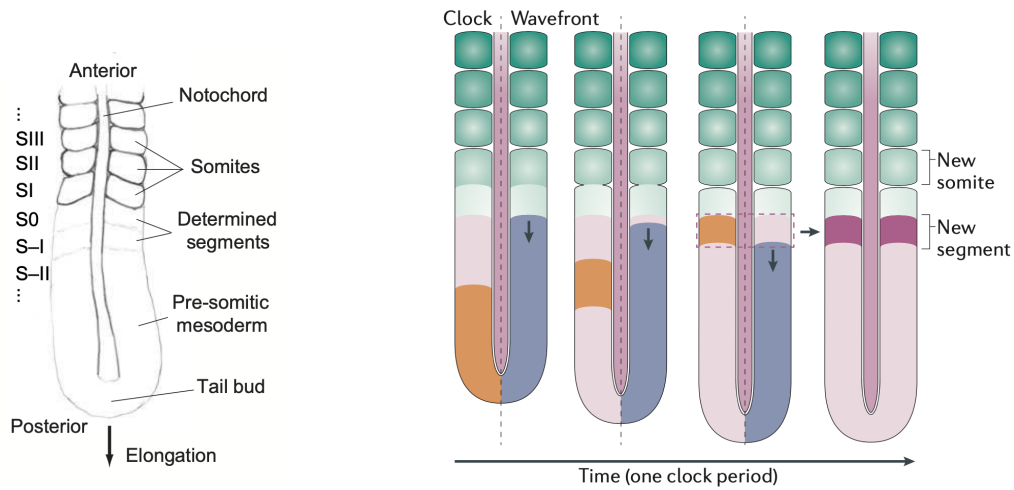
El modelo teórico predominante para explicar la somitogénesis, conocido como *Clock and Wavfront model*, fue propuesto por J. Cooke y E.C. Zeeman en 1976 [4] y postula que la formación de las somitas resulta de un cambio abrupto periódico (una catástrofe) en las propiedades celulares desencadenado por un frente de maduración que se desplaza (la onda frontal) [5]. Este modelo postula que, mientras que la población de células del PSM crece, todas las células que lo componen presentan una oscilación temporal en la expresión de una determinada familia de genes [6], [2]. Estos osciladores biológicos están sincronizados localmente, lo que da lugar a la formación de un frente de ondas de expresión génica que viaja de la parte posterior a la parte anterior del PSM. Por otro lado, un frente de ondas que se desplaza en sentido contrario congela a su paso las oscilaciones celulares [5] y se inicia un programa de diferenciación que da lugar a una somita o a tejido intersticial, de manera que del extremo anterior del PSM brotan pares de somitas secuencial y rítmicamente (ver Figura 1b). Para alcanzar sincronización celular en el reloj de segmentación es necesario un mecanismo de acoplo intercelular. Numerosas evidencias empíricas respaldan la teoría de que este mecanismo depende de la comunicación intercelular mediada por la vía Delta-Notch [7], [8], [9].

Tal y como se propone en [1], los mecanismos moleculares y celulares subyacentes en este proceso se pueden organizar en un **modelo de tres niveles**:

1. Oscilaciones genéticas de células individuales.
2. Sincronización de estos osciladores.
3. Detención controlada de las células que oscilan.

El **objetivo** de este trabajo consistirá en desarrollar un **modelo fundamentado en física biológica que reproduzca la dinámica de los dos primeros niveles**, es decir, del reloj de segmentación. Para ello se trabajará con ecuaciones diferenciales con desfase temporal, por lo que en la Sección 3 se desarrollará la teoría asociada a este tipo de ecuaciones. En la Sección 4 se modelizará el oscilador individual y posteriormente en la Sección 5 se estudiará la dinámica

de dos células al introducir el término de acoplo, para finalmente en la Sección 6 estudiar la dinámica de una red bidimensional de células sincronizadas a mayor escala.



(a) Vista de la parte posterior de un embrión de vertebrado en segmentación [1].

(b) Esquema del modelo “Clock and Wavefront” [5]. Evolución del reloj de segmentación (en naranja) y frente de ondas de arresto (en azul) durante un periodo de oscilación.

Figura 1: Vista esquemática de la formación de las somitas en el PSM.

2. Modelo teórico del reloj de segmentación

En primer lugar, vamos a motivar las distintas componentes del modelo teórico que se utilizará en este trabajo para simular el reloj de segmentación. Para ello es necesario introducir previamente algunos conceptos básicos relacionados con la biología a nivel celular.

2.1. Conceptos previos. Expresión génica

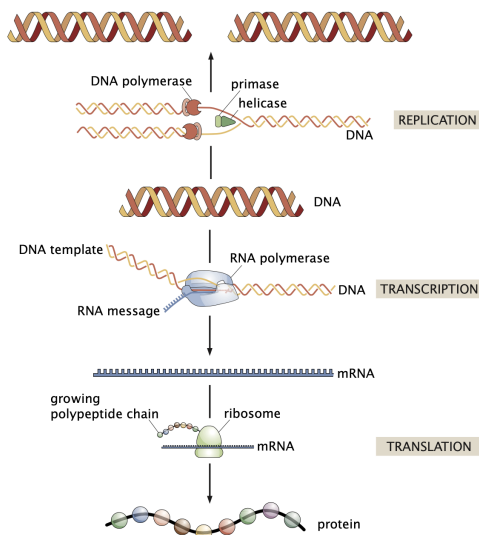


Figura 2: Dogma central de la biología molecular [6].

La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte en una función, por ejemplo, sintetizando proteínas o moléculas de ARN que cumplen otras funciones. Las etapas principales que tienen lugar durante este proceso se resumen en el dogma central de la biología molecular [10]. En particular, los dos siguientes procesos son clave en la síntesis de proteínas:

TRANSCRIPCIÓN. La información contenida en un fragmento de ADN se copia a una molécula de ARN-m. El proceso comienza con la unión de la ARN polimerasa (ARN-p) a una región específica de este gen denominada promotor.

TRADUCCIÓN. La información almacenada en el ARN-m se usa para sintetizar la secuencia de aminoácidos que consisten una proteína.

2.1.1. Circuitos genéticos

Una red reguladora de genes (o **circuito genético**) comprende un conjunto de genes que interactúan entre sí y con otras sustancias de la célula para gobernar los niveles de expresión génica de ARN-m y proteínas que, a su vez, determinan las funciones de la célula. Estas redes se componen de nodos y flechas:

- Cada nodo de una red representa un gen.
- Una flecha entre dos nodos indica que los productos de la expresión del primer gen regulan la expresión del segundo.

Existen diversas maneras de modelizar un circuito genético de forma teórica, dependiendo del nivel de detalle y complejidad que se desee alcanzar. En este trabajo se optará por desarrollar modelos basados en sistemas ecuaciones diferenciales con las que se representa la cinética de las distintas reacciones. De esta forma, la dinámica del sistema queda descrita por la **tasa de cambio de las concentraciones** de las especies.

2.1.2. Factores de transcripción

El proceso de expresión génica está cuidadosamente regulado y varía notablemente según las condiciones y los tipos celulares. Los productos de ARN y proteínas de muchos genes sirven para regular la expresión de otros genes. Un ejemplo de esto son los **factores de transcripción** (FT), proteínas que se unen a secuencias de ADN específicas para regular la tasa de anclaje de la ARN-p al promotor durante el proceso de transcripción de otras proteínas [6].

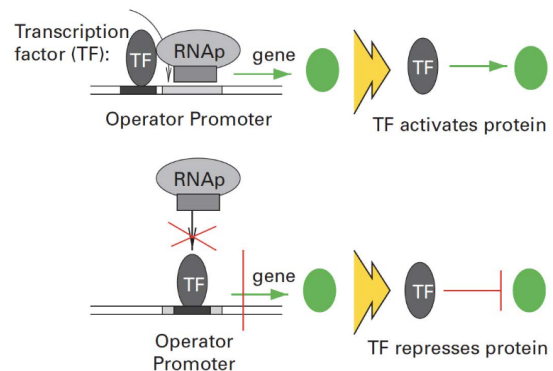
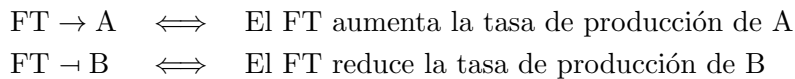


Figura 3: *Activadores e inhibidores* [11].

En función de si los FT promueven o bloquean la transcripción, estos reciben el nombre de **activadores** o **inhibidores**, respectivamente. La Figura 3 muestra un esquema de ambos tipos de FT, así como el símbolo con el que se denota a cada uno en un circuito genético:



Para modelar el efecto regulador de los factores de transcripción se suele expresar la producción mediante una **función de Hill** [6], [12]. Denotando por x la concentración de la proteína regulada, la expresión más general de estas funciones viene dada por

$$\begin{array}{ll} \text{PRODUCCIÓN CON ACTIVADOR} & \text{PRODUCCIÓN CON INHIBIDOR} \\ f_A(x) = \frac{(x/K)^\beta}{(1 + (x/K)^\beta)} & f_R(x) = 1 - f_A(x) = \frac{1}{(1 + (x/K)^\beta)} \end{array}$$

Estas funciones son no lineales y tienen forma sigmoideal, por lo que se usan para representar respuestas en las que hay una transición gradual entre un estado inactivo y un estado activo en función de la concentración del ligando.

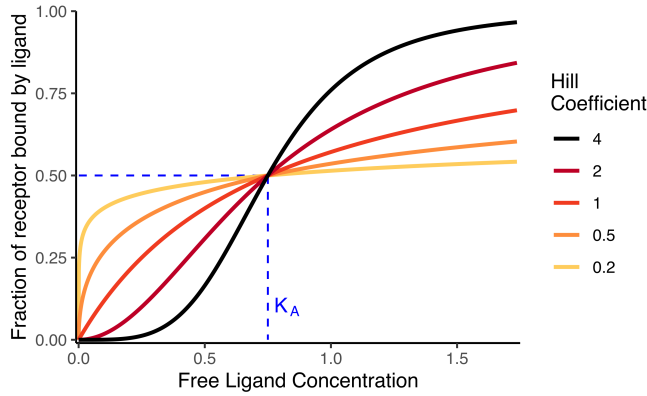


Figura 4: *Funciones de Hill de activadores para distintos valores de exponente de Hill β [13].*

El parámetro K se denomina constante de afinidad y representa la concentración a la cual la regulación del gen se encuentra a la mitad del valor máximo. Por otro lado, el exponente β describe la **cooperatividad** entre las moléculas que se unen al sitio regulador. Es un parámetro que determina la no linealidad en la regulación. Un valor mayor de β indica una regulación más cooperativa y más abrupta mientras que una β menor indica una regulación más suave y gradual.

2.2. Modelización del oscilador celular

A pesar de que el modelo de reloj de segmentación está muy conservado evolutivamente, la oscilación a nivel celular se controla por diferentes rutas génicas en distintas especies, como por ejemplo a través de un simple bucle de retroalimentación negativa en el pez cebra [8] o siguiendo un proceso más complicado con las proteínas de señalización FGF y Wnt en pollos y ratones [14]. En este trabajo se desarrollará un modelo del reloj de segmentación del pez cebra, debido a que ha sido ampliamente estudiado.

En el pez cebra, dos familias de genes vinculados que codifican proteínas reguladoras de genes represores (Her/Hes), están especialmente implicados en la génesis de las oscilaciones [1]. Dichos genes constituyen el bucle auto-regulador genético de **retroalimentación negativa** más simple. Se dice que el circuito presenta retroalimentación negativa ya que la proteína Her/Hes producida actúa como FT inhibidor de su propia producción.

Este circuito genético se compone de una serie de pasos intermedios:

1. El gen *Her/Hes* se traduce con cierta tasa basal.
2. El ARN-m se traduce fuera del núcleo.
3. Las proteínas se transportan de vuelta al núcleo, donde se asocian por pares (dimerizan) para formar un represor transcripcional.
4. Este represor se acumula y se une al promotor del gen para inhibir su expresión.
5. Cuando los productos del gen (ARN-m, proteína, dímero) decaen, se libera la represión del gen y el ciclo puede volver a empezar.

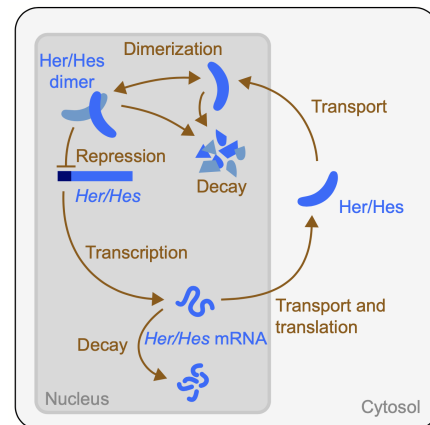


Figura 5: *Circuito genético oscilante del gen auto-represor Her/Hes [1].*

Conociendo el circuito genético, buscamos un conjunto de ecuaciones diferenciales que capturen la dinámica oscilatoria del sistema, $(\dot{x}_1, \dots, \dot{x}_n) = f(x_1, \dots, x_n)$; donde las x_i se corresponden con la concentración en cada instante de tiempo de cada una de las especies en el proceso.

En principio, el modelo debe ser como mínimo bidimensional, ya que según el teorema de Poincaré-Bendixon [15] no existen soluciones periódicas de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) en una única dimensión. En base a la Figura 5 podemos considerar como variables la concentración de la proteína Her/Hes y del ARN-m, denotadas por x y m , respectivamente. De este modo podemos suponer que las tasas de cambio de x y m obedecen a las ecuaciones [8]:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= am - bx \\ \dot{m} &= f(x) - cm\end{aligned}\tag{1}$$

donde las constantes b y c son las tasas de degradación de las moléculas de proteína y ARN-m, a es la tasa de producción de nuevas moléculas de proteína por molécula de ARN-m y $f(x)$ es la tasa de producción de nuevas moléculas de ARN-m, que se supone que es una función decreciente con la cantidad de proteína. De nuevo, se puede demostrar [15] que es imposible que este par de ecuaciones diferenciales genere oscilaciones sostenidas, independientemente de la función $f(x)$ que escojamos siempre que a y c sean números positivos.

El problema radica en que estos modelos se basan en simplificaciones excesivas respecto al proceso global. Una solución es, por tanto, considerar mecanismos más complejos que impliquen un mayor número de especies intermedias [16] y procesos como el transporte de moléculas dentro y fuera del núcleo, los acontecimientos bioquímicos adicionales (como el empalme y las modificaciones postraduccionales) y la descomposición de los productos [1], lo que aumenta la complejidad del modelo. Sin embargo, la presencia de especies intermedias se puede traducir en la aparición de un retardo τ [17] en la evolución de la especie x , ya que tanto la transcripción como la síntesis de ARN-m y proteínas transcurren en un tiempo significativo y esto hace que la realimentación no sea inmediata.

Así, la tasa de cambio de concentración de las proteínas Her/Hes se puede expresar como

$$\dot{x} = \underbrace{\frac{\alpha}{1 + (x_\tau/K)^\beta}}_{\text{A}} - \underbrace{\frac{Vx}{K_m + x}}_{\text{B}} - \underbrace{\gamma x}_{\text{C}}\tag{2}$$

donde $x_\tau \equiv x(t - \tau)$ es el término con retardo y representa que la evolución de la concentración de la proteína x depende no solo de su valor actual en el tiempo t , sino también de su valor en un tiempo pasado $t - \tau$. Al introducir el término x_τ reducimos el sistema de ODEs a una única ecuación diferencial con retraso, o DDE (*Delay Differential Equation*).

Cada uno de los sumandos de la ecuación (2) tiene un sentido biofísico:

- A** es un término de producción modelado por una función de Hill, ya que representa la influencia de la concentración de proteínas reguladoras en la tasa de represión del propio gen. Tal y como se introduce en la Subsección 2.1.2, β es el índice de cooperatividad y K es la constante de afinidad. Por otro lado, α se corresponde con la tasa de producción basal, es decir, la tasa de producción del gen cuando la concentración de la molécula reguladora es baja o nula.
- B** es un término de degradación de Michaelis-Menten utilizado para modelizar una cinética similar a la de una reacción enzimática, donde una enzima (o una proteína con función de degradación) se une a la molécula a degradar y cataliza su descomposición en productos más simples. V es la velocidad máxima de la reacción, que representa la velocidad de la reacción cuando la enzima está saturada con su sustrato (molécula a degradar), y K_m es

la constante de Michaelis-Menten. Existen evidencias de que la degradación enzimática favorece la robustez de las oscilaciones en circuitos genéticos sintéticos [17].

- Ⓒ es un término de degradación lineal asociado al crecimiento y la división celular [17]. Se basa en la asunción de que las células crecen exponencialmente con una tasa γ .

2.3. Mecanismo de interacción intercelular Delta-Notch

Tal y como se comenta en la introducción, la teoría de que el mecanismo de acoplo se lleva a cabo por la vía Delta-Notch está fuertemente respaldada por un gran número de experimentos.

El mecanismo Delta-Notch es uno de los mecanismos de inhibición lateral mejor estudiados. La inhibición lateral es un proceso en el que una célula asume un destino particular (al que nos referiremos como *primario*) y luego comunica ese destino a las células vecinas, impidiendo así que hagan lo mismo y dejándolas con un destino *secundario*. Esto da lugar a la formación de patrones espaciales de tipo “sal y pimienta” como los que se muestran en la Figura 7.

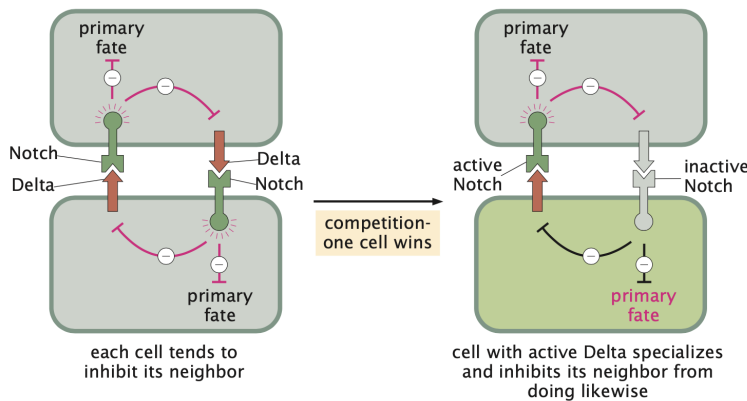


Figura 6: Mecanismo Delta-Notch entre dos células [6].

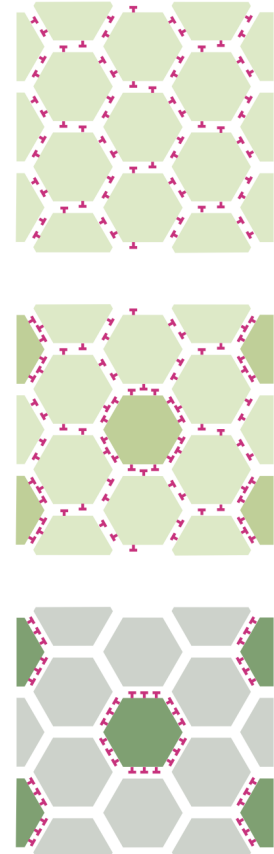


Figura 7: Patrón “sal y pimienta” [6].

En este caso, la inhibición del destino celular primario se consigue mediante una molécula conocida como Notch, un receptor de membrana que es activado por el ligando transmembrana Delta suministrado por una célula vecina. Las células con gran actividad Notch reprimen su destino celular primario (verde oscuro en la Figura 6). La actividad Notch es a su vez estimulada por la actividad Delta de una célula vecina, mientras que la actividad Notch dentro de una célula reduce la actividad Delta en la misma célula. Cuando una célula asume su destino primario (i.e., tiene una actividad Notch reducida) se estimula una actividad Delta elevada. A su vez, la Delta estimula la actividad Notch de la célula vecina, que se ve inhibida de asumir también el destino primario. Esto hace que pequeñas diferencias en la actividad Notch se amplifiquen y células vecinas asuman destinos diferentes.

En la Sección 5 se explicará en detalle el circuito genético correspondiente al modelo incorporando el mecanismo de acoplo, así como una simplificación del mismo con la introducción de un término de retardo adicional.

3. Estudio de ecuaciones diferenciales con retardo

Las ecuaciones diferenciales con retardo se aplican ampliamente para realizar análisis y predicciones en diversas áreas de las ciencias de la vida, como la dinámica de poblaciones, la epidemiología, la inmunología, la fisiología y las redes neuronales. La memoria o los retardos temporales en estos modelos están relacionados con la duración de ciertos procesos ocultos, como las etapas de un ciclo vital, el tiempo entre el inicio de la infección de una célula y la producción de nuevos virus, el periodo de infección o el periodo inmunitario [18].

Mientras que gran número de fenómenos de la vida real se pueden modelizar con problemas de valor inicial (PVI) con ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) del tipo

$$\begin{cases} \dot{x}(t) = f(t, x(t)) & t \geq 0 \\ x(0) = x_0 \end{cases}$$

en otras ocasiones es necesario modificar la función f de manera que incluya la dependencia de la derivada \dot{x} en un tiempo pasado $t - \tau$. El retardo introducido puede ser una constante, una función del tiempo $\tau = \tau(t)$ o incluso una función del estado x , i.e., $\tau = \tau(t, x(t))$ en función de la complejidad del fenómeno que se quiera modelar, pero debe ser siempre no negativo. En el modelo biofísico que consideramos tendremos una colección finita de retardos constantes $\tau_i \geq 0, i = 1, \dots, m$, de forma que el PVI que debemos plantear es un sistema de ecuaciones no lineales autónomas con retardo de la forma

$$(*) \quad \begin{cases} \dot{x}(t) = f(x(t), x(t - \tau_1), \dots, x(t - \tau_m)) & t \geq 0 \\ x(t) = \psi_0(t) & -\tau \leq t \leq 0 \end{cases}$$

donde se ha definido $\tau := \max_{i=1, \dots, m} \tau_i$. Si trabajamos con una población de n células, $x(t) \in \mathbb{R}^n$. De manera general, $f : \mathbb{R}^{(m+1)n} \rightarrow \mathbb{R}^n$ es una función no lineal suficientemente suave. En este caso, la existencia de retardo hace que la condición inicial del problema deba ser una función ψ_0 definida en el intervalo $-\tau \leq t \leq 0$, en lugar de un simple valor inicial x_0 . En el Apéndice A.1 se explican en profundidad los métodos de integración usados para hallar soluciones numéricas de PVI de este tipo.

3.1. Análisis de estabilidad de DDEs

El estudio de la estabilidad de un sistema de ecuaciones diferenciales proporciona importantes resultados cualitativos sobre la evolución del sistema dinámico.

En primer lugar, se deben buscar los puntos fijos del sistema (*), es decir, las soluciones estacionarias $x(t) \equiv x^*$ que satisfacen la ecuación $\dot{x}(t) = 0 \implies f(x^*, \dots, x^*) = 0$.

La estabilidad local de los puntos fijos queda determinada por la estabilidad de la ecuación linealizada

$$\dot{x}(t) = A_0 x(t) + \sum_{j=1}^m A_j x(t - \tau_j), \quad \text{donde } A_j = \left. \frac{\partial f}{\partial x_{j+1}} \right|_{x^*} \quad (3)$$

$A_j \in \mathbb{R}^{n \times n}$ se corresponde con la derivada parcial de f respecto a su $(j + 1)$ -ésimo argumento evaluada en x^* . La ecuación linealizada es asintóticamente estable si todas las raíces λ de la

ecuación característica

$$\det \left(\lambda I - A_0 - \sum_{j=1}^m A_j e^{-\lambda \tau_j} \right) = 0 \quad (4)$$

satisfacen $\operatorname{Re}\{e(\lambda)\} < 0$. A diferencia del caso de ODEs en el que la ecuación característica es polinómica, esta ecuación característica tiene un número infinito de raíces λ . Sin embargo, el número de raíces características con parte real superior a cierto valor umbral es finito, por lo que para estudiar la estabilidad de una solución estacionaria es suficiente con hallar todas las raíces que satisfacen $\operatorname{Re}\{e(\lambda)\} > r$ para un cierto $r < 0$ próximo a cero [19].

3.2. Ejemplo de resolución. Ecuación lineal

Tal y como acabamos de ver, el tratamiento de DDEs requiere una teoría ligeramente diferente a la usada para la resolución de ODEs a las que estamos acostumbrados. Por eso, antes de estudiar la ecuación no lineal de nuestro modelo (2), nos centramos en caracterizar la DDE lineal más sencilla y comparar con los resultados expuestos en [20] para testear los algoritmos de resolución y familiarizarnos con este tipo de ecuaciones. Consideramos la ecuación escalar

$$\dot{x}(t) = a \cdot x(t) + b \cdot x(t - \tau) \quad a, b \in \mathbb{R} \quad (5)$$

En particular, nos centramos en la búsqueda de una solución estacionaria y del análisis de estabilidad del sistema. La ecuación característica general (4) particularizada para esta DDE se corresponde con

$$h(\lambda) = \lambda - be^{-\lambda\tau} - a = 0 \quad (6)$$

Buscamos soluciones en el plano complejo, es decir; $\lambda = u + iv \in \mathbb{C}$, ($u, v \in \mathbb{R}$); de forma que la ecuación anterior se puede expresar equivalentemente como el siguiente sistema de dos ecuaciones:

$$\begin{aligned} g_1(u, v) &= u - be^{-u\tau} \cos v\tau - a = 0 \\ g_2(u, v) &= v + be^{-u\tau} \sin v\tau = 0 \end{aligned} \quad (7)$$

La solución de este sistema se puede hallar numéricamente usando el algoritmo de Newton-Raphson, donde buscamos resolver el siguiente sistema lineal de manera iterativa

$$Jg(u, v)\Delta x = -g(u, v) \quad \longrightarrow \quad x_{k+1} = x_k + \Delta x, \quad k \in \mathbb{N} \quad (8)$$

donde $Jg(u, v)$ se corresponde con el Jacobiano de la función del sistema, en nuestro caso

$$Jg(u, v) = \begin{pmatrix} 1 + b\tau e^{-u\tau} \cos v\tau & b\tau e^{-u\tau} \sin v\tau \\ -b\tau e^{-u\tau} \sin v\tau & 1 + b\tau e^{-u\tau} \cos v\tau \end{pmatrix}$$

Tal y como se deduce detalladamente en [20], el comportamiento del punto fijo $x^* = 0$ depende de la relación entre los parámetros a, b y en algunos casos del desfase τ :

- (1) Si $a + b > 0$, $x^* = 0$ es inestable.
- (2) Si $a + b < 0$ y $b \geq a$, $x^* = 0$ es asintóticamente estable.
- (3) Si $a + b < 0$ y $b < a$, existe un τ_* tal que $x^* = 0$ es asintóticamente estable para $0 < \tau < \tau_*$ e inestable para $\tau > \tau_*$

A continuación se representan los resultados obtenidos con la simulación.

En la Figura 8 observamos que los puntos por encima de la recta $a + b = 0$ tienen raíces con parte real positiva dado que el punto fijo es inestable (región (1) de la gráfica)¹. Por otro lado, por debajo de la recta $a + b = 0$ distinguimos dos comportamientos: cuando $b \geq a$ (2) la solución es asintóticamente estable, tal y como esperábamos observar; mientras que cuando $b < a$ existen valores de (a, b) para los cuales la solución es estable y valores para los que no, algo que tiene sentido puesto que hemos realizado la simulación con τ fijo y sabemos que existe un τ_* crítico para garantizar la estabilidad.

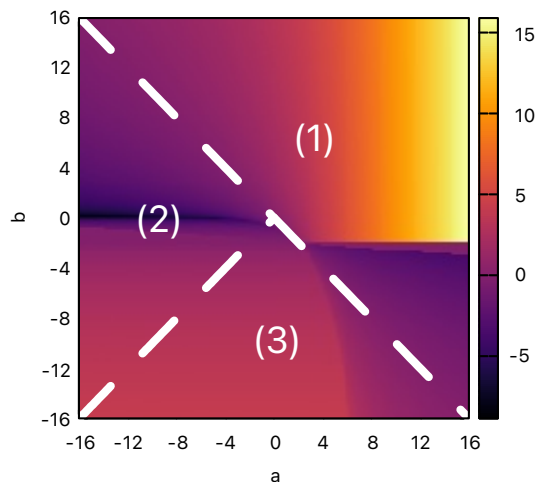


Figura 8: Parte real del autovalor dominante de (6) en función de a y b . $\tau = 1.0$

4. Simulación de un oscilador celular

Tal y como se ha introducido en la Subsección 2.2, la dinámica de cada oscilador celular se modeliza mediante la DDE (2). Para llevar a cabo el estudio de esta ecuación se implementa un RK2 de N dimensiones, de tal forma que se pueda simular simultáneamente la dinámica de una misma célula con N condiciones iniciales diferentes. A cada componente se le asigna una concentración inicial constante $x_0 \geq 0$ en el intervalo de tiempos iniciales $[-\tau, 0]$. El valor de x_0 se asigna de forma aleatoria siguiendo una distribución uniforme en el intervalo² $[0, 1]$.

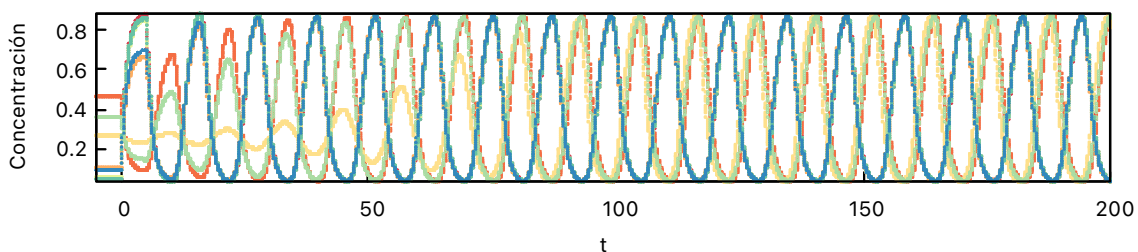


Figura 9: Solución periódica para la DDE del oscilador celular.

La evolución temporal de las concentraciones presenta el aspecto periódico deseado para un gran rango de valores de parámetros³ (ver Figura 9). Adicionalmente observamos que, en función del valor de concentración inicial de la célula, las oscilaciones se concentran en torno a dos trayectorias a las que nos referiremos como atractores.

¹Hay una región en (1) con valores negativos debido a que la solución para ese conjunto de valores de (a, b) no es accesible numéricamente.

²Se hicieron simulaciones aumentando el rango de valores de CI hasta $[0, 50]$ y seguimos observando la presencia de los dos atractores, aunque en este caso las curvas presentaban cierta dispersión en fase.

³En el Apéndice B.1 se indican los valores de los parámetros del modelo con los que se han realizado las simulaciones, así como los rangos de valores de los parámetros para los cuales se observan oscilaciones sostenidas.

4.1. Dinámica del sistema. Emergencia del ciclo límite

En la Figura 9 vemos que para valores de concentración inicial ~ 0.2 se tarda un mayor tiempo de simulación en converger a uno de los atractores. Esta fenomenología sugiere que hay un valor de concentración inicial x^* para el cual la solución no es oscilatoria sino constante, es decir; el sistema presenta un punto fijo. Además, a qué atractor converge la solución depende únicamente de si la concentración inicial de la célula en cuestión es mayor o menor que x^* , tal y como se puede ver en la Figura 10a.

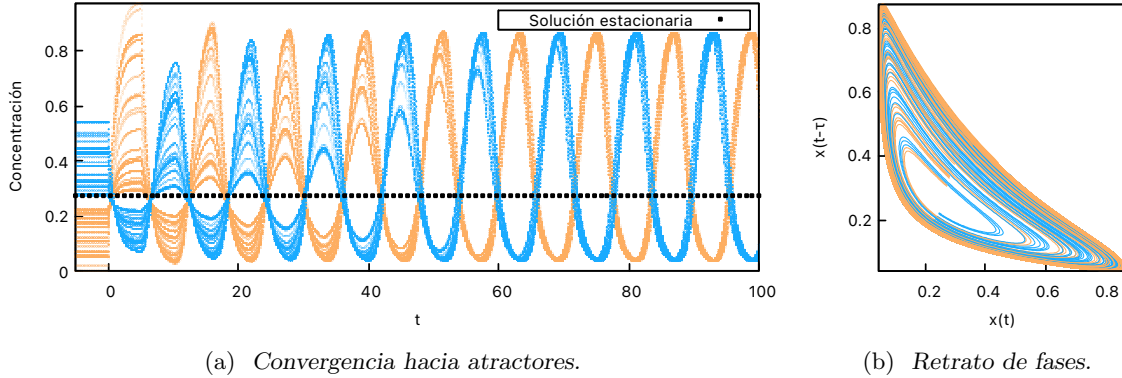


Figura 10

Si representamos el retrato de fases asociado a la Figura 10a observamos la presencia de un único ciclo límite al que convergen todas las trayectorias independientemente de las condiciones iniciales. A raíz de estas observaciones nos proponemos buscar dicho valor de concentración estacionaria y realizar un estudio de la estabilidad del punto fijo (ver Subsección 3.1).

4.1.1. Búsqueda de la solución estacionaria

El valor de concentración inicial para el cual no hay oscilaciones satisface que $\dot{x} = 0$ o equivalentemente $x(t) = x(t - \tau) = x^*$ por lo que, sustituyendo en la ecuación (2), buscamos hallar los ceros de

$$g(x^*) := \frac{\alpha}{1 + (x^*/K)^\beta} - \frac{Vx^*}{K_m + x^*} - \gamma x^* = 0 \quad (9)$$

En este caso buscamos únicamente soluciones reales no negativas (dado x representa concentraciones), por lo que se puede utilizar el método de Newton-Raphson mencionado en la Subsección 3.2 reducido a una dimensión,

$$x_{n+1} = x_n - \frac{g(x_n)}{g'(x_n)} \quad \text{donde} \quad g'(x^*) = -\frac{\alpha\beta(x^*/K)^\beta}{x^*(1 + (x^*/K)^\beta)^2} - \frac{VK_m}{(K_m + x^*)^2} - \gamma$$

La línea negra discontinua en la Figura 10a se corresponde con la solución numérica estacionaria, $x^* = 0.254$.

4.1.2. Estabilidad de la solución estacionaria

De acuerdo con la Figura 10a, el punto fijo x^* tiene carácter inestable, ya que cualquier trayectoria (independientemente de lo próxima que sea la concentración inicial al valor estaciona-

rio) acaba convergiendo hacia uno de los atractores para tiempos de simulación suficientemente grandes. Para comprobar esto buscamos las raíces de la siguiente ecuación característica

$$\lambda + \frac{\alpha\beta(x^*/K)^\beta}{x^*(1+(x^*/K)^\beta)^2} e^{-\lambda\tau} + \frac{VK_m}{(K_m+x^*)^2} + \gamma = 0 \quad (10)$$

Esta ecuación característica es análoga a la ecuación (6) correspondiente al caso escalar si identificamos los coeficientes a y b de la siguiente manera:

$$b \equiv -\frac{\alpha\beta(x^*/K)^\beta}{x^*(1+(x^*/K)^\beta)^2} \quad a \equiv -\frac{VK_m}{(K_m+x^*)^2} - \gamma$$

ya que x^* es una constante conocida (hallada con el método de Newton descrito anteriormente).

En la simulación de la Figura 10 las **raíces dominantes** de la ecuación característica son $\lambda = 0.13 \pm i0.54$, lo que concuerda con que el punto fijo $x^* = 0.254$ tiene carácter inestable ya que $\text{Re}\{\lambda\} > 0$. Además, la presencia de un ciclo límite estable y el hecho de que los autovalores dominantes de la ecuación característica sean complejos conjugados sugiere la presencia de una **bifurcación de Hopf** tras la cual el punto fijo x^* pasa de ser estable a inestable (este cambio en la estabilidad tiene lugar cuando la parte real de los autovalores dominantes pasa de ser negativa a positiva).

4.1.3. Bifurcación de Hopf mediada por el retardo

Para hallar los valores umbrales de los parámetros del sistema que garantizan la emergencia de la solución oscilatoria imponemos la condición $\text{Re}\{\lambda\} = 0$ i.e., $\lambda = \pm i\omega$, con $\omega \in \mathbb{R}$. De esta forma, desarrollando la ecuación característica llegamos al siguiente sistema de ecuaciones

$$(10) \implies \pm i\omega - be^{\mp i\omega\tau} - a = 0 \implies \begin{cases} a + \cos\omega\tau = 0 \\ \omega - b\sin\omega\tau = 0 \end{cases}$$

donde los coeficientes a, b dependen de los parámetros del sistema. Estas ecuaciones proporcionan la relación existente entre todos los parámetros del modelo para dar lugar a la bifurcación. Decidimos escoger el retardo como parámetro de bifurcación en base a resultados de trabajos previos [21], [22], [23] para modelos de con DDEs equivalentes al nuestro.

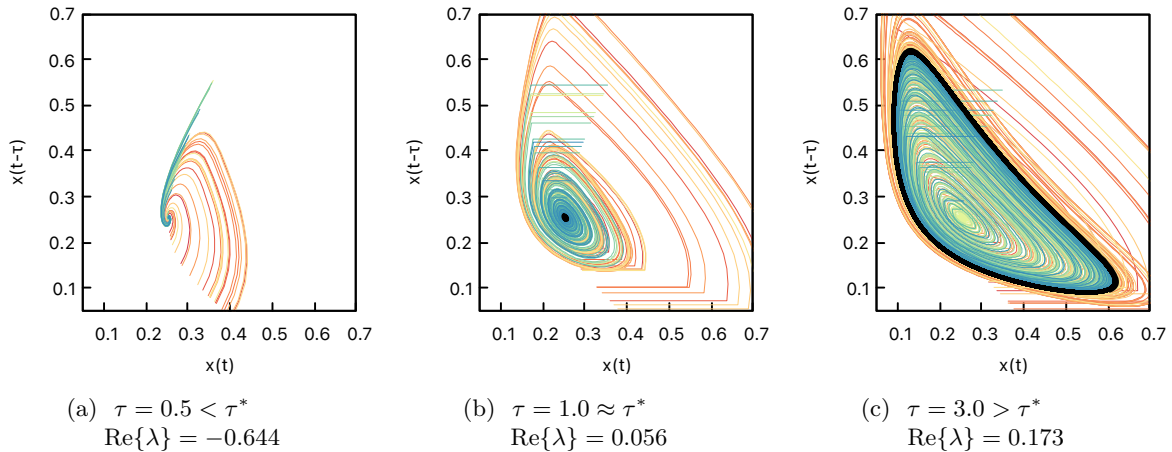


Figura 11: Emergencia de ciclo límite en el retrato de fases en función del retardo.

Se observa que por debajo de cierto τ^* , el sistema presenta oscilaciones amortiguadas que convergen a x^* constante. En este caso, el punto fijo es estable. En la Figura 11 observamos que al modificar el valor del retardo, el retrato de fases pasa de ser una espiral estable que converge al valor x^* (Figura 11a) a ser un ciclo límite (línea negra en la Figura 11c). Para hallar el valor de τ crítico a partir del cual cambia la estabilidad de x^* basta con buscar para qué valor τ^* las raíces λ complejas conjugadas de la ecuación característica satisfacen $\text{Re}\{\lambda\} = 0$. Este valor se corresponde con $\tau^* \approx 0.89$, para el cual $\lambda = -0.004 \pm i2.243$. No obstante, tal y como se observa en la Figura 11b, la amplitud de las oscilaciones es muy pequeña para valores de retardo muy próximos a τ^* .

4.2. Dependencia de la frecuencia de oscilación con el retardo

Una buena forma de caracterizar el modelo del oscilador es estudiar la dependencia de la frecuencia de las oscilaciones con los distintos parámetros del modelo. Para ello se define la frecuencia de oscilación ν como el número de ciclos completados por unidad de tiempo y se calcula promediando sobre N osciladores.

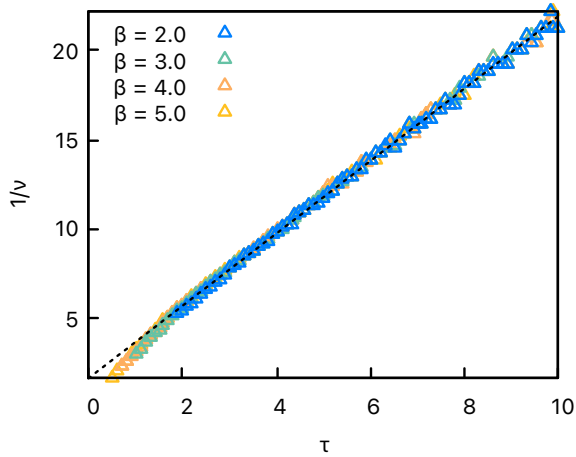


Figura 12: Inversa de ν en función de τ .

Para el valor de retardo estándar $\tau = 3$ se tiene $\nu = 0.13$ e $\text{Im}\{\lambda\} = 0.84 \approx 2\pi\nu$.

En el Apéndice B.3 se estudia la dependencia de ν con los demás parámetros de la ecuación.

Si bien la frecuencia de oscilación para un valor de retardo es independiente del exponente de Hill, el valor de τ umbral por debajo del cual no hay soluciones oscilatorias está fuertemente influenciado por β : conforme aumenta el índice de cooperatividad del modelo, menor es el valor de retardo mínimo requerido para alcanzar oscilaciones estables [24].

Observación: Recordemos que las soluciones oscilatorias para retardos próximos al τ^* hallado según el método descrito en la Subsubsección 4.1.3 tienen una amplitud de oscilación muy pequeña, por lo que en la Figura 13 se ha estimado el τ umbral como aquel retardo a partir del cual la amplitud A de las oscilaciones satisface $A > 0.05$.

Si representamos ν en función de τ manteniendo constantes los demás parámetros del sistema, observamos que ν es inversamente proporcional a τ . Esta constante de proporcionalidad entre $1/\nu$ y τ es independiente de β , por lo que la frecuencia de oscilación es constante para cada retardo independientemente del valor del exponente de Hill del oscilador.

Adicionalmente, comprobamos que la frecuencia de oscilación satisface la siguiente relación con la parte imaginaria del autovalor dominante: $\text{Im}\{\lambda\} \approx 2\pi \cdot \nu$.

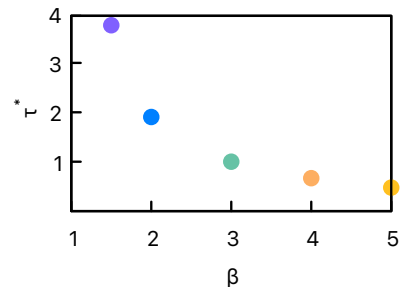


Figura 13: τ umbral en función de β .

5. Sincronización entre dos células

Una vez hemos caracterizado cada oscilador individual queremos observar la sincronización que surge al introducir interacciones entre ellos. Antes de estudiar la dinámica de una población de muchas células, nos proponemos estudiar el caso trivial de tener únicamente dos agentes que interactúan entre sí. En la literatura se proponen varios mecanismos de acoplo intercelular, y en este trabajo implementaremos uno de los modelos que, a pesar de su sencillez, presenta un comportamiento dinámico muy interesante.

5.1. Planteamiento teórico del modelo de interacción

El acoplamiento en términos moleculares tiene lugar porque los genes *Her* del pez cebra son dianas transcripcionales de la señalización Notch (aunque no dependen de Notch) y los genes que codifican los ligandos Delta son reprimidos por los mismos factores que controlan el bucle de retroalimentación del oscilador unicelular. Este cambio de fase local puede reproducirse utilizando un modelo matemático del bucle de retroalimentación *Her* que describe una cadena de células acopladas a través de la señalización Delta-Notch [25].

1. El gen *Delta* se transcribe en ARN-m.
2. El ARN-m se traduce y la proteína sufre modificaciones postraduccionales (*) antes de convertirse en un ligando activo para los receptores Notch de la célula vecina.
3. Tras la unión del ligando/receptor, el dominio intracelular Notch (NICD) se escinde del receptor Notch de la célula vecina y se transloca al núcleo, donde regula positivamente la transcripción de genes cíclicos, como los genes *Her/Hes* (en el caso particular del pez cebra, los genes *Her1/Her7* de esta familia son especialmente importantes).

Toda esta serie de procesos se resume en la Figura 14, donde los detalles del bucle de retroalimentación del oscilador unicelular (Figura 5) están atenuados para resaltar el mecanismo de acoplamiento.

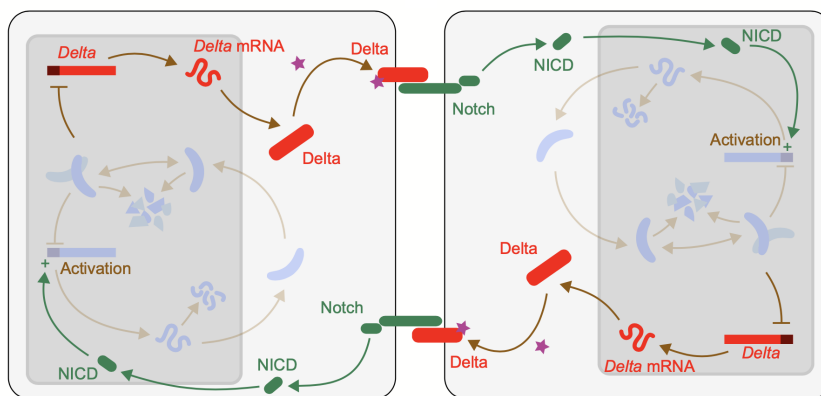
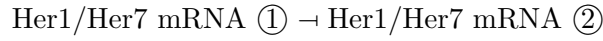


Figura 14: Circuito genético para la sincronización local en el reloj de segmentación [1].

Algunos trabajos han optado por modelizar la interacción acoplando osciladores vecinos representando la concentración del ligando Delta explícitamente [8], mientras que otros modelos reducen todos los procesos intermedios de la Figura 14

$$\text{Her1/Her7 mRNA } \textcircled{1} \rightarrow \text{Her1/Her7 } \textcircled{1} \rightarrow \text{Delta mRNA } \textcircled{1} \rightarrow \text{Delta } \textcircled{1} \rightarrow \text{Notch } \textcircled{2} \rightarrow \text{Her1/Her7 mRNA } \textcircled{2}$$

a un proceso equivalente en el que los genes Her/Hes de una célula inhiben los de su vecina con cierto retardo efectivo τ_c asociado a la autorrepresión del Her/Hes en la célula vecina [26], [27]; tal y como se ilustra en rosa y azul en la Figura 15.



De esta manera, la presencia de interacción Delta-Notch está implícita en la aparición de un nuevo retardo en el modelo pero no necesitamos incluir la dinámica de especies intermedias.

En [27] se propone representar la interacción entre células introduciendo un término de acoplo en la ecuación (2) del oscilador unicelular.

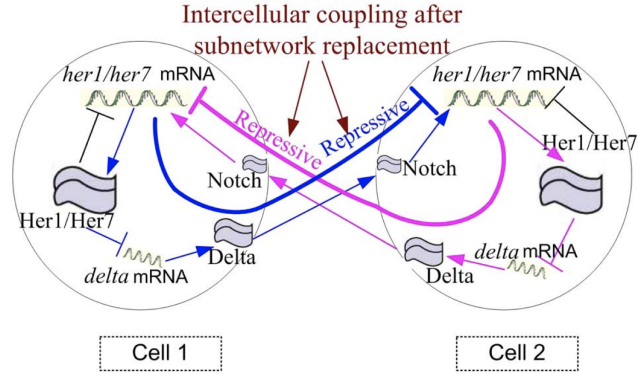


Figura 15: Circuito genético de acoplo equivalente [26].

$$\dot{x} = \frac{\alpha}{1 + (x(t - \tau)/K)^\beta} \left[(1 - \varepsilon) + \varepsilon \frac{1/K_c}{1 + (x_{ext}(t - \tau_c)/K_c)^{\beta_c}} \right] - \frac{Vx}{K_m + x} - \gamma x \quad (11)$$

El acoplamiento a través de la inhibición mutua se modela con una función de Hill represora que depende de la concentración promedio de las células vecinas x_{ext} . El parámetro $\varepsilon \in [0, 1]$ regula la intensidad de acoplamiento y como ya se ha mencionado, τ_c es un retardo que resume todos los retardos asociados con la expresión de Her/Hes, haciendo el modelo más abstracto pero más sencillo de estudiar.

En primer lugar, estudiaremos la dinámica de dos células con retardos⁴ τ_1, τ_2 cuya interacción viene mediada por un retardo τ_c . Manteniendo estos retardos fijos observamos que en ausencia de acoplamiento (Figura 16a) cada célula oscila con una frecuencia diferente, ya que los retardos τ_1 y τ_2 son distintos y por tanto ν_1 y ν_2 también lo serán (Figura 12). Cuando el acoplamiento es máximo, ambos osciladores alcanzan sincronización en frecuencias (Figura 16b).

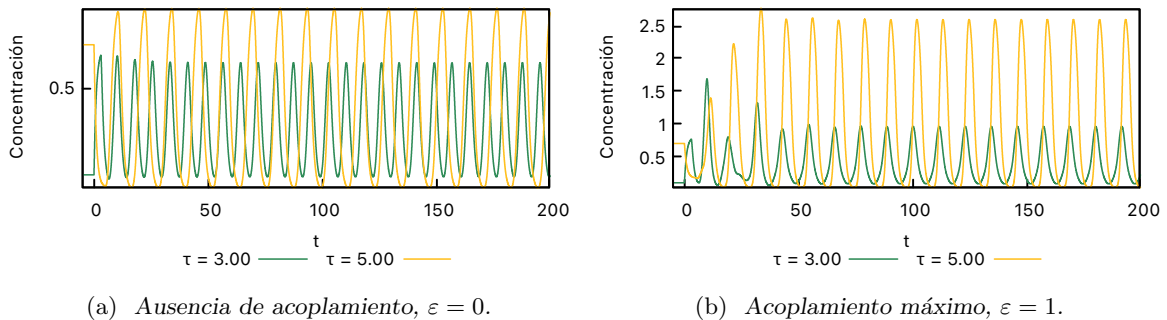


Figura 16: Simulación de la ecuación (11) para dos células con $\tau_1 = 3.00, \tau_2 = 5.00, \tau_c = 5.00$.

En la Figura 16 se muestran dos situaciones límite en cuanto al acoplamiento, pero para cuantificar de manera rigurosa el grado de sincronización en situaciones intermedias es necesario definir un parámetro de orden para el modelo.

⁴En principio estos retardos pueden ser diferentes ya que están asociados a procesos celulares (transcripción, traducción, transporte) cuya duración pueden variar para distintas células.

5.2. Medida de la sincronización. Parámetros de orden

Necesitamos definir un parámetro orden normalizado R que mida el grado de sincronización, por lo que nos gustaría que $R = 0$ en ausencia de sincronización y que $R = 1$ cuando haya sincronización total. No obstante, debido al comportamiento dinámico tan interesante que presentan los osciladores individuales, veremos que encontrar un parámetro de orden que cumpla estas características no es tan sencillo como puede parecer. Por este motivo trabajaremos con dos parámetros de orden que cuantifican el grado de sincronización desde dos enfoques duales: la series temporales de las concentraciones y sus espectros de frecuencias asociados.

5.2.1. Parámetro de orden basado en series temporales

Un parámetro de orden válido basado en promedios temporales es el propuesto en [28],

$$R = \frac{\langle M(t)^2 \rangle - \langle M(t) \rangle^2}{\langle x_i(t)^2 \rangle - \langle x_i(t) \rangle^2} \quad \text{donde} \quad M(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N x_i(t) \equiv \overline{x_i(t)} \quad (12)$$

Para un sistema con N agentes, R se corresponde con el cociente entre la desviación estándar de la concentración promedio $M(t)$ y la desviación estándar de cada concentración promediada sobre las células. Por este motivo, en ausencia total de sincronización R toma valor nulo ya que para N suficientemente grande $M(t) \approx 0$. Del mismo modo, si la concentración de todas las células oscila aproximadamente en fase, $x_i(t) \approx M(t)$ para todas las células y por tanto R será aproximadamente uno.

Es conveniente hacer una estimación de los valores que toma R en ausencia de sincronización para valorar cómo se ve reflejada la convergencia de las soluciones a los dos atractores del sistema. Para ello calculamos R promediado sobre $N = 60$ y un tiempo de simulación $t = 600$ (manteniendo el valor estándar de los parámetros y asignando el mismo retardo intercelular a todos los osciladores individuales) en los siguientes casos

$$\begin{cases} CI \in [0.00, 0.20] & (\text{por debajo de } x^*) \implies R \approx 0.979 \\ CI \in [0.25, 0.45] & (\text{por encima de } x^*) \implies R \approx 0.990 \\ CI \in [0.00, 0.50] & (\text{"mitad y mitad" respecto a } x^*) \implies R \approx 0.032 \end{cases}$$

Las estimaciones de R se corresponden con lo que esperábamos obtener: en los dos primeros casos, todas las trayectorias acaban convergiendo a una misma curva y el parámetro de orden es próximo a la unidad (ya que las concentraciones de todas las células oscilan en fase). Por otro lado, si asignamos a la mitad de las células valores aleatorios de concentración inicial (CI) por debajo de x^* y a la otra mitad valores superiores a x^* , el parámetro de orden es próximo a cero pero tiene cierto valor residual correspondiente a que las dos curvas no son perfectamente simétricas a pesar de que estén completamente desfasadas.

5.2.2. Parámetro de orden basado en series de frecuencia

El parámetro de orden anterior presenta algunas limitaciones que hacen necesaria la introducción de un segundo parámetro de orden \bar{R} para complementar el estudio de la sincronización.

- Para simulaciones como las de la Figura 16a en las que hay ausencia total de sincronización, el parámetro de orden toma valores $R \sim 0.5$.
- Para simulaciones como las de la Figura 17 en las que la interacción es máxima y se observa sincronización pero hay cierta “irregularidad” en las oscilaciones, el parámetro de orden es $R \sim 0.6$. Este tipo de dinámica se discutirá en la Subsección 5.3.

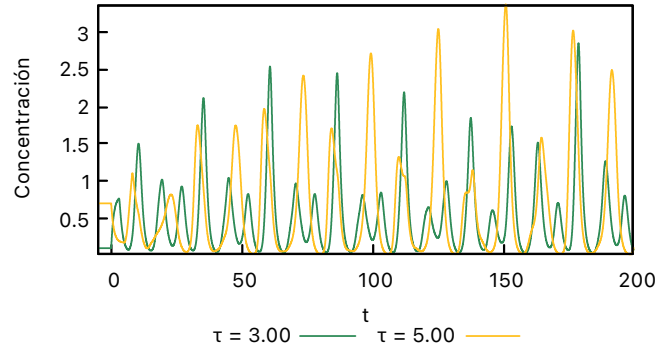


Figura 17: Sincronización con $\tau_c = 8.00$.

Es más, observamos que el valor de R correspondiente a osciladores desacoplados que oscilan con frecuencias diferentes es mucho mayor que el valor que toma R cuando todos los osciladores oscilan con la misma frecuencia pero están repartidos en los dos atractores.

Estas observaciones nos indican que medir el grado de sincronización únicamente con la información proporcionada por la evolución temporal es insuficiente, ya que **la frecuencia con la que oscila cada célula aporta información muy valiosa acerca de la dinámica del sistema**. Por ello, definimos el nuevo parámetro de orden \bar{R} de la siguiente manera:

1. Calculamos el espectro en frecuencias de la evolución de la concentración de cada célula i y la almacenamos como un vector de n componentes donde la componente k -ésima es $A_i^k := A_i(\omega_k)$. Para hacer este cálculo hemos implementado numéricamente la transformada de Fourier discreta de una serie temporal usando el algoritmo de Cooley-Tukey [29].
2. \bar{R} se corresponde con el coseno del ángulo que forman los dos vectores, i.e., el producto escalar de los A_i dividido por el módulo de ambos vectores, luego \bar{R} está normalizado.

$$\bar{R} = \frac{1}{\|A_1\| \|A_2\|} \sum_{k=1}^n A_1^k \cdot A_2^k$$

5.3. Influencia del retardo intercelular τ_c en la sincronización

En la sección anterior se ha mencionado la existencia de estados sincronizados “irregulares” como los de la Figura 17. Estos estados aparecen cuando partimos de una situación de sincronización regular como la de la Figura 16b y vamos aumentando el retardo intercelular, tal y como se muestra en la Figura 18.

Observamos que para intensidad de interacción máxima, el aumento de τ_c tiene el efecto de retrasar el momento de sincronización. Por encima de cierto valor crítico τ_c^* , la dinámica de las células individuales es demasiado rápida en comparación con la dinámica de la sincronización y no se consigue alcanzar un estado “estable”. Conforme aumentamos el valor de τ_c , observamos cómo aparentemente se va perdiendo la regularidad en las trayectorias, a pesar de que sigamos teniendo oscilaciones sostenidas en el tiempo.

A raíz de lo anterior, podemos concluir que el estado de sincronización de las células depende tanto de la intensidad de interacción (Figura 16) como del retardo intercelular (Figura 18). Si representamos en un diagrama de fases el parámetro de orden R para una colección de valores (τ_c, ε) , observamos los sorprendentes resultados que se muestran en la Figura 19.

Adicionalmente, en el Apéndice C se profundiza en el estudio de R analizando la influencia de la disparidad entre los τ_i en el valor de R alcanzado y se concluye que **el nivel de sincronización del sistema es sensible a la diferencia entre los retardos intracelulares**, siendo la sincronización máxima cuando los retardos τ_1, τ_2 y τ_c son aproximadamente iguales.

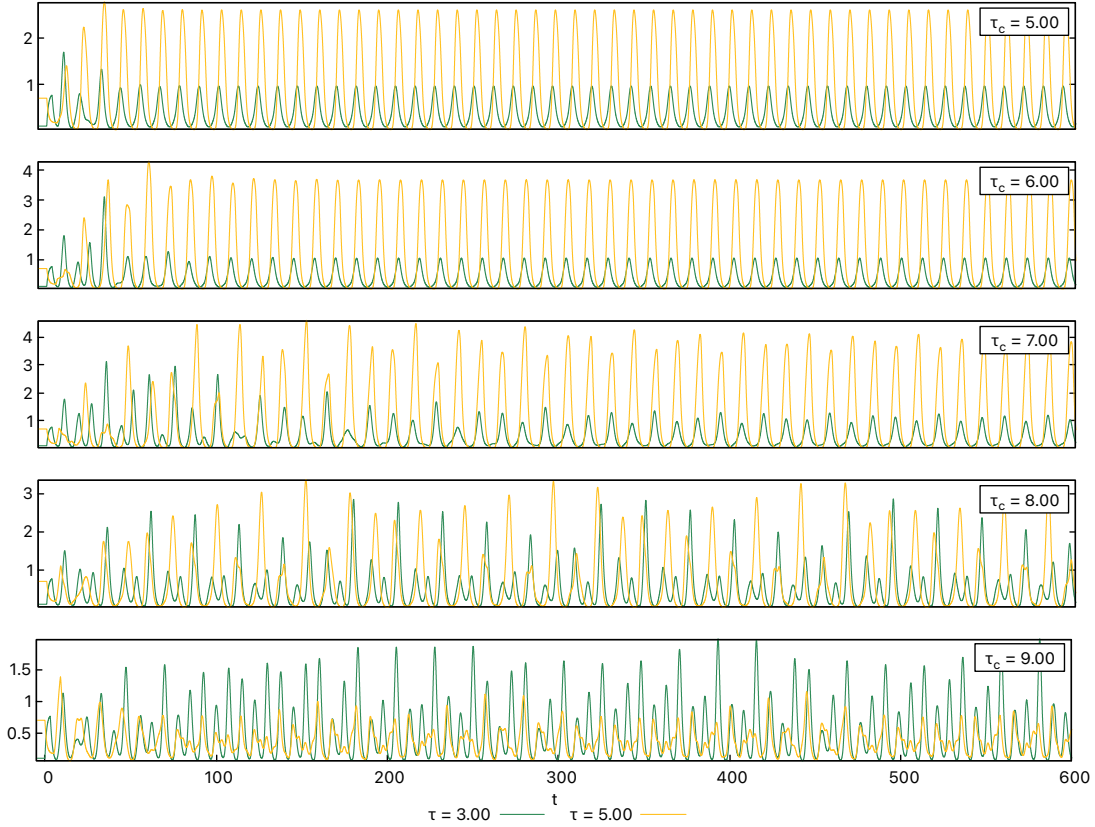


Figura 18: Pérdida de regularidad en la sincronización con el aumento del retardo intercelular.

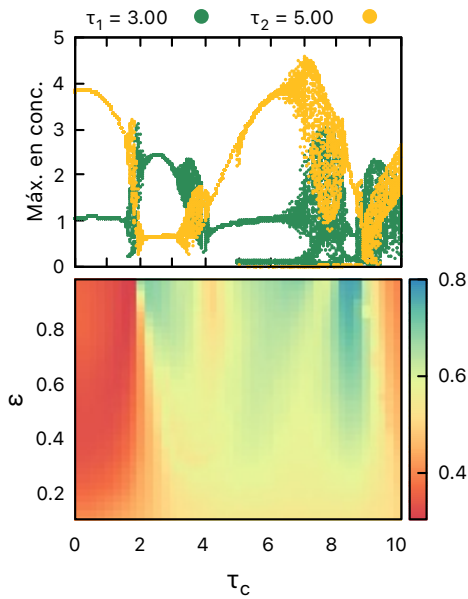


Figura 19: Máximos en las series de concentración según τ_c (arriba) y R según (τ_c, ε) (abajo).

En primer lugar, existe un valor umbral de τ_c intercelular por debajo del cual la sincronización de las células es baja, independientemente de la intensidad de interacción. Esto podría deberse a que no es verosímil que el τ_c sea menor que el τ_i de cada célula individual, ya que en esta simulación $\tau_1 = 3, \tau_2 = 5$ y el τ_c a partir del cual la sincronización aumenta es $\tau_c \approx 3$, una observación que se menciona en [27].

Para valores moderados de intensidad de interacción ($\varepsilon < 0.4$), el parámetro de orden es robusto ante modificaciones de τ_c . No obstante, conforme aumenta la intensidad de interacción (siendo el caso límite $\varepsilon = 1.0$) R presenta una fuerte dependencia con τ_c , que además no es monótona, ya que existe un entorno de valores de $\tau_c \approx (4, 5)$ para los cuales parece que aumentar la intensidad de interacción ε hace que disminuya el valor del parámetro de orden, algo que resulta aparentemente contraintuitivo. Además, la dinámica

de los dos osciladores es “irregular” en esos casos (recordar la Figura 17).

Para intentar comprender qué es lo que sucede en este rango de valores de τ_c representamos también los máximos en las series temporales de la concentración de cada una de las células para simulaciones en las que la intensidad de interacción es máxima ($\varepsilon = 1.0$), obteniendo la evolución con τ_c que se muestra en la parte superior de la Figura 19. Esto nos proporciona la siguiente información adicional sobre la dinámica del sistema:

- Para valores pequeños de τ_c , las señales son muy regulares (presentan un único máximo).
- Este comportamiento se ve interrumpido para $\tau_c \approx 2$ y $\tau_c \approx 4$, donde observamos una nube de puntos que indica que la señal pierde el carácter regular. En estas regiones observamos también cómo el parámetro de orden R disminuye.
- Cuando $\tau_c \approx 5$ se produce una duplicación de los máximos en las concentraciones de cada especie, aunque estos nuevos máximos toman valores muy pequeños.
- Para $\tau_c \approx (7, 8)$ observamos de nuevo una nube de puntos que indica nuevamente una dinámica irregular, así como una disminución en el valor de R .

Estas observaciones parecen indicar que estamos ante un caso de **caos determinista**, ya que partiendo de ecuaciones deterministas simples hemos obtenido soluciones aparentemente caóticas (puesto que son trayectorias irregulares muy sensibles a las condiciones iniciales).

En conclusión, el estudio tanto de R como de los máximos en las concentraciones confirman la emergencia de dinámicas sincronizadas pero irregulares para determinados intervalos de valores de τ_c . La evolución de las concentraciones recupera brevemente el carácter “regular” para volver a presentar múltiples máximos poco después, y así sucesivamente.

De hecho, si estudiamos la dinámica del sistema para un mayor rango de valores del retardo intercelular fijando $\varepsilon = 1.0$, observamos que R sigue una dependencia cíclica con τ_c : aparecen “ventanas de τ_c ” en las cuales R es estable y o bien hay sincronización ($R \sim 0.6$) o bien hay sincronización con cierto desfase ($R \sim 0.3$), tal y como se ve en la Figura 20, junto con una representación de la evolución temporal en el estacionario de cada una de las dos situaciones.

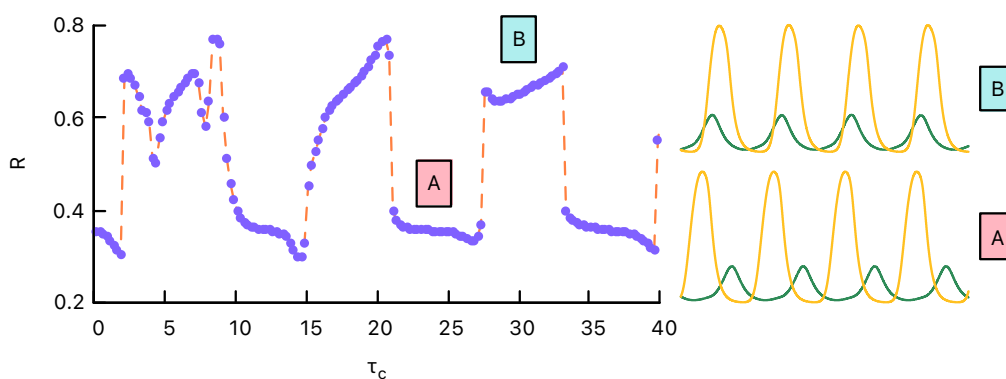


Figura 20: Evolución de R con τ_c para $\tau_1 = 3.0, \tau_2 = 5.0$.

A partir de cierto valor transitorio $\tau_c \approx 10$ por debajo del cual podemos observar dinámicas irregulares, las oscilaciones son regulares y tienen una frecuencia definida. Esta frecuencia es $\nu \approx 0.12$, similar a la frecuencia con la que oscilarían ambas células en ausencia de acoplo, y toma siempre valores similares independientemente del valor de τ_c de la simulación, es decir; **el retardo intercelular determina si los osciladores se sincronizan o no pero no influye en la frecuencia con la que oscilan las células acopladas.**

Este fenómeno se sigue observando al modificar los retardos de cada oscilador y es más pronunciado cuanto más próximos son τ_1 y τ_2 , llegando a darse situaciones intermitentes en las que R oscila entre $R \sim 0.1$ y $R \sim 1.0$, tal y como se muestra en el Apéndice C.

Finalmente, para completar el estudio de cómo se ve afectada la sincronización con el aumento del *delay* intercelular, representamos en la Figura 21 el equivalente a la Figura 18 en el espectro de frecuencias⁵. En primer lugar, recordemos que estas las simulaciones están realizadas tomando $\varepsilon = 1.0$, y que partimos de una situación en la que hay sincronización. Esto se aprecia claramente para $\tau_c = 5.00$, puesto que los espectros de ambas especies presentan máximos claros y coincidentes. Al estudiar la Figura 18 nos surgía la duda de si los estados asociados a retardos intercelulares elevados estaban realmente sincronizados. En la Figura 21 se aprecia que sí, dado que las frecuencias que presentan máximo en la contribución son coincidentes para las dos especies. Por otro lado, observamos que el aumento de τ_c conlleva un aumento en el número de frecuencias cuya contribución es relevante en la serie temporal, así como un menor distanciamiento entre los máximos. También se observa que los máximos se distinguen con menor facilidad respecto del fondo, todo ello asociado a que la señal pierde regularidad progresivamente.

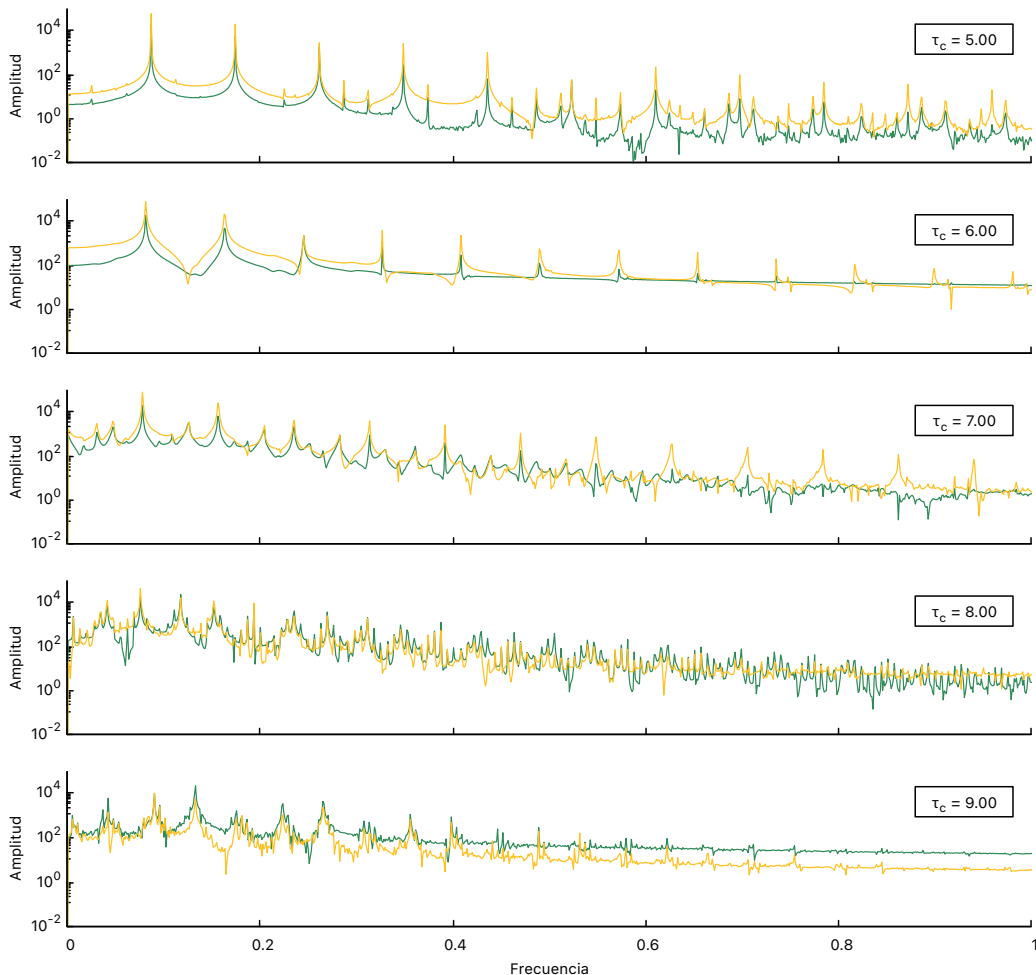


Figura 21: *Espectro de frecuencias asociado a las trayectorias de la Figura 18.*

⁵El espectro está normalizado ya que se han dividido los valores de frecuencias por la frecuencia máxima. Esta frecuencia se corresponde con la mitad de la frecuencia de muestreo de la FFT (Teorema de Nyquist).

Tal y como se definía en la Subsección 5.2, el parámetro de orden \bar{R} representa la disparidad que hay en el espectro de frecuencias de las dos series temporales⁶.

$$\begin{aligned}\tau_c = 5.0 &\implies \bar{R} = 0.998 \\ \tau_c = 6.0 &\implies \bar{R} = 0.995 \\ \tau_c = 7.0 &\implies \bar{R} = 0.965 \\ \tau_c = 8.0 &\implies \bar{R} = 0.867 \\ \tau_c = 9.0 &\implies \bar{R} = 0.826\end{aligned}$$

Para los espectros de la Figura 21, observamos que \bar{R} decrece con el aumento de τ_c , a pesar de que conserve un valor relativamente elevado. Concluimos por tanto que esta definición de parámetro de orden consigue capturar la sincronización que tiene lugar: las oscilaciones siguen estando sincronizadas pero cada vez son más irregulares.

6. Sincronización de un tejido multicelular

Después de haber caracterizado a fondo la sincronización de dos células, procedemos a estudiar la evolución de una población celular extensa. En las simulaciones hemos modelado un **tejido bidimensional con estructura de red hexagonal** con condiciones de contorno periódicas. Si bien esto es una simplificación de la realidad, ya que los tejidos celulares no presentan una estructura espacial tan regular, muchos modelos computacionales implementan en primera instancia una red hexagonal por ser la estructura bidimensional más compacta. La dinámica de cada célula viene de nuevo dada por la ecuación (11), en la que en este caso x_{ext} se calcula promediando las concentraciones de las seis células vecinas. Representando la evolución del sistema, observamos que se alcanzan oscilaciones sincronizadas a nivel global incluso para tamaños de red relativamente grandes (~ 1000 células).

En primer lugar, simulamos la dinámica de una red 30×30 (de 30 células de longitud) para la cual no hay dispersión en los retardos de cada oscilador, $\tau_i = 3.0$ y donde el retardo intercelular es también $\tau_c = 3.0$. Según los resultados vistos para de dos células en la Subsección 5.3, esta se correspondería con la situación más favorable para la sincronización.

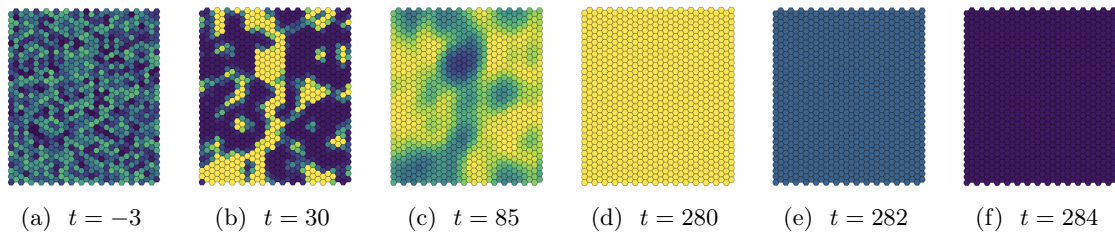


Figura 22: Sincronización de una red 30×30 para la que $\tau_i = 3.0, \tau_c = 3.0$.

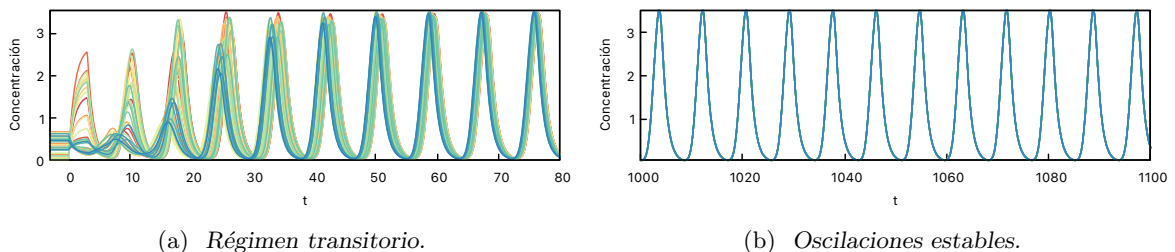


Figura 23: Evolución temporal de 40 células de una red 30×30 para la que $\tau_i = 3.0, \tau_c = 3.0$.

⁶Se debe hacer énfasis en esto, ya que de acuerdo con su definición \bar{R} no es capaz de capturar asincronía puramente temporal, por ejemplo: dos señales armónicas puras de la misma frecuencia y en contrafase corresponden a un $\bar{R} = 0$. Es por ello que para realizar un buen estudio de la sincronización del sistema debemos tener en cuenta ambos parámetros de orden.

Vemos cómo partiendo de condiciones iniciales aleatorias $x_i \in [0, 1]$ para cada célula, se forman dominios sincronizados en la Figura 22b cuyas fronteras se van suavizando (Figura 22c) hasta convertirse en una única región.

Tras un transitorio de duración ~ 70 u.a., las oscilaciones de todas células se sincronizan por completo. De hecho, en el transcurso de un semiperíodo de oscilación (instantes (d)-(f) en la Figura 22) observamos que la transición del estado de concentración mínima al de concentración máxima es también uniforme para todas las células. Los mínimos y máximos en la concentración para la Figura 22 se corresponden con el color azul oscuro y amarillo, respectivamente.

La simulación anterior se ha hecho con un retardo intercelular igual al retardo de cada oscilador, pero ya hemos mencionado que en la literatura se proponen valores de τ_c mayores⁷ que τ_i [27], por lo que exploramos la dinámica del tejido para valores mayores de τ_c . Además, permitiremos que los retardos intercelulares presenten cierta dispersión, con el fin de dotar de heterogeneidad a la red.

Si estudiamos la sincronización en términos de R observamos el mismo comportamiento de R con τ_c que para el caso de dos células: aparecen intervalos de valores de τ_c en los que hay sincronización elevada **B** que se alternan con intervalos en los cuales el parámetro de orden es muy bajo **A** hasta, que por encima de cierto τ_c , las células siempre se sincronizan (ver Figura 24). No obstante, hay un cambio cualitativo importante respecto a la Figura 20 ya que en este caso se favorecen las ventanas de sincronización respecto a los estados asíncronos.

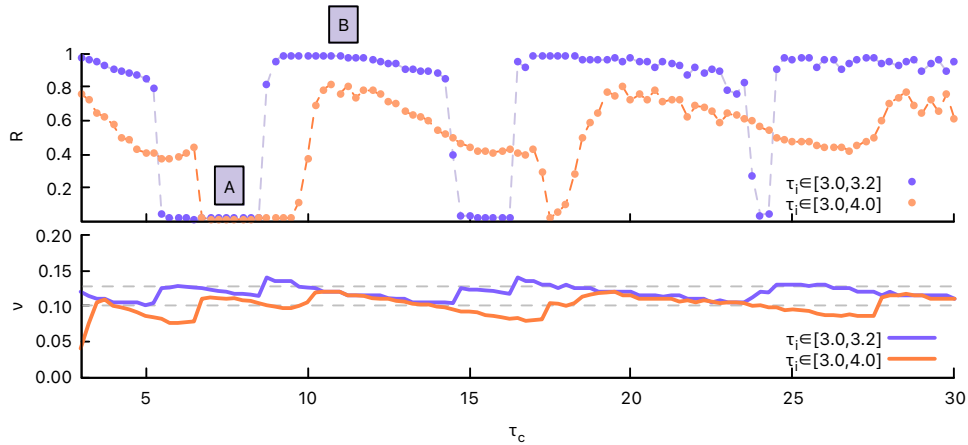


Figura 24: Dependencia de R y $\bar{\nu}$ con τ_c . Red 16×16 con distinto grado de dispersión en los τ_i . Las líneas discontinuas en la representación de $\bar{\nu}$ se corresponden con la frecuencia de oscilación de una célula con $\tau = 3$ y $\tau = 4$. Para hacer las simulaciones de esta figura se ha reducido el tamaño de la red por cuestiones de coste computacional.

Vemos que la evolución cíclica se aprecia sobre todo para las simulaciones con baja dispersión en los retardos intracelulares ($\tau_i \in [3.0, 3.2]$, en morado). Conforme aumentamos la dispersión en los τ_i más difícil es alcanzar el estado de sincronización (ya que las células oscilan inicialmente con frecuencias más dispares), lo que se traduce en que el valor de R máximo que se alcanza es menor. También observamos que la frecuencia promedio $\bar{\nu}$ mantiene un valor aproximadamente constante y aproximadamente igual a la frecuencia con la que oscilaría cada célula individualmente, independientemente de τ_c .

⁷De hecho, los valores que se proponen para τ_c llegan a ser cinco veces mayores que los τ_i 's de cada oscilador.

Finalmente, representamos la dinámica de las situaciones **A** y **B** para una red en la que $\tau_i \in [3.0, 4.0]$, ya que el estado sincronizado de la red con poca dispersión es el de la Figura 22.

Observamos que las trayectorias en **A** son totalmente asíncronas: cada célula oscila con una frecuencia y una amplitud diferente.

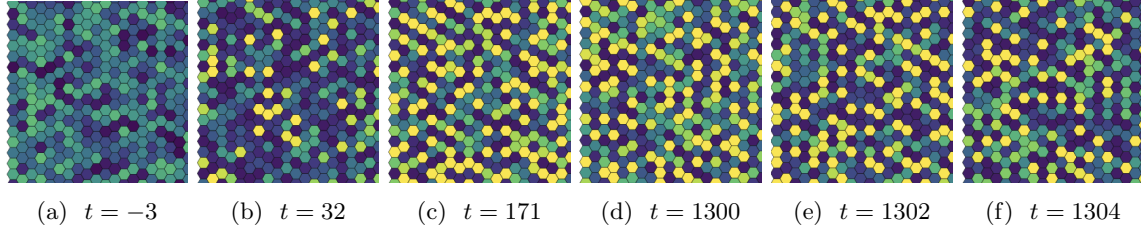
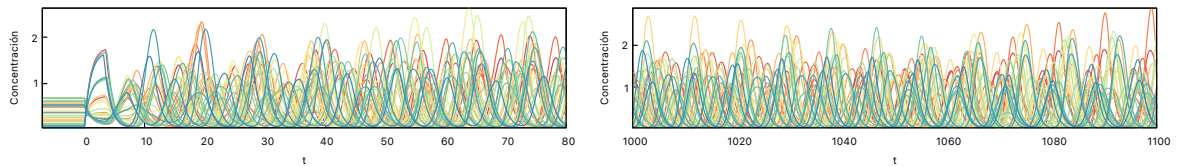


Figura 25: Sincronización de una red 20×20 para la que $\tau_i \in [3.0, 4.0]$, $\tau_c = 7.0$.



(a) Comienzo de la simulación.

(b) Ausencia de sincronización.

Figura 26: Evolución temporal de 40 células de una red 20×20 para la que $\tau_i \in [3.0, 4.0]$, $\tau_c = 7.0$.

Por otro lado, en las dinámicas de tipo **B** al haber introducido dispersión en los retardos de cada oscilador celular, aunque se alcanza sincronización con oscilaciones estables, la transición entre el mínimo (Figura 27d) y el máximo (Figura 27f) no es uniforme para todas las células (Figura 27e) y se llegan a formar dominios bastante diferenciados. La heterogeneidad en la transición se aprecia también en el estacionario de la Figura 28b en la que vemos que la curva de oscilaciones presenta cierta dispersión en las fases en comparación con la de la simulación de la Figura 23. Además, la sincronización alcanzada no es perfecta, ya que aunque haya oscilaciones del tejido, hay células cuya concentración nunca llega a alcanzar el valor máximo.

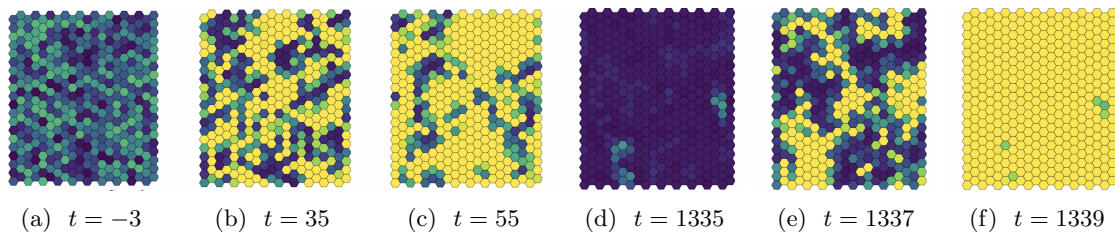
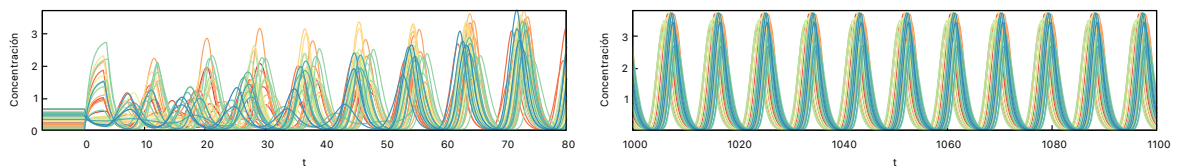


Figura 27: Sincronización de una red 20×20 para la que $\tau_i \in [3.0, 4.0]$, $\tau_c = 12.0$.



(a) Régimen transitorio.

(b) Oscilaciones estables.

Figura 28: Evolución temporal de 40 células de una red 20×20 para la que $\tau_i \in [3.0, 4.0]$, $\tau_c = 12.0$.

Por último, se debe comentar que esta dependencia del estado final de la red (sincronizado o no) con el valor de τ_c que observábamos por primera vez para dos células parece darse independientemente del tamaño de la red (al menos hasta redes de 30×30).

7. Conclusiones

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un modelo matemático del reloj de segmentación de la somitogénesis. Hemos simulado un conjunto de osciladores (o células) que, al interactuar entre sí, consiguen sincronizarse y oscilar en fase.

Para elaborar el modelo a nivel teórico nos hemos apoyado en resultados de investigaciones recientes, y hemos razonado y motivado el porqué de los distintos elementos que lo componían con ayuda de nuestros conocimientos de física biológica (Secciones 2.2 y 5.1). A nivel matemático hemos visto necesario trabajar con ecuaciones diferenciales con retardo, para lo que hemos adaptado la teoría conocida de sistemas dinámicos a este nuevo tipo de ecuaciones (Sección 3) y hemos desarrollado programas para resolverlas numéricamente. Para familiarizarnos con este tipo de ecuaciones, hemos comenzado por estudiar el comportamiento de los sistemas más sencillos.

Durante el estudio del oscilador individual hemos visto cómo una solución constante daba lugar a soluciones oscilatorias estables al aumentar el retardo del sistema. Para ello hemos caracterizado la estabilidad de las soluciones del sistema (Subsubsección 4.1.2) y hemos visto que el sistema experimentaba una bifurcación de Hopf mediada por el retardo τ (Subsubsección 4.1.3), todo ello usando la teoría de sistemas dinámicos. También hemos realizado un estudio de la dependencia de la frecuencia de oscilación con los principales parámetros del sistema y hemos comprobado que sus estimaciones numéricas coincidían con los valores teóricos esperados (Subsección 4.2).

Como paso previo a estudiar la dinámica de una población extensa, hemos caracterizado a fondo la sincronización entre dos células. Esto se ha hecho desarrollando dos parámetros de orden “duales”, uno en términos de series temporales y otro según los espectros de frecuencias asociados a estas, con el fin de distinguir los distintos estados sincronizados (Subsección 5.2). Al analizar la dinámica de los dos osciladores hemos encontrado resultados sorprendentes (Subsección 5.3): las células alcanzan varias situaciones finales de naturaleza muy distinta (sincronización regular o irregular o completa asincronía) en función del retardo intercelular τ_c . No obstante, el valor de τ_c no influye significativamente en la frecuencia con la que oscilan las células en los casos en los que hay sincronización.

Finalmente, en la Sección 6 hemos estudiado la evolución temporal de una población celular extensa. En un primer momento hemos observado oscilaciones sincronizadas a nivel global, y al introducir dispersión en los valores de retardo (para dotar de mayor riqueza dinámica al sistema) hemos visto que los resultados anteriores de la dinámica de dos células se aplicaban también a nuestra red con un gran cambio cualitativo, ya que en este caso se ven favorecidas las ventanas de τ_c para las que el sistema está sincronizado.

En conclusión, este trabajo ha logrado desarrollar un modelo matemático que consigue reproducir la sincronización de un conjunto de osciladores biológicos acoplados, aplicado en particular al reloj de segmentación de la somitogénesis. A través de un análisis detallado de la dinámica de los osciladores, hemos descubierto resultados sorprendentes sobre la sincronización y la gran influencia que los retardos entre las señales biológicas de las células en esta. Estos resultados abren la puerta a un estudio más detallado sobre la influencia de la arquitectura de los acoplos entre circuitos genéticos oscilantes en conjunción con los parámetros asociados a la dinámica que hemos desarrollado en este trabajo.

Referencias

- [1] A. C. Oates, L. G. Morelli y S. Ares. “Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock”. En: *Development* 139.4 (2012), págs. 625-639. ISSN: 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.063735.
- [2] O. F. Venzin y A. C. Oates. “What are you synching about? Emerging complexity of Notch signaling in the segmentation clock”. En: *Developmental Biology* 460.1 (2020), págs. 40-54. ISSN: 0012-1606. DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.06.024.
- [3] J. Negrete y A. C. Oates. “Towards a physical understanding of developmental patterning”. En: *Nature reviews. Genetics* 22.8 (2021), págs. 518-531. ISSN: 1471-0056. DOI: 10.1038/s41576-021-00355-7.
- [4] J. Cooke y E.C. Zeeman. “A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis”. En: *Journal of Theoretical Biology* 58.2 (1976), págs. 455-476. ISSN: 0022-5193. DOI: 10.1016/S0022-5193(76)80131-2.
- [5] A. Hubaud y O. Pourquié. “Signaling dynamics in vertebrate segmentation”. En: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (2014), págs. 709-21. DOI: 10.1038/nrm3891.
- [6] R. Phillips et al. *Physical Biology of the Cell (2nd ed.)* Garland Science., 2012, págs. 107, 932, 940-943. DOI: 10.1201/9781134111589.
- [7] Yun-Jin Jiang et al. “Notch signaling and the synchronization of the somite segmentation clock”. En: *Nature* 408 (2000), págs. 475-479. DOI: 10.1038/35044091.
- [8] J. Lewis. “Autoinhibition with Transcriptional Delay: A Simple Mechanism for the Zebrafish Somitogenesis Oscillator”. En: *Current Biology* 13.16 (2003), págs. 1398-1408. ISSN: 0960-9822. DOI: 10.1016/S0960-9822(03)00534-7.
- [9] M. J. F. Barresi y S. F. Gilbert. *Developmental biology*. Oxford University Press, 2004, págs. 413-415.
- [10] F. H. Crick. “On protein synthesis”. En: *Symposia of the Society for Experimental Biology XII: The Biological Replication of Macromolecules* (1958), págs. 138-163.
- [11] K. Sneppen. *Models of Life: Dynamics and Regulation in Biological Systems*. Cambridge University Press, 2014, pág. 37. DOI: 10.1017/CB09781107449442.
- [12] U. Alon. *An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits*. Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology. Taylor & Francis, 2006, Apéndice A. ISBN: 9781584886426.
- [13] Wikipedia. *Hill equation (biochemistry)* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Hill_equation_\(biochemistry\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Hill_equation_(biochemistry)). [Online; consultado a 04/08/2023].
- [14] A. Goldbeter y O. Pourquié. “Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the Notch, Wnt and FGF signaling pathways”. En: *Journal of Theoretical Biology* 252.3 (2008), págs. 574-585. ISSN: 0022-5193. DOI: 10.1016/j.jtbi.2008.01.006.
- [15] D. W. Jordan y P. Smith. *Nonlinear Ordinary Differential Equations (3rd ed.)* Oxford University Press, Inc., 1999, pág. 109. ISBN: 0198596561.
- [16] H. Hirata et al. “Oscillatory Expression of the bHLH Factor Hes1 Regulated by a Negative Feedback Loop”. En: *Science* 298.5594 (2002), págs. 840-843. DOI: 10.1126/science.1074560.
- [17] E. L. O’Brien, E. Van Itallie y M. R. Bennett. “Modeling synthetic gene oscillators”. En: *Mathematical Biosciences* 236.1 (2012), págs. 1-15. ISSN: 0025-5564. DOI: 10.1016/j.mbs.2012.01.001.
- [18] F. Rihan. *Delay Differential Equations and Applications to Biology*. Ago. de 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-0626-7.

- [19] D. Roose y R. Szalai. “Continuation and Bifurcation Analysis of Delay Differential Equations”. En: *Numerical Continuation Methods for Dynamical Systems: Path following and boundary value problems*. 2007, págs. 359-399. DOI: 10.1007/978-1-4020-6356-5_12.
- [20] H. Smith. “Delayed Negative Feedback: A Warm-Up”. En: *An Introduction to Delay Differential Equations with Applications to the Life Sciences*. Springer, 2011, págs. 13-24. DOI: 10.1007/978-1-4419-7646-8_2.
- [21] X. P. Wu y M. Eshete. “Bifurcation analysis for a model of gene expression with delays”. En: *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 16.2 (2011), págs. 1073-1088. ISSN: 1007-5704. DOI: 10.1016/j.cnsns.2010.05.010.
- [22] Y. Song, Y. Han y T. Zhang. “Stability and Hopf bifurcation in a model of gene expression with distributed time delays”. En: *Applied Mathematics and Computation* 243 (2014), págs. 398-412. ISSN: 0096-3003. DOI: 10.1016/j.amc.2014.05.122.
- [23] A. Verdugo y R. Rand. “Hopf bifurcation in a DDE model of gene expression”. En: *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 13.2 (2008), págs. 235-242. ISSN: 1007-5704. DOI: 10.1016/j.cnsns.2006.05.001.
- [24] R. Fernández Melic. “Biología de sistemas: circuitos genéticos oscilatorios y sincronización”. Trabajo de Fin de Grado. Departamento de Física de la Materia Condensada, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 2020.
- [25] Kazuki Horikawa et al. “Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock”. En: *Nature* 441 (2006), págs. 719-723. DOI: 10.1038/nature04861.
- [26] Y. Wang et al. “Intercellular Delay Regulates the Collective Period of Repressively Coupled Gene Regulatory Oscillator Networks”. En: *Automatic Control, IEEE Transactions on* 59 (2014), págs. 211-216. DOI: 10.1109/TAC.2013.2270072.
- [27] T. Tomka, D. Iber y M. Boareto. “Travelling waves in somitogenesis: Collective cellular properties emerge from time-delayed juxtacrine oscillation coupling”. En: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 137 (2018), págs. 76-87. ISSN: 0079-6107. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.04.004.
- [28] Jordi Garcia-Ojalvo, Michael Elowitz y Steven Strogatz. “Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), págs. 10955-60. DOI: 10.1073/pnas.0307095101.
- [29] Wikipedia. *Cooley–Tukey FFT algorithm* — *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. https://en.wikipedia.org/wiki/CooleyTukey_FFT_algorithm. [Online; consultado a 22/08/2023].

Apéndices

A. Resolución numérica de DDEs

Resolver ecuaciones diferenciales con retardo puede ser más complejo que resolver ecuaciones diferenciales ordinarias debido a la naturaleza no local de las DDEs (como ya se ha comentado, las tasas de cambio en un momento dependen de los valores de la función en momentos anteriores, lo que introduce un retardo temporal). Esta no localidad requiere que se almacene⁸ la información de la solución en tiempos anteriores para calcular la evolución actual, lo que puede ser computacionalmente muy costoso.

Recordemos que queremos hallar la solución del PVI (*) presentado en la Sección 3, donde $x(t) \in \mathbb{R}^n$ al estar modelizando una población de n células. No obstante, aunque el sistema de ecuaciones esté acoplado y en principio tengamos m retardos diferentes; por cómo son las ecuaciones es fácil ver que la ecuación diferencial que rige la dinámica de cada célula solo depende de dos retardos: el asociado a su propio oscilador celular y el asociado a la interacción con las células vecinas. Por tanto, resolver el PVI planteado inicialmente se reduce de manera equivalente a resolver el siguiente PVI en una dimensión para cada una de las n células,

$$(**) \quad \begin{cases} \dot{y}(t) = f(y(t), y(t - \tau_1), y(t - \tau_2)) & t \geq 0 \\ y(t) = \psi_0(t) & -\tau \leq t \leq 0 \end{cases}$$

donde τ_1, τ_2 y las condiciones iniciales varían para cada agente. Recordar que $\tau := \max\{\tau_1, \tau_2\}$.

A.1. Algoritmo de integración de DDEs

Existen diferentes métodos numéricos para resolver DDEs. En este trabajo se han desarrollado métodos de pasos únicos, puesto que son una extensión de los métodos de Runge-Kutta para ODEs y por tanto resultan más intuitivos. Estos métodos aproximan la solución en un solo paso, utilizando aproximaciones polinómicas o spline para la parte con retardo, como se explicará a continuación. Otros métodos numéricos se basan en, por ejemplo, descomponer la DDE en un conjunto de ODEs con diferentes desfases temporales y posteriormente utilizar métodos de ODEs estándar para resolver el sistema resultante.

Las simulaciones se han llevado a cabo usando dos métodos de Runge-Kutta de segundo orden⁹ (RK2) para la integración de la ecuación diferencial. A continuación se exponen las principales similitudes y diferencias entre ambos métodos:

Método de Heun: También conocido como método de Euler modificado. Se calcula un valor intermedio y finalmente la aproximación final, luego la iteración i -ésima se calcula como

$$\left. \begin{aligned} k_1 &= f(y_i, y^*(t_i - \tau_1), y^*(t_i - \tau_2)) \\ k_2 &= f(y_i + hk_1, y^*(t_i + h - \tau_1), y^*(t_i + h - \tau_2)) \end{aligned} \right\} \implies y_{i+1} = y_i + \frac{h}{2} (k_1 + k_2)$$

⁸Para reducir este coste, los códigos se han optimizado de tal manera que los *arrays* con la evolución temporal de las células almacenan únicamente la evolución temporal para intervalos de tiempo 2τ y se van actualizando conforme se avanza en la integración.

⁹También se ha implementado el método de Euler, pero se ha preferido RK2 porque la solución presenta un mayor error relativo para el caso sencillo (ver Figura 30).

donde h se corresponde con la anchura del paso de tiempo y por tanto $t_{i+1} = t_i + h$. Denotamos por y^* al array que contiene los puntos con la solución numérica que se va calculando, de manera que $y^*(t_i) \equiv y_i$. Notar, por tanto, que este array toma valores únicamente para tiempos t_i separados un intervalo temporal h .

Método del punto medio: En este caso, la aproximación final se obtiene de la siguiente manera,

$$\left. \begin{aligned} k_1 &= f(y_i, y^*(t_i - \tau_1), y^*(t_i - \tau_2)) \\ k_2 &= f\left(y_i + \frac{h}{2}k_1, y^*(t_i + \frac{h}{2} - \tau_1), y^*(t_i + \frac{h}{2} - \tau_2)\right) \end{aligned} \right\} \implies y_{i+1} = y_i + hk_2$$

Si bien ambos algoritmos presentan un error total acumulado del orden de $\mathcal{O}(h^2)$ por ser de orden 2; el método de Heun es considerablemente más fácil de implementar. En el método del punto medio, a la hora de calcular k_2 es necesario acceder a valores de la solución $y^*(t_i + h/2 - \tau)$. Estos valores no han sido previamente calculados, por lo que es necesaria una interpolación de la solución a partir de los puntos de los que disponemos. Esta interpolación se debe hacer en cada iteración del algoritmo, y si se quiere realizar de manera precisa es necesario aproximar, por ejemplo, con polinomios de grado mayor o igual que 2; lo que resulta computacionalmente muy costoso. Sin embargo, si escogemos valores de retardos τ tales que sean múltiplos¹⁰ del paso de tiempo h , es fácil ver que esta interpolación no es necesaria al utilizar el algoritmo de Heun (porque los valores $y^*(t_i + h - \tau)$ sí han sido calculados en iteraciones anteriores). Por todo lo comentado anteriormente, se ha escogido **llevar a cabo la integración de las ecuaciones por el método de Heun.**

A.2. Estudio del error para un caso analítico

Para establecer una comparación entre los distintos algoritmos (Euler, RK2 Heun y RK2 de punto medio), estudiamos la solución de la ecuación con retardo más sencilla: $\dot{x}(t) = -x(t - \tau)$, cuya solución analítica es conocida. Cuando $\tau = 0$, recuperamos una ODE cuya solución decae exponencialmente con el tiempo.

Buscamos hallar la solución del problema de valor inicial

$$\begin{cases} x'(t) = -x(t - \tau) & , t \geq 0 \\ x(t) = x_0 & , t \in [-\tau, 0] \end{cases} \quad (C.I.) \quad (13)$$

A pesar de su gran simplicidad, este PVI presenta un comportamiento dinámico muy interesante y sirve para ilustrar características comunes a las DDEs, como la tendencia de los retardos a dar lugar a oscilaciones que pueden volverse no amortiguadas si los retardos son grandes. También nos sirve para ilustrar los retos asociados al estudio de las DDEs, ya que para esta ecuación lineal tan simple, la estabilidad del equilibrio trivial requiere un análisis de las raíces de una ecuación trascendental (ecuación (6) de la Subsección 3.2 tomando $a = 0, b = -1$).

¹⁰Esto no supone una restricción tan grande sobre los valores que puede tomar τ . Por ejemplo, haciendo las simulaciones con $h = 0.01$ esto únicamente implica que los τ pueden tener hasta dos cifras decimales de precisión.

La solución analítica de este PVI viene dada por [20]:

$$x(t) = x_0 \left[1 + \sum_{k=0}^n (-1)^k \frac{[t - (k-1)\tau]^k}{k!} \right] \quad t \in [(n-1)\tau, n\tau], \quad n \in \mathbb{N}$$

Tomando $x_0 = 1$, estudiamos el comportamiento de la solución en función del desfase τ . Vemos que $x(t)$ oscila para valores de $\tau > 1/e \approx 0.37$, y que $x = 0$ es estable cuando $\tau < \pi/2 \approx 1.57$ e inestable cuando $\tau > \pi/2$.

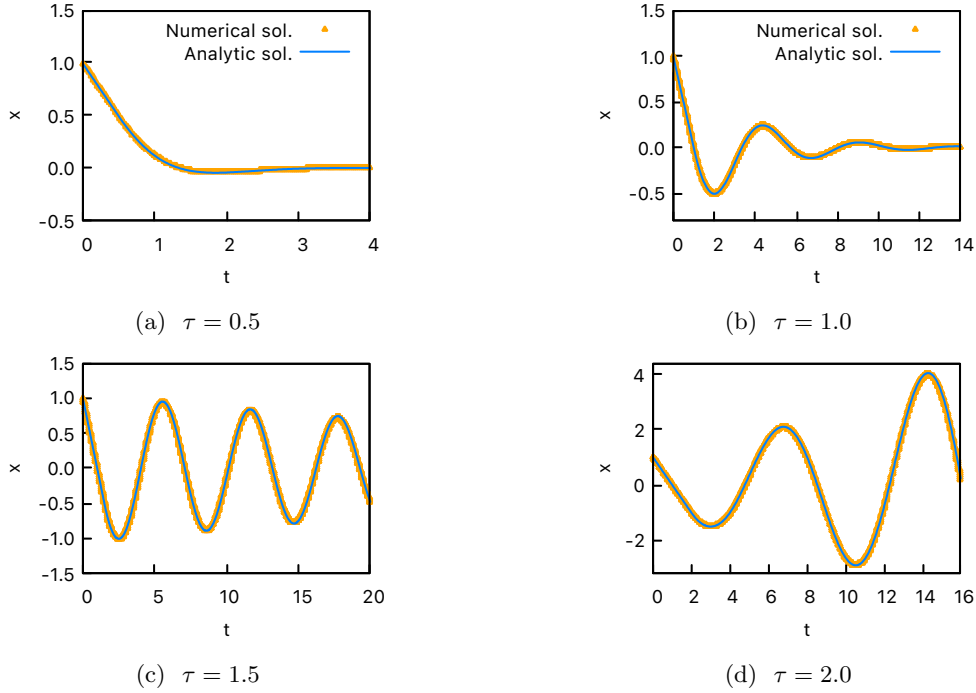


Figura 29: Evolución temporal de la solución para distintos valores de retardo τ ($h = 0.01$).

Vemos que para un paso de tiempo $h = 0.01$ la solución numérica se aproxima muy bien a la solución analítica. Para estimar esto de manera más rigurosa comparamos el error relativo entre la aproximación numérica y la solución exacta para distintos métodos de integración¹¹ y dos pasos de tiempo diferentes.

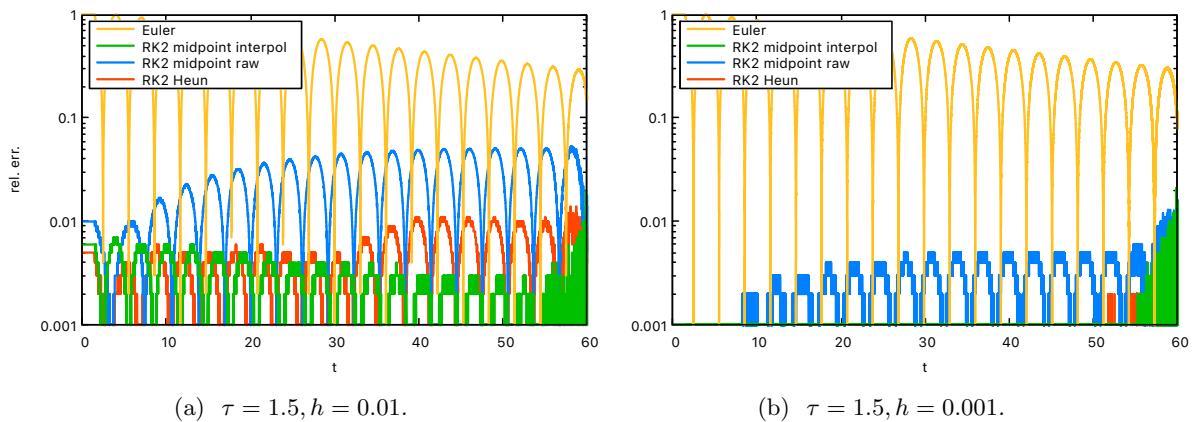


Figura 30: Error relativo respecto a la solución analítica de (13) para distintos métodos de integración.

¹¹Para realizar la interpolación de la solución en puntos intermedios en RK2 de punto medio se utiliza la regla del punto medio, debido al compromiso entre el coste computacional y la precisión de la aproximación.

Comparando ambas figuras extraemos las siguientes conclusiones:

- La reducción de h en un factor de 10 mejora notablemente el error relativo.
- Es importante realizar la interpolación de la solución en caso de usar el método del punto medio de RK2.
- El método de RK2 Heun presenta un error relativo del mismo orden que los demás RK2 y sin embargo es más sencillo de implementar y menos costoso a nivel computacional (lo que justifica una vez más elegir este algoritmo de integración para llevar a cabo las simulaciones).

El aumento en el error relativo para valores de $t > 50$ se debe probablemente a errores en la aproximación de la solución analítica, ya que en lugar de calcular los factoriales de cada sumando en la expresión de la solución se estimó una aproximación de los mismos tomando logaritmos.

B. Cuestiones de la simulación

B.1. Valores de parámetros del modelo del oscilador unicelular

La mayoría de las simulaciones del se han realizado con los siguientes valores de parámetros para cada oscilador unicelular

VALORES ESTÁNDAR: $\tau = 5, \beta = 2, \alpha = 1, K = 0.15, V = 1, K_m = 50, \gamma = 1$

Con estos valores se consiguen las dinámicas oscilantes deseadas. No obstante, se debe mencionar que varios de estos parámetros son robustos ante variaciones y observamos oscilaciones estables para un amplio rango de valores de los mismos. Esto es importante ya que nos podría permitir representar inhomogeneidades en poblaciones celulares muy extensas mediante la inclusión de ruido estático en los valores de los parámetros del modelo.

- $\tau = k \cdot h$ U.A., donde $h = 0.01$ se corresponde con el paso del tiempo y $k \in \mathbb{N}$.
En principio el retardo puede ser arbitrariamente grande, aunque su valor queda limitado siempre por el tiempo de simulación.
- $\beta \in [1.0, 10.0]$
No obstante, recordemos que para cada valor de β existe un τ umbral por debajo del cual no hay oscilaciones (Figura 13).
- $\alpha \in [0.5, 1.0]$
- $V \in [0, 5]$
Su valor influye poco en el comportamiento del sistema.
- $K_m \in [0.5, 50.0]$
Variando este parámetro se modifica ligeramente la forma de las curvas (de menos a más “booleanas”). La frecuencia promedio de oscilación y la concentración de equilibrio también se ven modificadas, pero no en gran medida.

Para llevar a cabo todas las simulaciones hemos tomado la tasa de degradación γ igual a 1, lo que nos ha permitido trabajar con una escala temporal adimensional. A partir de los valores experimentales de γ se puede recuperar la información temporal de las simulaciones, tal y como se explica a continuación.

B.2. Estimación de las escalas temporales del modelo

Al imponer $\gamma = 1$ en las simulaciones, las unidades temporales son adimensionales, lo que nos ha permitido simplificar el modelo al reducir el número efectivo de parámetros y no trabajar con dimensiones. No obstante, si disponemos de una estimación del valor real de γ_{exp} , podemos comprobar que los resultados que proporciona el modelo son compatibles con los resultados de experimentos.

Los experimentos [8] estiman el valor de la constante de degradación en $\gamma_{\text{exp}} = 0.23 \text{ min}^{-1}$, luego para recuperar los valores de parámetros en términos de unidades de tiempo reales debemos multiplicar/dividir por γ_{exp} (según si el parámetro tiene unidades de tiempo, de frecuencia, etc.). Además, disponemos de medidas del retardo total y el período de oscilación de cada oscilador individual [8], siendo el orden de estos valores $\tau_{\text{exp}} \sim 20 \text{ min}$ y $T_{\text{exp}} \sim 40 \text{ min}$.

Tomando un valor de retardo $\tau = 4$ en nuestro programa, observábamos que las oscilaciones tenían frecuencia $\nu = 0.1 \text{ u.a.}$, o equivalentemente período $T = 1/\nu = 10 \text{ u.a.}$ Recuperando las unidades reales,

$$\begin{aligned} \tau = 4 \text{ u.a.} &\implies \tilde{\tau} = \tau/\gamma_{\text{exp}} = 17 \text{ min} \sim \tau_{\text{exp}} \\ T = 10 \text{ u.a.} &\implies \tilde{T} = T/\gamma_{\text{exp}} = 43 \text{ min} \sim T_{\text{exp}} \end{aligned}$$

Concluimos así que **el modelo que hemos desarrollado proporciona resultados compatibles con los datos experimentales relativos a la somitogénesis del pez cebra.**

B.3. Influencia de los parámetros en las oscilaciones de una célula

En la Subsección 4.2 estudiamos la dependencia de la frecuencia de oscilación de cada célula con el retardo y vimos que eran inversamente proporcionales. También vimos que la frecuencia con la que oscilan las células para un mismo valor de τ es independiente del exponente de Hill. Si bien β y τ son los parámetros más interesantes del modelo porque tienen una interpretación biológica directa y hemos visto que son clave en fenómenos dinámicos muy interesantes, debemos tener en mente que la ecuación (2) del modelo presenta otros parámetros: α, V, K, K_m y γ .

Debido a este gran número de parámetros, nos planteamos simplificar el estudio analizando la dependencia de ν con los cocientes α/V y K/K_m por ser parámetros de mismas unidades.

Observamos que, manteniendo los demás parámetros del sistema dentro de los rangos habituales, para cada valor de α existe un valor umbral de K por encima del cual no hay oscilaciones (ver Figura 31). Adicionalmente, las simulaciones muestran que la frecuencia de oscilación no se ve afectada ante la modificación del valor de la constante K_m , lo que concuerda con lo comentado en la B.1 sobre que la variación de K_m no modifica sustancialmente la dinámica de las oscilaciones.

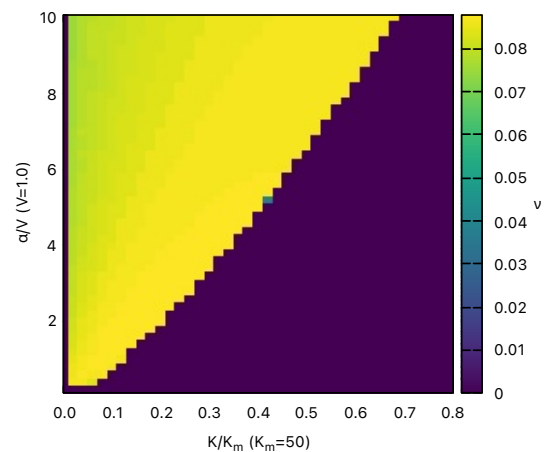


Figura 31: Frecuencia de oscilación en función de α y K . $\tau = 5, \beta = 4$.

C. Estudio ampliado de R para la interacción entre dos células

En la Subsección 5.3 hemos estudiado la influencia de τ_c en la sincronización del sistema para valores fijos del retardo de cada oscilador ($\tau_1 = 3, \tau_2 = 5$). Dado que los valores de τ_i determinan la frecuencia del oscilador individual, supusimos que la sincronización podía depender de la dispersión entre los τ_i de cada célula. Para comprobarlo repetimos la Figura 19 variando la dispersión entre los dos τ_i :

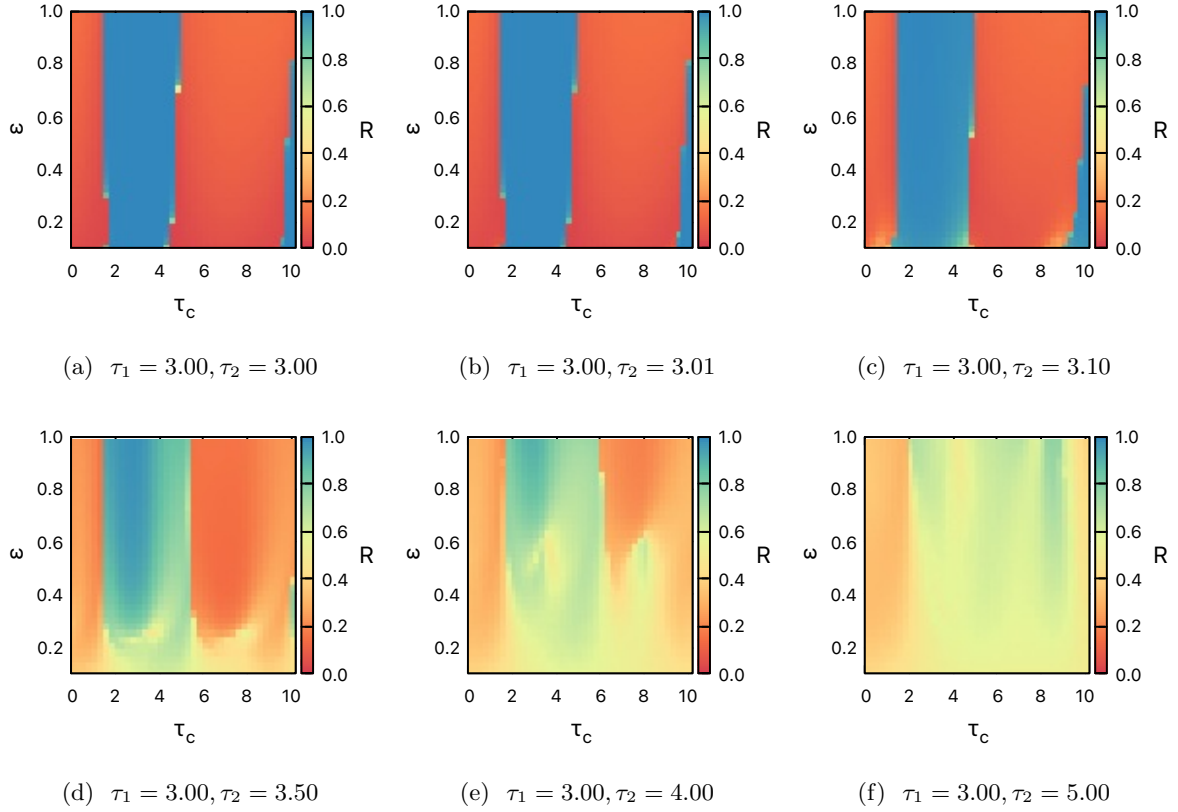


Figura 32: Diagrama de fases de R según (τ_c, ε) aumentando la diferencia entre τ_1 y τ_2 .

Simulaciones con retardos intracelulares similares. Se observa que para τ_i 's próximos, los estados finales son o claramente sincronizados o claramente asíncronos, dependiendo de si las concentraciones iniciales convergen hacia el mismo ciclo límite en fase o contrafase, es decir; el hecho de que los retardos sean próximos hace que en estas situaciones los atractores observados para el caso del oscilador individual (recordar la Subsección 4.1) sigan presentes. Por ello, al hacer las simulaciones inicializamos la concentración de cada célula a valores diferentes ($x_1 = 0.1, x_2 = 0.7$) para favorecer que cada una converja hacia uno de los atractores. Mirando detalladamente las trayectorias correspondientes a las zonas en rojo de las simulaciones (a), (b), (c) se ve que se corresponden con situaciones en las que, por muy elevado que sea el tiempo de simulación, cada serie converge a un atractor y el parámetro de orden es $R \approx 0$. Repitiendo estas mismas simulaciones con concentraciones iniciales similares ($x_1 \approx x_2$) se observa que $R \approx 1$ para cualquier valor de ε, τ_c . Esto indica que para τ_i 's muy próximos, los atractores del sistema individual siguen estando presentes, incluso aunque la intensidad de interacción sea máxima.

Por otro lado, la región azul se corresponde con simulaciones en las que hay sincronización total para cualquier intensidad de acoplo. Lo que sucede en estas situaciones es que la trayectoria

de ambas células acaba convergiendo a un mismo atractor. En la Figura 33 se aprecia claramente cómo la dinámica de cada célula comienza en un atractor hasta que al final la trayectoria de una de ellas (verde) acaba siguiendo la misma trayectoria que la otra (amarilla). Como comentario final se debe mencionar que en las simulaciones que presentan sincronización total el retardo intercelular es aproximadamente igual que el retardo de cada uno de los osciladores ($\tau_c \sim 3$).

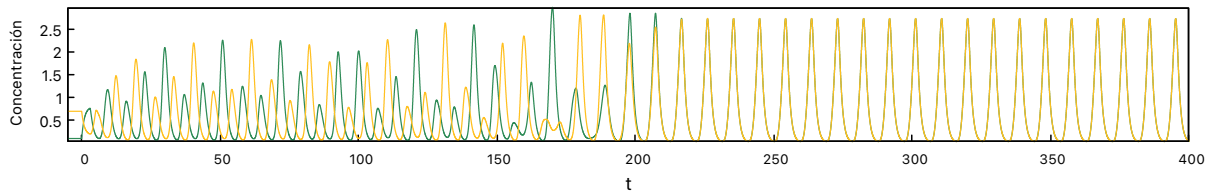


Figura 33: *Convergencia de las oscilaciones a un mismo atractor.* $\tau_1 = \tau_2 = \tau_c = 3$.

Simulaciones con retardos intracelulares diferentes. Conforme aumenta la diferencia entre los τ_i , la diferencia entre las frecuencias de oscilación para cada célula sin interacción también se acentúa (recordar la Figura 12), lo que hace que los estados finales alcanzados presenten una dinámica no tan claramente sincronizada o asíncrona. Esto se aprecia en la Figura 32 ya que se observan menos regiones azules o rojas, respectivamente). No obstante, seguimos observando una región en el entorno de $\tau_c \sim 3$ para cual el parámetro de orden es elevado.

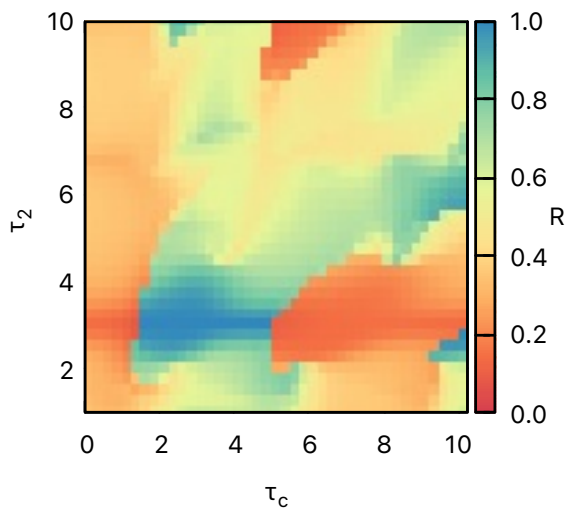


Figura 34: *R según (τ_c, τ_2) fijando $\varepsilon = 1.0, \tau_1 = 3.0$.*

simulaciones en las que **los retardos τ_1, τ_2 y τ_c son aproximadamente iguales**. Esta región de sincronización máxima está entre dos regiones de sincronización mínima (ver la región horizontal de la ?? con $\tau_2 \approx 2$). Tal y como hemos comentado, esto se corresponde con simulaciones en las que los τ_i son similares y se tienen ventanas de sincronización total seguidas por regiones con anti-sincronización, según vamos aumentando τ_c . Esto se corresponde con el caso extremo de lo que habíamos observado en la Subsección 5.3 al explorar el comportamiento del sistema para valores de τ_c elevado y se ilustra a continuación (en una figura análoga a la Figura 20). Este fenómeno se observa también en nuestro modelo al simular la dinámica de poblaciones muy extensas, tal y como se discute en la Sección 6.

Por último, y dado que acabamos de ver que **el nivel de sincronización del sistema es muy sensible a la diferencia entre los retrasos intracelulares**, repetimos el diagrama de fases de R fijando la intensidad de interacción máxima y variando la diferencia entre τ_1 y τ_2 .

Si bien observamos que R presenta un comportamiento muy heterogéneo frente a la diferencia entre los τ_i , observamos claramente que hay un τ_c umbral por debajo del cual no hay sincronización, tal y como se había argumentado ya en la Subsección 5.3. También vemos que hay una región en la que **la sincronización es máxima** que se corresponde con

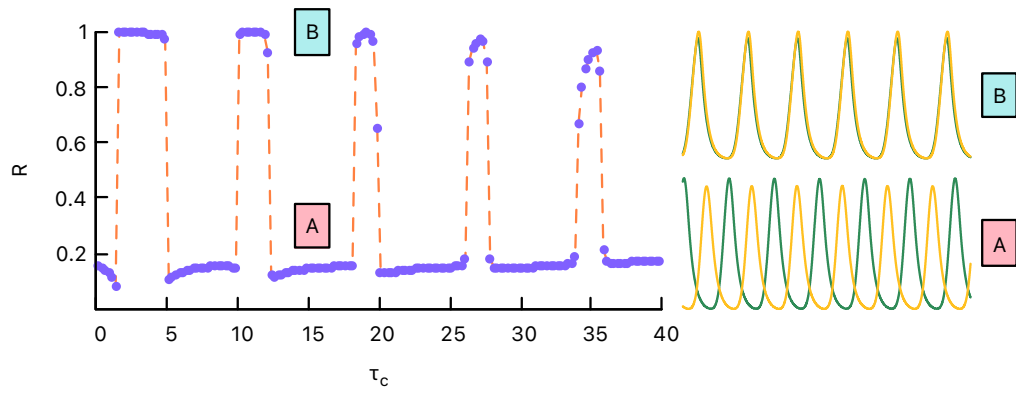


Figura 35: Evolución de R con τ_c para $\tau_1 = 2.9, \tau_2 = 3.0$.