



UNAM-UMSNH

---

CENTRO DE CIENCIAS MATEMÁTICAS  
POSGRADO CONJUNTO

MODELO MATEMÁTICO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR  
DE NEUROSPORA CRASSA

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MATEMÁTICAS

PRESENTA:  
DANIEL SANTANA QUINTEROS

DIRECTOR DE TESINA:  
DRA. ELISA DOMÍNGUEZ HÜTTINGER



MORELIA, MICHOACÁN

AGOSTO, 2022

# Modelo matemático de la diferenciación celular de *Neurospora crassa*

Daniel Santana Quinteros

17 de agosto de 2022

## Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Planteamiento del problema	2
4. Datos experimentales que describen la respuesta bioquímica ante ambientes oxidantes en <i>N. crassa</i>	3
5. Modelo matemático mínimo de regulación de <i>ROS</i>	6
6. Derivación analítica de condiciones para existencia de oscilaciones de relajación en <i>ROS</i> y <i>XH</i>	9
7. Ajuste de parámetros: en búsqueda de una concordancia cuantitativa del modelo con los datos experimentales	13
8. Resultados	14
9. Conclusiones y perspectivas	14

## Índice de figuras

1. Datos experimentales . . . . .	4
2. Escalas temporales . . . . .	5
3. Modelo mínimo de interacciones . . . . .	6
4. Ceroclinas en cuasi-equilibrio . . . . .	10
5. Simulación numérica ajustada . . . . .	15

## Índice de tablas

1. Variables . . . . .	7
2. Reacciones . . . . .	7
3. Regulaciones . . . . .	7
4. Matriz de estequiometría . . . . .	8
5. Parámetros y unidades . . . . .	11

## 1. Resumen

*Neurospora crassa* es un hongo ampliamente estudiado para entender diversos procesos biológicos. Uno de estos fenómenos es la diferenciación celular que emerge como respuesta de adaptación ante condiciones ambientales

adversas, por ejemplo, ambientes hiper-oxidantes (abundantes en oxígeno) que generan una sobre-acumulación intercelular de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés). De no producirse esta adaptación ante altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, el hongo podría morir.

Este trabajo plantea un modelo matemático mínimo que representa los mecanismos bioquímicos regulatorios suficientes y necesarios que subyacen la diferenciación celular en *N. crassa* mediada por especies reactivas de oxígeno. Se deducen analíticamente las condiciones necesarias para mostrar las oscilaciones de relajación sobre la concentración intercelular de *ROS* que caracterizan el ciclo reproductivo asexual. Utilizando algoritmos tipo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) logramos ajustar los parámetros del modelo a datos que describen experimentalmente la dinámica de las principales variables intercelulares (*ROS*, poder reductor y biomasa) que procesan los ambientes hiper-oxidantes.

Se logró demostrar la existencia de oscilaciones de relajación en el modelo propuesto y se confirmó mediante integración numérica estableciendo rangos paramétricos de ajuste con el uso de MCMC.

**Palabras clave:** *Biología de sistemas, diferenciación celular, especies reactivas de oxígeno, optimización paramétrica, respuesta bioquímica*

## 2. Abstract

*Neurospora crassa* is a very studied fungus to understand diverse biological processes. One of these phenomena is the cellular differentiation that arises as an adaptation response to adverse environmental conditions, for example, hiper-oxidant environments (rich in oxygen) that generate an intercellular over-accumulation of reactive oxygen species (*ROS*). If this adaptation to reactive oxygen species is not produced the fungus can die.

This work proposes a minimal mathematical model that represents the regulatory biochemical mechanisms necessary and sufficient underlying the cellular differentiation in *N. crassa* mediated by reactive oxygen species. Are analytically deduced the necessary conditions to show the relaxation oscillations on the intercellular concentrations of *ROS* which characterize the asexual reproductive cycle. By de use of algorithms Markov Chain Montecarlo (MCMC) like we achieved to adjust the model's parameters to data that describes experimentally the dynamics of the principal intercellular variables (*ROS*, reducin power, and biomass) which processes the hiper-oxydant environments.

was achieved to show the existence of relaxation oscilations in the proposed model and was confirmed by the use of numerical integration.

**key words:** *Systems biology, cellular differentiation, reactive oxygen species, parametric optimization, biochemical response*

## 3. Planteamiento del problema

La modelación matemática de sistemas biológicos, permite entender cómo las observaciones empíricas emergen de las interacciones dinámicas entre distintos componentes regulatorios. Una de estas propiedades emergentes es la diferenciación celular, proceso por el cual una célula cambia su estructura de manera que pueda realizar una función usualmente mas especializada. Ésta diferenciación surge como consecuencia directa de las complejas interacciones entre diferentes redes de regulación intercelular. Considerando esto la diferenciación celular se puede entender como un proceso de toma de decisiones en respuesta a señales ambientales: el ambiente funge como entrada del sistema, éste procesa dichas señales intercelulares para tomar una decisión fenotípica (estadio de diferenciación celular), siendo ésta la salida del sistema.

El desarrollo es una secuencia de eventos de diferenciación celular y por tanto, se puede entender como una propiedad dinámica que emerge de la interacción entre fenotipos celulares (estadio de diferenciación) y micro-ambientes en los que se desarrollan (Cosentino y Bates, 2012; Iglesias *et al.*, 2007; Johan Åström y Murray, 2010; Wolkenhauer *et al.*, 2005). Uno de estos procesos de diferenciación celular en respuesta a ambientes cambiantes se observa en la maduración asexual del hongo *Neurospora crassa* (*N. crassa*), la cual ocurre como consecuencia de su exposición ante ambientes hiper-oxidantes.

En este contexto micro-ambiental, el oxígeno es un elemento muy tóxico pero de gran importancia para el desarrollo de la vida. Por un lado, muchas reacciones químicas dependen del oxígeno como receptor final de electrones (Hansberg *et al.*, 2008). Por otro lado, su presencia en el medio intracelular favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (*ROS*) y en consecuencia de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se debe a la presencia de moléculas inestables altamente reactivas, las cuales resultan nocivas por que son capaces de romper enlaces en otras moléculas restando estabilidad a sus estructuras, éste proceso eventualmente puede llevar a la muerte celular.

*N. crassa* es un hongo modelo ampliamente estudiado y caracterizado experimentalmente. En respuesta a atmósferas oxidantes, éste presenta un ciclo reproductivo asexual de 3 etapas marcadamente diferenciables. Cada una de ellas se caracteriza por la formación de estructuras especializadas denominadas respectivamente, hifas adherentes,

hifas aéreas y conidios. Numerosos estudios experimentales (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 1993, 2008; Lledías *et al.*, 1998; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, 1995) han reportado que la transición entre cada uno de los tres estadios de diferenciación en *N. crassa* es precedida por un aumento marcado pero transitorio en la concentración intercelular de especies reactivas de oxígeno. Además la formación de cada una de estas estructuras especializadas va acompañada de un aumento en la capacidad antioxidante, dado por un aumento en la tasa de expresión de catalasa (Michán *et al.*, 2002). Colectivamente estas observaciones sugieren que el desarrollo de *N. crassa* puede entenderse como un mecanismo de adaptación ante el estrés oxidativo.

En este trabajo se busca dilucidar los procesos bioquímicos regulatorios necesarios y suficientes, que subyacen la diferenciación de *N. crassa* mediada por especies reactivas de oxígeno. Para ello, proponemos un modelo matemático mínimo que representa los mecanismos subcelulares de respuesta a oxígeno extracelular y que los vincula con la diferenciación de *N. crassa* (objetivo 1). El modelo integra información empírica que describe los diferentes componentes regulatorios del sistema en un marco explicativo formal y coherente. Derivamos analíticamente las condiciones suficientes y necesarias para que el modelo reproduzca las oscilaciones de relajación de ROS que caracterizan la dinámica de diferenciación de *N. crassa* (objetivo 2). Usamos algoritmos tipo Markov Chain Monte Carlo (MCMC; inferencia bayesiana) para ajustar los parámetros integrando información empírica de seis conjuntos de datos experimentales (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, 1995, 1986), logrando que las simulaciones numéricas de nuestro modelo reproduzcan cualitativamente estos datos empíricos y cuantitativamente los tiempos de diferenciación celular.

La metodología que se usó logró mostrar la existencia de oscilaciones de relajación en conjunto con las condiciones necesarias y suficientes para su existencia. El ajuste mediante MCMC logró ajustar datos cualitativos respetando e integrando condiciones cualitativas al tiempo que genera información sobre la distribución de los parámetros más probables que explican las observaciones registradas.

## 4. Datos experimentales que describen la respuesta bioquímica ante ambientes oxidantes en *N. crassa*

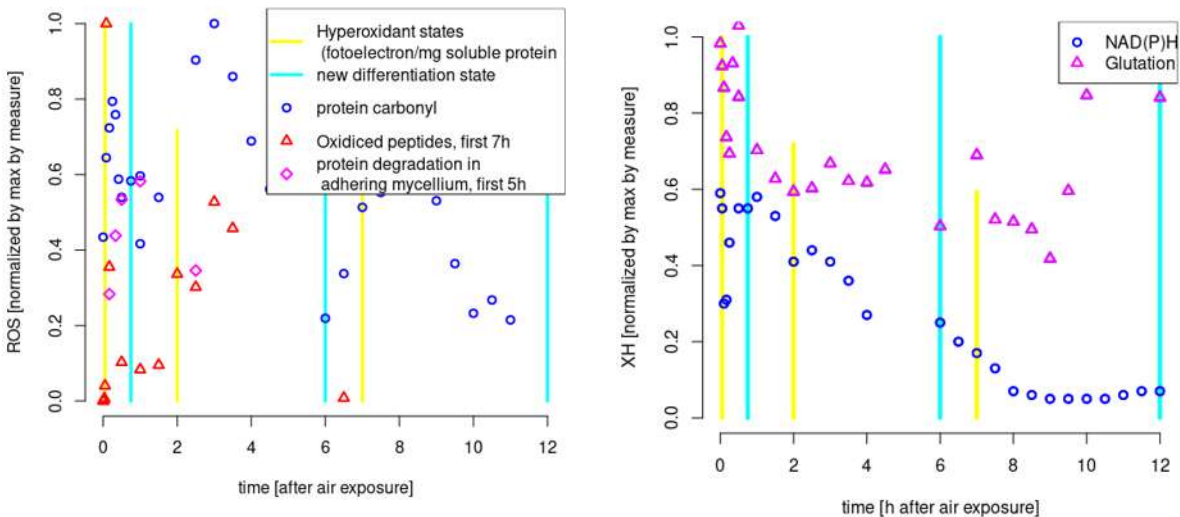
La respuesta regulatoria a ambientes oxidantes y sus consecuencias fenotípicas y ontogenéticas (relativas al proceso de desarrollo) ha sido ampliamente caracterizada de forma empírica en *N. crassa* (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, 1995, 1986). En estos experimentos de caracterización, típicamente se aumenta la concentración de oxígeno extra-celular de manera abrupta (incrementando de  $1\mu M$  a  $200\mu M$  por mg de proteína soluble) y se miden las concentraciones internas de especies reactivas de oxígeno (*ROS*), de potencial reductor (*XH*) y de esqueletos reducidos de carbono (*RCS*) (figura 1). El potencial reductor de una sustancia se refiere a su capacidad para reducir (brindar electrones) a otra sustancia por lo cual resulta vital en el medio intra-celular para realizar diversas tareas, entre ellas el control de *ROS*.

Respecto a las mediciones de *ROS*, contamos con seis conjuntos de datos (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, 1995, 1986) correspondientes a las mediciones de distintas variables de manera experimental. Los datos registrados se agrupan en cuatro clases:

1. Los picos de *ROS* registrados corresponden al número de fotoelectrones por miligramo de proteína y fueron medidos a los tres minutos, dos horas y siete horas tras la exposición del micelio al ambiente rico en oxígeno (Toledo *et al.*, 1991, 1995); además se cuenta con el registro del número de fotoelectrones contabilizados en estos tiempos, lo cual también muestra su amplitud decreciente (figura 1a)
2. Los péptidos oxidados son tomados como medida indirecta de las cantidades de *ROS* presentes (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1986)
3. Contenido de carbonilo medido en nano moles por mg de proteína soluble (Toledo y Hansberg, 1990).
4. Las proteínas degradadas también se consideraron correlacionadas con las cantidades presentes de *ROS* (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1986)

Como se aprecia en la figura 1a (y figura 2 con más detalle) se presentan tres incrementos abruptos de ROS en las mediciones correspondientes a fotoelectrones/mg proteína soluble y a contenido de carbonilo. Debido a la estabilidad de la muestra, las mediciones de proteínas oxidadas y de degradación de proteínas son confiables solamente durante las primeras 7 y 5 horas post exposición a oxígeno respectivamente, por lo que solamente se aprecian dos y un pico respectivamente.

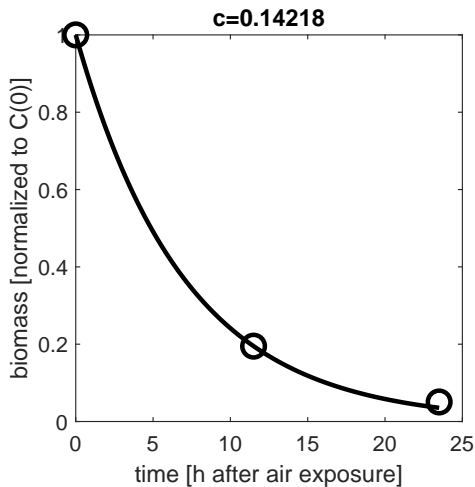
Con respecto a las mediciones de potencial reductor contamos con tres conjuntos de datos correspondientes a mediciones de NAD(P)H y Glutation (Hansberg *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 1991, 1995), dichos conjuntos corresponden



(Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg *et al.*, 2008; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1986) (Hansberg *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 1991, 1995)

(a) ROS

(b) XH



(Hansberg datos no publicados)

(c) RCS

Figura 1: *Datos experimentales*, extraídos del artículo indicado correspondiente y normalizados sobre el máximo de cada molécula medida. Líneas amarillas indican estados hiper-oxidantes con altura proporcional al número de foto-electrones (por mg de proteína soluble) registrado, las líneas azules marcan el proceso de diferenciación celular y los puntos (figuras geométricas) corresponden a las mediciones normalizadas. La línea negra corresponde al ajuste exponencial sobre los datos de biomasa (círculos negros), los cuales se ajustan a una constante de decaimiento  $c = 0.14218$ . Las gráficas respectivas son a) *Especies reactivas de oxígeno*, b) *Potencial reductor*, c) *Biomasa*.

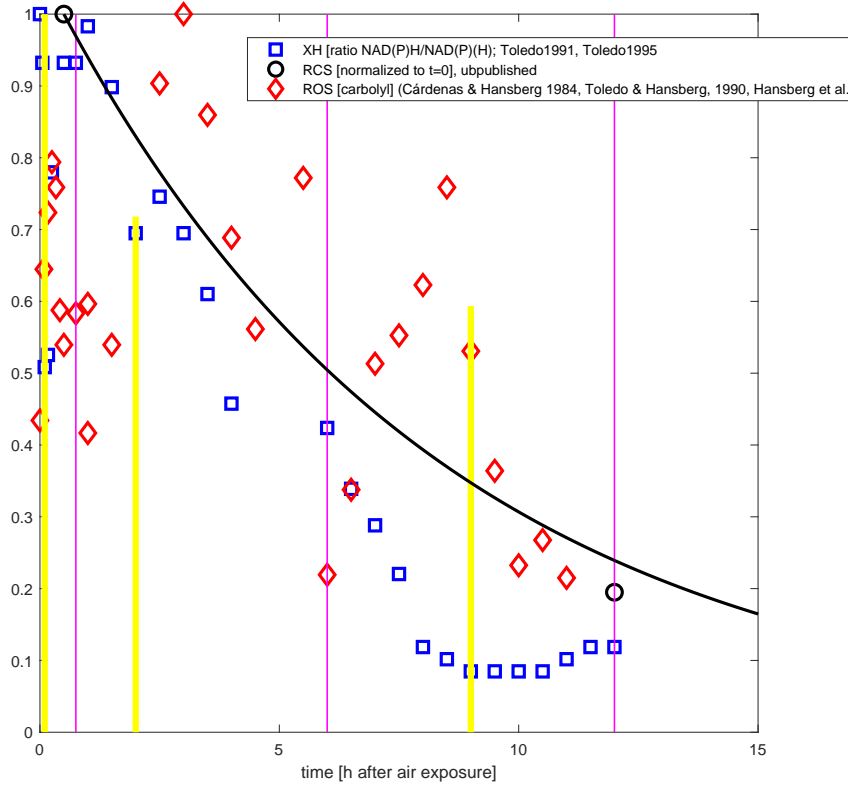


Figura 2: *Escalas temporales*. Normalizando los datos como se indica en la figura, se observa con mayor claridad el comportamiento decreciente que presentan todas las variables de interés. Se observa la disminución de  $XH$  por debajo del comportamiento general durante los picos de  $ROS$ , lo cual se corresponde con el conocimiento empírico siendo  $XH$  empleado en el control de  $ROS$ .

a mediciones promedio obtenidas sobre varias replicas del respectivo experimento. En la figura 1b se muestran los datos de potencial reductor en los cuales se observa una disminución exponencial que, inmediatamente después de los picos de  $ROS$  se acentúa drásticamente pero de forma transitoria, con amplitudes y frecuencias que decrecen conforme avanza el proceso de desarrollo. En otras palabras, observamos también para  $XH$  el comportamiento de oscilaciones de relajación, aunque -a diferencia de  $ROS$ - para  $XH$  estas oscilaciones de relajación ocurren sobre una curva exponencial decreciente (figura 2).

Este comportamiento cualitativo se aprecia de forma más clara en las mediciones de  $NAD(P)$ ; en las mediciones de Glutacion, dicho comportamiento se aprecia con mas claridad en las primeras 6 horas, antes de que se comienzan a formar las hifas aéreas.

Para los esqueletos reducidos de carbono, contamos con datos (Hansberg, datos no publicados) de biomasa del hongo en tres tiempos post-exposición a oxígeno. Se aprecia un decaimiento exponencial, lo que sugiere que la degradación lineal de los RCS contribuye de manera importante a su dinámica.

Observe sin embargo en la figura 1c que el número de mediciones para los RCS es significativamente más modesto que para las otras dos variables de estado, aunque los tiempos de medición son más extendidos.

En adición a lo anterior, también conocemos de la literatura (Toledo *et al.*, 1991) los tiempos post-exposición a oxígeno en los cuales ocurren las transiciones entre cada uno de los tres estadios de diferenciación celular:

- A los 45 minutos se forman las hifas adherentes
- A las 6 horas se forman las hifas aéreas
- A las 12 horas se forman los conidios

En suma, el comportamiento cualitativo a replicar con el modelo son oscilaciones de relajación para  $ROS$  y  $XH$ , donde para  $XH$  éste es ponderado por una exponencial decreciente que sigue la dinámica de RCS. Así mismo el comportamiento cuantitativo que se desea ajustar corresponde a los tiempos donde ocurren los picos de  $ROS$ .

Tabla 1: *Variables.*

variable	descripción	unidades
$t$	tiempo post-exposición a oxígeno	minutos
$RCS$	Esqueletos reducidos de carbono	Adimensional
$ROS$	Especies reactivas de oxígeno	Adimensional
$XH$	Potencial reductor	Adimensional

Tabla 2: *Reacciones.*

nombre	precursor	producto	reguladores	constante cinética	descripción
R1) Oxidation	$XH$	$ROS$	$K_O(ROS(t))$	$d_{OX}$	Producción de $ROS$ ante exposición a oxígeno
R2) Nut Perm	$\phi$	$XH$	$K_N(ROS(t))$		Ingreso de nutrientes al medio intra-celular
R3) OxC	$ROS$	$RCS$	$d_{ROS}(ROS(t))$		Degradación de proteínas por desequilibrios de $ROS$
R4) AO	$ROS$	$\phi$	$EAO(ROS(t))$		Actividad enzimática en el control de $ROS$
R5) RCS consumption	$RCS$	$XH$		$c$	Generación de $XH$ a partir de $RCS$
R6) Respiration	$XH$	$\phi$	$K_O(ROS(t))$	$d_{Res}$	Procesos de respiración celular
R7) CoE degradation	$XH$	$\phi$	$d_p(ROS(t))$		Mecanismos de estabilización y reparación del ADN
R8) Cell growth	$XH$	$\phi$		$d_{XH}$	Consumo de recursos en crecimiento celular
R9) XH diffusion	$XH$	$\phi$	$k_N(ROS(t))$		Pérdida de $XH$ por efectos difusivos en la membrana celular

## 5. Modelo matemático mínimo de regulación de $ROS$

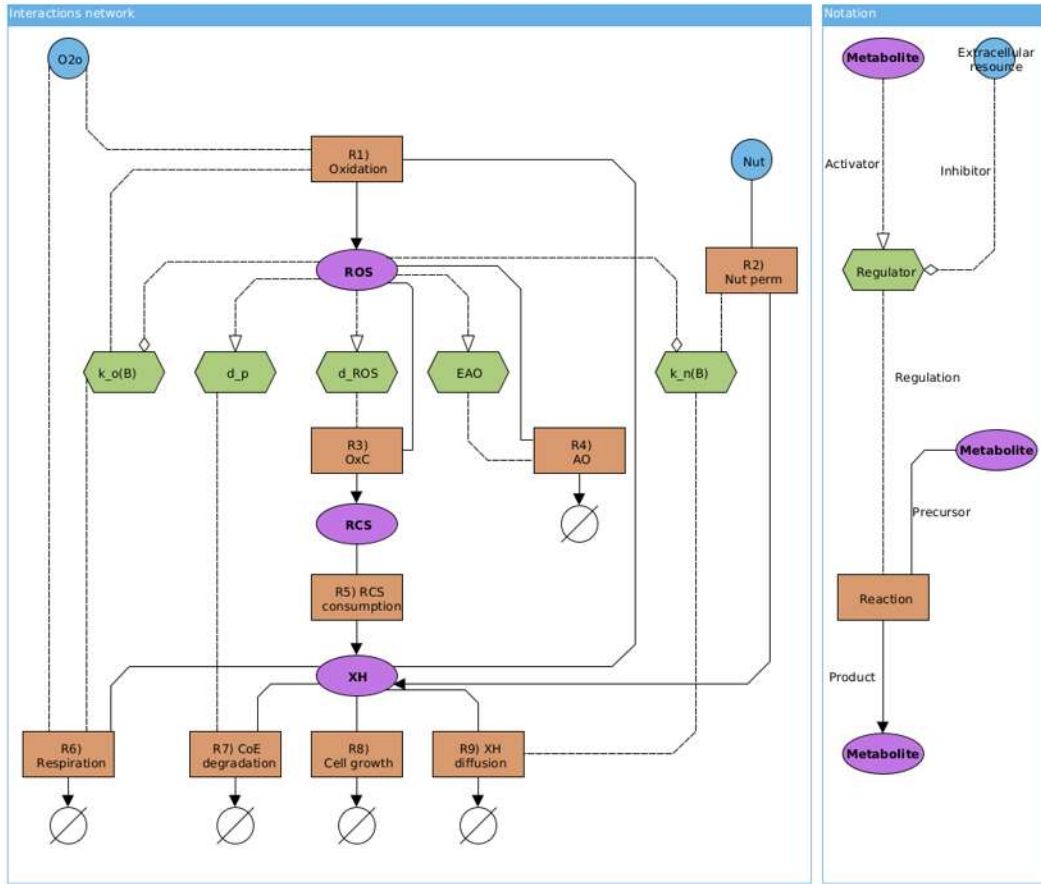
El objetivo de este trabajo es entender cómo la dinámica de diferenciación asexual de *N. crassa* (figura 1) emerge como respuesta a condiciones oxidantes. Para ello, proponemos un modelo matemático mínimo que represente los mecanismos regulatorios (figura 3a) conformados por las interacciones entre  $ROS$ ,  $XH$  y  $RCS$ .

Estos mecanismos representan hipótesis explicativas basadas en observaciones experimentales de distintos autores (Cárdenas y Hansberg, 1984; Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 1993, 2008; Lledías *et al.*, 1998; Toledo y Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, 1995).

Las entradas del sistema ( $O_2$ ,  $Nut$ ) son procesadas por las variables internas ( $ROS$ ,  $XH$ ,  $RCS$ ) por medio de nueve reacciones enzimáticas que se detallan en la tabla 2. De éstas reacciones, siete son mediadas por tasas cinéticas cuyo valor cambia de forma abrupta cuando  $ROS$  alcanza valores críticos (hexágonos verdes en figura 3a;  $k_N$  y  $k_O$  tienen efecto sobre dos reacciones cada uno). El comportamiento discontinuo de estas cinco regulaciones (tabla 3) se divide en dos categorías: Para  $k_o$ ,  $k_n$  y  $EAO$ , su valor aumenta de manera abrupta cada vez que la concentración de  $ROS$  excede un valor umbral (denominado  $R^+$ ), conllevando a un aumento gradual y acumulativo de los valores correspondientes conforme avanza el proceso ontogenético (figura 3b[i]). Por otro lado, el consumo de  $ROS$  y de  $XH$  ( $d_{ROS}$  y  $d_p$  respectivamente) también aumentan de manera abrupta pero reversible en función de  $ROS$ ; con valores altos (max) cuando  $ROS > R^+$  y bajos (min) cuando  $ROS < R^-$ . En la región de histéresis, comprendida entre los umbrales de desactivación (R-) y activación (R+), el valor de  $d_{ROS}$  y de  $d_p$  depende de sus valores anteriores, y por tanto son dos reacciones con memoria (3b[ii]). Para reducir el espacio de búsqueda, el ajuste paramétrico consideró los valores 'min' iguales a cero.

Al describir matemáticamente la red de respuesta a ambientes oxidantes, se asumió que el sistema:

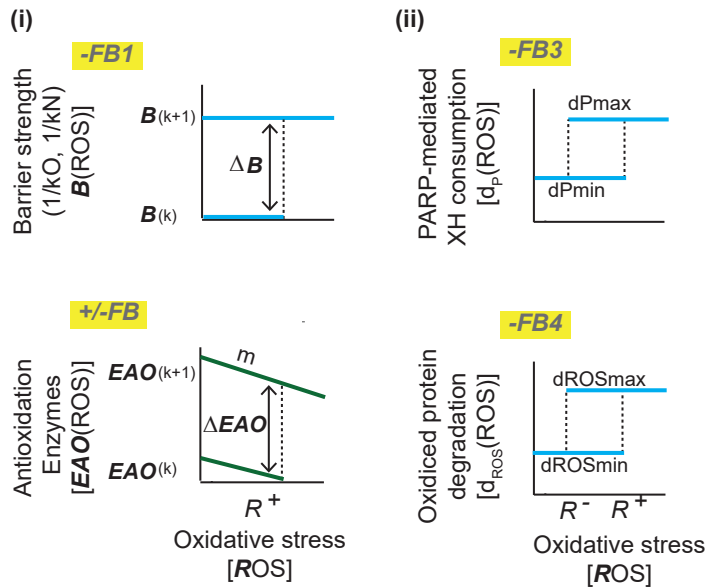
1. Está bien mezclado; dado que estamos estudiando el comportamiento promedio de un grupo razonablemente grande de biomoléculas intercelulares, podemos asumir que en promedio la producción y consumo de cada variable dinámica está uniformemente distribuido.
2. Hipótesis del medio continuo; análogo y complementario al punto anterior, dado que estudiamos cantidades suficientemente grandes sobre las que analizamos el comportamiento promedio, podemos asumir éstas cantidades pueden tomar cualquier valor fraccionario y así tratarlas como variables continuas.
3. Se comporta de forma determinista; si bien a nivel molécula aislada el comportamiento dominante es estocástico,



(a) Red de interacciones.

Red de interacciones que subyace la respuesta de *N. crassa* a ambientes oxidantes.

En líneas sólidas se representan reacciones y en líneas punteadas las vías de regulación. Flechas sólidas indican el producto de una reacción, flechas vacías muestran regulación positiva y rombos vacíos regulación negativa. Hexágonos indican regulaciones (subfigura b), rectángulos corresponden a reacciones, elipses a variables dinámicas y círculos a entradas del sistema (medio extra-celular). Cada reacción se corresponde con su ecuación mediante ley de acción de masas multiplicando las concentraciones de los precursores con el correspondiente regulador o constante cinética.



(b) Reguladores modulados abruptamente por ROS.

i) Interruptores irreversibles ii) Interruptores con histéresis

Figura 3: Modelo mínimo de interacciones



Tabla 3: *Regulaciones*. Los paréntesis hacen explícito de quien depende cada función.

nombre	descripcion	reacciones
i) irreversibles		
$K_O(ROS(t))$	permeabilidad de membrana al ingreso de oxígeno	R1, R6
$K_N(ROS(t))$	permeabilidad de membrana al ingreso de nutrientes	R2, R9
$EAO(ROS(t))$	Actividad enzimática en el control de $ROS$	R4
ii) reversibles		
$d_{ROS}(ROS(t))$	tasa de degradación de $ROS$	R3
$d_p(ROS(t))$	tasa de degradación de $XH$ debido a mecanismos de control de $ROS$	R7

Tabla 4: *Matriz de estequiometría*

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
$XH$	-	+	0	0	+	-	-	-	-
$ROS$	+	0	-	-	0	0	0	0	0
$RCS$	0	0	+	0	-	0	0	0	0

al estudiar conjuntos suficientemente grandes de moléculas podemos despreciar el comportamiento estocástico dado que en promedio, estas se comportan de forma determinista.

Para representar las nueve reacciones enzimáticas se utilizó la ley de acción de masas, que asume bajo suposiciones del medio bien mezclado y la hipótesis del medio continuo, que la tasa de reacción de un químico es proporcional al producto de las concentraciones de los reactantes.

Las relaciones estequiométricas que resumen, cómo estas reacciones consumen y producen las variables de estado del modelo están representadas en la tabla 4, en ésta se indica el sentido en que afecta cada reacción a cada una de las variables involucradas, así columnas con signo negativo representan degradación, con signo positivo muestran creación y aquellas con signos tanto negativos como positivos indican reacciones de transformación.

Para representar los cambios abruptos en las constantes cinéticas (figura 3b) se asumieron valores definidos a trozos, cuyo valor cambia toda vez que la concentración de  $ROS$  excede el umbral  $R^+$ , o disminuye por debajo del umbral  $R^-$  en el caso de los interruptores reversibles.

En cuanto a las funciones que representan los reguladores modulados abruptamente por  $ROS$  (tabla 3), asumimos que  $K_N$  y  $K_O$  son polinomios de grado cero cuyo valor decrece en la misma proporción que aumentan las barreras membranales asumiendo una constante de cambio  $\Delta B$ ; de manera semejante asumimos la función  $EAO$  como polinomio de grado uno con pendiente negativa  $-m$  y cuya ordenada al origen  $EAO_k(ROS = 0)$  aumenta con los picos de  $ROS$  en proporción  $\Delta EAO$ . Tomando en cuenta observaciones empíricas se asumió que  $\Delta B$  es semejante a  $\Delta EAO$  aceptando su igualdad para efectos del ajuste paramétrico. Finalmente para las funciones  $d_p$  y  $d_{ROS}$  asumimos un comportamiento biestable con valor  $d_{p \min}$  y  $d_{ROS \min}$  para  $ROS < R^-$ ;  $d_{p \max}$  y  $d_{ROS \max}$  respectivamente para  $ROS > R^+$  y entre  $R^-$  y  $R^+$  (con  $R^- < R^+$ ) el valor de  $d_p$  y  $d_{ROS}$  puede ser min o max dependiendo de sus valores previos, es decir, de su historia (histéresis).

Así, el modelo matemático resultante es un sistema de ecuaciones diferenciales suave a trozos con términos que no son una función suave de sus parámetros (Bernardo et al., 2008), es decir, contienen discontinuidades en la función o en su derivada. Los problemas de esta clase surgen en todo tipo de áreas, un ejemplo de este tipo se observa cuando dentro de un sistema de estudio se presenta un mecanismo de control que reacciona a significativamente mayor velocidad que el resto del sistema. En nuestro caso considerarlo suave a trozos es razonable, pues las discontinuidades en el modelo representan cambios fenotípicos abruptos e inmediatos característicos de los eventos de diferenciación en respuesta a  $ROS$ .

Integrando toda esta información previa y recalando que los paréntesis no indican producto sino que hacen

explícita la dependencia entre variables, el sistema de ecuaciones diferenciales resultante es

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} XH(t) = & \overbrace{Nut(t) k_N(ROS(t))}^{R2} + \overbrace{d_{RCS} RCS(t)}^{R5} - \overbrace{O2_O(t) k_O(ROS(t)) XH(t) d_{Res}}^{R6} \\ & - \overbrace{O2_O(t) k_O(ROS(t)) XH(t) d_{Ox}}^{R1} - \overbrace{XH(t) d_{XH}}^{R7} \\ & - \overbrace{XH(t) d_p(ROS(t))}^{R8} - \overbrace{XH(t) k_N(ROS(t))}^{R9} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} ROS(t) = & \overbrace{O2_O(t) k_O(ROS(t)) XH(t) d_{Ox}}^{R1} - \overbrace{ROS(t) EAO(ROS(t))}^{R4} \\ & - \overbrace{ROS(t) d_{ROS}(ROS(t))}^{R3} \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt} RCS(t) = \overbrace{ROS(t) d_{ROS}(ROS(t))}^{R3} - \overbrace{d_{RCS} RCS(t)}^{R5} \quad (3)$$

donde las regulaciones (y sus transiciones) están matemáticamente descritas por

$$\begin{aligned} K_N(ROS(t)) &= \frac{K_{N0}}{B(ROS(t))} \\ K_O(ROS(t)) &= \frac{K_{O0}}{B(ROS(t))} \\ EAO(ROS(t)) &= EAO_k(ROS(t)) + m ROS(t) \\ (B, EAO_k) &= \begin{cases} (B, EAO_k) \rightarrow (B \Delta B, EAO_k \Delta EAO) & \text{si } ROS' > 0 \text{ y } ROS = R^+ \\ (B, EAO_k) \rightarrow (B, EAO_k) & \text{otro caso} \end{cases} \\ (d_p, d_{ROS}) &= \begin{cases} (d_{p \min}, d_{ROS \min}) \rightarrow (d_{p \max}, d_{ROS \max}) & \text{si } ROS' > 0 \text{ y } ROS = R^+ \\ (d_{p \max}, d_{ROS \max}) \rightarrow (d_{p \min}, d_{ROS \min}) & \text{si } ROS' < 0 \text{ y } ROS = R^- \\ (d_p, d_{ROS}) \rightarrow (d_p, d_{ROS}) & \text{otro caso} \end{cases} \end{aligned} \quad (4)$$

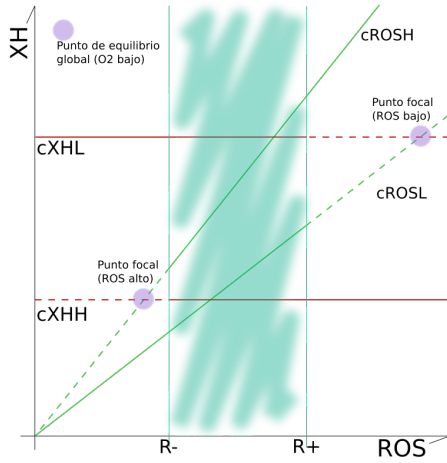
asumiendo que  $k$  hace alusión al  $k$ -ésimo estadio de diferenciación, siendo  $k = 0$  su estado inicial. Es importante recalcar que este sistema diferencial, es suave a trozos debido a las diferentes escalas temporales que se están considerando. Los parámetros con sus valores nominales están descritos en la tabla 5.

## 6. Derivación analítica de condiciones para existencia de oscilaciones de relajación en $ROS$ y $XH$

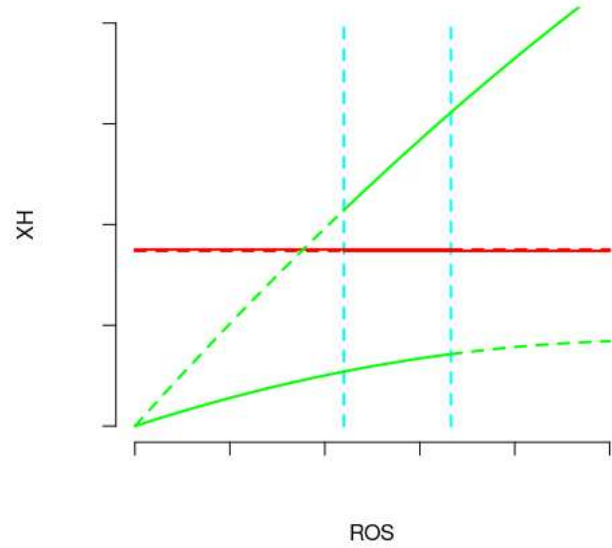
Una vez planteado el modelo matemático (en la sección anterior), en esta sección derivamos las condiciones necesarias y suficientes (sobre los valores de parámetros) para que el modelo muestre el comportamiento cualitativo buscado (objetivo 1): las oscilaciones de relajación en  $ROS$  que acompañan el proceso de diferenciación de  $N. crassa$ .

Para lograr este objetivo, realizamos un análisis estacionario del modelo híbrido dado por el acople entre ecuaciones 1 a 4.

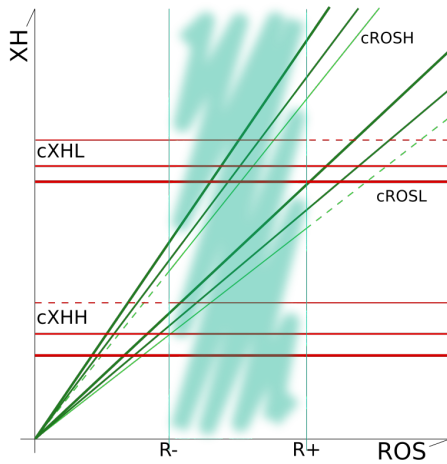
El comportamiento cualitativo que queremos reproducir con el modelo son las oscilaciones de relajación; este comportamiento se aprecia tanto para  $ROS$  como para  $XH$ . La tercer variable,  $RCS$ , muestra un comportamiento dinámico mucho más simple, de decaimiento exponencial. Este mismo comportamiento exponencial distorsiona las oscilaciones de relajación de  $XH$  y -en menor medida-  $ROS$ , tomando esto en consideración y sobre todo las escalas temporales mas lentas a las que evoluciona  $RCS$  con respecto a  $XH$  y  $ROS$ , decidimos enfocarnos en analizar éstas últimas en ausencia del arrastre por  $RCS$ . Para ello, hicimos un supuesto adicional de cuasi-equilibrio con el que pudimos reducir el modelo de tres dimensiones dinámicas a un sistema planar, de esta manera tomando en cuenta las escalas temporales, para el análisis se consideró constante el valor de  $RCS$  fijando su valor en  $RCS(t = 0)$



(a) Puntos focales



(b) Condiciones iniciales



(c) Cambios ante diferenciación

Figura 4: *Ceroquinas en cuasi-equilibrio*

Esquema de ceroquinas en el espacio  $ROS-XH$ . En cian vemos los umbrales de  $ROS$  para las funciones  $d_p$  y  $d_{ROS}$ , entre estos umbrales hay una región de histéresis. Este umbral delimita dos regiones con dinámicas diferentes.

En rojo y verde se muestran las ceroquinas para  $XH$  y  $ROS$  respectivamente, las líneas punteadas son una extensión visual del comportamiento que tendría si  $d_p$  y  $d_{ROS}$  no cambiaran tras atravesar el umbral de  $ROS$  correspondiente. La ceroquina de  $ROS$  se graficó recta solo por simplicidad visual, su comportamiento real corresponde a una curva cuadrática.

(a) enfatiza los puntos focales, (b) muestra las ceroquinas en condiciones iniciales, (c) destaca cambios en las ceroquinas tras la diferenciación celular, mayor grosor indica mayor nivel de diferenciación.

Tabla 5: Tabla de parámetros y unidades.  
 $k = 0$  hace referencia al estado inicial (previo a la diferenciación)

#	Parámetro	Valor nominal	Varianza	Unidades	Descripción
1	$k_O(k = 0)$	0.076536538	2.521829e-05	$\frac{1}{[t]}$	Permeabilidad basal del oxígeno
2	$B(k = 0)$	1	na	1	Valor inicial de barreras
3	$\Delta B$	1.497134	0.05414029	1	Incremento de barreras membranales
4	$d_{Ox}$	0.4273808	0.003650885	1	Tasa de oxidación
5	$k_N(k = 0)$	0.1104071	0.0002248455	$\frac{1}{[t]}$	Permeabilidad de los nutrientes
6	$d_{ROS\ min}$	0	na	$\frac{1}{[t]}$	Tasa mínima de degradación de $ROS$ mediado por poder reductor
7	$d_{ROS\ max}$	0.04511325	8.610657e-05	$\frac{1}{[t]}$	Tasa máxima de degradación de $ROS$ mediado por poder reductor
8	$EAO_{k=0}$	0.04178781	0.0001426772	$\frac{1}{[t]}$	Actividad base de antioxidantes
9	$\Delta EAO$	1.497134	0.05414029	1	Incremento de actividad base de antioxidantes ante diferenciación celular
10	$m$	0.003286982	3.26846e-06	$\frac{1}{[t]}$	Reducción de efectividad de antioxidantes por aumentos de $ROS$
11	$d_{RCS}$	0.007492926	4.166925e-05	$\frac{1}{[t]}$	Tasa de consumo de biomasa
12	$d_{Res}$	0.3247473	0.007244499	1	Tasa de respiración
13	$d_{XH}$	0.05867843	0.0002371525	$\frac{1}{[t]}$	Tasa de consumo de poder reductor
14	$d_{p\ min}$	0	na	$\frac{1}{[t]}$	Consumo mínimo de poder reductor mediado por PARP
15	$d_{p\ max}$	0.00648807	2.208844e-05	$\frac{1}{[t]}$	Consumo máximo de poder reductor mediado por PARP
16	$R^+$	9.910526	2.148733	1	Umbral superior de histéresis
17	$R^-$	3.711136	0.2931092	1	Umbral inferior de histéresis

describiendo así el sistema planar

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}XH(t) = & \overbrace{Nut(t)k_N(ROS(t))}^{R2} + d_{RCS}RCS(t=0) - \overbrace{O2_O(t)k_O(ROS(t))XH(t)d_{Res}}^{R6} \\ & - \overbrace{O2_O(t)k_O(ROS(t))XH(t)d_{Ox}}^{R1} - \overbrace{XH(t)d_{XH}}^{R7} \\ & - \overbrace{XH(t)d_p(ROS(t))}^{R8} - \overbrace{XH(t)k_N(ROS(t))}^{R9} \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}ROS(t) = & \overbrace{O2_O(t)k_O(ROS(t))XH(t)d_{Ox}}^{R1} - \overbrace{ROS(t)EAO(ROS(t))}^{R4} \\ & - \overbrace{ROS(t)d_{ROS}(ROS(t))}^{R3} \end{aligned} \quad (6)$$

Esta simplificación nos permitió obtener expresiones analíticas (posteriormente validadas con la simulación numérica) y con ello derivar de manera explícita las condiciones que los parámetros del modelo deben satisfacer para que éste muestre las oscilaciones de relajación observadas empíricamente (figuras 5b y 5a). Así, asumiendo esta condición sobre  $RCS$ , éste puede ser manejado como un parámetro mas del modelo, enfocándonos para efectos de análisis en el sistema resultante de las ecuaciones 5 y 6 en conjunto con las condiciones de salto 4.

Para obtener las ceroclinas se resolvió el sistema de ecuaciones 5, 6 igualando a cero cada una, para visualizar las ceroclinas resultantes se despejó el valor de  $XH$  obteniendo así el sistema de ceroclinas

$$XH_{cXH} = \frac{d_{RCS}RCS + k_N^* Nut}{d_{Ox}k_O^* O2_O + d_p^{**} + d_{Res}k_O^* O2_O + d_{XH} + k_N^*} \quad (7)$$

$$XH_{cROS} = \frac{ROS d_{ROS}^{**} + EAO^* ROS - m ROS^2}{d_{Ox}k_O^* O2_O}, \quad (8)$$

donde, los subíndices de  $XH$  indican a que variable corresponde la ceroclina respectiva, dos asteriscos (\*\*) resaltan las funciones reversibles del sistema y un asterisco (\*) resalta las funciones que cambian cada vez que  $ROS > R^+$ , es decir, que cambian abruptamente cuando  $k \rightarrow k + 1$  (se realiza la diferenciación).

La ceroclina  $cXH$  (ecuación 7) se comporta como una línea horizontal dentro del plano  $XH-ROS$  donde  $d_p$  cambia la posición vertical de dicha ceroclina (fig. 4a) de manera reversible en función del valor de  $ROS$  mientras que  $k_O^*$  y  $k_N^*$  lo hacen de manera irreversible frente a la diferenciación celular; la ceroclina  $cROS$  (ecuación 8) forma una parábola que pasa por el origen con apertura hacia abajo, la pendiente con que corta el origen es modificada de manera reversible por  $d_{ROS}$  e irreversible debido a diferenciación celular por  $k_O^*$  y  $EAO^*$ , su curvatura es fija y controlada por  $m$ .

Debido a la estructura de la ecuación 7 no resulta inmediato deducir su comportamiento ante fenómenos sucesivos de diferenciación (es decir, aumento en barreras), sin embargo, dado el comportamiento decreciente propuesto para  $k_N$  y  $k_O$  podemos plantear la ceroclina 7 como una división de funciones exponenciales que decrecen a la misma tasa y su valor límite (cuando  $B \rightarrow \inf$ ) está dado por

$$\frac{c RCS}{d_p + d_{XH}}, \quad (9)$$

permitiendo así que la posición vertical de ésta ceroclina tienda a subir o bajar en función de su posición inicial y el valor límite descrito.

Revisando la ecuación 8 es sencillo analizar que para un valor fijo de  $ROS$  la posición vertical de la ceroclina  $cROS$  aumenta cuando la  $EAO$  se incrementa y cuando la formación de barreras crece (i.e.  $k_O$  disminuye). Generalizando este comportamiento para cualquier valor de  $ROS$  observamos que la parábola descrita por  $cROS$  se desplaza a la derecha y arriba conservando su curvatura y cruce por el origen.

Fijando los valores de  $K_N$ ,  $K_O$ ,  $EAO$ ,  $d_p$  y  $d_{ROS}$  obtenemos un sub-modelo que describe la dinámica del sistema para una región particular de  $ROS$  y de diferenciación. Fijando estos valores para todos los casos: \*\* L ( $ROS$  bajo) o \*\* H ( $ROS$  alto) y  $*k = 0$ ,  $*k = 1$   $*k = 2$ ,  $*k = 3$  ( $k$ -ésimo estadio de diferenciación) obtenemos entonces  $2 \times 4 = 8$  pares de ceroclinas. La unión de todos estos sub-modelos en las fronteras respectivas define el sistema dinámico suave a trozos. Podemos estudiar la dinámica de este sistema partiendo de identificar los puntos focales correspondientes a cada uno de los 8 sub-modelos (en conjunto con las condiciones de pegado/salto).

Tomando un sub-modelo cualquiera (ec. 5 y 6 fijando parámetro antes descritos) y recordando el comportamiento parabólico de  $cROS$  podemos derivar dos puntos fijos (si hay intersección de ceroclinas), de los cuales, tomando los valores propios del sistema linealizado, se comprobó que para valores suficientemente bajos de  $m$  y  $ROS$  solo hay un punto fijo estable correspondiente a

$$\begin{aligned} XH &\rightarrow \frac{d_{RCS} RCS + k_N Nut}{k_O O2O (d_{Ox} + d_{Res}) + d_p + d_{XH} + k_N} \\ ROS &\rightarrow \frac{-\sqrt{\left(EAO_k^2 - \frac{4m d_{Ox} k_O O2O (d_{RCS} RCS + k_N Nut)}{k_O O2O (d_{Ox} + d_{Res}) + d_p + d_{XH} + k_N}\right)} + d_{ROS}^2 + 2d_{ROS} EAO + d_{ROS} + EAO_k}{2m}, \end{aligned} \quad (10)$$

Dada su estabilidad, este es el único punto focal para el sub-modelo asumiendo que existe la intersección de ceroclinas. Si las ceroclinas no se intersectan entonces se conserva un punto focal en el mismo valor  $XH$  pero con  $ROS$  tendiendo a infinito, el cual rápidamente cambia al caso previo tras la diferenciación celular.

Biológicamente, el primer ciclo consta de la exposición del hongo al ambiente rico en oxígeno, que desemboca en la formación del primer pico de  $ROS$  y su posterior diferenciación celular. Desde el punto de vista del modelo, esto se traduce en una transición del sub-modelo "L" partiendo del punto de equilibrio (ecuaciones 10 y 11 asumiendo  $O2O$  muy bajo), hacia el sub-modelo "H" debido a que cuando  $O2O$  pasa de hipoxia a saturación, el punto focal de  $ROS_L$  (ec. 11 con  $d_{p \min}$  y  $d_{ROS \min}$ ) supera el umbral  $R+$ . Podemos entonces decir las condiciones necesarias para esta transición se da si el punto focal L en 11 para el sub-modelo bajo se encuentra por encima del umbral  $R+$ . Es decir, se obtienen con la desigualdad  $R+ < ROS_L$  y simplificando, así (para  $m \neq 0$ ) la condición necesaria es

$$d_{ROS \min} + EAO_k > 2m R^+ + \sqrt{\left(EAO_k^2 - \frac{4m d_{Ox} k_O O2O (d_{RCS} RCS + k_N Nut)}{k_O O2O (d_{Ox} + d_{Res}) + d_{p \min} + d_{XH} + k_N}\right)} + d_{ROS \min}^2 + 2d_{ROS \min} EAO. \quad (12)$$

Biológicamente tras los picos de  $ROS$  sucede un proceso de diferenciación celular, control del pico de  $ROS$  y una posterior presencia de otro pico. Desde el modelo se traduce en ajustes de  $K_N$ ,  $K_O$  y  $EAO_k$ , para transitar del sub-modelo alto al bajo, cruzando el umbral bajo de  $ROS$  ( $R^-$ ) y luego transitar de regreso desde el sub-modelo bajo al alto como se describió previamente. Numéricamente, se requiere que el punto fijo descrito por 11 se encuentre por debajo (para  $ROS_H$ ) o por encima (para  $ROS_L$ ) del umbral respectivo para cada sub-modelo y cada etapa de diferenciación celular, de esta forma la condición necesaria para  $ROS_H$  es (con  $m \neq 0$ )

$$d_{ROS \max} + EAO < 2m R^- + \sqrt{\left(EAO^2 - \frac{4m d_{Ox} k_O O2O (d_{RCS} RCS + k_N Nut)}{k_O O2O (d_{Ox} + d_{Res}) + d_{p \max} + d_{XH} + k_N}\right)} + d_{ROS \max}^2 + 2d_{ROS \max} EAO \quad (13)$$

la cual se cumple en conjunto con la condición 12 para  $m \neq 0$  y los respectivos parámetros  $k_N$ ,  $k_O$  y  $EAO_k$  dependientes del número de picos de *ROS* transcurridos.

Considerando este punto focal (descrito por 10 y 11), es complicado analizar su dinámica con respecto a la formación de barreras membranales y aumentos en la actividad enzimática debido a la dinámica de *cXH* (ec. 7), sin embargo, para  $m$  suficientemente pequeña y aumentos de barreras y actividad enzimática en la misma proporción (como es nuestro caso), por medio de derivadas se encontró la tendencia a reducir el valor de *ROS* en el punto focal de cada sub-modelo, confirmando la existencia de picos de amplitud decreciente. Así mismo, la dinámica propia de *RCS* induce la disminución tanto en *XH* como en *ROS* de los puntos focales (a través de *cXH*) a medida que *RCS* disminuye, confirmando así, la observación previa sobre el comportamiento decreciente de *XH* a través de esta liga con *RCS*.

Con esto se logró deducir las condiciones necesarias para la existencia de oscilaciones de relajación confirmando en el proceso la fuerte relación entre el comportamiento exponencial decreciente de *RCS* y el comportamiento de decaimiento observado para *XH* (fig. 2).

## 7. Ajuste de parámetros: en búsqueda de una concordancia cuantitativa del modelo con los datos experimentales

Dentro de la teoría de ecuaciones diferenciales ordinarias, podemos distinguir dos problemas de importancia. El primero, al cual podemos llamar *problema directo* consiste en estudiar la evolución del sistema si conocemos los parámetros y fenómenos que lo rigen. El segundo, al cual llamamos *problema inverso* consiste de manera general en entender las causas que dan origen a un fenómeno observado (Engl, 1995).

Conocer el estado futuro de un sistema físico partiendo del conocimiento de su estado actual, es el ejemplo típico de un problema directo. A partir de aquí, podemos plantear diferentes problemas inversos: por ejemplo, determinar los parámetros de un sistema conociendo (parte de) su evolución. Este ejemplo es conocido como *estimación paramétrica*, y forma parte en el desarrollo de este trabajo.

La noción de problema bien planteado fue introducida por Hadamard, la cual se refiere a un problema cuya solución existe, su solución es única y esta depende continuamente de los datos.

En su trabajo Hadamard sugiere que solo un problema bien planteado podría modelar correctamente (de manera única) un fenómeno físico. Hablando de problemas inversos es muy habitual encontrar que estos no cumplen las condiciones de Hadamard o al menos no todas simultáneamente, en cuyo caso, de existir la solución es perfectamente posible que diferentes conjuntos de parámetros den lugar a las mismas observaciones.

Numéricamente este problema presenta dificultades significativas, atribuibles en parte a los términos no lineales. Además desde el punto de vista de Hadamard, las discontinuidades presentes en las fronteras entre sub-modelos acarrear complicaciones de planteamiento a tomar en cuenta dada la rigidez numérica en que se incurre. Así mismo, al abordar problemas de ajuste paramétrico, se incurre nuevamente en un problema mal planteado de acuerdo a Hadamard, cuya solución debe ser tratada cuidadosamente.

La solución numérica de un sistema de ecuaciones diferenciales involucra la programación y consecuentemente un lenguaje de programación. Para este trabajo se programó usando *Rstudio* (versión 1.2.5033) ejecutando código de *R* (versión 4.0.4), el cual fue elegido por la simplicidad y la existencia previa de librerías adecuadas. Debido a la rigidez numérica presente se decidió usar librerías de integración numérica que consideraran este escenario, de esta forma se eligió la librería *deSolve* (versión 1.28) y *FME* (versión 1.3.6.1). La primera incluye entre sus opciones el integrador numérico *lsoda*, elegido por su capacidad para alternar entre problemas rígidos y no rígidos dinámicamente; la segunda librería incluye entre sus algoritmos un optimizador basado en Markov chain monte carlo (MCMC). Para lidiar adecuadamente con las discontinuidades se implementó un algoritmo de localización de eventos con el cual adaptar los parámetros necesarios durante la diferenciación celular.

Estudiando el problema directo se eligieron como punto de partida (primer estimado) los valores de parámetros del sistema, entre valores observados en la literatura o experimentalmente y valores arbitrarios en rangos biológicamente razonables. Bajo estas condiciones se simuló la evolución del sistema en la exploración inicial del comportamiento descrito por el modelo.

Las condiciones derivadas en la sección previa nos permiten plantear conjuntos arbitrarios pero biológicamente plausibles (ie positivos) de parámetros tal que las características cualitativas deseadas se cumplan. Explorar este espacio de parámetros de forma que se pueda reproducir alguna característica cuantitativa y se demuestre la presencia de las características cualitativas deseadas es una tarea mas complicada y difícil de reproducir manualmente. En este sentido se exploró el uso de algoritmos tradicionales tipo Newton para el ajuste paramétrico, sin embargo, dado que el problema inverso es por naturaleza un problema mal planteado en el sentido de Hadamard, los algoritmos tipo

Newton enfrentan una alta rigidez numérica que se traduce en una lenta convergencia a la solución, y en muchas ocasiones, esta convergencia no se alcanza en un número razonable de evaluaciones.

Los algoritmos tipo MCMC suavizan el efecto de la rigidez numérica, al cambiar un problema de mínimos cuadrados por un problema probabilístico donde se busca maximizar la verosimilitud (aplicado a nuestro caso, la probabilidad de que un conjunto de datos de origen a las observaciones registradas). Si bien estos algoritmos requieren un alto número de repeticiones para explorar el espacio paramétrico, su sensibilidad ante errores numéricos o mínimos locales se ve disminuida, en función de la calidad de la función de verosimilitud elegida.

Tomando en cuenta su utilidad para problemas inversos y problemas rígidos, se decidió implementar un algoritmo MCMC usando las librerías disponibles en FME.

Como punto inicial para explorar el espacio de parámetros, el algoritmo fue alimentado con valores arbitrarios que satisfagan las condiciones descritas en la sección anterior, de forma que se pueda satisfacer el comportamiento cualitativo esperado. Como condición inicial para los pasos de integración, se tomó el punto fijo del modelo para un valor de oxígeno arbitrariamente bajo dos décadas por debajo del valor de simulación para  $O_{2\text{out}}$  (en saturación de oxígeno).

Considerando los datos cuantitativos disponibles, se decidió crear una función de verosimilitud que considere los tiempos experimentales de los picos de  $ROS$ , así como, el valor final de  $RCS$  un décimo por debajo de su valor inicial, este último con finalidad de limitar el posible crecimiento exponencial de  $RCS$  en la simulación sin ser fuertemente restrictivos sobre su evolución. Alrededor de estos datos se estableció una distribución normal con desviación estándar arbitraria de 40 y centrada en el  $i$ -ésimo dato  $s_i$ , para referencia llamaremos  $d_i$  a la distribución establecida para el  $i$ -ésimo dato. Por último se crea algo semejante a una función de verosimilitud de acuerdo a la ecuación

$$-2\sum_{i \in I} \ln P(m_i | s_i, d_i(s_i)), \quad (14)$$

representando por  $s_i$  el  $i$ -ésimo dato obtenido por simulación y  $m_i$  el obtenido por experimentación o elección (el caso de  $RCS$ ).

## 8. Resultados

La figura 5 muestra el resultado del ajuste paramétrico realizado usando MCMC y la función de verosimilitud 14, truncando la búsqueda tras 10000 pasos de simulación. Si bien MCMC brinda información sobre la distribución paramétrica, para su visualización se tomó el conjunto de parámetros de máxima verosimilitud (en rojo), así como el conjunto mas probable calculando la media de cada parámetro sobre las mil últimas muestras obtenidas, estos últimos son reportados en la tabla 5.

El ajuste logró reproducir la presencia de oscilaciones de relajación buscadas en el modelo, éstas oscilaciones muestran el comportamiento exponencial decreciente de  $XH$  y  $ROS$  que fue descrito. También se observa mediante las muestras graficadas en la figura 5d un fenómeno reportado de pérdida de sincronización para tiempos altos del experimento, fenómeno que no había sido resaltado previamente en este trabajo.

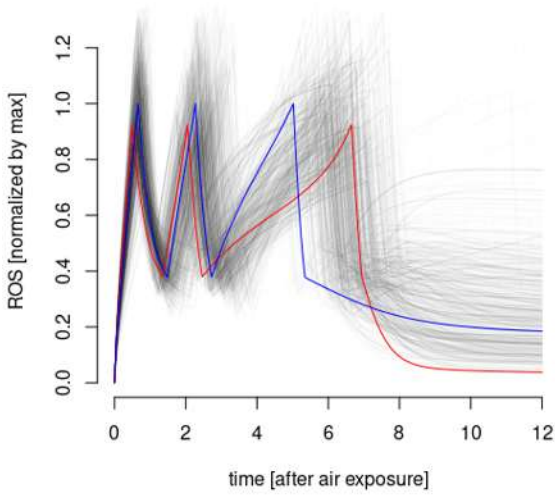
## 9. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se lograron derivar las condiciones necesarias para que el modelo reproduzca de forma robusta, el comportamiento cualitativo de oscilaciones de relajación que se observa como respuesta a un medio ambiente hiperoxidante, siendo este adverso para el hongo. Esta característica se puede apreciar tanto en la formulación matemática del modelo como en la integración numérica mostrada en la figura 5, donde se ve claramente la existencia de los tres picos de  $ROS$  esperados.

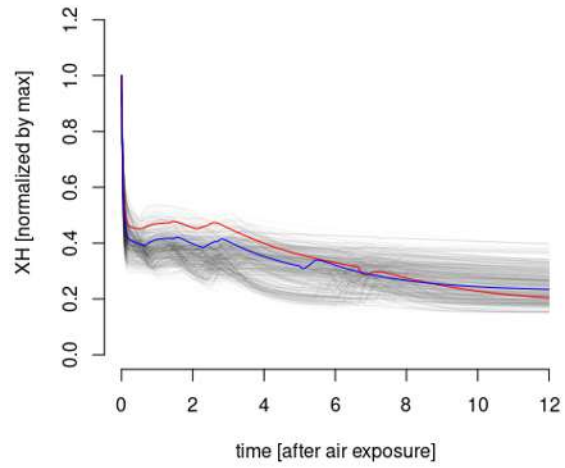
Una segunda observación que fue de interés para el desarrollo de este modelo, es la existencia de picos de  $ROS$  en periodos que varían dependiendo del estadio de diferenciación al que pertenecen. Análogo al punto anterior, esta característica de interés se observa en la figura 5 en la cual, dos de los tres picos de  $ROS$  suceden en los tiempos esperados experimentalmente, mientras que el tercero si bien se encuentra cercano al punto esperado, requiere mas análisis para lograr reproducir sus tiempos adecuadamente.

Se concluye entonces que las reacciones tomadas en cuenta para este trabajo e integradas formalmente en el modelo matemático descrito por las ecuaciones 1 a 4 son capaces de reproducir los picos de  $ROS$  que preceden a la diferenciación celular, así como la existencia de oscilaciones de relajación para  $XH$  y el comportamiento decreciente de  $RCS$ .

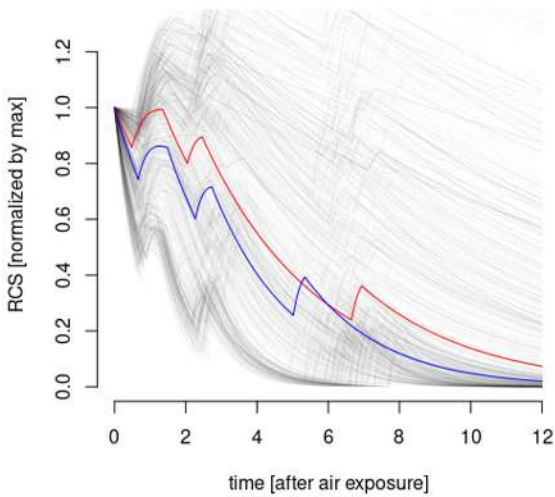
Una característica significativa de MCMC es que su velocidad de convergencia a la solución está fuertemente influenciada por la calidad de la función de verosimilitud, y en este sentido el trabajo actual eligió una función "no



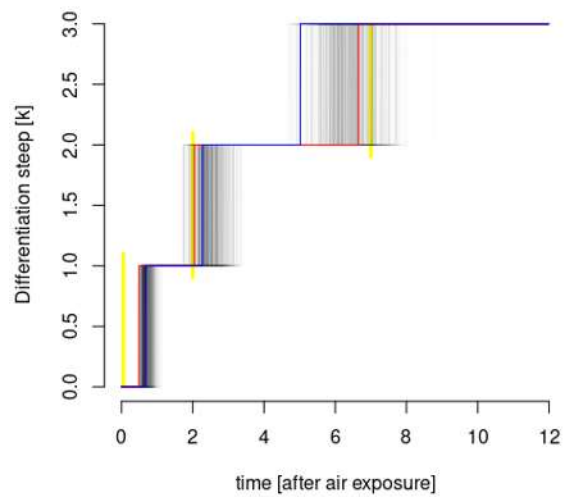
(a) *Mediciones y simulación de ROS*



(b) *Mediciones y simulación de XH*



(c) *Mediciones y simulación de RCS*



(d) *Detección de eventos*

Figura 5: *Simulación numérica ajustada.*

Simulaciones obtenidas por ajuste paramétrico mediante MCMC, en negro muestra con 1000 conjuntos de parámetros diferentes, en rojo el conjunto de mejor ajuste, en azul parámetros promedio de la muestra y en amarillo tiempos registrados para los picos de ros



informativa” lo cual significa que no se conoce la distribución real de los datos experimentales observados. A futuro contar con esta información de las observaciones experimentales e integrarla en el modelo permitirá agilizar el proceso de convergencia generando distribuciones de probabilidad de parámetros más realistas.

Con su avance actual, el modelo propuesto ya es capaz de reproducir las características cualitativas que se observan en la reproducción asexual de *N. crassa* sin embargo, a futuro este modelo requiere más pasos de validación para seguir explorando los mecanismos que subyacen a la diferenciación celular. En este sentido el modelo se encuentra en condiciones para ser comparado con experimentos en mutantes de pérdida o ganancia de función, éstos permitirán a futuro evaluar las premisas bajo las cuales se ha construido éste modelo, ya sea confirmando su validez o mostrando nuevas características a tomar en cuenta para futuras revisiones.

## Referencias

- COSENTINO, C. Y BATES, D. *Feedback Control in Systems Biology*. CRC Press (2012)
- CÁRDENAS Y HANSBERG. Glutamine Metabolism During Aerial Mycelium Growth of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **130**(7):1733–1741 (1984)
- ENGL, H.W. *Inverse Problems*. Aportaciones matemáticas, Sociedad Matemática Mexicana (1995)
- HANSBERG, W. Y AGUIRRE, J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol* **142**:201–221 (1990)
- HANSBERG, W., DE GROOT, H., Y SIES, H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine* **14**(3):287–293 (1993)
- HANSBERG, W., AGUIRRE, J., RÍS-MOMBERG, M., RANGEL, P., PERAZA, L., MONTES DE OCA, Y., Y CANO-DOMÍNGUEZ, N. Chapter 15 Cell differentiation as a response to oxidative stress. *British Mycological Society Symposia Series* (2008)
- IGLESIAS, P.A., KHAMMASH, M., MUNSKY, B., SONTAG, E.D., Y DEL VECCHIO, D. Systems biology and control — A tutorial. En *2007 46th IEEE Conference on Decision and Control*, págs. 1–12 (2007)
- JOHAN ÅSTRÖM, K. Y MURRAY, R.M. *Feedback systems: an introduction for scientists and engineers*, tomo 46. American Library Association (2010)
- LLEDÍAS, F., RANGEL, P., Y HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem* **273**:10630–10637 (1998)
- MICHÁN, S., LLEDÍAS, F., BALDWIN, J.D., NATVIG, D.O., Y HANSBERG, W. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine* **33**(4):521–532 (2002)
- TOLEDO, I. Y HANSBERG, W. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol* **14**:184–189 (1990)
- TOLEDO, I., NORONHA-DUTRA, A., Y HANSBERG, W. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* **173**:3243–3249 (1991)
- TOLEDO, I., RANGEL, P., Y HANSBERG, W. Redox Imbalance at the Start of Each Morphogenetic Step of *Neurospora crassa* Conidiation. *Arch. Biochem. Biophys* **319**:519–524 (1995)
- TOLEDO, I., AGUIRRE, J., Y HANSBERG, W. Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an experimental model system. *Experimental Mycology* **10**(2):114–125 (1986)
- WOLKENHAUER, O., ULLAH, M., WELLSTEAD, P., Y CHO, K.H. The dynamic systems approach to control and regulation of intracellular networks. *FEBS Lett* **579**:1846–1853 (2005)