

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA MATERIA CONDENSADA

TRABAJO DE FIN DE GRADO (FÍSICA)

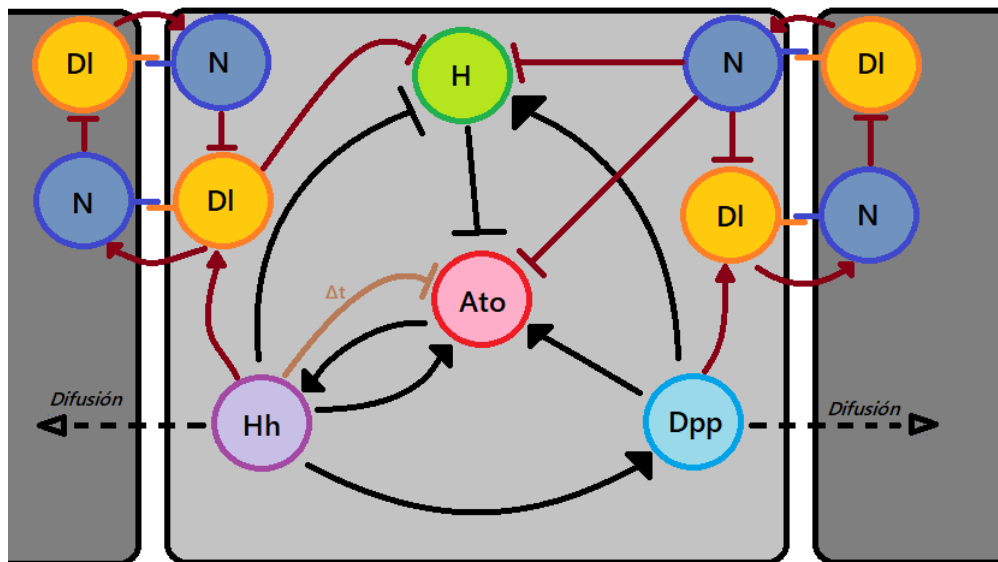
**Estructura celular y patrones en biología:
un enfoque de biología de sistemas**

Autor:

Alejandro Ruberte Sanz

Directores:

Dr. Fernando Falo Forniés
Dr. Pierpaolo Bruscolini



Zaragoza a 28 de junio de 2019

“El todo es mayor que la suma de sus partes”

Aristóteles, en su obra *‘Metafísica’*

Índice

1	Introducción	1
1.1	Biología de Sistemas	2
1.2	El ojo de la ‘ <i>Drosophila Melanogaster</i> ’	5
1.3	Objetivos	7
2	‘<i>Morphogenetic Furrow</i> (MF)’	8
2.1	Descripción cualitativa	8
2.2	Modelos previos	11
2.2.1	Modelo I	11
2.2.2	Modelo II	12
2.2.3	Modelo III	13
2.3	Nuestro modelo	13
2.3.1	Dinámica general	14
3	Aplicación de los modelos	16
3.1	Modelo 1D	16
3.2	Modelo 2D	18
3.2.1	Interacciones básicas	19
3.2.2	Introduciendo DI-N	19
3.2.3	Introduciendo la inhibición retardada	21
4	Conclusiones	24
5	Referencias	25
Anexos		
A	Notación	I
B	Adimensionalización	II
C	Parámetros utilizados	III
C.1	Modelo simple	III
C.2	Modelo <i>Delta-Notch</i>	IV
C.3	Modelo de inhibición con retardo	V
D	Programas	VI
D.1	Simulador 1D	VII
D.2	Simulador 2D	XII
D.3	Análisis de la velocidad del MF	XXVII
D.4	Representación 1D	XXX
D.5	Representación 2D	XXXIII

1. Introducción

Día a día nos encontramos con ejemplos de complicadas estructuras, combinaciones concretas de materia con una increíblemente elevada organización, desde la regularidad de una red cristalina, hasta la armoniosa dinámica de los cuerpos celestes. Todo esto, puesto bajo reflexión concienzuda, representa algo poco intuitivo, ya que, recurriendo a las leyes de la termodinámica, y teniendo en cuenta las condiciones de partida del universo (a elevadas temperaturas y un grado de homogeneidad importante), se espera que resulte en un conjunto homogéneo de materia y energía. El hecho de no ser así, puede achacarse a que estamos tratando con sistemas fuera del equilibrio [1].

Esta inhomogeneidad, enmarcada en un comportamiento global del sistema, presenta como resultado lo que denominamos “fenómeno emergente”. Un fenómeno emergente se define como el comportamiento colectivo que se puede observar en sistemas macroscópicos y que surge de las interacciones de los elementos microscópicos del sistema, no pudiéndose dar, ni prever, en cada uno de los elementos microscópicos de forma aislada [2]. Algunos ejemplos de la aparición de fenómenos emergentes son la superconductividad en materiales, el lenguaje como fenómeno social o incluso el comportamiento cooperativo en una colonia de hormigas [3].

Un ejemplo perfecto en el que se evidencia éste efecto es un organismo pluricelular, pues partiendo de una unidad mínima replicable (la célula madre), se pueden llegar a formar estructuras extremadamente complejas, compuestas de unidades muy diferenciadas (células hijas especializadas). Además es necesario remarcar que ligeros cambios en una fase temprana de crecimiento, o en la condición inicial, pueden dar resultados completamente diferentes. Una buena demostración de esto es el hecho de que gran parte del código genético está compartido por la mayoría de especies (*e.g.* cerca del 75 % de genes humanos vinculados con enfermedades, tienen su homólogo en el genoma de la mosca de la fruta (*Drosophila Melanogaster*)[4].

A un nivel más simple, y fácil de analizar, tenemos los “patrones”, organización de las unidades del sistema de forma regular, pero inhomogénea, en el espacio y en el tiempo. La formación de estos patrones (en concreto la del ojo de la *Drosophila Melanogaster*, mosca de la fruta) será el objeto de estudio del presente trabajo. En la Figura 1 presentamos imágenes de algunos ejemplos de patrones en sistemas biológicos.

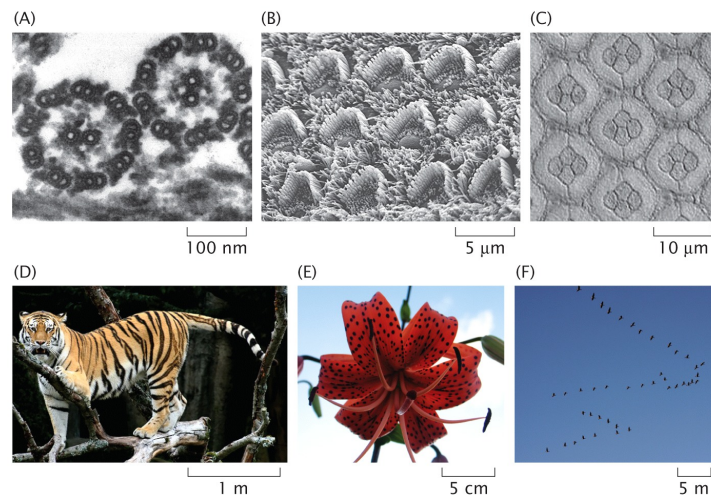


Figure 20.1 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Figura 1: Formación de patrones biológicos a diferentes escalas de longitud. (A) Red de microtúbulos en formato 9/2 en la sección transversal del flagelo del alga unicelular *Chlamydomonas*. (B) ‘Hair cells’ en el oído interno de un ratón. (C) Células fotorreceptoras ordenadas hexagonalmente en el ojo de una *Drosophila*. (D) Tigre mostrando el patrón a rayas de su pelaje. (E) *Lilium Columbianum* exhibiendo manchas regulares y ordenaciones geométricas de pétalos y pistilos. (F) Orden espacial en una bandada de gansos. Figura extraída de [5].

Como ya hemos mencionado, será el proceso de formación, y no el patrón en sí, lo que trataremos en profundidad. El interés que tienen estos procesos radica en un hecho fundamental, y es que la correcta formación del patrón requiere de la propagación de información (generalmente dada por concentraciones de distintos tipos de moléculas) de forma precisa, ya que cada una de las células, debe ‘saber’ cuándo y dónde está de forma ininterrumpida para actuar en consecuencia.

Los mecanismos de transporte a estas escalas pueden clasificarse, principalmente, en dos tipos: (1) un transporte activo cuya velocidad de propagación es aproximadamente constante, pero que requiere un gasto de energía y resulta ineficaz a distancias cortas, y (2) un transporte por difusión cuya velocidad de propagación decae con el tiempo ($\propto t^{-1/2}$), que es inútil para un transporte direccionado y a distancias largas [6].

En el caso de estos eventos biológicos de propagación, como son el transporte de señales a través de las neuronas o la migración colectiva de células, la velocidad de la señal debe estar muy bien regulada. Esta es, además, demasiado elevada como para poder entenderse como un proceso difusivo, por lo que se postula la existencia de mecanismos de regulación genética como ‘motor’ de una propagación con esas características[6].

El funcionamiento básico de estos mecanismos de regulación radica en que una pequeña concentración de una molécula (que puede difundir a las vecinas) promueve su propia producción dentro de la célula ‘foco’, haciendo así aumentar su concentración en dicha célula. Las células vecinas, debido a la difusión, producen también la esta molécula, actuando como ‘nuevos focos de difusión’. Este mecanismo favorece la propagación de una señal a largas distancias.

Nuestro trabajo se enfocará en estudiar el comportamiento de estos sistemas de regulación como medio de transporte de la información en la formación del patrón encontrado en el ojo de la *Drosophila Melanogaster*. Este proceso será explicado *a posteriori* con más detalle, basándonos, fundamentalmente, en los resultados experimentales expuestos en la literatura.

1.1. Biología de Sistemas

La Biología de Sistemas surge como una nueva e importante área de la Biología. Ésta consiste en integrar, en un único campo, el conocimiento de los distintos componentes y mecanismos de las células. La Biología de Sistemas trata, fundamentalmente, de la modelización matemática de procesos biológicos, como son los mecanismos de regulación de la expresión del ADN (nuestro caso), el crecimiento de poblaciones, la cinética enzimática, *etc.*

Esta relativamente reciente rama de la biología rompe con toda la metodología previa en la investigación biológica, centrada en obtener descripciones cualitativas a partir de los resultados experimentales. Con la Biología de Sistemas, sin embargo, pasamos a una descripción cuantitativa en el análisis y comprensión de estos sistemas, pudiendo ver las causas de los subsecuentes fenómenos emergentes. Esto se consigue mediante el uso de métodos cuantitativos aplicados a problemas biológicos, sobre todo con la aproximación de éstos a modelos matemáticos concretos. La necesidad de usar esta herramienta se debe a que, la mayoría de las veces, estos comportamientos se escapan a nuestra intuición inmediata, y su comprensión la requieren.

Un campo en el que esta disciplina se ha aplicado con mayor éxito es en el estudio de la formación de patrones. Uno de los pioneros en el análisis de estos patrones fue el biólogo y matemático escocés D’Arcy W. Thompson, considerado como el primer ‘biomatemático’. Éste realizó la primera aplicación relevante de las matemáticas a los organismos vivos en su obra ‘*On Growth and Form*’[7], publicada en 1917.

Tras esto, la Biología de Sistemas se ha desarrollado desde mediados del siglo XX hasta nuestros días, aportando modelos matemáticos bioinspirados. Hay dos formas de abordar estos modelos: algunos se enfocan a problemas concretos y a escalas muy diferentes, mientras

que otros se proponen como modelos generales que explican los mecanismos básicos de los diferentes problemas a resolver. Estos últimos son las herramientas esenciales de la Biología de Sistemas, que facilitan la modelización de sistemas complejos y diversos. Uno de los primeros ejemplos de modelo general para la formación de patrones es el publicado por el reconocido matemático británico Alan M. Turing en 1952 [8]. En él se demuestra la posibilidad de generar un patrón heterogéneo en un sistema con dos componentes difusoras (con distintas constantes de difusión).

A continuación vamos a describir las herramientas matemáticas que vamos a utilizar a lo largo de este trabajo. Éstas herramientas son, básicamente, la modelización de los procesos de regulación genética que ocurren a nivel celular.

La transcripción de las diferentes secuencias del ADN (que posteriormente derivará, en nuestro caso, en la producción de unas proteínas concretas) por la ARN polimerasa (ARNp) es un proceso estocástico. La cantidad de material producido de un tipo concreto depende de la afinidad de la ARNp con una zona concreta del ADN. Las zonas cuya función específica es la de establecer la posición de adherencia de la ARNp son las denominadas “regiones promotoras”. El grado de afinidad en estas regiones puede variar en función de la concentración de los “factores de transcripción” (FT), que son algunas de las proteínas producidas que se adhieren a la región promotora. Los genes que codifican estos factores de transcripción suelen estar regulados por otros y, un número importante, por ellos mismos, conformando así un complejo mecanismo de regulación capaz de responder de forma efectiva a estímulos [9].

Las regiones promotoras pueden ser, generalmente, de tres tipos: (1) promotores regulados positivamente por activadores, como se muestra en la Figura 2(a), (2) promotores regulados negativamente por represores, como se muestra en la Figura 2(b), y (3) promotores siempre activos, de producción basal [10].

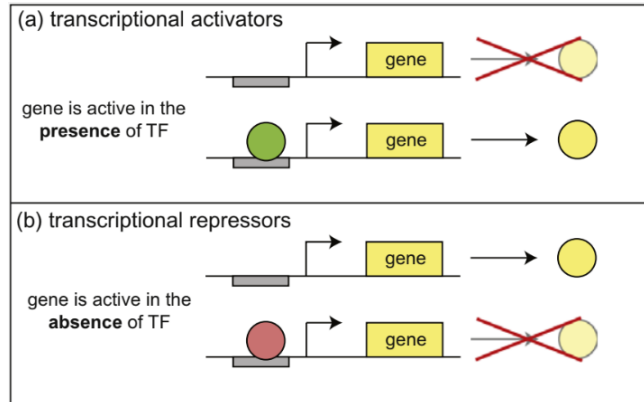


Figura 2: Regulación de promotores a través de factores de transcripción (FT). (a) El activador inicia la transcripción de un gen una vez ligado al promotor. En su ausencia el gen no se expresa. (b) El represor inhibe la transcripción del gen mientras esté ligado al promotor. En su ausencia se permite la expresión del gen. Figura tomada de [10].

Como ya hemos mencionado anteriormente, para los promotores regulados la actividad del gen viene dada por la concentración de los FT modulada por la probabilidad de que estos queden ligados a su lugar específico del ADN en la región promotor [10]. Como un ejemplo simple, supongamos un promotor con un lugar de adherencia para un FT concreto, y consideremos que dicho FT debe dimerizarse (esto es, agregarse dos de estos FT en una única molécula) antes de ligarse al promotor. Si las concentraciones de ADN y FT son constantes, entonces podemos escribir las siguientes relaciones cinéticas [10].





Donde F representa la concentración del FT en forma de monómero, F_2 en forma de dímero, P_v la concentración de los llamados operones (zona de adhesión del FT dentro del promotor) vacíos y P_o la de ocupados.

Ahora bien, si consideramos que estas reacciones están en equilibrio, entonces se cumple lo siguiente.

$$k_d F^2 = k_{-d} F_2 \quad (1.3)$$

$$k_b P_v F_2 = k_{-b} P_o \quad (1.4)$$

Teniendo ahora en cuenta que consideramos constante la concentración de ADN ($P_v + P_o = N$), podemos resolver la cantidad de operones ocupados en función del resto de parámetros, llegando a:

$$P_o = \frac{N F^2}{\frac{k_{-d} k_{-b}}{k_d k_b} + F^2} \quad [10] \quad (1.5)$$

Donde si denotamos:

$$K = \sqrt{k_{-d} k_{-b} k_d^{-1} k_b^{-1}} \quad (1.6)$$

y considerando la velocidad de lectura del ADN lineal con la concentración de promotores ocupados:

$$\partial_t C = \mathcal{K} P_o \quad (1.7)$$

con C la concentración de la proteína codificada por el gen y \mathcal{K} representando la probabilidad por unidad de tiempo de que la ARNp se adhiera al lugar P_o , obtenemos la expresión general de una función de Hill de activación:

$$\left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_A = \mathcal{K} N \frac{F^2}{K^2 + F^2} \equiv H \frac{F^n}{K^n + F^n} \quad (1.8)$$

Para el caso de tratar con un represor, la transcripción del gen será proporcional al número de promotores no inhibidos, es decir:

$$\left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_I = \mathcal{K} P_v = \mathcal{K} (N - P_o) \Rightarrow \left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_I \equiv H \frac{K^n}{K^n + F^n} \quad (1.9)$$

Este será el tipo de funciones (fórmulas de Hill) que utilizaremos durante todo el trabajo, y el significado de cada término (además del que conocemos de su deducción) son, H velocidad máxima de producción, o “amplitud” de la interacción, K concentración de F a la cual se consigue ocupar la mitad de los operones, y n el exponente de Hill, que representa el grado de polimerización de F previo a poder ligarse al promotor [10].

Vistas ya las ecuaciones típicas en estos sistemas, vamos a explicar brevemente la simbología utilizada en los esquemas de regulación, pues es una forma muy intuitiva de presentar un sistema biológico, como haremos posteriormente. Uno de los esquemas utilizados habitualmente es, por ejemplo, el de la Figura 2, pero para redes complicadas resulta un tanto complicado, por lo que se recurre a esquemas como el presentado en la Figura 3.

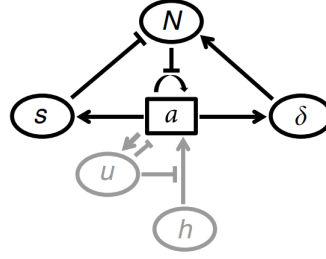


Figura 3: Modelo de Avishai Gavish *et al.* para explicar la función del FT ‘*Scabrous*’ en la diferenciación a R8 de algunas de las células del ojo de la *Drosophila Melanogaster* durante el paso del ‘*Morphogenetic Furrow*’, publicado en [11].

Entender el esquema presentado es bastante sencillo, únicamente hay que saber que las flechas habituales (\rightarrow) indican activación, es decir, en un sistema del tipo $A \rightarrow B$ lo que estamos diciendo es que el gen A actúa, mediante su expresión en proteínas, que son FT de B , activando la expresión del gen B . De forma análoga, la flecha truncada (\dashv) representa la inhibición, de forma que si $A \dashv B$, entonces B es inhibido por A .

1.2. El ojo de la ‘*Drosophila Melanogaster*’

El proceso de formación del ojo de la mosca de la fruta será el marco en el que se englobe nuestro trabajo. Éste puede dividirse en varios subprocesos. En primer lugar, porque el desarrollo se da en varias partes de la cabeza de la mosca (retina, lámina, médula, lóbulo y ‘*lobula plate*’) [12], y en segundo lugar, porque cada uno de ellos ocurre a diferentes tiempos. De las diferentes secciones de desarrollo, en al menos tres encontramos “ondas de diferenciación”, el proceso de transporte por regulación antes mencionado. Estas son, (1) el ‘*Morphogenetic Furrow*’, en la retina, (2) el ‘*Lamina Furrow*’, en la lámina, y (3) la ‘*Proneural Wave*’, en la médula [12].

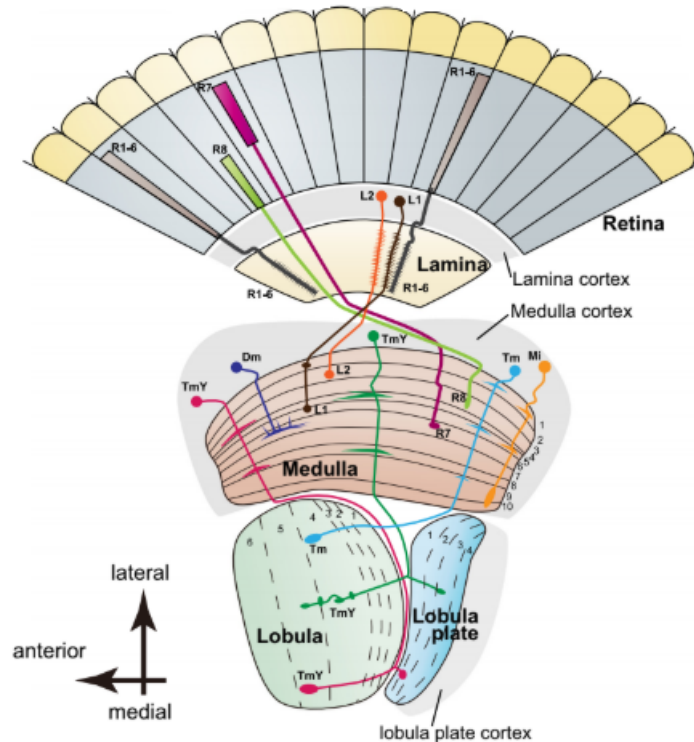


Figura 4: Sección horizontal del sistema visual de la *Drosophila Melanogaster*. Figura tomada de [12].

Nosotros nos centraremos en la formación del cristal omatidio en la retina, donde se da el *Morphogenetic Furrow* (MF). Sin embargo, el parecido entre los sistemas de regulación de las diferentes partes nos ha llevado también a realizar pruebas de simulación con el problema de la *Proneural Wave* (PW), basándonos en el sistema de regulación propuesto por David J. Jörg *et al.* en [13].

A continuación vamos a describir de forma simplificada el proceso de formación de la retina. Nuestra explicación abarcará desde el momento en el que comienzan a diferenciarse las células del disco óptico (región que evolucionará hasta convertirse en el ojo propiamente dicho), hasta el patrón celular final que se encuentra en éste.

En un primer instante, el disco óptico está compuesto por células no especializadas (idénticas). El inicio de la diferenciación se da por una perturbación (en concentraciones de proteínas FT) en la parte más posterior del disco. Algunas de estas proteínas difunden, estando sujetas a un mecanismo de regulación de transcripción autoactivador [14]. Esta condición es la que propicia la existencia de una onda de transporte de información, en este caso el MF, que promueve la diferenciación organizada del resto de células.

El MF se propaga en forma de onda plana desde la parte posterior a la anterior. Esta ‘onda’ deja tras de sí *clusters* de células que forman una red con conectividad hexagonal casi regular, y que posteriormente pasaran a convertirse en fotorreceptores concretos [14]. La formación de estos fotorreceptores es secuencial, siendo el primero en diferenciarse el denominado R8. Este fotorreceptor propicia la diferenciación de las células circundantes en los otros siete tipos de fotorreceptores (R1→R7) de forma ordenada [14]. Este conjunto de células será lo que llamamos la ‘omacidia’, que será la unidad básica de la que se compondrá la retina.

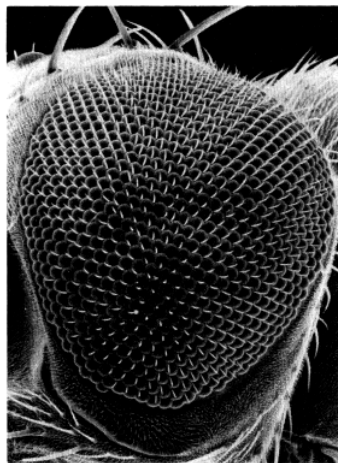


Figura 5: Imagen del ojo de la *Drosophila Melanogaster* obtenida mediante micrografía electrónica [15].

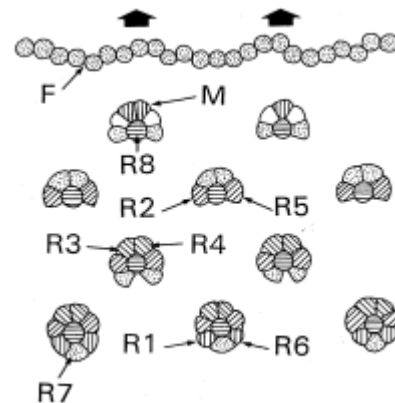


Figura 6: Formación del patrón descrito en el ojo de la *Drosophila*. Se representa debajo la parte posterior y encima la anterior. F representa el *Morphogenetic Furrow*. Las células M son eliminadas a través de muerte celular selectiva [15].

Para finalizar con la descripción del proceso de formación de la retina, y como dato adicional, los fotorreceptores proyectan axones en la región óptica del cerebro, donde forman proyecciones retinotópicas en la lámina y en la médula.[14]

Y ahora, visto el marco general, en el que se engloba nuestro trabajo, pasamos a presentar los objetivos que nos planteamos.

1.3. Objetivos

Los objetivos que nos planteamos en un inicio fueron los que exponemos a continuación. De ellos, podemos considerar todos, a excepción del último, cumplidos.

- Estudiar los modelos de generación de ondas en la formación de tejidos diferenciados.
- Analizar los circuitos genéticos que llevan al '*Morphogenetic Furrow*'.
- Establecer un modelo realista (basado en resultados experimentales) de la formación y propagación de la onda.
- Obtención del patrón que da origen a la omatidia en la parte posterior del MF.
- Analizar los distintos componentes del circuito para comprender su papel en el mismo.
- Comprobar la estabilidad del sistema frente al ruido (intrínseco o extrínseco).

2. ‘*Morphogenetic Furrow* (MF)’

Ya hemos explicado previamente, y de manera muy breve, qué es el MF. Ahora vamos a pasar a describirlo con bastante más detalle, exponiendo los distintos FT involucradas, así como sus propiedades, funciones y comportamiento durante el paso de éste.

Nuestro análisis tratará exclusivamente de lo ocurrido en el disco óptico durante la propagación del MF, ignorando el desarrollo del resto de áreas involucradas. La razón de obviarlas tiene base en que, de manera habitual, el crecimiento y formación de los seres vivos se da en distintas partes de éste de forma independiente (*e.g.* Poco después de comenzar el desarrollo del ala de la *Drosophila Melanogaster*, aquella puede crecer sin ningún problema en una posición ectópica tras haber sido transplantada) [15].

2.1. Descripción cualitativa

El MF, como ya hemos visto, es un sistema de regulación biológico. Esto plantea un primer problema para su análisis, su complejidad. El hecho de que el sistema de regulación se base en la variación de concentraciones de moléculas y sus capacidades para mantener su estructura y ligarse a lugares específicos lo hace muy sensible a fluctuaciones. Esto se contrarresta robusteciendo el sistema, usando, por ejemplo, un exceso de tipos de moléculas de regulación, con funciones redundantes, o subsistemas de regulación cooperativos entre ellos, también redundantes en un sistema sin ruido.

Para salvar dicha complejidad añadida, el procedimiento común es el de simplificar la acción de dos o más genes/proteínas con las mismas funciones o simplemente de forma que se puedan englobar en un único gen/proteína ‘genérico’, reduciendo así las dimensiones del problema de forma sustancial. Es por esto que, en la descripción a detallar a continuación, nombraremos únicamente los genes relevantes, mencionando las supuestas relaciones entre ellos extraídas de resultados experimentales.

Durante el proceso de diferenciación en el que está activo el MF, podemos hablar de tres zonas diferenciadas: (1) la parte anterior, en la que las células continúan siendo idénticas, (2) la ‘frontera’, donde se encuentran las células ‘pre-proneurales’ [16], sufriendo los cambios llevados por el MF, y (3) la parte posterior, aquella por la que ya ha transcurrido el MF y donde las células, ya en estado ‘proneural’ [16], comienzan a diferenciarse en los fotorreceptores R.

Como ya hemos explicado, lo que diferencia las células en los distintos estados son las concentraciones de las distintas moléculas encontradas en ellas. La proteína¹ que induce la diferenciación en fotorreceptores es la denominada ‘*Senseless*’ (Ss) [12, 17], activada por ‘*Atonal*’ (Ato) [12, 17, 18]. Dado que Ss actúa como simple intermediaria de Ato, la obviaremos en todos los modelos.

Previamente hemos visto en 1.2 que el primer fotorreceptor en diferenciarse es el R8, y que sus circuitos genéticos posteriores a ésta diferenciación son los que promueven la de las células circundantes. Es por esto que la idea fundamental en el MF es la de conseguir altos niveles de Ato únicamente en las células que posteriormente pasarán a diferenciarse en R8, buscando, con los modelos, un patrón geométrico como el presentado en las figuras 7 y 8.

¹Durante el resto del trabajo, por comodidad, llamaremos por sus abreviaciones (*e.g.* Ss) tanto a la proteína, como al gen que la codifica. También hablaremos de las interacciones entre ‘proteínas’, entendiéndose que detrás se encuentra toda la maquinaria explicada en 1.1, con la expresión de genes como intermediaria.

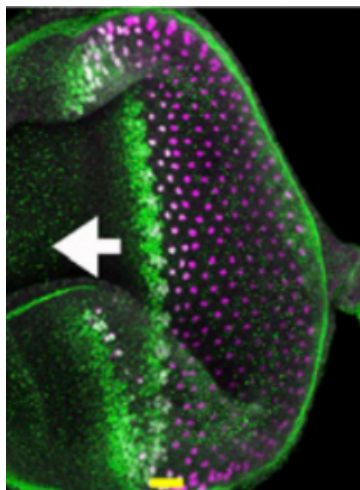


Figura 7: Imagen de la formación del patrón de R8 en el disco óptico de la *Drosophila Melanogaster*. Las células moradas son las diferenciadas en R8. La flecha marca el avance del MF. Imagen tomada de [18].

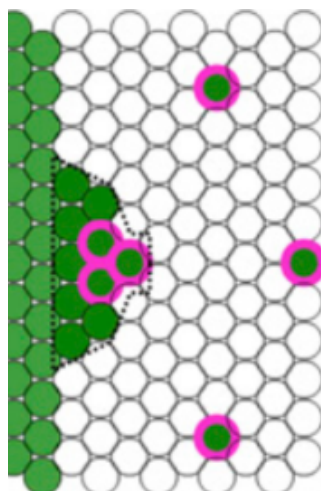


Figura 8: Misma figura de forma esquemática. El color verde representa la concentración de Ato, y los aros púrpuras las células R8. Figura tomada de [18].

La expresión de Ato es inhibida en la parte anterior al MF por ‘*Hairy*’ (H) y ‘*Extramacrochaete*’ (Emc) [12, 14, 16, 17]. Estas dos proteínas realizan funciones similares, por lo que en modelos posteriores pasaran a considerarse como una única. En mutantes con ausencia de estas proteínas se observa un MF acelerado, dada la imposibilidad de frenar el crecimiento en la concentración de Ato [12].

En la parte posterior al MF encontramos niveles bajos de H/Emc. Esto es debido a la proteína ‘*Hedgehog*’ (Hh), que las inhibe [16, 17]. Esta proteína es la que genera el MF y comienza toda la cadena de cambios. Esto se produce por un aumento inicial de su concentración en la parte más posterior del disco óptico [14]. Hh es secretada por las células R [12, 16], y sus efectos sobre Ato no son simples. Esto se debe a la cantidad de entramados mecanismos que conectan ambas proteínas. En primera instancia, Hh activa Ato, bien directamente [14, 16, 19], bien a través de otra proteína mediadora (‘*Raf*’) [12], o bien a través de la inhibición de H/Emc.

La existencia del MF implica necesariamente la existencia de al menos una proteína difusora que, además, sea autoactivada mediante algún mecanismo. Esta proteína es Hh, en cooperación con ‘*Decapentaplegic*’ (Dpp). Esta nueva proteína es activada por Hh [11, 12, 14, 16, 18], y también difunde. Al contrario que Hh, activa H [14], aunque también activa Ato por diversos mecanismos [14, 16]. En el caso de Dpp la difusión es mayor. Estas características llevan a una frontera estrecha que avanza a una velocidad controlada, debido a un ligero aumento en la concentración de H, activada por Dpp, antes de decaer debido a la inhibición de Hh. Añadir que para una correcta diferenciación solo una de las anteriores (Hh o Dpp) es necesaria, pero en ese caso el MF se ralentiza [12, 16, 17].

La ‘autoactivación’ que debe presentar el sistema se consigue con la producción de Hh en las células R8 [12, 14, 16], traducido como una activación de Hh por parte de Ato en el sistema. [18]

Las proteína ya presentadas (Hh, Dpp, H/Emc y Ato) son las que podríamos considerar básicas en el mecanismo de diferenciación característico del MF. Sin embargo, no han sido expuestos todos los procesos de regulación necesarios para la formación del patrón del ojo de la mosca de la fruta, pues son necesarios mecanismos inhibidores de Ato posteriores al MF.

Ejemplos de modelos basados en estas interacciones básicas son el de J.Y. Roignant *et al.* (Figura 9) y el de M. Sato *et al.* (Figura 10).

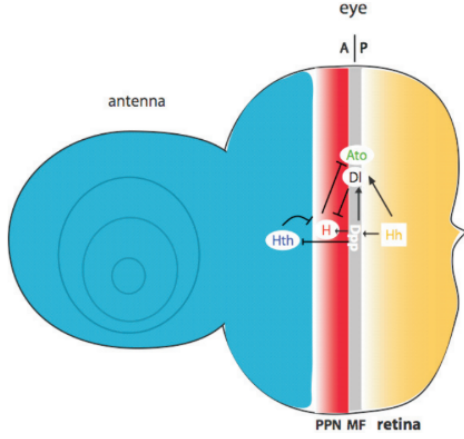


Figura 9: Modelo de sistema de regulación básico para el MF propuesto por Jean-Yves Roignant *et al.* en [14]. PPN representa la zona ‘preproneural’ generada por la activación a larga distancia de H debido a Dpp.

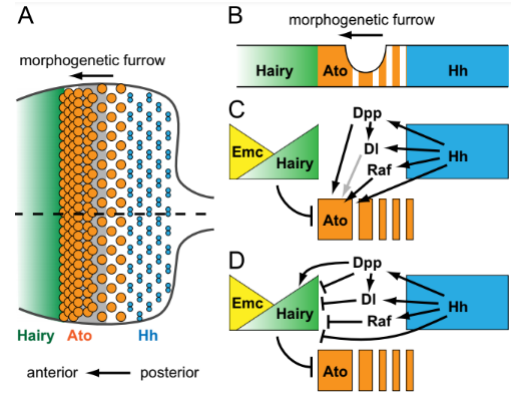


Figura 10: Modelo de sistema de regulación básico para el MF propuesto por Makoto Sato *et al.* en [12]. La zona considerada como MF se representa en gris (A).

Como mecanismo secundario de extrema relevancia tenemos el llamado *Delta-Notch* (Dl/N), encontrado en un gran número de sistemas de regulación de los seres vivos. Estas dos proteínas son proteínas de membrana, y actúan como ligandos, interaccionando con concentraciones de las células vecinas. En una misma célula, *Delta* es inhibida por *Notch* ($N \rightarrow Dl$), pero una célula con alta concentración de Dl promueve la expresión de N en las células vecinas ($Dl \xrightarrow{n,n} N$) [1, 13, 20]. Esto lleva a regímenes biestables, en este caso, la situación de equilibrio se caracteriza por tener células con alta concentración de Dl rodeadas por células con alta concentración de N, formando el comunmente llamado patrón de ‘sal y pimienta’ (Figura 12).

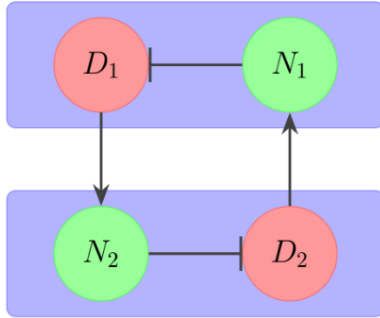


Figura 11: Sistema de regulación *Delta-Notch*. Dl activa N en las células vecinas y N inhibe Dl en la misma célula. Figura tomada de [1].

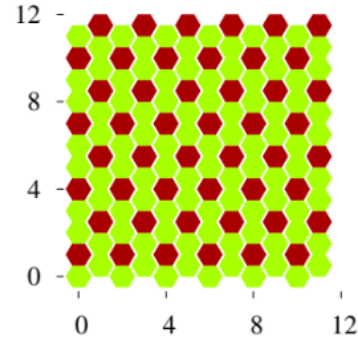


Figura 12: Patrón de ‘sal y pimienta’. Simulación perfecta (sin ruido y con condiciones iniciales concretas) del mecanismo *Delta-Notch* realizada por Pablo J. Blasco en [1]. El color rojo representa alta concentración en *Delta*, y el verde, baja.

Este mecanismo secundario actúa robusteciendo el sistema relativo al MF. Su principal cometido es el de diferenciar una única célula de cada omatidio a R8 [14]. En algunos de los modelos matemáticos propuestos por otros investigadores (*e.g.* el de David K. Lubensky *et al.*) se forman *clusters* con más de una célula diferenciada a R8, o en una posición desplazada de la correcta. Este problema, que se acentúa con el ruido térmico, puede ser resuelto por el sistema Dl-N, entre otros. Esto se consigue gracias a la inhibición de Ato por parte de *Notch* [11, 14, 16]. De esta forma, solo la célula del *cluster* que tenga alta concentración en *Delta* (y por tanto sus contiguas la tendrán en *Notch*) expresará Ato de forma efectiva.

Las relaciones concretas que se encuentran entre las proteínas de este subsistema y el básico son: (1) la activación de Dl por parte de Hh [12, 16, 17] y Dpp [12], (2) la inhibición de *Hairy* por parte de Dl [14, 16, 17] y N [16, 17], (3) la activación de Ato por Dl [16], y (4) la inhibición de Ato debido a N [16]. Aparte de esto, este mecanismo debe tener alguna función más, ya que eliminando Dl o N, o simplemente sustituyendo Dl por ‘*Serrate*’ (Serr, un ligando alternativo para *Notch*) no se da la diferenciación [16].

Visto esto, cabe aclarar que con las interacciones entre proteínas previamente explicadas sigue siendo imposible la generación de un patrón como el del ojo de la mosca. Esto es así porque las distancias (en número de células) entre cada R8 no se corresponde con el modelo de sal y pimienta. Es por esto que se proponen algunos otros modos de inhibición de Ato. Uno de ellos es que ‘*Scabrous*’ (Sca), activado por vías indirectas desde el mecanismo Dl-N inhiba Ato en las células cercanas a las R8 [18]. Otra posibilidad que se plantea (probablemente siendo la misma) es que Hh actúe como inhibidor de Ato con un retardo temporal Δt [14, 19]. Esta última posibilidad será la que implementaremos nosotros en una variante de nuestro modelo.

Otro gran número de interacciones y proteínas son contempladas por otros investigadores (e.g. EGFR-Hh [18], Dpp-Hth-H [14], Dpp→*Daughterless* [16], etc.).

2.2. Modelos previos

Tras exponer de forma cualitativa lo ocurrido durante este proceso, recurriendo a resultados experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, pasaremos a presentar algunos de los modelos matemáticos de regulación planteados previamente por otros investigadores, abriendo paso, así, a la explicación detallada del nuestro.

Las pruebas propias realizadas con estos modelos se hicieron únicamente en una dimensión, pues su objetivo era una simple familiarización con el proceso, a la par que construir un programa funcional para la realización de modelos más complejos. De esta manera nos aseguramos también de la veracidad de los resultados expuestos.

2.2.1. Modelo I

El primer modelo utilizado para observar el comportamiento de una onda química de regulación fue el desarrollado por A. J. Koch y H. Meinhardt para el MF, expuesto en [15]. En él únicamente se consideran dos componentes, f y s . Éstas carecen de significado físico en la dinámica de regulación del MF, por lo que presentamos directamente las ecuaciones de regulación.

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D_f \nabla^2 f + \rho_f \frac{s f^2}{1 + \kappa_f f^2} - \mu_f f \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial s}{\partial t} = -\rho_s s f^2 \quad (2.2)$$

Antes de desarrollar el funcionamiento del sistema, vamos a explicar qué es cada uno de los términos de la ecuación 2.1, pues presenta la forma más o menos general para este tipo de problemas (regulación de la transcripción del ADN). En primer lugar, las variables f y s representan la concentración de cada una de sus moléculas. En segundo lugar, el primer término del lado derecho ($D_f \nabla^2 f$) representa la influencia de la difusión en el cambio de concentraciones, donde D_f es el coeficiente de difusión de f y ∇^2 debe entenderse como el operador ‘Laplaciano’. El siguiente término es un homólogo a las funciones de Hill, donde ρ_f marca la influencia del mecanismo de regulación sobre la concentración y κ_f algún tipo de umbral. Se observa que f es autoactivado por mediación de s , que a su vez es reprimida por f . Por último, el término de degradación ($-\mu_f f$) registra la influencia de dicha degradación, con μ_f su coeficiente.

En este caso, una de las condiciones iniciales necesarias para que pueda darse esta onda es: (1) Un estado inicial homogéneo con $f = 0$ y $s = 1$, y (2) Una perturbación en una única célula tal que $f = f_0$. Bajo estas condiciones se genera una onda de información que se propaga desde la perturbación inicial haciendo crecer, en primera instancia, la concentración de f . Conforme avanza esta onda la concentración de s se extingue y, posteriormente, lo hace la de f .

En este modelo (y siguientes), se puede observar como la onda alcanza un ‘equilibrio dinámico’, presentando una forma del frente y una velocidad de propagación constantes.

2.2.2. Modelo II

El segundo modelo con el que realizamos simulaciones como prueba es el propuesto por David J. Jörg *et al.* en [13]. Este modelo no trata exactamente el MF, si no que intenta simular el comportamiento de la ‘*proneural wave*’, referente a la formación de la parte del cerebro de la *Drosophila Melanogaster*. Ésta se encarga, precisamente, de recibir la información del ojo. El hecho de que sean problemas muy similares, tanto en su función, como en la formación de los patrones finales, es lo que nos ha llevado a tratar este caso, donde los genes involucrados pueden ser diferentes, pero presentan funciones muy parecidas al caso del MF.

El ‘circuito genético’ básico a partir del cuál construye un modelo más completo (donde también introduce DI-N) es el presentado en la Figura 13.

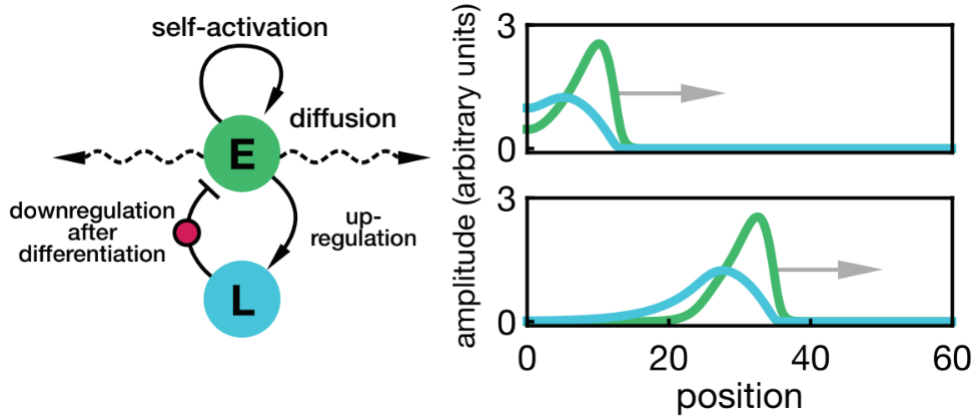


Figura 13: Modelo de interacciones de regulación entre el EGFR (*‘Epidermal growth factor receptor’*) y el gen proneural L’sc (*‘Lethal of scute’*) en el modelo de David J. Jörg *et al.* [13]. La actuación de varias moléculas implicadas en la activación de EGFR se condensan en una única que denominamos ‘E’. E puede difundir, promueve su propia expresión, y activa la de L’sc (‘L’). Una vez la célula alcanza el estado proneural, L inhibe E. A la derecha encontramos los resultados de una simulación regida por las ecuaciones 2.3 y 2.4. Imagen tomada de [13].

Las ecuaciones de regulación que gobiernan el sistema son:

$$\frac{\partial E}{\partial t} = D_E \nabla^2 E + \rho_E h_{(E)} \bar{h}_{(L)} - \mu_E E \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial L}{\partial t} = \rho_L h_{(E)} - \mu_L L \quad (2.4)$$

donde se ha utilizado la misma notación que en las ecuaciones 2.1 y 2.2 para las constantes en cada término. $h_{(F)}$ y $\bar{h}_{(F)}$ representan las funciones de Hill normalizadas ($H = 1$) de activación (expresión 1.8) e inhibición (expresión 1.9) respectivamente. En este modelo se han normalizado las concentraciones de forma que la concentración umbral en dichas funciones de Hill (K) sea la unidad. También han tomado arbitrariamente el exponente de Hill como $n = 3$.

Se visualiza bastante bien en la Figura 13 cómo evoluciona el sistema partiendo de concentraciones nulas de E y L en todas las células salvo en una pequeña región perturbada, donde se inicia la onda.

2.2.3. Modelo III

El último modelo que expondremos es el propuesto por David K. Lubensky *et al.* en [18]. El sistema de regulación de partida en el que se basa este artículo (presentado en la Figura 14 (A)) es ya aplicable al MF, teniendo significado físico cada una de sus componentes e interacciones. En el artículo [18] se propone como modelo simplificado el expuesto en la Figura 14 (B).

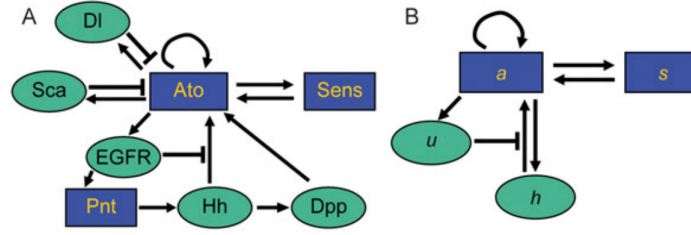


Figura 14: Modelo de David K. Lubensky *et al.*, publicado en [18]. (A) Modelo supuesto. (B) Modelo simplificado.

Como podemos ver, en este modelo se reduce el circuito genético a 4 proteínas ‘tipo’, en el que no incluye el mecanismo DI-N. Con ello se simula el MF, logrando el patrón de la Figura 8. El problema de este modelo es que generaba pares, o *clusters* de células R8 bajo fluctuaciones. Nosotros vamos a procurar simular el mismo circuito genético (nos referimos al real) desde otro punto de vista, considerando DI-N.

2.3. Nuestro modelo

Llegados a este punto, y partiendo de las interacciones mostradas en la descripción cualitativa del MF, presentamos nuestro modelo simplificado del problema. Este modelo lo podemos dividir en dos partes diferenciadas. Por un lado, las interacciones básicas que permiten la existencia de la onda cambiando satisfactoriamente la concentración de las moléculas principales involucradas (a excepción de Ato) de la región anterior a la posterior (Figura 15). Por el otro, las interacciones secundarias que, o bien hacen más robusto el sistema, o bien lo modifican en la medida necesaria para establecer correctamente los niveles de Ato en la parte posterior y formar así el patrón deseado. Ambas forman el modelo completo (Figura 16).

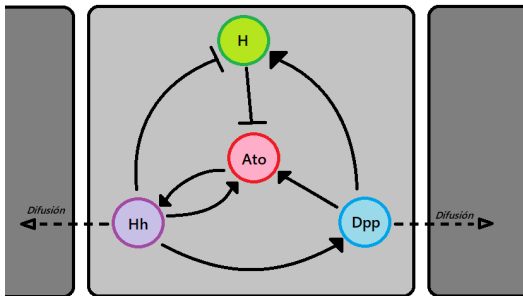


Figura 15: Modelo básico de regulación. Para las primeras simulaciones Ato se sustituye por una autoactivación de Hh.

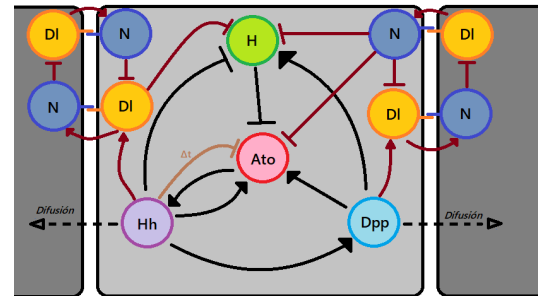


Figura 16: Modelo completo de regulación. En marrón oscuro las interacciones adicionales debidas a la integración de DI-N. En marrón claro la inhibición de Ato por Hh con retardo (Δt).

Nombre	Siglas	Activa	Inhibe	Difunde	Referencias
Hedgehog	Hh	Dpp, Ato	H	Si	[11, 12, 14, 16, 17, 18, 19]
Decapentaplegic	Dpp	H, Ato		Si	[14, 16, 18]
Hairy	H		Ato	No	[12, 14, 16, 17]
Atonal	Ato	Hh, Ss		No	[12, 17, 18]

Tabla 1: Interacciones entre proteínas contempladas en el sistema básico propuesto. Véase el mero papel representativo de Ss (*Senseless*), ya que no tiene más importancia que la de ser la promotora final de la diferenciación al estado proneural. De esta manera representamos que Ato promueve la diferenciación.

Nombre	Siglas	Activa	Inhibe	Difunde	Referencias
Hedgehog	Hh	Dpp, Ato, Dl	H, Ato*	Si	[11, 12, 14, 16, 17, 18, 19]
Decapent.	Dpp	H, Ato, Dl		Si	[12, 14, 16, 18]
Hairy	H		Ato	No	[12, 14, 16, 17]
Atonal	Ato	Hh, Ss		No	[12, 17, 18]
Delta	Dl	N'	H	Ligando	[13, 14, 16, 17, 20]
Notch	N		H, Ato, Dl	Ligando	[11, 13, 14, 16, 17, 20]

Tabla 2: Interacciones entre proteínas contempladas en el sistema completo propuesto. (*) representa que la interacción se da con un desfase temporal (Δt), y que (') representa la influencia sobre los primeros vecinos exclusivamente (y no sobre la misma célula). Esta última es una interacción propia de las proteínas de membrana que actúan como ligandos, como es el caso de Dl-N.

El circuito genético presentado en la Figura 15 (salvando Ato) es usado como ‘test’ en 1D, y en 2D. Éste lo usamos para comprobar su capacidad para generar una onda como el MF y, de ser el caso, obtener parámetros orientativos de las ecuaciones reguladoras. Una vez comprobada su funcionalidad, y habiendo adquirido algo de intuición sobre el problema, podemos integrar modificaciones que lo hagan más preciso. Estas modificaciones irán enfocadas a obtener, finalmente, el patrón esperado para las células R8, que coincide con el mostrado en la Figura 8.

Las modificaciones que introduciremos a posteriori serán, por un lado, la implementación del ‘subsistema’ Dl-N, y por otra, una interacción de inhibición con retardo de Ato por parte de Hh. Esta última está inspirada por lo mencionado en 2.1 sobre la intermediación de Sca (*Scabrous*) [14, 18, 19].

Se puede ver en las Figuras 15 y 16, la adición de estas interacciones ‘secundarias’ complica, en gran medida, el análisis del sistema. La búsqueda de parámetros válidos para el sistema se hace realmente ardua, ya que la intuición deja de ser suficiente. Explicaremos posteriormente la metodología utilizada para la obtención de estos parámetros.

2.3.1. Dinámica general

Ahora, con el sistema ya presentado, vamos a traducir éste a un modelo matemático basado en las herramientas desarrolladas en la Sección 1.1. Dado que el trato durante este apartado va a ser muy general, tomaremos el modelo completo. El simple puede obtenerse haciendo nulas las ‘amplitudes’ de las interacciones adicionales.

Dadas las dimensiones del problema (concentraciones de 6 proteínas distintas en una malla 2D), construimos el código de forma algebraica, haciendo uso de operaciones con ‘matrices’. En estas matrices se engloba toda la información sobre la ‘conectividad’ de las células y las distintas constantes de interacción entre componentes. Para más información consultar el Anexo D.

Para presentar las ecuaciones generales y hacer un desarrollo matemático optimizado asignamos un índice (número) a cada una de las proteínas. La opción tomada se presenta en la Tabla 3

Índice	1	2	3	4	5	6
Proteína	Hh	Dpp	H	Ato	Dl	N

Tabla 3: Asignación de índices a las diferentes proteínas.

Llegados a este punto, conviene conocer el significado de cada una de las expresiones que vamos a utilizar en nuestras ecuaciones de regulación. Esta información es adjuntada en forma de tabla en el Anexo A (Tabla 4).

Vista pues la simbología a utilizar, la forma general de la ecuación de regulación para un componente i será:

$$\partial_t C_i = D_i \nabla^2 C_i + \sum_j^A H_i^j h_i^j + \sum_j^I H_i^j \bar{h}_i^j - \mu_i C_i \quad (2.5)$$

donde el sumatorio A abarcaría los genes j activadores de i , mientras que el I actuaría sobre los inhibidores. En nuestro modelo tomaremos $n_i^j = 3 \forall i, j$ por carecer de la información necesaria para concretarlo y por ser un valor común en otros sistemas biológicos (pertenece al rango habitual).

Presentada ya la forma de la ecuación general de regulación pasamos, ahora, a exponer la característica de cada una de las proteínas obviando los términos nulos.

$$\partial_t C_1 = D_1 \nabla^2 C_1 + H_1^4 h_1^4 - \mu_1 C_1 \quad (2.6)$$

$$\partial_t C_2 = D_2 \nabla^2 C_2 + H_2^1 h_2^1 - \mu_2 C_2 \quad (2.7)$$

$$\partial_t C_3 = H_3^2 h_3^2 + H_3^1 \bar{h}_3^1 + H_3^5 \bar{h}_3^5 + H_3^6 \bar{h}_3^6 - \mu_3 C_3 \quad (2.8)$$

$$\partial_t C_4 = H_4^1 h_4^1 + H_4^2 h_4^2 + H_4^3 \bar{h}_4^3 + H_4^6 \bar{h}_4^6 + H_4^{1'} \bar{h}_4^{1'} - \mu_4 C_4 \quad (2.9)$$

$$\partial_t C_5 = H_5^1 h_5^1 + H_5^2 h_5^2 + H_5^6 \bar{h}_5^6 - \mu_5 C_5 \quad (2.10)$$

$$\partial_t C_6 = H_6^5 \bar{h}_6^5 - \mu_6 C_6 \quad (2.11)$$

Una vez vista la dinámica de regulación (de forma teórica), solo quedaría definir cuáles son los estados posibles de concentración para las distintas células.

Si hablamos únicamente de concentraciones ‘altas’ (que representaremos con el valor 1) o ‘bajas’ (0) de una determinada proteína, para el modelo completo se pueden encontrar solo 4 estados posibles: (1) que la célula esté en la zona anterior al MF ($C_i = (0, 0, 1, 0, 0, 0)$), o que esté en la zona posterior siendo de ‘tipo’ (2) *Notch* ($C_i = (1, 1, 0, 0, 0, 1)$), (3) *Delta* pero que no exprese *Atonal* ($C_i = (1, 1, 0, 0, 1, 0)$), o (4) R8 ($C_i = (1, 1, 0, 1, 1, 0)$).

Esta información será relevante a la hora de elegir las condiciones iniciales para las simulaciones de nuestros modelos.

Ahora, como es común en la física de sistemas complejos, antes de realizar ninguna simulación, intentamos adimensionalizar de la mejor forma posible las ecuaciones antes expuestas (2.6 - 2.11). El proceso se expone en el Anexo B, obteniéndose la ecuación de carácter general 2.12.

$$\frac{\partial \tilde{C}_i}{\partial \tau} = \tilde{D}_i \nabla^2 \tilde{C}_i + \sum_j^A \tilde{H}_i^j \frac{(\tilde{C}_i)^n}{(\tilde{K}_i^j)^n + (\tilde{C}_i)^n} + \sum_j^I \tilde{H}_i^j \frac{(\tilde{K}_i^j)^n}{(\tilde{K}_i^j)^n + (\tilde{C}_i)^n} - \tilde{C}_i \quad (2.12)$$

3. Aplicación de los modelos

Antes de tratar cada uno de los modelos vamos explicar brevemente cuál ha sido la metodología utilizada durante toda la parte práctica del trabajo.

En primer lugar, una vez diseñados los programas de simulación, para encontrar los resultados deseados debemos tener en cuenta dos aspectos importantes. Uno de ellos es el valor de los parámetros, las constantes ‘arbitrarias’ de los modelos (\tilde{H}_i^j , \tilde{K}_i^j , *etc.*). La búsqueda de estos parámetros es el trabajo más costoso en este tipo de problemas. El otro aspecto es el de las condiciones iniciales, ya que los sistemas no lineales tienen una fuerte dependencia de ellas.

Para poder obtener los valores de todas estas variables aplicamos principalmente la intuición. La construcción de estos modelos la realizamos de forma progresiva, introduciendo en primer lugar solo un par de variables. Una vez hallados parámetros orientativos para éstas, aumentamos la complejidad incluyendo más interacciones a la vez que adecuamos los parámetros ya obtenidos al nuevo sistema y deducimos los nuevos que entran en juego.

En algunos de los casos (a la hora de tratar con el modelo completo) la complejidad del sistema de ecuaciones nos ha obligado a utilizar herramientas propias del análisis de sistemas no lineales, los diagramas de fase.

Para intentar cumplir nuestros objetivos diseñamos dos programas principales diferentes. Uno de ellos realiza simulaciones en 1D, y el otro en 2D. Las simulaciones en 1D están enfocadas a clarificar el funcionamiento del modelo, y nos permitían observar de forma más precisa las concentraciones de cada proteína en cada una de las células involucradas (en 2D se hace necesario el uso de mapas de color). El programa en 1D solo permite observar el comportamiento del modelo presentado en la Figura 15 o el de modelos más simples. A niveles superiores encontramos ya la formación de patrones no homogéneos que requieren de una simulación en 2D, como es el caso del modelo presentado en la Figura 16.

Por todo esto, en el modelo unidimensional solo tratamos interacciones muy básicas enfocadas a ganar intuición del problema, encontrar parámetros o ver qué aspectos tiene en común con los resultados experimentales.

3.1. Modelo 1D

Para empezar, lo primero que debemos comprobar es la existencia de una onda con el sistema más simple propuesto, el presentado en la Figura 15. El modelo utilizado en primera instancia prescinde de Ato, estando esta proteína incluida en Hh. Las interacciones de Ato se tradujeron, en este caso, en una autoactivación de Hh.

En este modelo unidimensional tuvimos bastante éxito en los resultados, que se adecuan bastante bien a lo esperado. Una de las propiedades que se visualizan es la generación de una zona ‘preproneural’ debido a la interacción de Dpp [16] (véase la Figura 18). Otra característica esencial es la convergencia de la frontera a una forma estable (estacionaria). También medimos la velocidad a la que se propaga la onda, llegando a la conclusión de que es constante, como se ve en la Figura 19.

Se ha simulado una línea de 200 células, como se muestra en las Figuras 17 y 18. Las simulaciones se han realizado a partir de una condición inicial en la cual un cuarto de la línea de células se encontraba en la zona posterior al MF (proneural), y el resto en la anterior. Como frontera hemos implementado, en las condiciones iniciales, una función escalón. Esto es irrelevante para el desarrollo posterior de la simulación debido a la rápida convergencia del frente de onda a su ‘forma de equilibrio’, como se muestra en las Figuras 17 y 18.

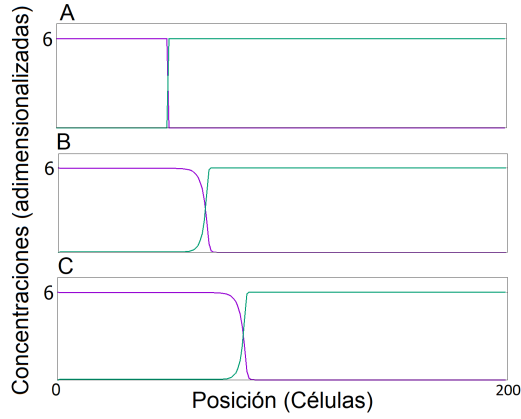


Figura 17: Concentraciones de Hh (morado) y *Hairy* (verde) en una línea de 200 células para el primer modelo simple en 1D. (A) $\tau = 0$ (B) $\tau = 10$ (C) $\tau = 20$. Los parámetros de simulación son expuestos en el Anexo C.1, Tabla 5.

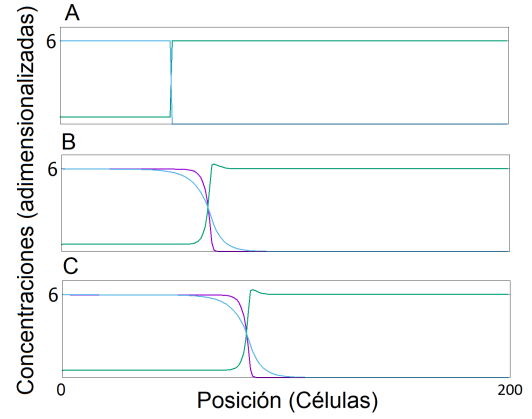


Figura 18: Concentraciones de Hh (morado), *Hairy* (verde) y Dpp (azul) en una línea de 200 células en el segundo modelo simple en 1D. (A) $\tau = 0$ (B) $\tau = 10$ (C) $\tau = 20$. Véase el incremento en H previo al paso de la onda. Esto define la zona ‘preproneural’ [16]. Los parámetros de simulación son expuestos en el Anexo C.1, Tabla 6.

En este modelo diseñamos también un programa que analiza los datos midiendo la velocidad de la onda. El cálculo se realiza observando la velocidad a la que se desplaza el punto donde se sitúa concentración media $(C_{max} + C_{min})/2$ de alguna de las proteínas. En la Figura 19 mostramos el cálculo de la velocidad para la situación de la Figura 18, donde hemos tomado la concentración de *Hairy* como la representante de la evolución del MF. No es difícil ver que la velocidad solo toma valores enteros. Esto se debe a que los valores de posición están cuantizados (no tiene sentido hablar de la célula 1,3 *p.ej*) y el intervalo de tiempo que transcurre cada vez que hacemos el cálculo es (en este caso) $\delta\tau = 1$.

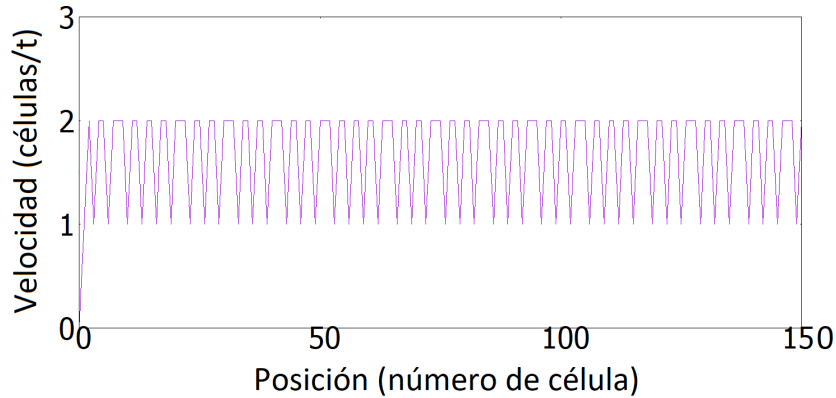


Figura 19: Velocidad de grupo del MF de la Figura 18. La velocidad media calculada (desde $\tau = 0$ hasta $\tau = 150$, ambos inclusive) es de $1,67 \pm 0,04$ u.a.. Los parámetros utilizados en esta simulación son los mismos que los de la Figura 18, expuestos en el Anexo C.1, Tabla 6

Tratado el modelo ‘minimal’, pasamos a introducir la proteína Ato, simulando el sistema de la figura 15 con todas sus interacciones. Las condiciones iniciales para estas simulaciones siguen el mismo criterio que las hasta ahora presentadas. También, pese a tener el sistema parametrizado para las proteínas Hh, Dpp y H, realizamos con Ato una simulación sin la influencia de Dpp (Figura 20) y otra con ella (Figura 21) para observar como afecta ésta al MF. La razón de realizar estas dos simulaciones y no diferenciar, por ejemplo con Hh, es debido a que Dpp no es esencial y, aparentemente, puede ser redundante.

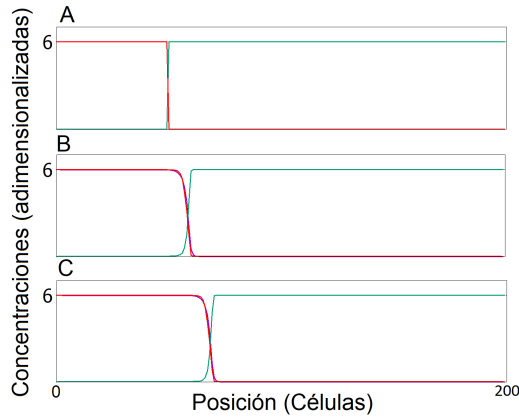


Figura 20: Concentraciones de Hh (morado), *Hairy* (verde) y Ato (rojo) en una línea de 200 células en un modelo sin Dpp (influencia contemplada en Hh). (A) $\tau = 0$ (B) $\tau = 10$ (C) $\tau = 20$. Los parámetros de simulación son expuestos en el Anexo C.1, Tabla 7.

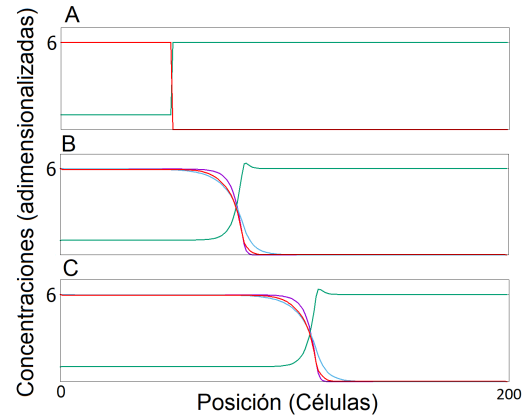


Figura 21: Concentraciones de Hh (morado), *Hairy* (verde), Dpp (azul) y Ato (rojo) en una línea de 200 células en un modelo con Dpp. (A) $\tau = 0$ (B) $\tau = 10$ (C) $\tau = 20$. Los parámetros de simulación son expuestos en el Anexo C.1, Tablas 8 y 9.

De los resultados de las figuras expuestas podemos concluir que la velocidad del MF está íntimamente ligada a las interacciones mediadas por Dpp. Otra conclusión importante que se extrae de la comparación entre estas dos figuras es la velocidad con la que decae la concentración de Ato en la frontera de la onda. El cambio en dicha concentración es más suave con intermediación de Dpp. Esto es debido a la activación de Ato por parte de Dpp, que difunde más que Hh. Por otro lado, con valores diferentes a los dados para los parámetros, se podría obtener el efecto contrario, ya que Dpp promueve un aumento en la concentración de *Hairy* previo al MF. Este grado de libertad que aporta Dpp, y su influencia en la velocidad de propagación del MF, puede ser relevante en la formación del patrón, lo que nos lleva a considerar Dpp como una proteína independiente y no agruparla con Hh.

Con esto concluimos el análisis en una dimensión. El programa utilizado para realizar estas simulaciones se adjunta en el Anexo D.1. También se exponen los programas de cálculo de la velocidad y de representación en los Anexos D.3 y D.4 respectivamente.

3.2. Modelo 2D

Una vez simulado nuestro modelo de forma exitosa en una dimensión pasamos a realizar simulaciones en 2D. Antes de exponer los resultados obtenidos vamos a explicar brevemente el entorno en el que se realiza la simulación. Como partes diferenciadas, aparte de la dinámica inherente al problema, tenemos: (1) el tipo de red creada entre las células (2) las condiciones de contorno en las que simulamos el modelo, y (3) las condiciones iniciales de las que partimos en las diferentes simulaciones.

En primer lugar, la red bidimensional tomada para la simulación es una red hexagonal. En nuestro caso es regular (no introducimos fluctuaciones en la posición estable de cada célula). Esto nos permite tratar la simulación de una forma más simple en el código, pues la distancia entre cada ‘unidad espacial’(cada célula) es siempre 1, facilitando el cálculo del laplaciano de las concentraciones de moléculas difusoras. Esta suposición es coherente con la realidad, pues es el patrón habitual en un tejido con células idénticas.

En el caso de las condiciones de contorno optamos por una única posibilidad en todas nuestras simulaciones. Esta consiste en un ‘tejido’ con delimitación rectangular con condiciones de contorno ‘cerradas’ en la dirección \hat{x} y condiciones de contorno periódicas en la dirección \hat{y} . Esta opción es coherente con un MF plano que se propaga en dirección \hat{x} , lo que consideraremos en todos los casos.

Una propiedad importante de este entorno es que no es ‘de dimensiones libres’, ya que el objetivo es el de formar un patrón no homogéneo y periódico. Esto obliga a que la longitud del sistema (en número de células) en la dirección \hat{y} (c.c. periódicas) sea múltiplo de la unidad mínima replicable de ‘tejido’ que forme la red. En nuestro caso esta ‘dimensión’ mínima será, sin ningún añadido al modelo base, de una célula en cada dirección ($\mathcal{D}_{min}|_0 = (1, 1)$). Una vez añadido el subsistema DI-N, el número de células en la dirección \hat{y} deberá ser múltiplo de tres, es decir, la dimensión mínima será $\mathcal{D}_{min}|_{DI-N} = (1, 3)$. Por último, introduciendo la inhibición retardada (Hh- \neg Ato), buscando el patrón que reproducen D. K. Lubensky *et al.* en [18], tenemos que $\mathcal{D}_{min}|_{i.r.} = (1, 9)$.

Finalmente, para dar por finalizada la discusión del entorno del sistema, tenemos las posibles condiciones iniciales con las que tratar. En este punto, a diferencia del resto, si que realizamos diversas simulaciones con distintas condiciones iniciales. Algunos ejemplos son los de un patrón DI-N ya formado en la parte posterior al MF, el establecimiento de distintas formas de la región posterior al MF, o la introducción de ruido en las concentraciones estándar. Para más información se adjunta el código empleado para las simulaciones y su explicación, junto con el de representación en los Anexos D.2 y D.5 respectivamente.

Visto esto, pasamos a presentar las diferentes ‘fases’ en el análisis de nuestro sistema, comenzando por obtener los parámetros que hacen funcional el modelo con las interacciones básicas.

3.2.1. Interacciones básicas

Con la metodología ya descrita conseguimos parametrizar el modelo presentado en la Figura 15 (que incluye a Hh, Dpp, H y Ato). Estas simulaciones no tienen mayor relevancia porque los resultados que aportan son los mismos que en el análisis unidimensional (debido a la homogeneidad del MF y a que se propaga como una onda plana). La realización de simulaciones con este modelo se centraron en comprobar que el programa funcionara bien y ajustar los parámetros (que no sufrían muchos cambios) a 2D.

Con este modelo no podemos desarrollar más el análisis del MF porque se puede demostrar (considerando $n \rightarrow \infty$ para realizar un análisis lógico del sistema) que es imposible mantener células en un estado de baja expresión de Ato en la parte posterior (la única manera es tener concentraciones de proteínas similares a las de las células en la región anterior al MF). Es por esto que se propone la introducción de otras dos interacciones: la interacción con DI-N y la de inhibición con retardo (Hh- \neg Ato). Con estas interacciones pretendemos que aparezca un patrón inhomogéneo de Ato en la parte posterior, como se evidencia en los experimentos [11, 12, 14, 16, 18, 19].

3.2.2. Introduciendo DI-N

Vimos ya en la sección 2.1 que DI-N era uno de los modelos aplicables al sistema del MF. Hemos elegido este subsistema como el regulador para la formación del patrón esperado, tras el paso del MF, por la cantidad de información experimental sobre su relación con el MF y por conocer bien sus interacciones [12, 14, 16, 17]. La interacción ‘más importante’ entre el sistema DI-N y el MF es la inhibición de Ato por *Notch*, que deriva en la formación de un patrón de ‘sal y pimienta’ quedando Ato expresado, únicamente, en células aisladas de la parte posterior.

El procedimiento que se siguió para la integración de DI-N en nuestro modelo (aparte de los cambios necesarios en el código) se hizo en dos pasos. El primero fue el de simular el modelo DI-N de forma aislada, para comprobar que tanto el código, como las ecuaciones, funcionaran correctamente y para encontrar el rango de los parámetros involucrados. Tras esto se simuló el modelo completo.

En este caso se intentó resolver alguna interacción de forma analítica (tratando el sistema como puertas lógicas, considerando $n \rightarrow \infty$), pues el sistema ya era demasiado complicado como para buscar los parámetros de forma intuitiva.

Una vez establecidos unos parámetros funcionales, pudimos simular el sistema, que presentaba ciertos problemas. En un primer momento realizamos simulaciones con variaciones en las concentraciones de los distintos componentes en las células de la parte posterior al MF (de no ser así no podría crearse un patrón inhomogéneo debido a la simetría en la interacción DI-N). Estas simulaciones no funcionaron, ya que el patrón DI-N que se forma está plagado de defectos en la estructura. Se observa que las células comienzan a diferenciarse en *Delta* o *Notch* en el frente del MF en un momento dado, lugar donde N promueve la diferenciación [16].

El otro tipo de simulación que realizamos fue partiendo de un patrón DI-N ya formado en la parte posterior al MF. En este caso el patrón evolucionaba bien, pero comenzaba a adelantar al MF, lo que no se adecuaba con los resultados experimentales. Posteriormente realizamos una simulación similar con un ajuste más fino de los parámetros. Esta última es la presentada en la Figura 22, de donde se pueden extraer varias conclusiones. La progresión del MF junto con el patrón DI-N es estable, aunque se observa un adelantamiento de este último. En la parte ‘preproneural’ (que aquí podemos definir como la que abarca la sección que ya ha comenzado a diferenciarse pero aún no presenta un patrón DI-N claro, de unas 3-5 células de grosor con nuestros parámetros), se puede ver como hay una columna en la que todas sus células aumentan la expresión de DI. Esto se puede explicar gracias a Dpp, que activa DI en esta región. Cuando concentraciones suficientemente altas de Hh llegan a estas células, el mayor incremento en DI, en aquellas que no tengan otra célula DI en estado ‘proneural’ cerca, hace a las demás adoptar el patrón de ‘sal y pimienta’. Se ve pues que en este modelo la acción de DI-N esta fuertemente regulada por Hh, Dpp y H.

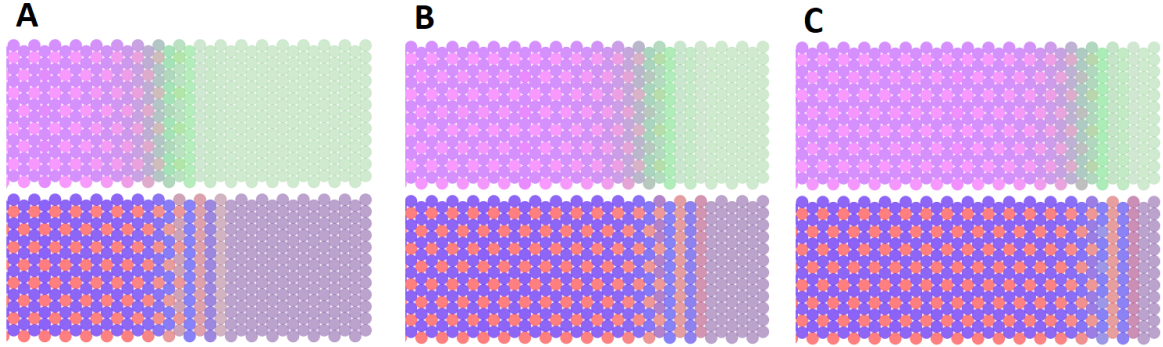


Figura 22: Simulación del modelo Delta-Notch implementado sobre el modelo básico para el MF. El grupo de células de la parte superior muestra las concentraciones de Hh (morado), Ato (rojo) y *Hairy* (verde). Las concentraciones altas de Ato las encontramos en las células de color ‘rosado’, donde Hh también está muy expresado. El grupo de células inferior presenta las concentraciones de DI (rojo) y Notch (azul). Dpp no se ha representado para no sobrecargar las imágenes. Las imágenes han sido tomadas a tiempos (A) 20 u.a., (B) 40 u.a. y (C) 50 u.a.. La condición inicial aplicada impone a un cuarto de la red concentraciones correspondientes a la parte posterior al MF (con el patrón DI-N ya formado correctamente), mientras que al resto se le asignan concentraciones previas al MF. Los parámetros de esta simulación se presentan en el Anexo C.2.

Como conclusiones de este modelo, que se pueden extraer de la Figura 22, todas las interacciones propuestas son relevantes, pues la inhibición de Ato por parte de N da como resultado un patrón con células R8 aisladas y una forma aproximada a la real (aunque no se cumplen las distancias entre estas en número de células). Por otro lado, se entiende que en la realidad el patrón DI-N debe formarse a la misma velocidad que el MF. Para esto, los parámetros se han elegido de forma que el mecanismo DI-N no pueda activarse en ausencia de Hh o Dpp [16] (que activan DI), lo que limita su velocidad de formación a la del MF.

3.2.3. Introduciendo la inhibición retardada

Ya explicamos en 2.3 que con el modelo construido hasta ahora no se podía generar el patrón deseado porque debíamos obtener un mayor espaciado entre las células que expresaran Ato. Para intentar lograr este objetivo introducimos la inhibición retardada de Ato por Hh. El origen de este retardo ya ha sido explicado previamente, y se debe a que esta interacción no es directa, si no que esta mediada por otras proteínas (como Sca o Bar) [18, 14, 19]. La inhibición implica la adición de una función de Hill que depende de la concentración de Hh a un tiempo $(\tau - \delta\tau)$. Esto también nos llevo a realizar algún cambio en la estructura del código (que debía ‘acordarse’ de la concentración de Hh durante un tiempo $\delta\tau$).

Esta nueva interacción plantea dos grandes problemas a la hora de intentar intuir qué puede ocurrir y qué valores deben tener los distintos parámetros. Uno de ellos es, precisamente, cómo puede afectar el retardo. El otro es la ‘incoherencia’ del sistema (Ato es activado e inhibido por Hh, aunque no al mismo tiempo). Dado lo complejo del problema comenzamos el tratamiento del sistema desde cero, donde ahora empezábamos por obtener los parámetros de las interacciones entre Hh y Ato.

Dado que no había un proceso concreto de interacción que nos pudiera guiar en la búsqueda de los parámetros óptimos, tuvimos que recurrir a estudiar los diagramas de fase. En este caso pudimos utilizarlos por haber sólo dos concentraciones involucradas. Para hacer un análisis fenomenológico optamos por considerar $n \rightarrow \infty$, quedando un diagrama de fase con funciones escalón. Eligiendo los parámetros adecuados, optamos por el diagrama de la Figura 23. Para que el sistema evolucione como nosotros queremos los parámetros deben cumplir (suponiendo $n \rightarrow \infty$): $\tilde{H}_4^1 > 1$, $\tilde{H}_1^4 > 1$, $\tilde{H}_4^{1'} \gtrsim 1$ y $\tilde{K}_4^{1'} < 1$. Las constantes primadas son las relativas a la inhibición retardada.

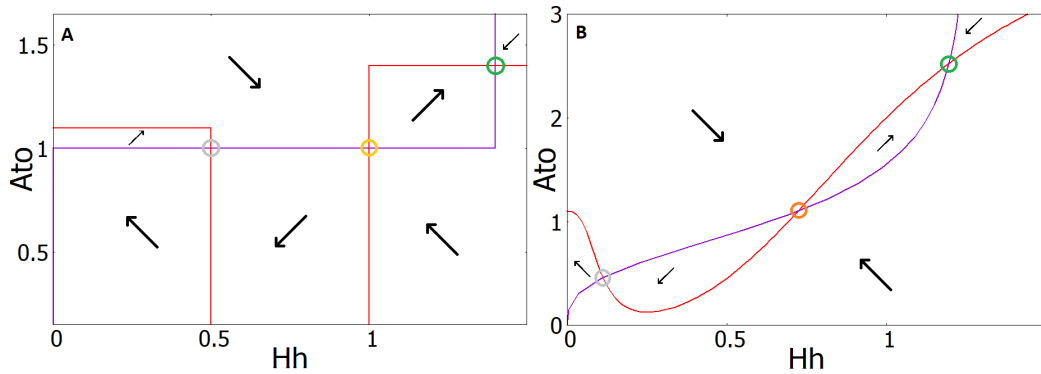


Figura 23: Diagramas de fase del sistema con parámetros que cumplen las condiciones $\tilde{H}_4^1 > 1$, $\tilde{H}_1^4 > 1$, $\tilde{H}_4^{1'} \gtrsim 1$ y $\tilde{K}_4^{1'} < 1$. En el caso (A) consideramos $n \rightarrow \infty$, en el caso (B) $n = 3$. La curva morada indica la nulclina $\partial_\tau Hh = 0$, y la roja $\partial_\tau Ato = 0$. La evolución aproximada del sistema en las distintas regiones se representa con las flechas negras. Los puntos fijos son señalados con círculos huecos. El de color verde representa un punto fijo estable, el amarillo un punto silla y el gris el centro de un ciclo límite. El ciclo límite se debe, en parte, al retardo en la interacción del sistema (mayor retardo implica un mayor radio). Los parámetros utilizados para ambos casos son expuestos en el Anexo. C.3, Tablas 14 (A) y 15 (B).

De la Figura 23 se pueden extraer algunas reflexiones. En primer lugar, la existencia de un sistema oscilatorio de pequeña amplitud a niveles bajos de Hh y Ato. Las células que se encuentran en este estado son las anteriores al MF, o las que posteriormente no expresan Ato. El punto estable es el estado en el que se encuentran las células que pasarán a diferenciarse a R8.

Una idea de qué debe pasar para lograr el patrón buscado es, primero, que *Hairy* mantenga a las células de la parte anterior al MF en el estado ‘bajo’ (el del ciclo límite). El paso del MF, que introduce por difusión una alta concentración de Hh y Dpp procedente de las células en el estado ‘alto’ (punto fijo estable), debería superar el punto silla para que las células pasaran a expresar Ato y Hh. Esto no plantea ninguna dificultad, ya que es similar a lo simulado hasta ahora. El problema se encuentra en disminuir la concentración de algunas de las células de la fase posterior. Se deduce que, para obtener un patrón con células R8 aisladas, éstas deben inhibir por algún mecanismo la producción de Hh o de Ato en las vecinas. La solución pasa por considerar la difusión en los diagramas de fase. La inyección por difusión de Hh se puede traducir por un desplazamiento en la nulclina $\partial_\tau Hh = 0$ (la morada), que se ‘aproximará’ hacia la concentración de Hh de las células vecinas. Esta modificación de la nulclina es presentada en la Figura 24 para dos casos distintos.

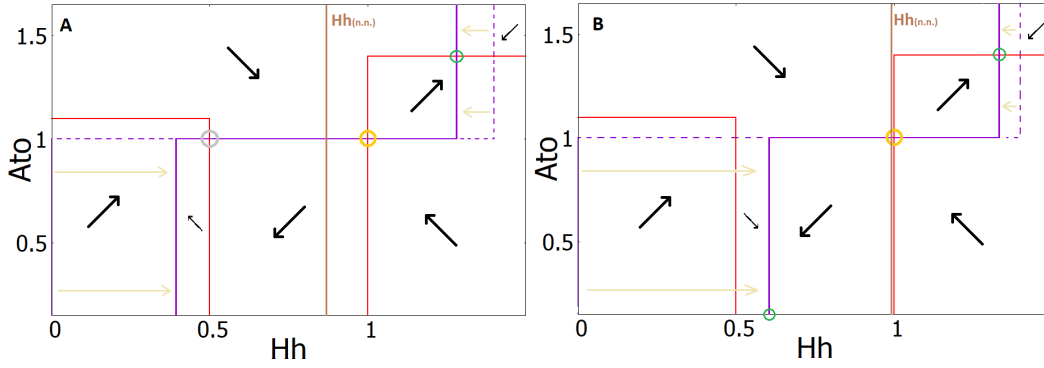


Figura 24: Diagramas de fase con las nulclinas $\partial_\tau Hh = 0$ (moradas) desplazadas debido a la difusión. En (A) se muestra un caso en el que el aporte de Hh por difusión no supera la constante de umbral $\tilde{K}_4^{1'}$, donde el mecanismo sigue funcionando de manera similar al original. En (B) el umbral es superado y el centro del ciclo límite desaparece a la vez que se forma un punto fijo estable con $Ato = 0$ y $Hh \in (\tilde{K}_4^{1'}, 1)$. Los efectos numéricos de la difusión no han sido calculados, de forma que puede no coincidir concretamente la nueva posición de la nulclina con la real, pero el efecto cualitativo es el mismo.

Esta última figura, pese a no aproximarse mucho a la realidad ($n \rightarrow \infty$), nos es de utilidad para tratar cualitativamente la influencia de la difusión en el sistema y proponer diversos mecanismos que puedan llevar a la formación del patrón deseado. Presentamos ahora en la Figura 25 un ejemplo de la simulación con los mismos parámetros que los empleados para la Figura 23 (B).

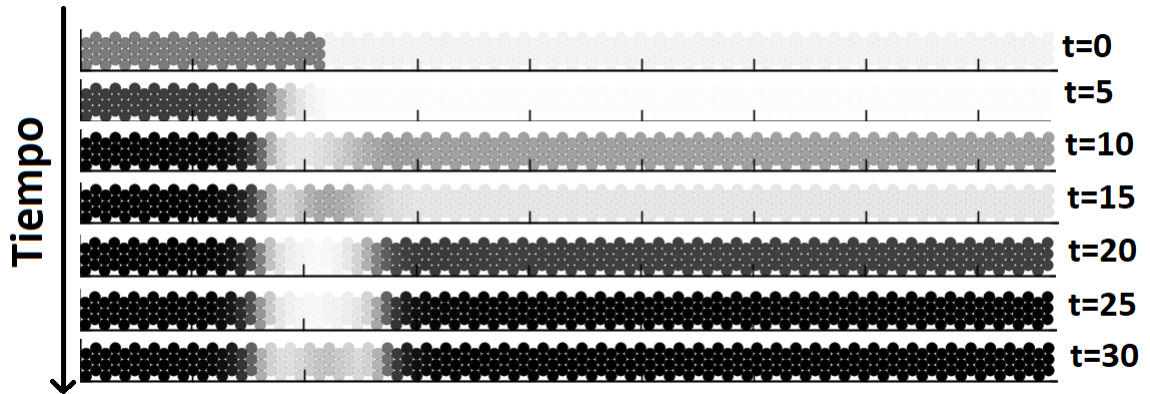


Figura 25: Concentración de Hh (en negro) en las distintas células para tiempos distintos. Simulación considerando Hh y Ato. La condición inicial de la simulación es la presentada a tiempo 0: Un cuarto de la red comienza con concentraciones que dirigen al punto fijo ‘alto’. El resto comienza con bajas concentraciones de Hh y Ato.

En la Figura 25 se pueden observar bastante bien los tres posibles comportamientos descritos por los diagramas de fase de la Figura 24. Al lado izquierdo vemos que las células alcanzan directamente el punto fijo estable ‘alto’. Las células de la derecha, que comienzan con niveles bajos de Hh y Ato oscilan en un primer momento (aunque después llegan al punto fijo, algo que podría ser solucionado introduciendo *Hairy*). Finalmente, las células de la frontera se mantienen a niveles bajos de Hh en todo momento, lo que quiere decir que están en el punto fijo estable ‘bajo’.

Haciendo referencia a lo anterior, pese a que las células de la frontera presenten una concentración baja de Hh, se visualiza una leve oscilación. Para explicar esto debemos aclarar que los diagramas de fase presentados en la Figura 24 no son estáticos a no ser que todas las células de la red hallan alcanzado un punto estable. Es decir, siempre que haya alguna célula en un ‘estado’ de ciclo límite ésta va a aportar una cantidad variable de Hh por difusión, lo que lleva a una ‘oscilación’ en la forma de la nulclina. Esto plantea un problema importante, pues este tipo de oscilaciones puede hacer que una célula adyacente a otra ya diferenciada en R8 pase del punto fijo ‘bajo’ (que estará muy próximo a $Hh \approx 1$) al ‘alto’. Este hecho se ve reflejado en la Figura 26, donde, una vez estabilizado el frente, avanza una columna de células por oscilación.

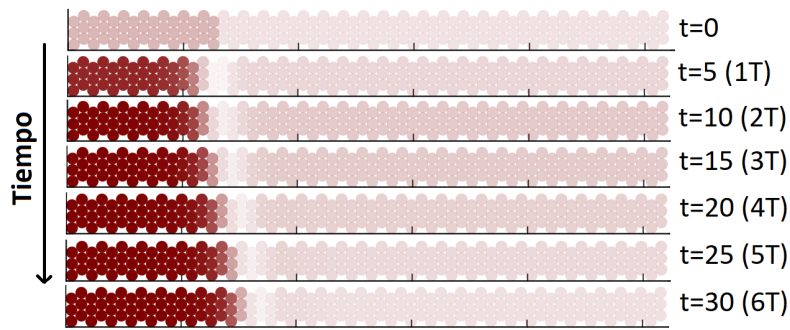


Figura 26: Concentración de Ato (color rojo) en cada célula de la red a diferentes tiempos. Simulación del sistema con Hh, Dpp y Ato. Los parámetros utilizados son los presentados en el Anexo C.3, Tablas 16 y 17. A la derecha de la imagen presentamos el tiempo en unidades arbitrarias y en número (aproximado) de periodos transcurridos. La velocidad de propagación del estado ‘alto’ de Ato es de una célula por periodo.

Todas estas simulaciones eran de ‘ámbito’ unidimensional y se podrían haber obtenido resultados similares en una fila de células². Intentamos simular un patrón con las características deseadas, situando las condiciones iniciales de todas las células en la zona posterior al MF. Sin embargo, o el ajuste de los parámetros no era el correcto, o era necesario considerar todas, o gran parte de las proteínas para que el modelo fuera funcional.

Pese a no poder profundizar más en este modelo, podemos extraer varias conclusiones. El resultado de mayor importancia es que la inhibición a células vecinas por parte de las R8 se puede dar de forma exitosa. Esto se puede ver en las Figuras 25 y 26, donde se ve una muy baja concentración de Hh y Ato en la frontera formada. Un mayor ajuste de los parámetros sería necesario para conseguir que de entre varias células contiguas con alta concentración de Ato, solo una mantuviera alta su expresión. Creemos que nuestro modelo completo (con ambas modificaciones simultáneamente) podría llevarnos a este estado, donde DI-N aseguraría aislar a las células R8, y la interacción retardada evitaría que se expresara Ato en las ‘células DI’ próximas.

²No se hizo ningún análisis en 1D por que el código no contemplaba las interacciones con retardo ni por ligandos y quedó obsoleto para realizar estos problemas. El código en 2D nos permitía extraer los mismos análisis, por lo que recurrimos a éste en vez de adaptar el primero.

4. Conclusiones

En este trabajo hemos tratado de la biología y modelización de la onda morfogenética que es responsable de la diferenciación celular de la retina del ojo de la mosca de la fruta ("*Morphogenetic Furrow*"). Esta onda es un excelente ejemplo de mecanismo de transporte de información genética para la diferenciación celular. Su comprensión y modelización han sido objeto de investigación en los últimos años, como se ha reflejado en esta memoria.

Se ha hecho una revisión de los hechos experimentales y de los modelos propuestos en la literatura relativos al MF. El detalle de la descripción de los circuitos genéticos involucrados varía ampliamente de un modelo a otro. De la misma manera, hemos encontrado algunas disparidades en las descripciones experimentales respecto a las proteínas y genes que participan en la propagación del MF. Todo ello nos ha llevado a un estudio sistemático de las distintas proteínas y su papel en este sistema.

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- El circuito genético correspondiente al MF es altamente complejo con interacciones redundantes que, posiblemente, respondan a un propósito de robustez del sistema. Este hecho hace que la elección adecuada de las proteínas relevantes sea complicada.
- La dinámica del circuito genético expresada en las ecuaciones 2.6-2.11 es altamente no lineal y presenta una fuerte dependencia de parámetros y condiciones iniciales.
- El modelo 'básico' representado por las interacciones entre las proteínas Hh, Dpp, *Hairy* y Ato es capaz de simular la propagación del MF a lo largo del tejido. Sin embargo, no permite por sí solo la modelización de la diferenciación celular en la parte posterior al MF.
- Proponemos dos mecanismos complementarios que permitirían simular el patrón celular tras el paso del MF. Estos serían:
 - La introducción del mecanismo *Delta-Notch* que produce un patrón 'sal y pimienta' (hexagonal) en la parte posterior al MF. *Notch* inhibe Ato produciendo células proneurales (R8) en las células con alto contenido de Dl. Este resultado se aproxima cualitativamente al patrón experimental, aunque las distancias entre dichas células no son las observadas.
 - La introducción de la inhibición retardada de Ato por parte de Hh. Este mecanismo está sugerido por algunos resultados experimentales [14, 19]. La dinámica de Ato con estas interacciones consiste en un punto estable de alta concentración (que corresponde a las células proneurales) y un ciclo límite de baja concentración.

Aunque nuestro modelo es exitoso en la representación del MF, el estudio detallado del estado de diferenciación posterior requeriría más trabajo con un ajuste preciso en los parámetros de los mecanismos propuestos anteriormente. De la misma manera, sería necesario un estudio sistemático de la robustez de los mecanismos propuestos, tanto de la propagación del MF como de la diferenciación frente a distintas fuentes de ruido.

5. Referencias

- [1] P. J. Blasco Hernández. *Sistemas dinámicos y expresión de genes: cómo se forman los patrones celulares*. Universidad de Zaragoza, Departamento de Física de la Materia Condensada, 2018.
- [2] ICMM-CSIC. <https://wp.icmm.csic.es/superconductividad/fisica-cuantica-y-transiciones/temperatura/fenomeno-emergente/>.
- [3] C21. <https://www.comunicacionycomplejidad.com/emergencia>.
- [4] S. Chien M. Gribskov L. T. Reiter, L. Potocki and E. Bier. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila Melanogaster*. *Genome Research*, 11(6):1114–1125, Junio 2001.
- [5] J. Theriot H. Garcia R. Phillips, J. Kondev. *Physical Biology of the Cell*. CRC Press (Taylor & Francis Group), 2012.
- [6] V. E. Deneke and S. Di Talia. Chemical waves in cell and developmental biology. *Journal of Cell Biology*, 217(4):1193–1204, January 2018.
- [7] D. W. Thompson. *On Growth and Form*. Cambridge University Press, 1917.
- [8] A. M. Turing. The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 237(641):37–72, 1952.
- [9] U. Alon. *An Introduction to Systems Biology*. Chapman & Hall/CRC, 2007.
- [10] E. Van Itallie E. L. O’Brien and M. R. Bennett. Modeling synthetic gene oscillators. *Elsevier (Mathematical Biosciences)*, 236:1–15, Enero 2012.
- [11] A. Weizman E. Schejter B.Z. Shilo A. Gavish, A. Shwartz and N. Barkai. Periodic patterning of the *Drosophila* eye is stabilized by the diffusible activator scabrous. *Nature Communications*, 7(10461):1–10, Febrero 2016.
- [12] T. Suzuki M. Sato and Y. Nakai. Waves of differentiation in the fly visual system. *Elsevier (Developmental Biology)*, 380:1–11, April 2013.
- [13] A. E. Hakes E. G. Contreras A. H. Brand D. J. Jörg, E. E. Caygill and B. D. Simons. The proneural wave in the drosophila optic lobe is driven by an excitable reaction-diffusion mechanism. *eLife*, pages 1–34, February 2019.
- [14] J.Y. Roignant and J. E. Treisman. Pattern formation in the drosophila eye disc. *The international journal of developmental biology*, 53:795–804, May 2009.
- [15] A. J. Koch and H. Meinhardt. Biological pattern formation: from basic mechanisms to complex structures. *Reviews of Modern Physics*, 66(4):1481–1507, October 1994.
- [16] A. Baonza and M. Freeman. Notch signalling and the initiation of neural development in the drosophila eye. *Development*, 128:3889–3898, July 2001.
- [17] W. Fu and N. E. Baker. Deciphering synergistic and redundant roles of hedgehog, decapentaplegic and delta that drive the wave of differentiation in *Drosophila* eye development. *Development*, 130:5229–5239, Julio 2003.
- [18] B. I. Shraiman D. K. Lubensky, M. W. Pennington and N. E. Baker. A dynamical model of ommatidial crystal formation. *PNAS*, 108(27):11145–11150, July 2011.
- [19] M. Dominguez. Dual role for hedgehog in the regulation of the proneural gene atonal during ommatidia development. *Development*, 126:2345–2353, May 1999.
- [20] P. K. Maini J. R. Collier, N. A. M. Monk and J. H. Lewis. Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *Journal of Theoretical Biology*, 183:429–446, August 1996.