

Tesis de Grado

Sistemas de señalización celular cooperatividad y receptores de membrana

Sevlever, Federico

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sevlever, Federico. (2017). Sistemas de señalización celular cooperatividad y receptores de membrana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nFIS000034_Sevlever

Cita tipo Chicago:

Sevlever, Federico. "Sistemas de señalización celular cooperatividad y receptores de membrana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nFIS000034_Sevlever

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Sistemas de Señalización Celular

Cooperatividad y Receptores de Membrana

Federico Sevlever

Tesis de Licenciatura en Ciencias Físicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Marzo 2017

TEMA: Modelado de mecanismos en biología molecular

ALUMNO, LU N°: Federico Sevlever, 744/11

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias – CONICET-UBA
Departamento de Fisiología Biología Molecular y Celular – FCEN - UBA
Departamento de Física – FCEN – UBA

DIRECTOR DEL TRABAJO: Dra. Alejandra Ventura

CODIRECTOR: Dr. Alejandro Colman-Lerner

FECHA DE INICIACION: 1º de Abril de 2016

FECHA DE FINALIZACION: 13 de Marzo de 2017

FECHA DE EXAMEN: 28 de Marzo de 2017

INFORME FINAL APROBADO POR:

Autor

Jurado

Director

Jurado

Profesor de Tesis de Licenciatura

Jurado

Resumen

Este trabajo fue realizado como Tesis de Licenciatura de la carrera de Ciencias Físicas y está enmarcado en el tema de modelado matemático y computacional de mecanismos de biología molecular y celular. El estudio consistió en el desarrollo de un protocolo diseñado para distinguir entre dos tipos de estos mecanismos presentes en diversos sistemas de señalización celular, los cuales son llamados *cooperatividad negativa e independencia* entre sitios de ligadura. Este problema se plantea detalladamente (ver *2.Objetivo*) luego de una introducción donde se explican estrategias y métodos generales utilizados para modelar estos mecanismos, con el fin de presentar al lector el problema a tratar de manera más completa. Introducido el objetivo, se describen luego los métodos particulares de este trabajo para estudiar los dos mecanismos nombrados y, a partir de ello, el diseño de diversos protocolos de distinción.

Finalmente, se probaron los protocolos diseñados simulando datos experimentales computacionalmente y se muestran los resultados obtenidos y las conclusiones, en las cuales puede verse que si bien los protocolos no son infalibles, lograron determinar correctamente la mayor parte de los datos simulados.

Índice

1. Introducción	8
1.1 Ley de Acción de Masas	9
1.2 Curvas temporales y dosis-respuesta	11
1.3 Cooperatividad	14
1.4 EC50 y Coeficiente de Hill	19
2. Objetivo	22
2.1 Problema a Resolver	22
2.2 Antecedentes	22
3. Modelado	24
4. Indistinguibilidad en equilibrio	26
4.1 Subespacio de indistinguibilidad	26
4.2 Interpretación	28
5. Análisis en pre-equilibrio	32
5.1 Algoritmo de resolución del sistema	33
5.2 Barridos de parámetros	35
5.3 Barrido inicial	36
5.4 Base de datos de evoluciones temporales del coeficiente de Hill	38

6. Protocolos de distinción	40
6.1 Protocolo Fit	40
6.2 Protocolo Hill	41
7. Prueba de protocolos	46
7.1 Simulación de datos experimentales	46
7.2 Resultados	47
8. Protocolo combinado	50
9. Eficiencia de los protocolos con el error de los datos	52
9.1 Dependencia con el desvío estándar del error gaussiano	52
9.2 Ruido térmico	54
10. Conclusiones	56
11. Anexos	60
11.1 Código de resolución de IB y NC	60
11.2 Código para obtener los sets de parámetros	63
11.3 Código para el ajuste en equilibrio	64
11.4 Código del Protocolo Fit	65
11.5 Código del Protocolo Hill	66
11.6 Código para la simulación de datos	68
12. Agradecimientos	70
13. Referencias	76

1. Introducción

En este trabajo se estudiaron sistemas de señalización celular, es decir, los mecanismos que permiten a las células sensor propiedades físicas o químicas del medioambiente y responder de alguna manera favorable. Estos procesos consisten en reacciones químicas entre factores externos a las células (temperatura, presión osmótica, concentración de sustancias) e internos (proteínas receptores, enzimas catalizadoras, grupos fosfato, ADN, ARN, etc.)¹. Los mismos se modelan en la literatura como redes de señalización, donde cada nodo representa un tipo de partícula y cada link una interacción. De la dinámica de estas redes resultan las respuestas posibles de la célula ante algún estímulo externo (*Figura 1*).

Este trabajo consiste en el análisis de las propiedades del primer paso de estas redes, el pegado de una partícula externa de ligando a un receptor celular. Los receptores son proteínas que cuentan con una o varias zonas afines a una partícula de ligando (el factor externo), estas zonas se denominan sitios de unión o ligadura. Dicha unión produce un cambio conformacional que activa el receptor (por ejemplo, como catalizador de otra reacción) e inicia algún mecanismo particular de la red de señalización que concluye en una respuesta celular específica². Si bien esta no es la única manera de activar una red de señalización (existen mecanismos más complejos donde el receptor debe, además, pegarse a moléculas internas de las células), es la más simple y la que se tratará en esta tesis.

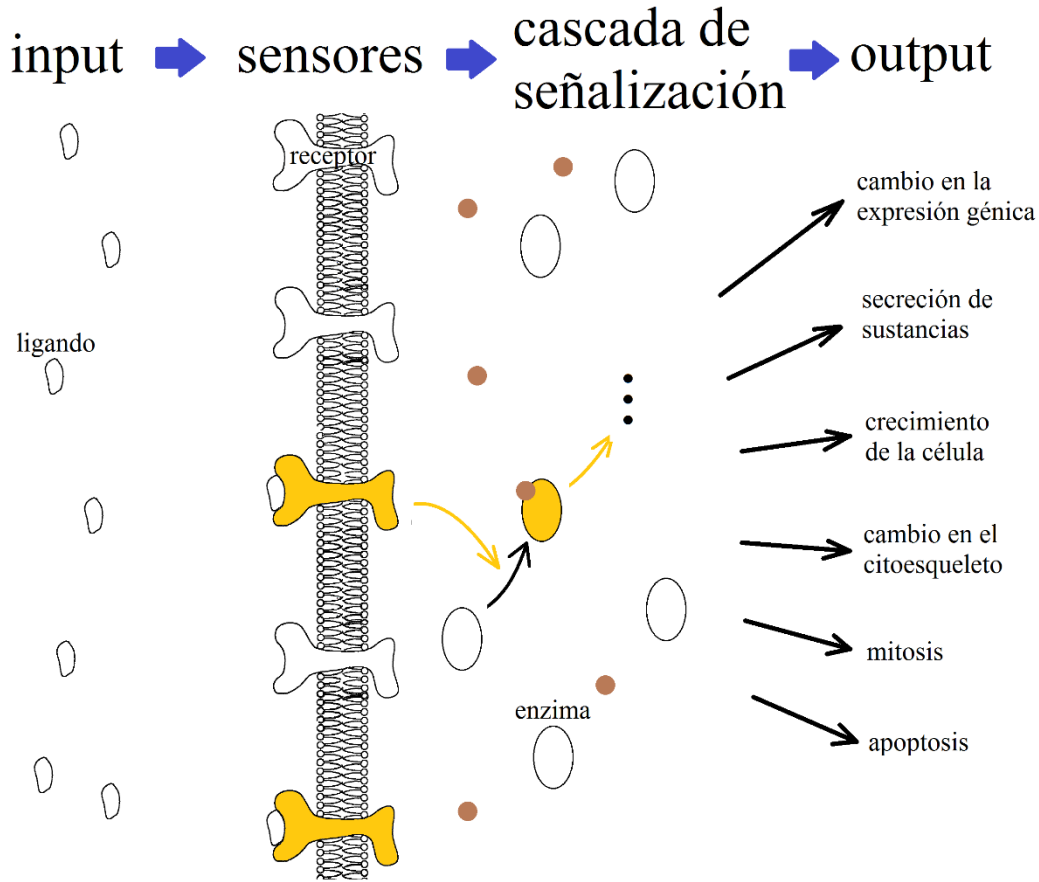


Figura 1: Esquema de los mecanismos de señalización celular. Una partícula de ligando se adhiere a un receptor de membrana para activarlo e iniciar una cascada de señalización, es decir, una sucesión de reacciones químicas que promueven e inhiben sucesivas reacciones. Un ejemplo puede ser la adición de un grupo fosfato de una molécula de ATP a una enzima que la activa como promotora de otra reacción. Esta cascada, de acuerdo al mecanismo específico, puede concluir en un cambio en la síntesis de proteínas, en la secreción de sustancias al medio, en cambios en la forma de la célula, etc. Figura adaptada ³.

1.1 Ley de acción de masas

La ley de acción de masas es la ley fundamental que permite asociar redes de señalización con sistemas de ecuaciones diferenciales, y se enuncia de la siguiente manera⁴:

Sean dos sustancias químicas, A y B, que reaccionan al colisionar formando el producto C, entonces la tasa de acumulación de C será el producto entre el número de colisiones entre los reactivos por unidad de tiempo y la probabilidad de que una colisión supere la energía libre de activación de la reacción.

La ecuación 1 traduce el enunciado en términos matemáticos, donde $[X]$ representa la concentración de la sustancia X y el número de colisiones por unidad de tiempo se toma proporcional a las concentraciones de los reactivos, con un factor de proporcionalidad k que dependerá de la geometría de las partículas y la temperatura.



$$\frac{d[C]}{dt} = k[A][B] \quad (1)$$

Además, si se trata de una reacción reversible, es posible que C se transforme en A y B, con lo cual debe agregarse un término negativo y proporcional a la concentración de C, como expresa la ecuación 2, donde los factores de proporcionalidad k_+ y k_- se denominarán tasas de pegado y despegado respectivamente cuando se trate re reacciones de unión, y tendrán unidades de *Concentración*⁻¹.*tiempo*⁻¹ y de *tiempo*⁻¹.



$$\frac{d[C]}{dt} = k_+[A][B] - k_-[C] \quad (2)$$

Una observación importante es que en el estado estacionario, donde las concentraciones no varían en el tiempo ($\frac{d[C]}{dt} = 0$), se obtiene la ecuación 3, de donde puede definirse $[A_0] := [A] + [C]$ como la concentración total (constante en caso de que no haya otras reacciones). En el caso particular de las reacciones de unión, se define además $K_D := \frac{k_-}{k_+}$ la constante de disociación o constante de equilibrio, para llegar a la ecuación 4. Se concluye también que K_D tiene unidades de concentración y que tiene información acerca de la afinidad entre A y B, al ser mayor el sistema tenderá a estar disociado en A y B, y, al ser menor, estarán formando C. Nótese que el equilibrio del sistema no depende de las tasas de pegado y despegado por separado sino de la constante de disociación, lo cual puede generalizarse para sistemas más complicados⁴.

$$[C]_{EQ} = \frac{k_+}{k_-} [A]_{EQ} [B]_{EQ} \quad (3)$$

$$\frac{[C]_{EQ}}{[A_0]} = \frac{[B]_{EQ}}{K_D + [B]_{EQ}} \quad (4)$$

1.2 Curvas temporales y dosis-respuesta

Las curvas temporales se obtienen de resolver las ecuaciones diferenciales para un conjunto de condiciones iniciales y representan la dinámica del sistema. Para el caso del modelo monovalente (*Figura 2 A*), que consiste en un receptor con un único sitio de ligadura, la resolución puede hacerse analíticamente, y se obtiene la expresión de la ecuación 5, donde se resolvió la ecuación 2 reemplazando A , B y C por el receptor R , el ligando L (el input o la dosis) y el complejo R^L (el output o la respuesta), definiendo $R_0 := R + R^L$ a la concentración total e invariante de receptor (a partir de aquí se omitirán los corchetes para denotar concentraciones). Esta expresión está graficada en la *Figura 2 B* para diferentes valores de L , donde se eligió como condición inicial $R^L(t = 0) = 0$. Puede observarse que no es más que una curva que crece monótona y exponencialmente en el tiempo hacia un valor de equilibrio que depende de la concentración de ligando. La invariancia de la concentración total de receptor es una hipótesis de este trabajo (no siempre válida) y la misma proviene de suponer que tanto la síntesis como la degradación de las moléculas de receptor ocurren en escalas temporales más lentas que la interacción con el ligando.

$$\frac{R^L}{R_0} = \frac{L}{K_d + L} (1 - e^{-(k_+L + k_-)t}) \quad (5)$$

Las curvas dosis-respuesta son el resultado de graficar el output (R^L/R_0) del mecanismo estudiado en función del input (L), una vez que el sistema está en equilibrio. Puede verse esta curva graficada a modo de ejemplo para el mismo modelo (*Figura 2 C*). La curva proviene de la ecuación 6 donde se utilizó la ecuación 4 reemplazando los valores de A , B y C como antes. Cabe mencionar que cada curva temporal representa un único punto en la curva dosis-respuesta (el equilibrio), y que experimentalmente es necesario medir tantas curvas temporales como puntos de las curvas dosis-respuesta se deseen obtener.

$$\frac{R_{EQ}^L}{R_0} = \frac{L}{K_D + L} \quad (6)$$

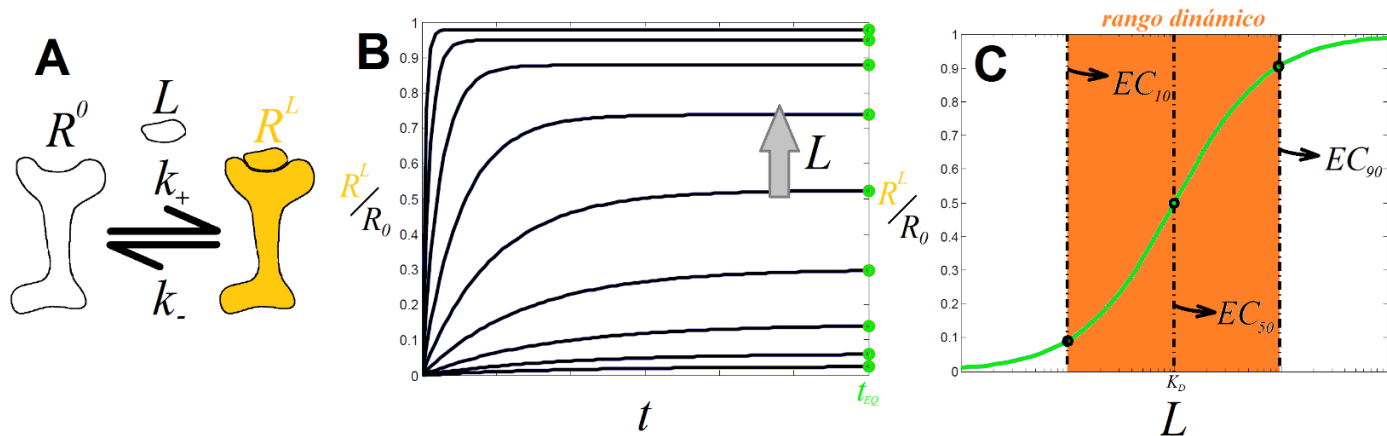


Figura 2

A Modelo monovalente donde el receptor consta de un único sitio de ligadura. R_0, R^0, R^L representan las concentraciones de receptor total, libre y ocupado respectivamente mientras que L, k_+, k_- la concentración de ligando y las tasas de pegado y despegado.

B Curva temporal para el modelo monovalente. El tiempo t en el eje horizontal en escala lineal y, en el eje vertical, la concentración normalizada de receptor ocupado R^L . Puede observarse que son curvas monótonamente crecientes al valor de equilibrio, el cual representa un punto en las curvas dosis-respuesta.

C Curva dosis-respuesta para el modelo monovalente. El input, en el eje horizontal, es la concentración total de ligando L en escala logarítmica y el output, en el eje vertical, la concentración normalizada de receptor ocupado R^L . A partir de estas curvas es que pueden definirse $EC_{90}, EC_{50}, EC_{10}$ como los valores donde el output alcanza el 90%, 50% y 10% de su máximo valor, respectivamente, además del **rango dinámico**, que se define como el intervalo de concentraciones de ligando que va desde el EC_{10} al EC_{90} y es donde un sistema es sensible ante cambios en el input, es decir, donde el output cambia considerablemente. Es importante notar que en este ejemplo $K_D = EC_{50}$, lo que implica que la constante de disociación indica dónde está centrada la curva y es el parámetro de comparación, tanto las muy bajas concentraciones de ligando como las muy altas respecto de la misma quedan fuera del rango dinámico. Esto se debe a que, para bajas concentraciones, las variaciones en el input son despreciables para el sistema y, en el caso de altas concentraciones, a que la gran mayoría de los receptores se encuentran ocupados e imposibilitan el pegado de más partículas de ligando, incluso si se aumenta más la concentración.

Una aclaración importante es que existe un grado de libertad en la elección de las unidades de las concentraciones y del tiempo. Es decir, dado un intervalo de concentraciones de ligando, por ejemplo $[10^{-2}, 10^2]$, puede pensarse que la unidad es $0.1\mu M$ de modo que el intervalo sería $[1nM, 10\mu M]$, donde la escala temporal queda determinada por los valores de las constantes de pegado y despegado.

Es importante notar que esta manera de graficar las curvas dosis-respuesta da información únicamente del equilibrio de la reacción entre el ligando y el receptor, perdiendo la dinámica de la misma. Se sabe también que existen casos donde el tiempo característico asociado al pegado de ligando al receptor es más lento incluso que los tiempos de la o las reacciones asociadas al segundo paso en la cascada de señalización⁵, y esto indica que es incorrecto estudiar las propiedades de las curvas dosis-respuesta únicamente en el equilibrio, ya que la información se propaga por la cascada antes de que la reacción entre el receptor y el ligando llegue al equilibrio.

Una herramienta muy útil para esto es la de graficar las curvas dosis-respuesta a tiempos anteriores al de equilibrio⁵. Esto se hace de manera análoga al equilibrio, se toman curvas temporales con diferentes dosis de ligando y cada una de estas curvas representará un punto en la curva dosis-respuesta, pero en vez de tomar el valor que alcanza el output en el equilibrio, se toma el valor al tiempo deseado, como ejemplifica la *Figura 3 A* y *B*. De esta manera, al igual que fueron definidos EC_{90} , EC_{50} , EC_{10} y el rango dinámico en el equilibrio (*Figura 2*), podemos definirlos ahora como funciones dependientes del tiempo donde, por ejemplo, $EC_{50}(t)$ representará la concentración de ligando para la cual la respuesta es la mitad de la máxima alcanzada al tiempo t .

Puede apreciarse la importancia de los estudios del pre-equilibrio en el gráfico de la *Figura 3 A*, donde de la dinámica de las curvas dosis-respuesta se deduce que dos dosis muy altas de ligando, diferentes pero parecidas, pueden resultar en outputs indistinguibles en el equilibrio por encontrarse fuera del rango dinámico de la curva verde, pero dar respuestas bien separadas en el pre-equilibrio, donde corresponde una curva azul. Este hecho, sumado a que los pasos subsiguientes en la cascada de señalización pueden ser más rápidos que la reacción entre ligando y receptor, origina el mecanismo conocido como PRESS⁵ (pre-equilibrium sensing and signaling), que permite mover el rango dinámico en el espacio de concentraciones de ligando y así aumentarlo significativamente.

Otra forma de ilustrar las curvas dosis-respuesta a distintos tiempos es mediante un mapa de colores (*Figura 3 C*) donde se grafica proporción de sitios ocupados como una función de dos variables, el tiempo y la concentración de ligando.

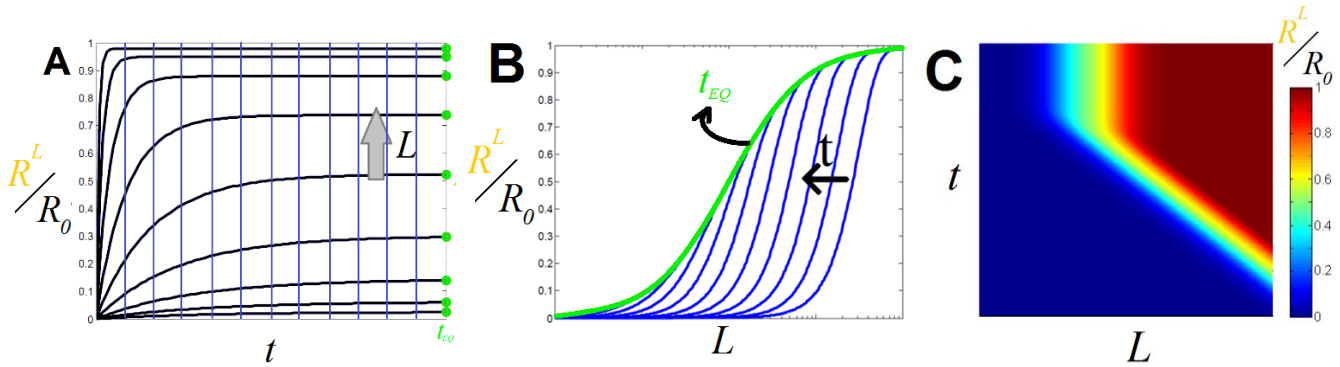


Figura 3

A Curvas temporales para diferentes concentraciones de ligando, las líneas azules verticales indican los tiempos pre-equilibrio tomados para graficar las curvas dosis-respuesta mientras que los puntos verdes el valor de equilibrio.

B Curvas dosis-respuesta a varios tiempos pre-equilibrio y en equilibrio.

C Mapa de colores que muestra la proporción de sitios ocupados en escala de colores respecto del tiempo y de la concentración de ligando $\frac{R^L}{R_0}(t, L)$ como una superficie, ambos en escala logarítmica.

1.3 Cooperatividad

Se dice que dos individuos (en principio independientes) *cooperan* cuando trabajan en conjunto para lograr un fin determinado. En biología, este concepto puede aplicarse a diferentes escalas, ya sea para peces en un cardumen como para moléculas de receptores en una célula. Más específicamente, en bioquímica el concepto de *cooperatividad* se refiere a reacciones de pegado y despegado, donde una reacción puede afectar o *cooperar* con otra.

Puede verse un ejemplo de esto en los receptores, los cuales pueden contar con más de un sitio de ligadura. En este caso, los diferentes pares de sitios pueden ser dependientes, ya que el

pegado de ligando sobre uno de estos sitios podría cambiar la estructura del otro, alterando su afinidad. En la literatura⁶, esto es lo que se denomina cooperatividad y se clasifica como *positiva* en caso de que la ocupación del primer sitio aumente la afinidad del segundo, o *negativa* en caso contrario. Se dice además que un par de sitios son independientes si la ocupación de cualquiera de ellos no afecta la afinidad del otro.

Muchos ejemplos sobre la importancia de la cooperatividad en la naturaleza han sido descriptos. Un mecanismo bien conocido es el encargado de transportar oxígeno por la sangre⁷. Este mecanismo funciona a partir de la hemoglobina, una proteína que se encuentra en los glóbulos rojos y cuenta con cuatro sitios de ligadura afines a las moléculas de oxígeno. Estos sitios presentan cooperatividad positiva, de manera que el pegado de un oxígeno aumenta las probabilidades de pegados sucesivos favoreciendo la ocupación total de la hemoglobina solo en ambientes como los pulmones donde la concentración de oxígeno es alta. De esta manera la sangre es capaz de absorber mayor cantidad de oxígeno en los pulmones y, sobre todo, de liberar casi toda esa cantidad en el resto del cuerpo. Esto puede observarse en la *Figura 4*⁸, que compara las curvas dosis-respuesta de la hemoglobina real con una curva ficticia donde no hay cooperatividad.

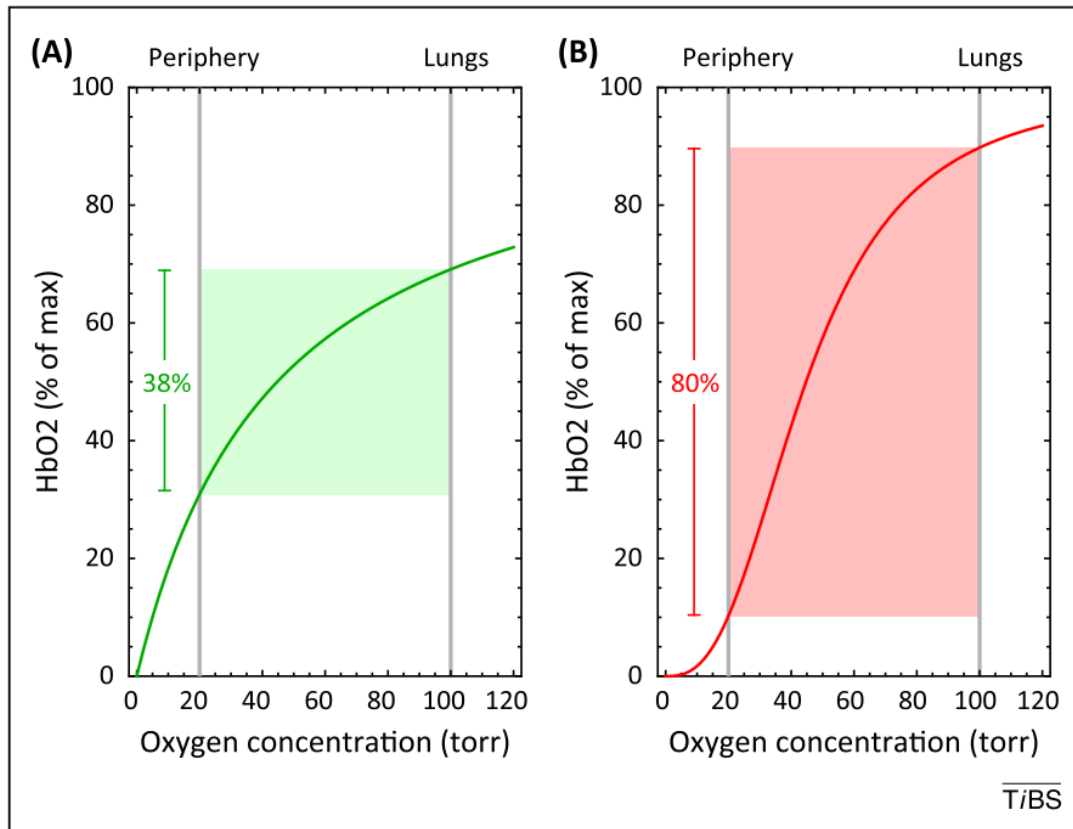


Figura 4⁸: Porcentaje de ocupación de la hemoglobina (HbO₂) en función de la concentración de oxígeno donde se marcan las concentraciones en los pulmones y en la periferia y el transporte neto de oxígeno que resultaría en cada caso, A sin cooperatividad y B con cooperatividad positiva. Se concluye no solo que se une más oxígeno en los pulmones sino que se libera más oxígeno en la periferia.

La cooperatividad se estudia en la literatura con modelos muy diferentes^{9,10,11,12,13}. En este trabajo la modelaremos como un factor multiplicativo ω en la tasa de pegado de ligando sobre receptor (k_+). De esta manera, $\omega > 1$ implicará cooperatividad positiva mientras que $\omega < 1$, negativa. En la Figura 5, se ilustra un ejemplo de distintos estados de ocupación de un receptor con dos sitios de ligadura y sus tasas de pegado y despegado de acuerdo a la cooperatividad.

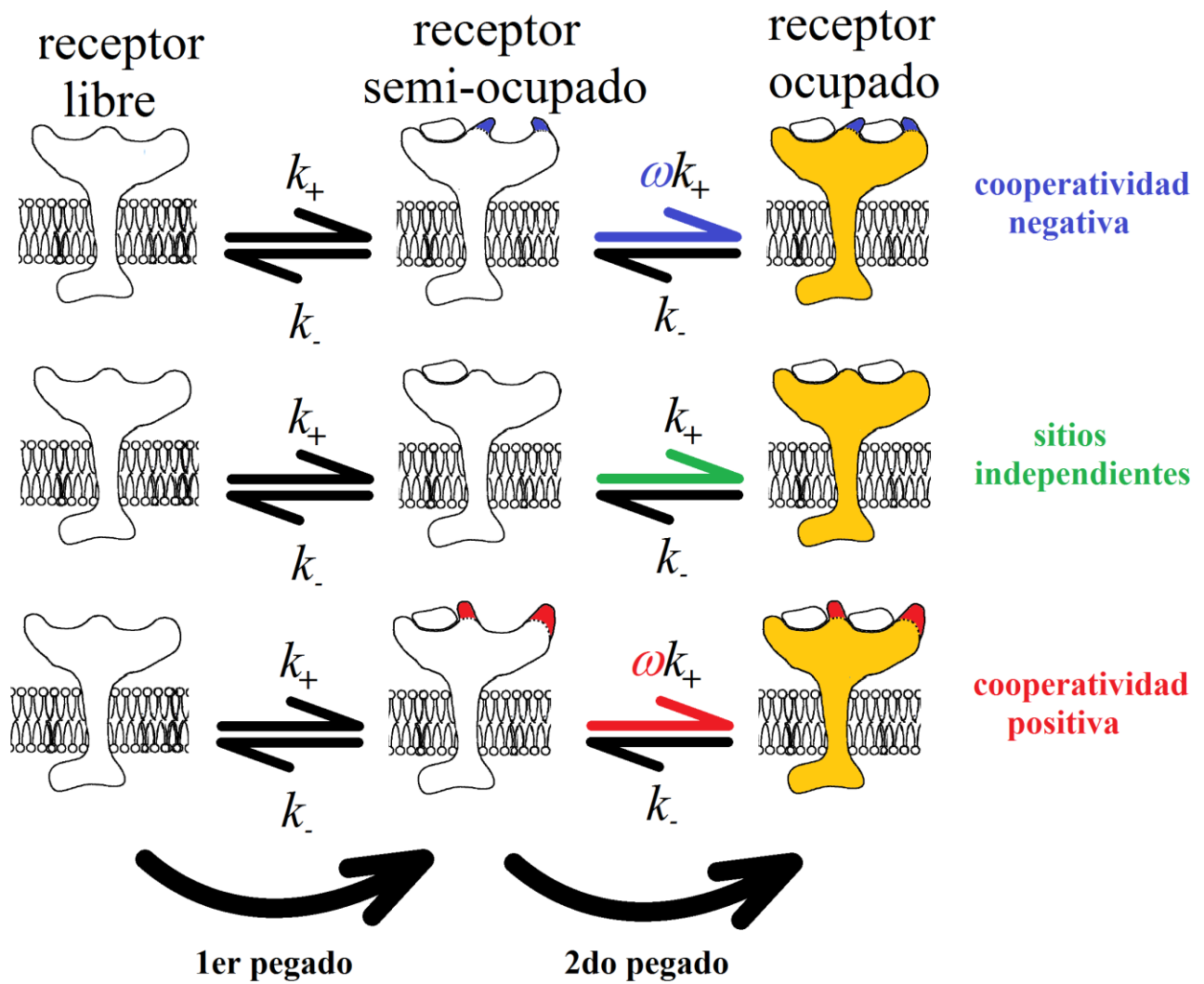


Figura 5: Cooperatividad positiva y negativa y sitios independientes para el caso de un receptor con dos sitios de ligadura.

Los primeros trabajos en cooperatividad rescataban las propiedades de la cooperatividad positiva, dándole particular importancia al aumento que puede generar en la sensibilidad de un sistema entendiendo a esta como la capacidad de un sistema de distinguir entre dos inputs parecidos (lo que suele denominarse ultrasensibilidad en el contexto de la biología molecular). En el caso de los receptores, está dada por la diferencia que generan dos concentraciones parecidas de ligando en las concentraciones de receptor activo, la cual puede medirse con la pendiente de las curvas dosis-respuesta (a mayor pendiente, mayor será la capacidad del sistema de distinguir entre dos concentraciones diferentes de ligando). En el ejemplo de la hemoglobina, la cooperatividad positiva aumenta las probabilidades de que se peguen más moléculas de oxígeno una vez que ya se pegó una, aumentando también la sensibilidad y dando la ventaja en el transporte de oxígeno⁷. Sin embargo, aumentar la sensibilidad de un sistema implica también disminuir el rango dinámico del mismo, debido a que, en el caso de los receptores, estos saturarán a menores concentraciones de ligando mientras mayor sea la cooperatividad. Es en este punto donde entró la ventaja de la cooperatividad negativa y comenzaron los estudios sobre la misma^{10,12,14,15}, la cual es capaz de aumentar el rango dinámico de un sistema, a expensas de disminuir su sensibilidad. Esto puede entenderse fácilmente si se piensa que cooperatividad negativa implica que el pegado de una molécula de ligando a un sitio de ligadura de un receptor baja las probabilidades de un próximo pegado, haciendo que sea necesario aumentar más la concentración de ligando para que este próximo pegado ocurra, aumentando así el rango dinámico.

En un trabajo reciente sobre cooperatividad negativa¹² se descubrió incluso que una cooperatividad negativa suficientemente fuerte puede generar ultrasensibilidad en un receptor con dos sitios de ligadura donde ambos son muy afines al ligando (*Figura 6*¹²). Esto ocurre debido a que si se aumenta la concentración de ligando, se ocuparán todos los receptores con una única molécula de ligando antes de que existan estados de ocupación total, debido a la fuerte cooperatividad negativa. Esto deja una situación en la cual cada nueva molécula de ligando que se agregue se pegará a un receptor semi-ocupado, ocupándolo completamente y activándolo (se consideró que el receptor se activa cuando se encuentra completamente ocupado). Es decir, que existirá un intervalo de concentraciones de ligando para las cuales el sistema tendrá una relación uno a uno entre las moléculas de ligando y los receptores activados, lo que implica la ultrasensibilidad.

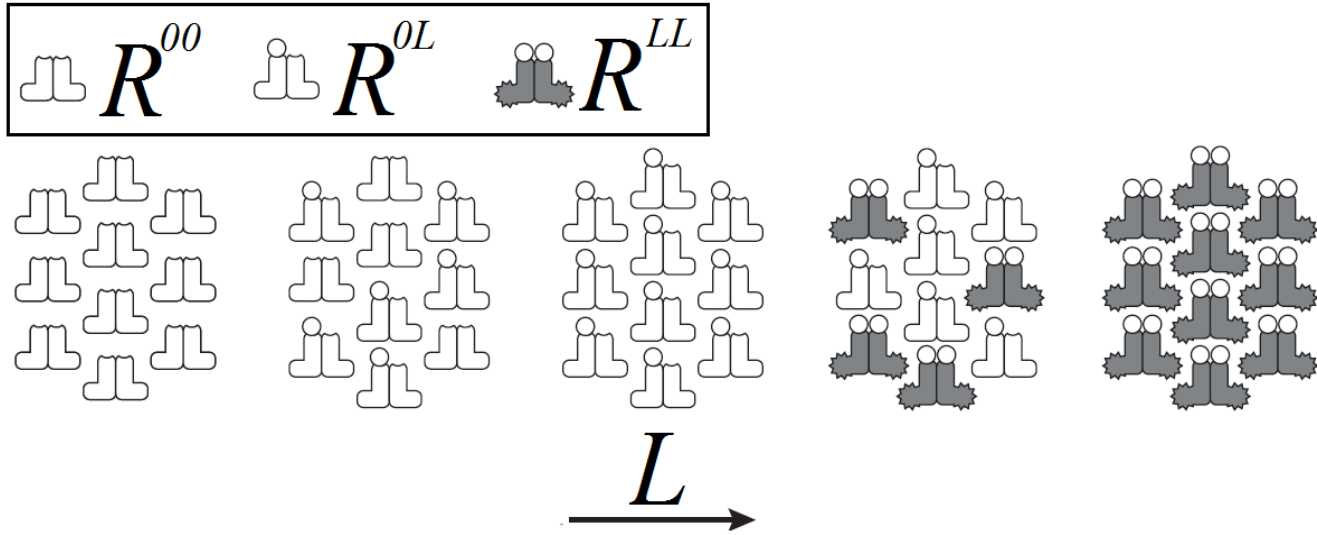


Figura 6: Ultrasensibilidad en un sistema con receptores de dos sitios de ligadura con fuerte cooperatividad negativa y afines al ligando, donde el receptor se activa sólo cuando está plenamente ocupado (receptor gris). Puede observarse que a bajas concentraciones de ligando se encuentran todos los receptores desocupados. A concentraciones medias se encuentran todos en un estado intermedio y ninguno plenamente ocupado debido a la fuerte cooperatividad negativa y que cada nueva molécula de ligando agregada se pegará a un receptor ocupándolo plenamente. Este fenómeno le da al sistema la ultrasensibilidad. Figura adaptada¹².

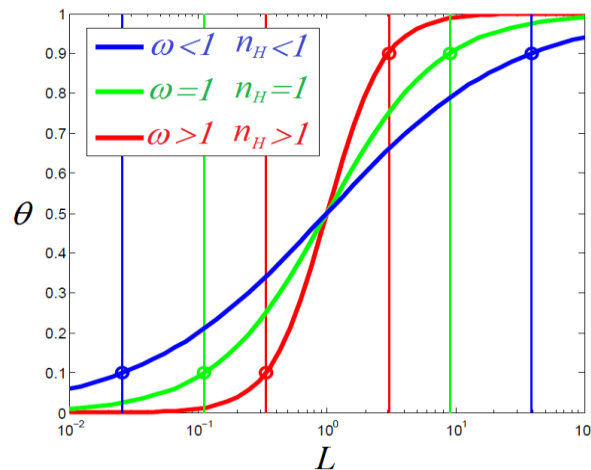
1.4 EC_{50} y Coeficiente de Hill

Dos índices importantes en la caracterización de las curvas dosis-respuesta son el EC_{50} , definido como la concentración de ligando para la cual el sistema alcanza la mitad de la máxima respuesta en el equilibrio y el coeficiente de Hill (n_H), definido por la ecuación 7. El primero indica aproximadamente dónde se encuentra centrado el rango dinámico del sistema, en el espacio de las concentraciones de ligando, mientras que el segundo indica su amplitud, asociándolos con el valor medio (EC_{50}) y la dispersión de las posibles respuestas (n_H)^{11,16,17}. Puede verse que si EC_{90} e EC_{10} se acercan, n_H aumentará, mientras que si se alejan disminuirá. El $\log(81)$ del numerador es simplemente una constante de normalización que proviene del caso de receptor monovalente, de manera que $n_H < 1$ indicará que el sistema estudiado tiene un rango dinámico más amplio que el monovalente y lo contrario si $n_H > 1$.

$$n_H = \frac{\log(81)}{\log\left(\frac{EC_{90}}{EC_{10}}\right)} \quad (7)$$

Existen diferentes maneras de definir el coeficiente de Hill además de la que da la ecuación 7¹⁸. Se tomó esta definición debido a que se trabajó con receptores de 2 sitios únicamente, de manera que esta definición del coeficiente de Hill está unívocamente relacionada con la sensibilidad global del sistema y ésta a su vez con la cooperatividad. La sensibilidad es la capacidad de un sistema de discriminar entre dos dosis, es decir, la pendiente de la curva dosis-respuesta (a mayor pendiente, mayor es la diferencia en la respuesta del sistema frente a dosis parecidas). El coeficiente de Hill tomado da una idea de la sensibilidad de un sistema en todo el rango dinámico. Cooperatividades positivas dan curvas dosis-respuesta más sensibles, disminuyendo el rango dinámico y aumentando el coeficiente de Hill. Lo contrario pasa a la inversa, para cooperatividades negativas el rango dinámico aumenta a costa de disminuir la sensibilidad y el coeficiente de Hill. Esto puede observarse de manera esquemática en el gráfico de curvas dosis-respuesta de la *Figura 7*.

Existen discusiones en la literatura^{11,16,17} sobre la cooperatividad en sistemas con receptores más complejos, con mayor número de sitios donde la cooperatividad y el coeficiente de Hill serán más difíciles de definir. En estos casos, se recurre, por ejemplo, al logaritmo de la pendiente de las curvas dosis respuesta que depende, en general, de la concentración de ligando, dando una idea de la sensibilidad local del sistema^{11,6}.



*Figura 7: Curvas dosis-respuesta. Proporción de sitios ocupados (θ) en función de la concentración de ligando (L) para cooperatividad **positiva**, **negativa** y sitios **independientes**. Se observa que la cooperatividad negativa es menos sensible y aumenta el rango dinámico, a diferencia de la positiva donde el rango dinámico disminuye pero aumenta la sensibilidad. Figura adaptada⁹.*

Otro atributo del coeficiente de Hill es que da una idea de la cantidad de sitios que tiene un receptor. En un principio, Hill propuso un modelo para explicar la cooperatividad donde supuso que todos los sitios de un receptor se ocupan simultáneamente⁷. A partir de esta suposición llegó a la ecuación de Hill (ecuación 8) que daría las curvas dosis-respuesta para receptores con n cantidad de sitios (donde llamó coeficiente de Hill a n). Sin embargo, la suposición de que los sitios se ocupan simultáneamente es muy fuerte ya que no tiene en cuenta los estados de ocupación intermedia, los cuales disminuyen la sensibilidad del sistema y el coeficiente de Hill, haciendo que éste resulte siempre menor a la cantidad de sitios del receptor. Es por esto que se trabajó con la ecuación 7 en lugar de la 8.

$$\theta = \frac{L^n}{K_D + L^n} \tag{8}$$

Una observación importante es que al igual que se definieron $EC_{90}(t), EC_{50}(t), EC_{10}(t)$ para tiempos en el pre-equilibrio, puede definirse $n_H(t)$ mediante la misma ecuación 7, tomando simplemente los valores de $EC_{90}(t)$ e $EC_{10}(t)$ para obtener la curva temporal del coeficiente de Hill, que dará información acerca de la evolución de la sensibilidad del sistema (Figura 8).

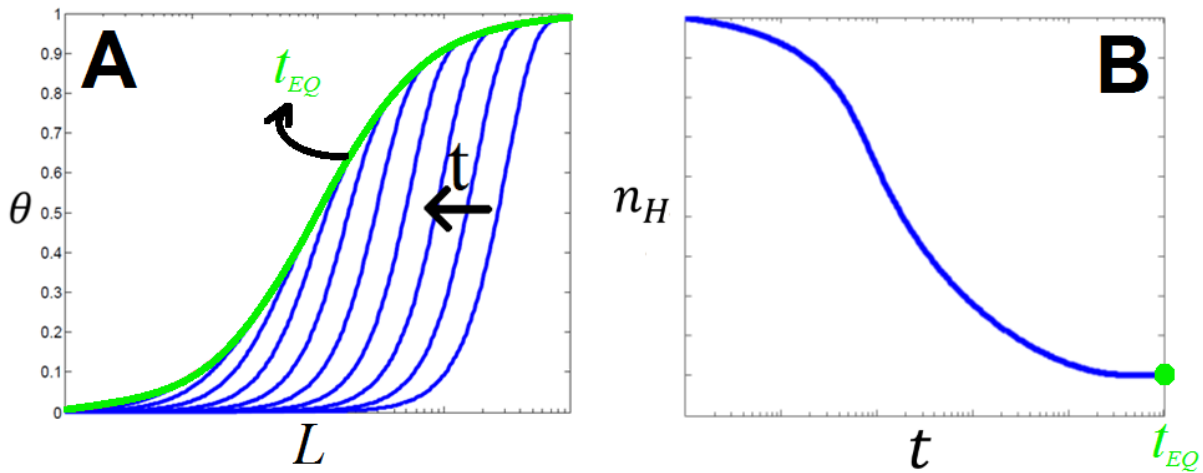


Figura 8

A Curvas dosis-respuesta en *equilibrio* y *pre-equilibrio*. Cada curva tiene su propia sensibilidad y rango dinámico y representa un punto en la evolución temporal del coeficiente de Hill.

B Coeficiente de Hill en función del tiempo. Puede observarse en este ejemplo que el sistema es más sensible en el *pre-equilibrio* que en el *equilibrio*.

2. Objetivo

2.1 Problema a resolver

Existe un problema planteado en la literatura^{19,9,22} que consiste en que una red de señalización que presente sitios equivalentes en afinidad con cooperatividad negativa es indistinguible en equilibrio de una que tenga sitios diferentes en afinidad pero independientes entre sí.

El objetivo de este trabajo es diseñar un protocolo que permita, dada una red de señalización desconocida, discernir si presenta cooperatividad negativa o si los sitios de ligadura son diferentes.

2.2 Antecedentes

Este trabajo se basa en uno anterior⁹ donde se aborda el mismo problema armando dos modelos, uno con cooperatividad negativa y sitios idénticos (**NC** por *negative cooperativity*) y otro con sitios independientes y diferentes (**IB** por *independent binding*). El trabajo mencionado⁹ estudia la dinámica de ambos modelos y observa que existe una diferencia en las curvas temporales (*Figura 9*⁹). Finalmente propone un protocolo de distinción basado en ajustar estas curvas con cada modelo para ver cuál ajusta mejor. Esta tesis toma los mismos modelos para desarrollar el protocolo propuesto, entre otros, y probar su funcionamiento, aprovechando los antecedentes de los directores de esta tesis en el estudio de los sistemas de señalización en pre-equilibrio⁵.

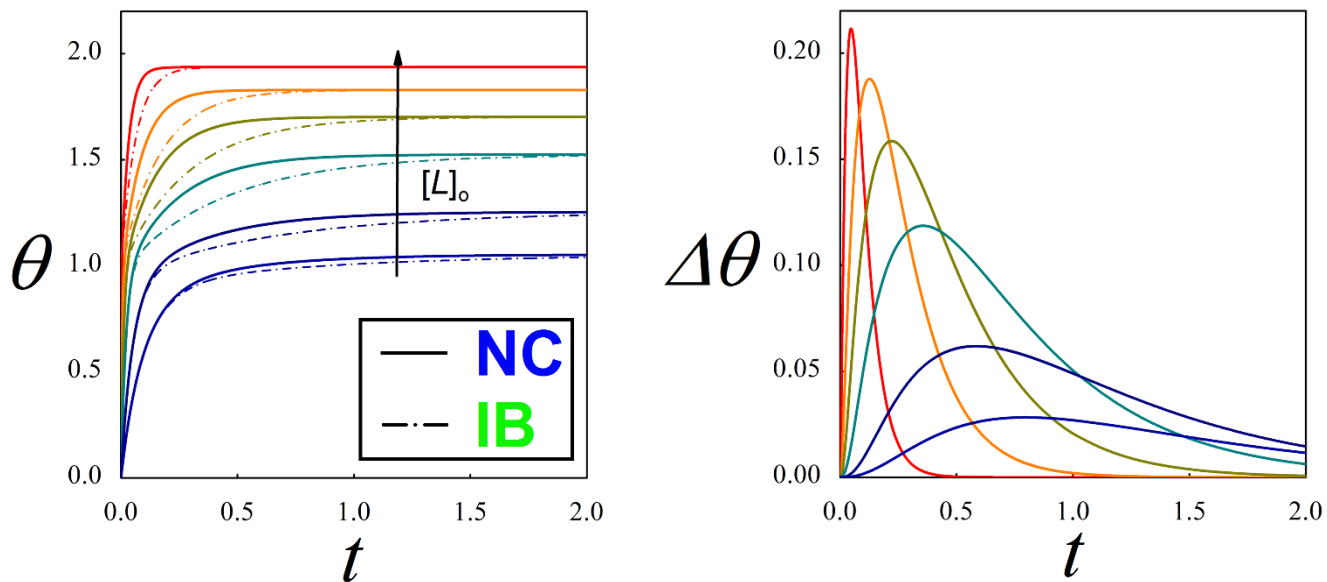


Figura 9: Diferencia en la dinámica de ambos modelos para varias concentraciones iniciales de ligando $[L]_0$. A la izquierda se observan las curvas para ambos modelos, mientras que a la izquierda la diferencia entre las curvas para cada concentración de ligando ($\Delta\theta \equiv \theta_{\text{NC}} - \theta_{\text{IB}}$). Figura adaptada⁹.

3. Modelado

A fin de estudiar el problema de la indistinguibilidad planteado en el objetivo, tomamos los mismos modelos que el trabajo antecesor⁹, elegidos por ser los más simples que pueden presentar cooperatividad al tener dos sitios de ligadura. Ambos modelos se esquematizan en la Figura 10.

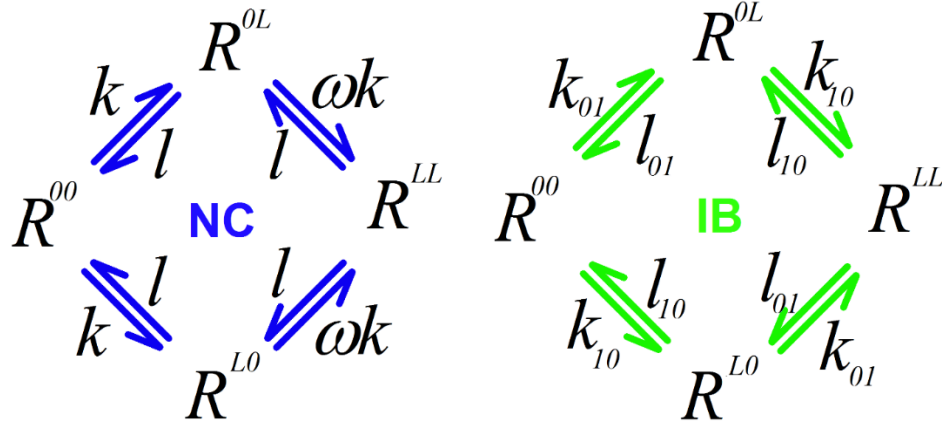


Figura 10: Modelos tomados del trabajo antecesor⁹ para estudiar la indistinguibilidad entre cooperatividad negativa (**NC**) y sitios independientes (**IB**). R^{00} representa el receptor vacío, R^{LL} con ambos sitios ocupados y R^{L0} y R^{0L} los dos estados intermedios con un solo sitio ocupado. k representa la tasa de pegado y l la de despegado. En **NC** estas tasas son iguales para ambos sitios, pero las tasas de pegado difieren por un factor ω entre el primer pegado y el segundo de manera de modelar la cooperatividad. En **IB** estas tasas son diferentes para ambos sitios, pero no varían entre el primer y el segundo pegado, de manera que los sitios sean independientes uno del otro.

A partir de la ley de acción de masas y usando que la cantidad total de receptor R_0 es invariante (no se sintetizan ni degradan los receptores dentro de las escalas temporales consideradas) podemos expresar los modelos como dos sistemas de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 9 para **IB** y 10 para **NC**).

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(l_{10} + k_{10}L + k_{01}L) & -k_{10}L & l_{01} - k_{10}L \\ -k_{01}L & -(l_{10} + k_{10}L + k_{01}L) & l_{10} - k_{01}L \\ k_{01}L & k_{10}L & -(l_{10} + l_{01}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} + R_0 \begin{pmatrix} k_{10}L \\ k_{01}L \\ 0 \end{pmatrix} \quad (9)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(l + kL + \omega kL) & -kL & l - kL \\ -kL & -(l + kL + \omega kL) & l - kL \\ \omega kL & \omega kL & -2l \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} + R_0 \begin{pmatrix} kL \\ kL \\ 0 \end{pmatrix} \quad (10)$$

Puede verse que ambos modelos son sistemas lineales de 3 variables cada uno (las concentraciones correspondientes a los dos estados semi-ocupados del receptor y la del estado ocupado), y que mientras que **NC** cuenta con 3 parámetros (ω, k, l), **IB** cuenta con 4 ($k_{10}, l_{10}, k_{01}, l_{01}$). Es importante aclarar que se trabajó sin depleción de ligando, es decir, bajo la hipótesis de que la concentración de ligando se mantiene constante. Esta hipótesis se cumple siempre y cuando el número de partículas de ligando sea mucho mayor que el número de partículas de receptor ($L \gg R_0$), de modo que por más que se ocupen todos los receptores la diferencia entre el número de partículas de ligando libre antes y después sea despreciable. También puede cumplirse si existe un buffer químico que la mantiene constante (algún mecanismo químico que libere tantas partículas de ligando al medio como las que se vayan uniendo a los receptores). Es por este motivo que no hay una cuarta ecuación para la tasa de variación de ligando, como sí existe en el trabajo antecesor⁹.

4. Indistinguibilidad en equilibrio

A fin de lograr una comprensión más amplia del problema de la indistinguibilidad, se buscó antes que nada resolver analíticamente las ecuaciones 9 y 10 en el equilibrio, es decir, donde las derivadas temporales son nulas, con el objetivo de obtener las expresiones de las curvas dosis-respuesta para ambos modelos y así estudiar bajo qué condiciones se da la indistinguibilidad en el equilibrio. Es importante observar que tanto en **IB** como **NC**, el estado estacionario y el equilibrio termodinámico son equivalentes ya que se trata de sistemas cerrados.

4.1 Subespacio de indistinguibilidad

Anulando el término de la derivada temporal en las ecuaciones 9 y 10, se obtuvieron analíticamente las ecuaciones 11 y 12 para **IB** y **NC** respectivamente, definiendo las constantes de disociación $K_{10} := \frac{l_{10}}{k_{10}}$, $K_{01} := \frac{l_{01}}{k_{01}}$, $K := \frac{l}{k}$ y la proporción de sitios ocupados $\theta_{EQ} := \frac{(R^{10}+R^{01}+2R^{11})}{2R_0}$.

$$\theta_{EQ} = \frac{L(K_{01}+K_{10}+2L)}{K_{10}K_{01}+(K_{10}+K_{01})L+L^2} = \frac{L}{K_{10}+L} + \frac{L}{K_{01}+L} \quad (11)$$

$$\theta_{EQ} = \frac{2(LK+\omega L^2)}{K^2+2KL+\omega L^2} \quad (12)$$

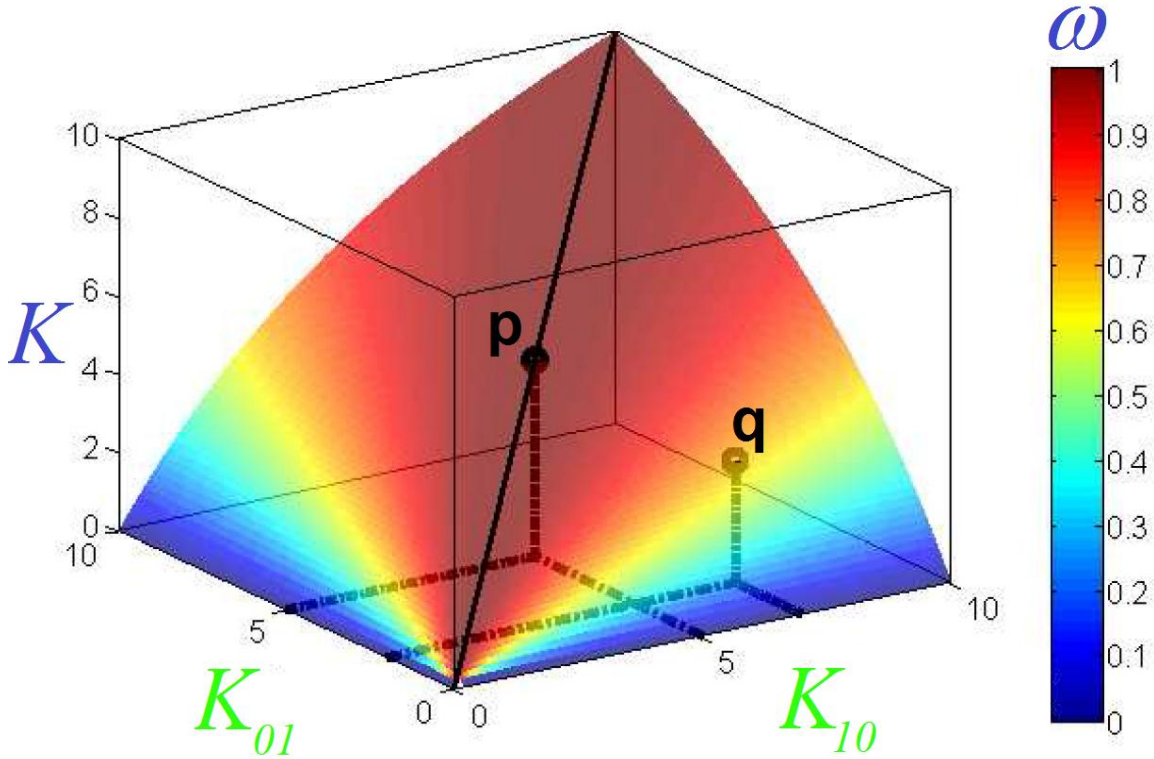
Puede observarse que las expresiones son las mismas que las obtenidas a partir de argumentos termodinámicos en el trabajo precedente⁹. Además, para el modelo de **IB** se obtuvo que el total es la suma de la contribución de cada sitio, cada uno con su constante de disociación, lo que es coherente con que se trata de sitios independientes. Para el modelo de **NC** se obtuvieron términos cuadráticos en la concentración de ligando, lo que se esperaba también para un sistema de dos sitios con cooperatividad.

Solo basta con igualar las expresiones 11 y 12 para obtener las condiciones de indistinguibilidad de los modelos. Las mismas se expresan en las ecuaciones 13 y 14 e indican qué relación entre los parámetros de cada modelo debe cumplirse para que ambos resulten en la misma curva dosis-respuesta. Éstas son las condiciones de indistinguibilidad ya que si se mide experimentalmente la curva dosis-respuesta no habrá manera de concluir si se trata de **NC** y no de **IB** o viceversa. Las mismas, originan un subespacio dentro del espacio de parámetros donde

el problema de indistinguibilidad existe, éste fue graficado despejando las ecuaciones y puede observarse en la *Figura 11*.

$$\frac{K^2}{\omega} = K_{10}K_{01} \quad (13)$$

$$\frac{K}{\omega} = \frac{K_{10}+K_{01}}{2} \quad (14)$$



*Figura 11: Subespacio de indistinguibilidad (en equilibrio) de los modelos **IB** y **NC**. Puede observarse que es simétrico respecto al intercambio de los ejes horizontales K_{10} y K_{01} lo que proviene de la simetría del receptor frente al intercambio de los diferentes sitios. ω aparece en la escala de colores y observamos también que el subespacio abarca solo los ω entre 0 y 1, con lo cual se recupera el problema expuesto en la literatura, que abarca solo cooperatividades negativas. Es importante además notar que cada punto del gráfico representa a su vez un subespacio de parámetros, que incluye a $\omega, k, l, k_{10}, l_{10}, k_{01}, l_{01}$ mientras que el gráfico se confeccionó en el espacio de $\omega, K, K_{10}, K_{01}$, que son los parámetros que definen únicamente el equilibrio de cada sistema. Se marcó además con una línea negra la función identidad $K = K_{10} = K_{01}$, la cual pertenece al subespacio con $\omega = 1$. El punto **p** marcado es parte de la misma y puede observarse, moviéndose hacia el punto **q**, que mientras más difieran las constantes de disociación de **IB**, más cercano a 0 deberá ser ω , siendo 1 si las constantes son iguales y tendiendo a 0 si la diferencia diverge.*

Es importante notar que un modelo **NC** con $\omega = 1$ (sin cooperatividad) es indistinguible en el equilibrio de un modelo **IB**, con todas las constantes de disociación de ambos modelos iguales. Esta solución debía pertenecer al subespacio de indistinguibilidad ya que implica que todos los parámetros que controlan el equilibrio del sistema (las constantes de disociación) son iguales y por ende indistinguibles. El subespacio restringido a $\omega = 1$ es de hecho un punto de quiebre del sistema, para $\omega > 1$ no existen soluciones de las ecuaciones 12 y 13 y por ende tampoco indistinguibilidad. Esto es coherente con el problema planteado en la literatura, que abarca solo cooperatividades negativas. Con $\omega = 1$ existe una recta de soluciones, en el espacio de (K, K_{10}, K_{01}) , donde todas las constantes de disociación son iguales entre sí. Para un $\omega < 1$ fijo, aparecen dos rectas de soluciones, simétricas ante el intercambio de sitios en **IB**. Es decir, dado un $\omega_0 < 1$ y un K_0 , existen dos pares (K_{10}, K_{01}) y (K'_{10}, K'_{01}) que son solución de las condiciones de indistinguibilidad, donde $K_{10} = K'_{01}$ y $K_{01} = K'_{10}$. Esta simetría proviene del hecho de que tanto **IB** como **NC** llevan una simetría intrínseca frente al intercambio de los sitios del receptor, esta simetría aparece también en las condiciones de indistinguibilidad. Finalmente, para $\omega \rightarrow 0$ las rectas se acercan a los ejes (K_{10}, K_{01}) , lo que implica que $K_{10} \gg K_{01}$ o bien $K_{10} \ll K_{01}$.

4.2 Interpretación

A fin de interpretar el significado de las condiciones de indistinguibilidad, se graficó numéricamente la ecuación 12 correspondiente a las curvas dosis-respuesta de **NC**, haciendo un barrido espaciado logarítmicamente en el parámetro ω , centrado en $\omega = 1$. Puede verse el resultado en la *Figura 12 A*, donde se observa que las curvas son más sensibles para cooperatividades positivas que para negativas como se esperaba, además de que presentan rangos dinámicos más amplios en el caso de cooperatividades negativas. Esto es coherente con la curva obtenida para el coeficiente de Hill respecto de ω (*Figura 12 B*), que es monótonamente creciente, pasando por el punto $n_H(\omega = 1) = 1$ lo que implica que sin cooperatividad el modelo tiene la misma sensibilidad que el caso monovalente. Puede observarse además que $n_H(\omega \rightarrow \infty) = 2$ y esto es coherente con el origen del coeficiente de Hill, que fue definido para medir la cantidad de sitios del receptor suponiendo que todos se ocupan simultáneamente (*ver 1.4 EC₅₀ y Coeficiente de Hill*). Esta suposición es equivalente a que la cooperatividad diverja y en este caso el coeficiente de Hill indica correctamente que el receptor cuenta con 2 sitios.

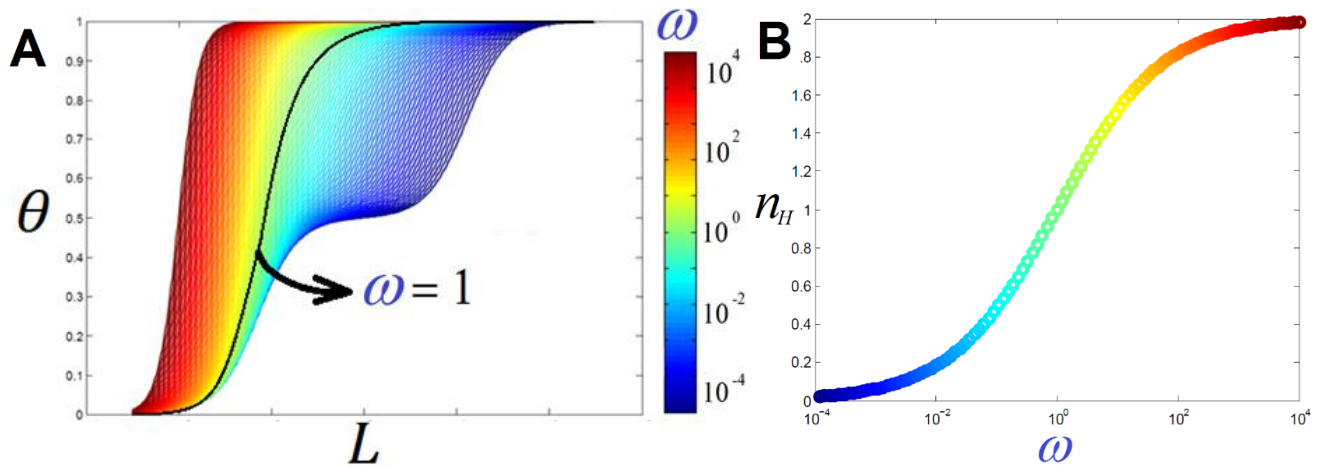


Figura 12

A Curvas dosis-respuesta de **NC**. Cada curva corresponde a un valor de ω en la escala de colores. El barrido está centrado en $\omega = 1$ y abarca cooperatividades negativas y positivas. Puede observarse que para las negativas aparece una región intermedia donde se atenúa la pendiente de la curva, y que la atenuación es mayor y de rango más amplio a medida que ω se hace más cercano a 0.

B Coeficiente de Hill en función de ω . Cada punto representa una de las curvas en **A**, las cuales no son propiamente curvas de Hill (ecuación 8) pero donde el coeficiente se calculó a partir de la ecuación 7 que da una idea de la sensibilidad global del sistema¹². Puede observarse que la curva es monótonamente creciente con la cooperatividad, esto se condice con que a mayor cooperatividad, menor será el rango dinámico del sistema y mayor la sensibilidad. Además, $n_H(\omega = 1) = 1$ lo cual es coherente ya que el coeficiente de Hill está normalizado al modelo monovalente que no presenta cooperatividad.

A partir del gráfico de la Figura 12 **A**, se tomó una de las curvas con $\omega < 1$ de **NC**, y conociendo K se despejaron K_{10} y K_{01} de las condiciones de indistinguibilidad (ecuaciones 13 y 14), es decir, las constantes de disociación de un modelo **IB** indistinguible por presentar la misma curva dosis-respuesta en equilibrio. Estos valores se graficaron junto a la curva dosis-respuesta en la Figura 13, donde se explica la forma de la misma a partir de cualquiera de los modelos y la raíz del problema de indistinguibilidad. Comparando las Figura 12 y Figura 13, puede concluirse también que como la región de transición con baja sensibilidad desaparece para $\omega \geq 1$ resultando en que $n_H \geq 1$, se hace imposible reproducir una curva a partir de **IB** indistinguible de una de **NC** con cooperatividad positiva, debido a que, al tratarse de sitios independientes, el máximo coeficiente de Hill es 1, como el del modelo monovalente simple (ver *Introducción*).

Otra propiedad de las condiciones de indistinguibilidad es que así como permiten relacionar un modelo de **NC** con parámetros de equilibrio K y ω a un modelo de **IB** con parámetros K_{10} y K_{01} , posibilitan en particular asignar una cooperatividad efectiva a cualquier modelo de **IB**, que corresponderá a el valor de ω del sistema indistinguible, siempre menor a 1. De esta manera, en lo que continúa de este trabajo se hará mención a la cooperatividad de cualquiera de ambos modelos, donde para el caso de **IB** debe entenderse la cooperatividad efectiva.

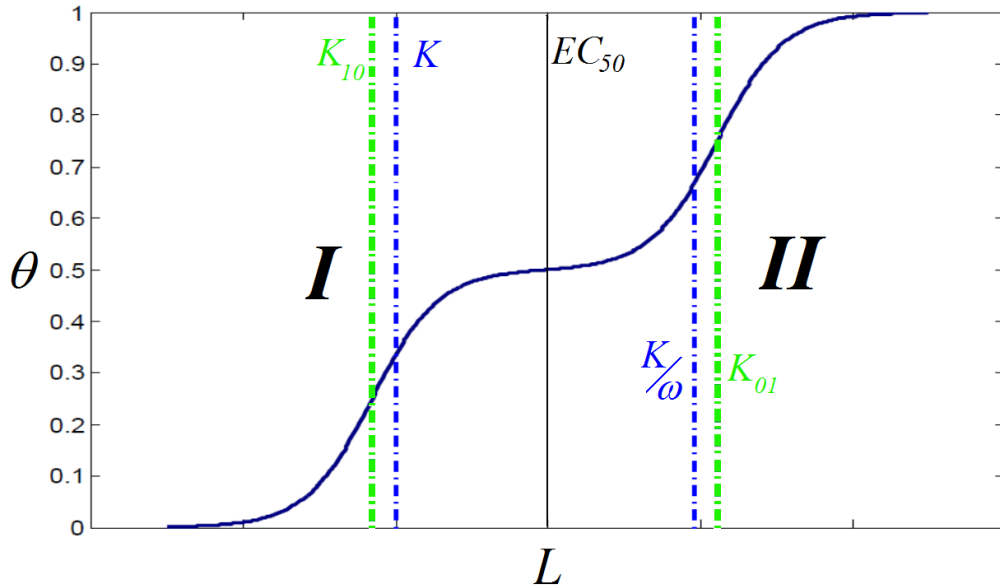


Figura 13: Curva dosis-respuesta en equilibrio, tanto del modelo **IB** como del **NC**. Se marcan además los valores de las constantes de disociación de ambos modelos ($K = 1$, $\omega = 10^{-4}$ y K_{10} y K_{01} despejados a partir de las condiciones de indistinguibilidad) y el EC_{50} . Es importante notar que mientras K_{10} y K_{01} dan la afinidad de dos sitios diferentes e independientes (donde el sitio 10 es más afín al ligando que el 01), K y $\frac{K}{\omega}$ corresponden a la afinidad del primer y segundo pegado de ligando, independientemente del sitio de ligadura (recordar que ambos sitios son iguales en **NC**). Pueden observarse dos regiones de sensibilidad **I** y **II** bien distinguidas en la curva, separadas por el EC_{50} que está centrado donde la sensibilidad es mínima. Nótese también que K_{10} y K pertenecen a **I** mientras que K_{01} y $\frac{K}{\omega}$ a **II**, y estos valores se ubican donde la curva es sensible. Esto es la raíz del problema, ya que puede explicarse la sensibilidad de ambas regiones a partir de cualquiera de los modelos. En el caso de **IB**, la región **I** corresponde al pegado de ligando sobre el sitio más afín (el de K_{10}), mientras que la región **II**, donde el sitio 10 ya está saturado, con el pegado sobre el sitio menos afín, que responde sólo a mayores concentraciones (el de K_{01}). En el caso de **NC**, la región **I** corresponde al pegado del primer ligando sobre cualquiera de los sitios iguales en afinidad, donde una vez que un receptor se encuentra semi-ocupado, no se pega el segundo ligando debido a la cooperatividad negativa, esto sólo ocurre en la región **II**, con concentraciones más altas de ligando, necesarias para oponerse a la cooperatividad negativa. Para ambos modelos es coherente también que el EC_{50} se encuentre centrado entre ambas regiones. En el caso de **IB**, marca la concentración donde el sitio más afín se encuentra saturado pero el menos afín está libre, lo que debe corresponderse a la mitad de la máxima ocupación. En el caso de **NC**, marca la concentración donde todos los receptores se encuentran semi-ocupados y no hay ocupaciones completas debido a la cooperatividad, lo que también se corresponde con la mitad de la máxima ocupación.

5. Análisis en pre-equilibrio

Con el objetivo de desarrollar protocolos que tomen datos de un sistema con dos sitios de ligadura y permitan hacer la distinción entre el modelo microscópico subyacente, **IB** ó **NC**, se estudiaron numéricamente los modelos en el pre-equilibrio en busca de diferencias cualitativas o cuantitativas, a fin de encontrar indicadores medibles de distinción. Para esto se programó un código en Matlab²³ que resuelve ambos sistemas lineales (ver 11.1 *Código de resolución de IB y NC*) diagonalizando la matriz y hallando sus autovectores y autovalores. Reescribiendo estos sistemas (ecuaciones 9 y 10) y dividiendo a ambos lados de las dos expresiones por R_0 obtenemos las ecuaciones 15 y 16, donde se re-definieron las variables del problema R^{01}, R^{10}, R^{11} como las proporciones de concentración de cada estado respecto de la concentración total considerada invariante. Esto adimensionaliza las variables que ahora serán escalares entre 0 y 1 (ningún estado de ocupación puede superar la concentración total de receptor) sin pérdida de generalidad.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(l_{10} + k_{10}L + k_{01}L) & -k_{10}L & l_{01} - k_{10}L \\ -k_{01}L & -(l_{10} + k_{10}L + k_{01}L) & l_{10} - k_{01}L \\ k_{01}L & k_{10}L & -(l_{10} + l_{01}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_{10}L \\ k_{01}L \\ 0 \end{pmatrix} \quad (15)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(l + kL + \omega kL) & -kL & l - kL \\ -kL & -(l + kL + \omega kL) & l - kL \\ \omega kL & \omega kL & -2l \end{pmatrix} \begin{pmatrix} R^{10} \\ R^{01} \\ R^{11} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} kL \\ kL \\ 0 \end{pmatrix} \quad (16)$$

De las ecuaciones 15 y 16, puede verse que para correr el programa se necesitan elegir los parámetros $\omega, k, l, k_{10}, l_{10}, k_{01}, l_{01}$ y las condiciones iniciales $R^{01}(t = 0), R^{10}(t = 0), R^{11}(t = 0)$, las cuales se tomaron todas nulas. De esta manera, se estudió el llenado de los receptores que a $t = 0$ se encuentran libres de ligando y a medida que transcurre el tiempo éste se va uniendo a los receptores hasta alcanzar un equilibrio. Las curvas de evolución temporal y el equilibrio alcanzado dependerán de la concentración de ligando L , de modo que se hizo un barrido espaciado logarítmicamente a fin de obtener una curva temporal para cada concentración de ligando y así las curvas dosis-respuesta en escala logarítmica.

5.1 Algoritmo de resolución del sistema

Se programó un código en Matlab para resolver los sistemas de ecuaciones 15 y 16 (ver *11.1 Código de resolución de IB y NC*). El mismo toma un set de parámetros prefijado y, al tratarse de dos sistemas lineales, los resuelve diagonalizando cada matriz a fin de hallar los autovalores y autovectores que darán la evolución temporal del sistema (es decir, las curvas $R^{01}(t), R^{10}(t), R^{11}(t)$). Como se desea obtener las curvas dosis-respuesta, el programa repite el procedimiento para varias concentraciones diferentes de ligando, haciendo un barrido espaciado logarítmicamente de manera de abarcar el rango dinámico de los sistemas, esto se verifica a posteriori una vez resuelto cada sistema. Luego de obtenidas las curvas dosis-respuesta (en equilibrio y a distintos tiempos pre-equilibrio), el programa utiliza el método de bisección²⁴ para hallar los valores de $EC_{10}(t), EC_{50}(t), EC_{90}(t)$ y calcular a partir de éstos y de la ecuación 7 la curva $n_H(t)$. En la *Figura 14* se exponen algunos de los ejemplos de gráficos que pueden obtenerse a partir de este programa, a partir de los cuales se fueron estudiando las propiedades de ambos modelos en busca de índices de distinción en pre-equilibrio. Es importante notar que en la figura se muestran ejemplos de las posibilidades del programa, pero que todos los gráficos se obtienen de la resolución de ambos sistemas con una sola elección particular de los parámetros, de manera que las diferencias observadas entre ambos modelos pueden no ser generales y observarse solo en la configuración elegida en este caso. Para encontrar diferencias generales, es necesario hacer un estudio estadístico que abarque un amplio espectro del subespacio de indistinguibilidad (ver *4.1 Subespacio de indistinguibilidad*). El set elegido en este caso fue $\omega = 0,0017$, $k = k_{10} = k_{01} = l_{10} = 1$ y tanto l como l_{01} fueron despejados de las condiciones de indistinguibilidad (ecuaciones 13 y 14) para hacer el estudio dentro del subespacio de parámetros donde existe el problema. Los intervalos tomados para el tiempo y la concentración de ligando fueron elegidos con un espaciado logarítmico entre $[10^{-6}, 10^4]$ y $[10^{-3}, 10^7]$ respectivamente.

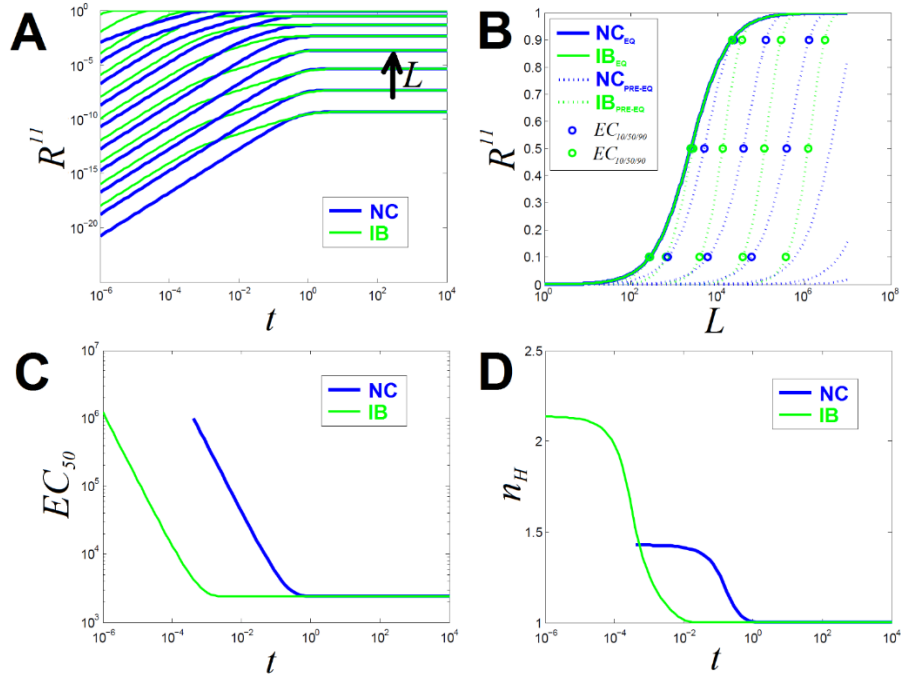


Figura 14: Ejemplos de gráficos obtenidos mediante el algoritmo de resolución de los sistemas **IB** como **NC**.

A Concentración de receptor doblemente ocupado en función del tiempo, cada curva representa la evolución temporal del sistema con una concentración diferente de ligando, con ambos ejes en escala logarítmica. Se verifica la indistinguibilidad en el equilibrio.

B Curvas dosis-respuesta en equilibrio (líneas continuas) y en el pre-equilibrio (líneas punteadas), donde se tomó como respuesta sólo a la concentración de receptor doblemente ocupado. A partir de estas curvas se obtuvieron numéricamente $EC_{90}(t)$, $EC_{50}(t)$, $EC_{10}(t)$ utilizando el método de bisección. Puede observarse que debido a que las curvas de **NC** más hacia la derecha del gráfico no alcanzaron el máximo con las concentraciones de ligando utilizadas, no puede definirse el EC_{50} correspondiente a esos tiempos. Es por esto que en **C** la curva de **NC** no se muestra para los tiempos más cortos y lo mismo ocurre con el EC_{10} e EC_{90} que hace que la curva de **NC** no alcance los tiempos más cortos en **D**. Se verifica la indistinguibilidad en el equilibrio.

C Evolución temporal de EC_{50} . Puede verse que las curvas dosis-respuesta se desplazan en el tiempo hacia valores de menor concentración de ligando hasta llegar al valor de equilibrio. Se verifica que para el set particular de parámetros utilizado, el centro de la curva de **NC** comienza en valores superiores de concentración de ligando con respecto a **IB**, y tarda más tiempo en llegar al valor de equilibrio.

D Evolución temporal del coeficiente de Hill. Puede observarse que ambas curvas son decrecientes lo que implica que el rango dinámico de ambos sistemas aumenta con el tiempo, disminuyendo la sensibilidad. Además, que la caída es más amplia en el caso de **IB** para este set particular de parámetros. Se verifica la indistinguibilidad en el equilibrio.

5.2 Barridos de parámetros

Cada set de parámetros distinto representa un sistema diferente, y como se busca encontrar indicadores de distinción generales que funcionen para cualquier set que pueda presentar un problema (que haya indistinguibilidad en el equilibrio), se trabajó con barridos en un espacio amplio de todos los parámetros, resolviendo el sistema para cada set diferente. Todos los barridos de los cuales se obtuvieron los sets fueron hechos también con un código programado en Matlab (ver 11.2 *Código para obtener los sets de parámetros*) que es la aplicación del método de *Latin Hypercube Sampling* (LHS)²⁰, el cual consiste en dividir al espacio de parámetros en una grilla equiespaciada y luego tomar puntos de cada celda de la grilla de manera aleatoria pero sin repetir filas ni columnas del grillado. Esto permite que dos sets elegidos no contengan siquiera un par de números del mismo parámetro demasiado parecidos entre sí, además de reducir el costo computacional de elegir todos los puntos del grillado.

Cabe mencionar que si bien son 7 los parámetros ($\omega, k, l, k_{10}, l_{10}, k_{01}, l_{01}$), el problema estudiado se presenta sólo en un subespacio incluido en el espacio de los 7 parámetros (el subespacio dado por las condiciones de indistinguibilidad de las ecuaciones 13 y 14). De manera que el set debe elegirse dentro de este subespacio ya que ahí es donde existe el problema de indistinguibilidad. Teniendo esto en cuenta, no es posible elegir los 7 parámetros libremente sino que dados 5 cualesquiera deben despejarse los otros 2 utilizando las condiciones de indistinguibilidad. Existen muchas maneras arbitrarias de hacerlo, de las cuales se optó por elegir siempre los valores de $\omega, k, l, l_{10}, l_{01}$ y despejar k_{10}, k_{01} . Esta elección cuenta con la ventaja de tener un control sobre el rango de ω en el que se desea trabajar, ya que si éste fuera uno de los parámetros despejados, el intervalo de valores no podría elegirse directamente sino que dependería del intervalo del resto de los parámetros y de las condiciones de indistinguibilidad. Esta elección se hizo porque ya se había identificado a ω como uno de los parámetros más importantes del problema, que controla cuán parecidos o diferentes serán ambos modelos (ver 4. *Indistinguibilidad en equilibrio*). Además, el grillado utilizado para el método de LHS no fue equiespaciado sino logarítmico, con el fin de abarcar un rango de varios órdenes de magnitud diferentes en el subespacio de indistinguibilidad.

5.3 Barrido inicial

Se realizó un primer barrido de 100 sets de parámetros a partir del método LHS como se describió en 5.2 *Barridos de parámetros*. Los histogramas para cada uno de los parámetros pueden verse en la *Figura 15* mientras que los sets se graficaron en escala logarítmica junto al subespacio de indistinguibilidad en la *Figura 16*.

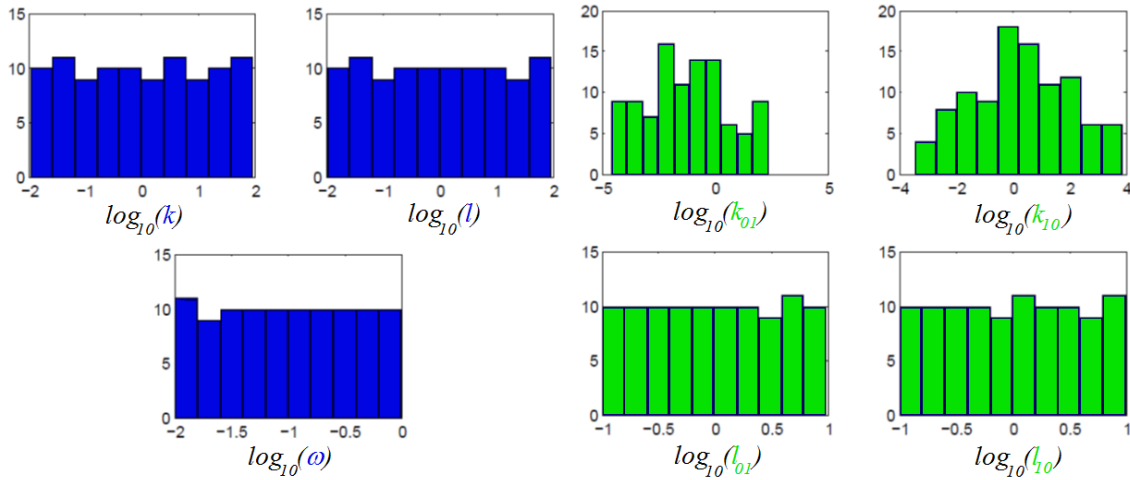


Figura 15: Histogramas para cada uno de los 7 parámetros del problema. Puede observarse que mientras que $\omega, k, l, l_{10}, l_{01}$ fueron elegidos de manera aleatoria y logarítmicamente uniforme, k_{10} y k_{01} fueron despejados a partir de las condiciones de indistinguibilidad, de manera que no están distribuidos uniformemente.

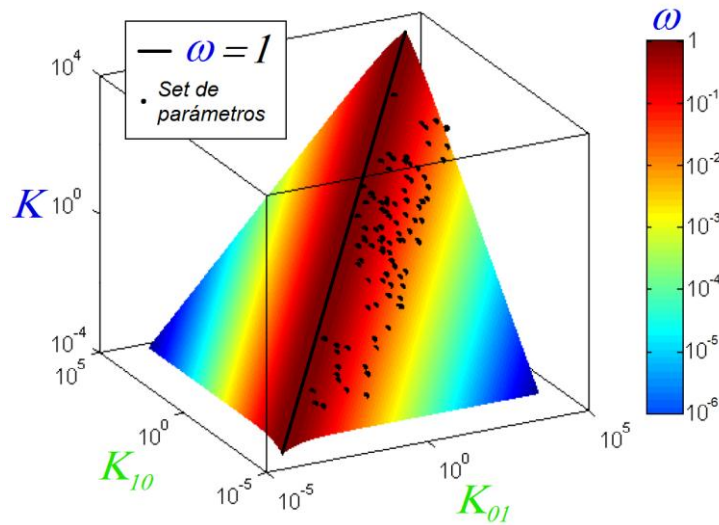
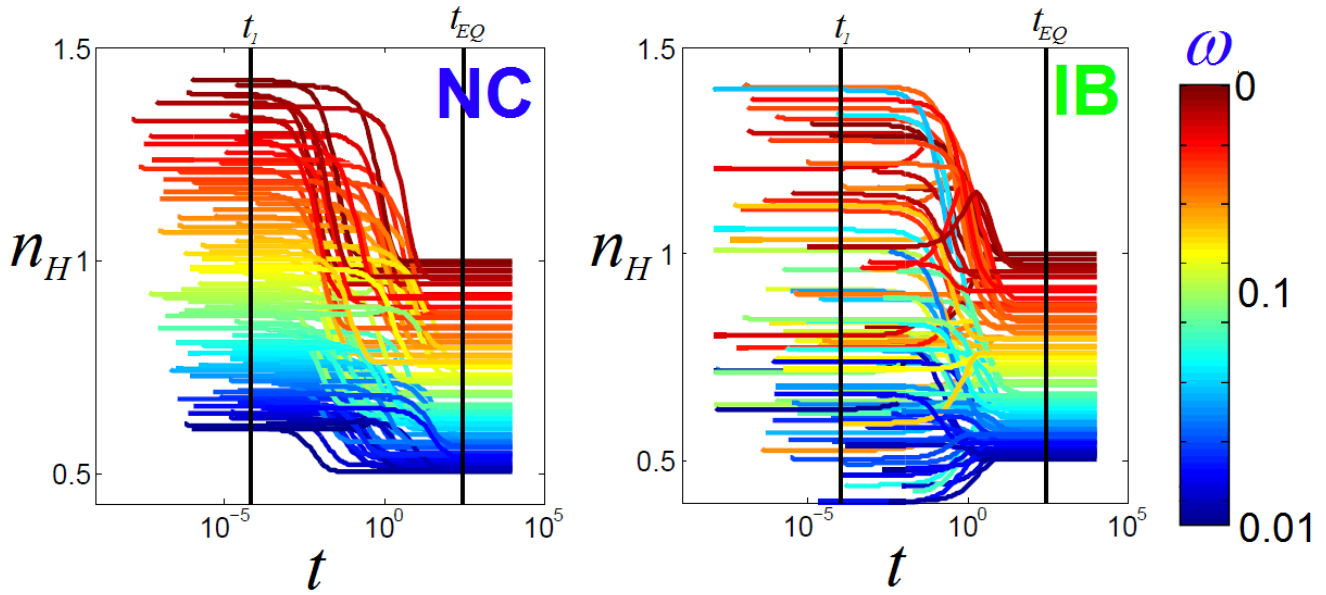


Figura 16: 100 sets de parámetros elegidos en el barrido inicial, todos se encuentran incluidos en el subespacio de indistinguibilidad graficado en escala logarítmica.

Una vez resueltos los sistemas para todos los sets diferentes, se obtuvo, entre muchos otros, el gráfico que muestra la *Figura 17*, donde se observó la primera diferencia general entre ambos modelos. Ésta se encuentra en el coeficiente de Hill a tiempos muy cortos respecto del tiempo de equilibrio. Se descubrió que para **NC** existe una función continua respecto de ω que no depende del resto de los parámetros (a t_1 las curvas se ordenan por color) mientras que para **IB** el coeficiente de Hill a tiempos cortos no forma ninguna curva. Es a partir de esta diferencia que se diseñó el *Protocolo Hill*, detallado más adelante (ver *6.2 Protocolo Hill*), cuya finalidad es la distinción entre los modelos mediante un procedimiento que compare la curva medida con las dos distribuciones de curvas diferentes. Es por esto que primero se hizo un nuevo barrido más exhaustivo para caracterizar con más detalle ambas distribuciones.



*Figura 17: Coeficiente de Hill en función del tiempo para ambos modelos. Cada curva corresponde a un set de parámetros diferente con el parámetro ω en la escala de colores. Las curvas comienzan a tiempos diferentes debido a que es necesario que las curvas dosis-respuesta alcancen primero el máximo para calcular el coeficiente de Hill a partir del EC_{90} e EC_{10} (ecuación 7). En el caso de las curvas **IB**, ω representa la “cooperatividad efectiva” y es el valor que tiene la cooperatividad del sistema **NC** indistinguible en equilibrio. Puede observarse la indistinguibilidad en t_{EQ} mientras que en el pre-equilibrio existe una clara diferencia entre ambos modelos. Para **NC** las curvas se encuentran ordenadas respecto de ω en t_1 y para **IB** esto no ocurre. Esta propiedad es el primer indicio encontrado que puede utilizarse para diseñar un protocolo que permita distinguir ambos modelos.*

5.4 Base de datos de evoluciones temporales del coeficiente de Hill

Con el objetivo de caracterizar mejor las distribuciones obtenidas en la *Figura 17* y guardar una base de datos de las mismas para utilizarla en el *Protocolo Hill*, se repitió el barrido de parámetros hecho en *5.3 Barrido inicial* pero más detalladamente, tomando 10000 sets de parámetros en lugar de 100 y ampliando el rango estudiado dentro del subespacio de indistinguibilidad. Los detalles pueden verse en los histogramas de la *Figura 18 A* y la región del subespacio escaneada en la *Figura 18 B*, mientras que ambas distribuciones están graficadas en la *Figura 19 A* y *B* donde puede apreciarse mejor la diferencia de ambos modelos en el pre-equilibrio.

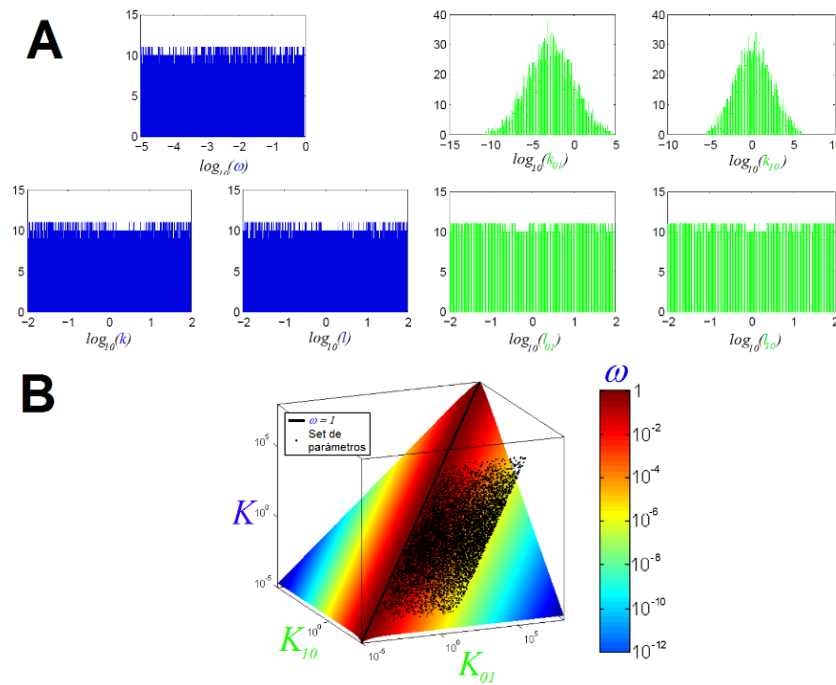


Figura 18

A Histogramas del barrido de parámetros exhaustivo (10000 sets) para cada uno de los 7 parámetros del problema. Puede observarse que mientras que $\omega, k, l, l_{10}, l_{01}$ fueron elegidos de manera aleatoria y logarítmicamente uniforme, k_{10} y k_{01} fueron despejados a partir de las condiciones de indistinguibilidad, de manera que no están distribuidos uniformemente.

B 10000 sets de parámetros elegidos en el barrido exhaustivo, todos se encuentran incluidos en el subespacio de indistinguibilidad graficado en escala de colores logarítmica.

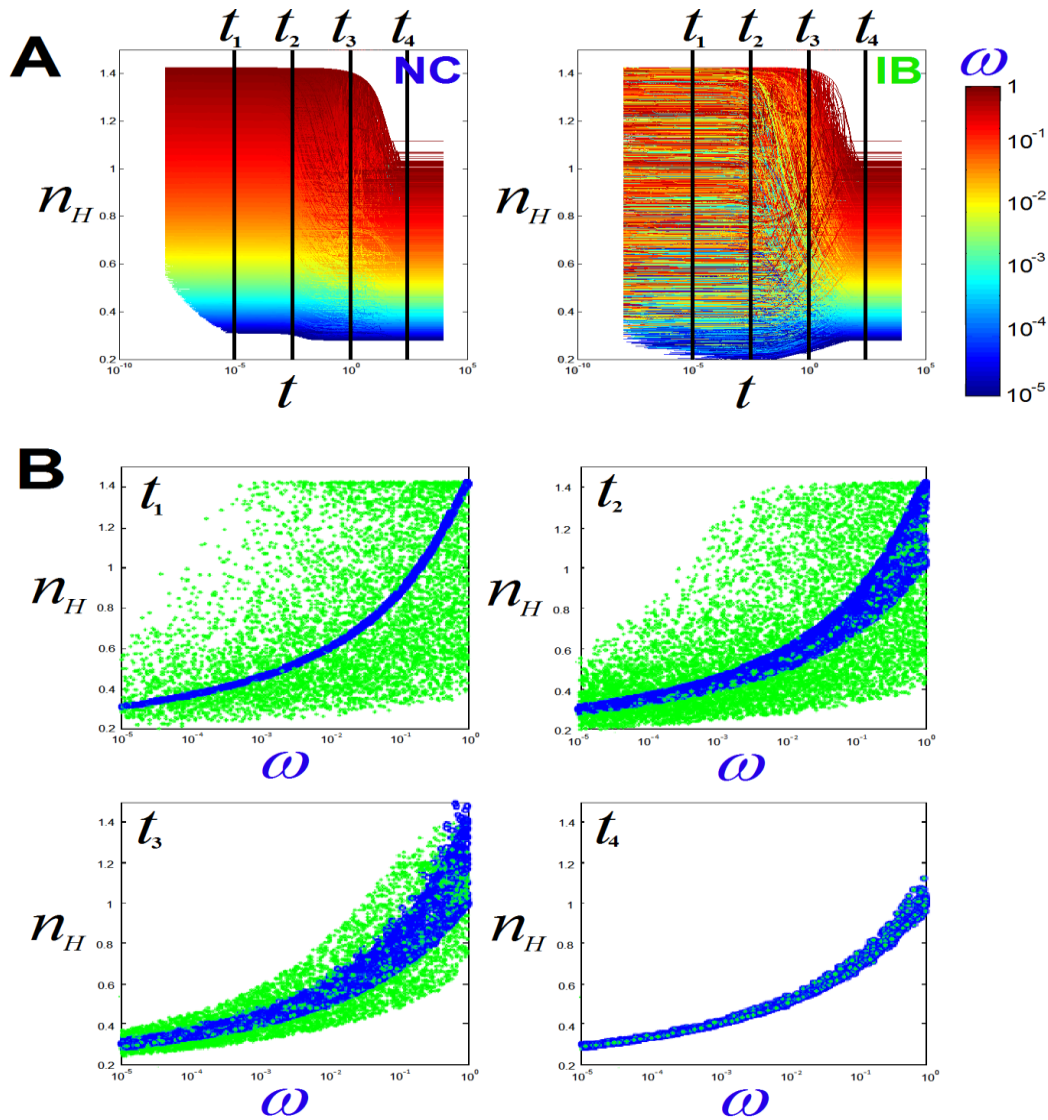


Figura 19

A Base de datos de las distribuciones detalladas de las curvas de coeficiente de Hill en función del tiempo para ambos modelos. Cada curva corresponde a uno de los 10000 sets de parámetros tomados, con ω en la escala de colores. En el caso de las curvas **IB**, ω representa la “cooperatividad efectiva” y es el valor que tiene la cooperatividad del sistema **NC** indistinguible en equilibrio. Pueden observarse diferencias en el ordenamiento de las curvas respecto de ω en el pre-equilibrio a partir de las cuales se diseñó el Protocolo Hill. Con el fin de observarlas mejor, se graficaron cortes de las mismas curvas para los 4 tiempos diferentes (t_1, t_2, t_3, t_4) marcados en **B**.

B Cortes de las curvas de la base de datos de las distribuciones en función de ω para los modelos **NC** e **IB**, para los 4 tiempos diferentes (t_1, t_2, t_3, t_4) marcados en **A**. Puede observarse la indistinguibilidad en el equilibrio (t_4) y las diferencias en las distribuciones en el pre-equilibrio.

6. Protocolos de distinción

Con el fin de cumplir el objetivo de esta tesis, se diseñaron dos protocolos diferentes que buscan distinguir entre los modelos **IB** y **NC**. El primero, *Protocolo Fit*, fue propuesto por el trabajo antecesor⁹ a éste, en esta tesis simplemente se implementó teniendo en cuenta el subespacio de indistinguibilidad. El segundo, *Protocolo Hill*, se basa en la diferencia en el coeficiente de Hill en pre-equilibrio hallada en este trabajo (ver 5.3 *Barrido inicial*).

6.1 Protocolo Fit

Este protocolo fue propuesto por el trabajo antecesor⁹ a esta tesis. El mismo se basa en realizar un ajuste de los parámetros de ambos modelos, aprovechando las diferencias en la evolución temporal de los mismos modelos (*Figura 9*). El algoritmo que propone el trabajo se detalla a continuación:

- 1) Realizar experimentos que permitan obtener las curvas temporales y de allí las curvas dosis-respuesta en el equilibrio.
- 2) Ajustar los datos del equilibrio a las curvas dosis-respuesta en equilibrio de ambos modelos (ecuaciones 11 y 12) de manera de obtener las constantes de disociación ($K, \frac{K}{\omega}, K_{01}, K_{10}$).
- 3) Ajustar la totalidad de los datos (incluyendo los perfiles temporales) a ambos sistemas de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 9 y 10), con la restricción para los parámetros libres obtenida del ajuste previo (recuérdese que $K = \frac{l}{k}, K_{01} = \frac{l_{01}}{k_{01}}, K_{10} = \frac{l_{10}}{k_{10}}$).
- 4) Mediante algún análisis estadístico, resolver qué modelo ajusta mejor.

A partir de este algoritmo se programó un código en Matlab (ver 11.4 *Código del Protocolo Fit*) que toma datos simulados y realiza ambos ajustes con algunas salvedades. En el punto 3), se decidió resolver los sistemas de ecuaciones diferenciales para obtener la proporción de sitios ocupados en función del tiempo y la concentración de ligando $\theta(t, L)$, al igual que el que muestra el mapa de colores de la *Figura 3*. Esta función dependerá de los parámetros de

cada modelo, que se tomaron como variables a ajustar para aplicar el método de cuadrados mínimos. Finalmente, se tomaron los valores mínimos obtenidos de cada ajuste para la norma 2 de la diferencia entre los datos de entrada y los calculados con cada modelo. Con estos dos números mín_{NC} y mín_{IB} , se definió un índice I_{Fit} como muestra la ecuación 17, que está comprendido entre $\frac{1}{2}$ y 1 (mín_{NC} y mín_{IB} son valores positivos) y es mínimo cuando ambos modelos ajustan igualmente bien y máximo si uno solo de ellos ajusta a la perfección. De esta manera y tomando algún valor fijo P_{Fit} entre $\frac{1}{2}$ y 1, el programa define que si $I_{Fit} > P_{Fit}$ entonces se trata del modelo que mejor ajusta, pero si $I_{Fit} \leq P_{Fit}$, el programa no define un modelo.

$$I_{Fit} := \frac{\text{máx}(\text{mín}_{NC}, \text{mín}_{IB})}{\text{mín}_{NC} + \text{mín}_{IB}} \quad (17)$$

Es importante notar que mientras más cercano a 1 sea el valor de P_{Fit} , más estricto se vuelve el protocolo, resultando en menor probabilidad de elegir alguno de los modelos pero mayor probabilidad de elegir correctamente. Este valor fue fijado posteriormente de acuerdo a los resultados de la puesta a prueba de los protocolos (ver 7.2 *Resultados*).

Un último detalle que se tuvo en cuenta fue que el vector de tiempos tomado para obtener los puntos de $\theta(t, L)$ llegara hasta el equilibrio del sistema sin pasarse. Si no hubiera sido así, es posible que dado uno de los sets de datos, su curva temporal alcanzara el equilibrio dentro de los primeros valores del vector completo del tiempo, resultando en que el ajuste que debe ser del pre-equilibrio contenga mucho más peso de los puntos de equilibrio.

6.2 Protocolo Hill

Este protocolo está basado en las distintas distribuciones de las curvas de evolución temporal de los coeficientes de Hill de ambos modelos, que se muestran en forma esquemática en el gráfico de la *Figura 17* y más detalladamente en la *Figura 19*. El protocolo consiste en medir una curva $n_H(t)$ en base a datos y realizar un análisis estadístico para ver a cuál de las dos distribuciones (una por cada modelo) pertenece o tiene mayores probabilidades de pertenecer. Para esto se necesitó primero caracterizar en detalle ambas distribuciones y guardarlas en una base de datos, es por esto que se repitió el barrido de parámetros inicial (ver 5.4 *Base de*

datos de evoluciones temporales del coeficiente de Hill) pero esta vez con 10000 sets de parámetros.

El algoritmo propuesto se detalla a continuación:

- 1) Obtener (experimentalmente o, como es el caso de esta tesis, numéricamente) las curvas dosis-respuesta tanto en el equilibrio como en el pre-equilibrio, es decir, en valores temporales desde cuatro órdenes de magnitud menores que el tiempo de equilibrio.
- 2) Ajustar los datos del equilibrio a las curvas dosis-respuesta en equilibrio de ambos modelos (ecuaciones 11 y 12) de manera de obtener las constantes de disociación ($K, \frac{K}{\omega}, K_{01}, K_{10}$) con sus respectivos intervalos de confianza.
- 3) A partir del valor de ω y su intervalo de confianza $\Delta\omega$ obtenidos del ajuste en equilibrio, tomar el conjunto de curvas $n_H(t)$ cuyos valores de ω se encuentren dentro de este intervalo de la base de datos con las distribuciones de curvas de ambos modelos (*Figura 20*). Se denominan ω al parámetro correspondiente a los datos simulados o medidos experimentalmente y ω a los de la base de datos.
- 4) Tomar la curva $n_H(t)$ de las mediciones hechas en 1) y comparar con las curvas tomadas en 3) para hallar la más cercana de cada modelo, de acuerdo a alguna distancia elegida.
- 5) Mediante algún análisis estadístico, resolver qué modelo es más cercano.

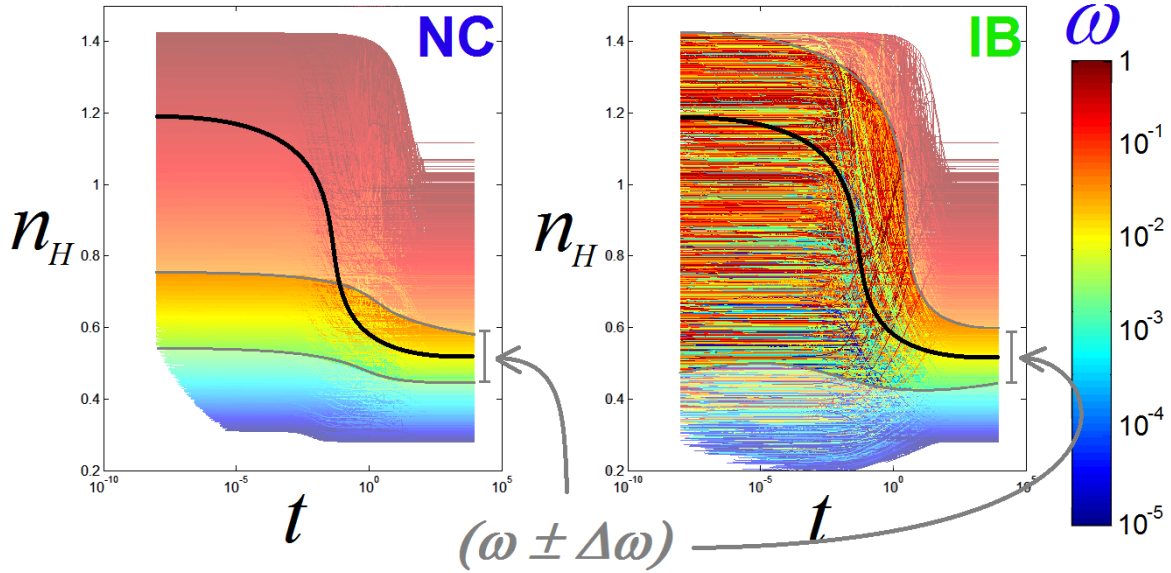


Figura 20: Esquema del funcionamiento del Protocolo Hill en base a las bases de datos de las curvas temporales del coeficiente de Hill. Se obtiene primero el ω y su intervalo de confianza $\Delta\omega$ del ajuste en el equilibrio para filtrar de la base de datos (todas las curvas de colores) solo las curvas cuyo ω pertenezca a dicho intervalo (las curvas de colores nítidos). Luego se elige, entre las curvas filtradas de ambos modelos, la que tenga la distancia mínima a la curva medida (en negro) que contiene la información del pre-equilibrio. En este caso, puede observarse que en el pre-equilibrio, no habrá ninguna de las curvas filtradas del modelo **NC** cuya distancia a la curva negra sea considerable, debido a que a tiempos cortos, la curva negra se aleja de la zona nítida. Esto indica que se trata de una curva perteneciente a la distribución de **IB** y por lo tanto proveniente de ese modelo.

A partir de este algoritmo se programó un código en Matlab (ver 11.5 *Código del Protocolo Hill*) que toma datos experimentales o simulados y realiza el ajuste en el equilibrio para obtener ω . Luego toma las curvas de la base de datos y las filtra de acuerdo al ω con que fueron obtenidas (o al ω del sistema indistinguible en caso de una curva **IB**). El filtro consiste en tomar sólo las curvas cuyo ω se encuentre dentro de un rango definido por $(\omega \pm \Delta\omega)$, donde $\Delta\omega$ estará dado por el error en el ajuste de ω en el equilibrio. Con ambos conjuntos de curvas filtrados de la base de datos de cada modelo, el programa luego calcula la distancia entre todas estas con la obtenida experimentalmente, buscando la curva de cada modelo que la minimiza. Se tomó la norma 2 como distancia. Finalmente, llamando $mín_{NC}$ y $mín_{IB}$ a las distancias mínimas para cada modelo, el programa calcula I_{Hill} , un índice definido como muestra la ecuación 18, que estará entre 0 y 1 siendo 0 si ambas distancias son iguales y tendiendo a 1 si alguna de ellas es

muy superior a la otra. De esta manera y tomando algún valor fijo P_{Hill} entre 0 y 1, el programa define que si $I_{Hill} > P_{Hill}$ entonces se trata del modelo que mejor ajusta, pero si $I_{Hill} < P_{Hill}$, el programa no define un modelo.

$$I_{Hill} := \frac{|\text{mín}_{NC} - \text{mín}_{IB}|}{\text{máx}(\text{mín}_{NC}, \text{mín}_{IB})} \quad (18)$$

Es importante notar que mientras más cercano a 1 sea el valor de P_{Hill} , más estricto se vuelve el protocolo, resultando en menor probabilidad de elegir alguno de los modelos pero mayor probabilidad de elegir correctamente. Este valor fue fijado posteriormente de acuerdo a los resultados de la prueba de los protocolos (ver 7.2 *Resultados*).

7. Prueba de protocolos

Una vez desarrollados los protocolos, se procedió a ponerlos a prueba con el fin de evaluar su funcionamiento y calibrar los indicadores $P_{Hill,Fit}$ (ver 6. *Protocolos de distinción*). Para esto se simularon datos experimentales de ambos modelos, tomando 100 sets de parámetros para cada uno. De esta manera se conocía la procedencia de cada dato y con ello se podría verificar si los protocolos definían correctamente en cada caso.

7.1 Simulación de datos experimentales

Con el fin de obtener datos similares a los que se obtendrían de un experimento, se simularon los sistemas de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 15 y 16) para 100 sets de parámetros diferentes. Para esto se programó otro código en Matlab (ver 11.6 *Código para la simulación de datos*) que, una vez resueltos los sistemas, calcula $\theta(t,L)$, es decir, la evolución temporal de la proporción de sitios ocupados para varias concentraciones diferentes de ligando. Un detalle que se tuvo en cuenta es que hasta el momento se había trabajado con mucha resolución en la concentración de ligando (200 valores diferentes) debido a que el objetivo era caracterizar ambos modelos, sin embargo, la finalidad ahora es reproducir datos experimentales de modo que se disminuyó la resolución en la concentración de ligando a 20 valores, que es una cantidad razonable para un experimento, con puntos logarítmicamente espaciados entre $[10^{-2}, 10^3]$, lo que podría significar $[1nM; 0.1mM]$ tomando unidades de $0.1\mu M$ ¹⁹. En cuanto a los valores temporales, se eligieron 200 puntos en un intervalo de 5 órdenes de magnitud, lo que podría ser, por ejemplo $[1ms; 100s]$ tomando unidades de segundos. Cabe mencionar aquí que si el equilibrio de una reacción se da a los pocos minutos u horas, las distribuciones de los coeficientes de Hill en el tiempo (*Figura 19 A*) indican que es necesario comenzar a los pocos milisegundos o segundos respectivamente para obtener información que permita hacer la distinción entre los protocolos, esto indica que el protocolo diseñado funcionaría utilizando técnicas actuales de medición⁵, aunque sería más efectivo mientras más atrás en el tiempo se logren obtener datos con respecto al tiempo de equilibrio.

Con la misma finalidad de simular datos de experimentos, el programa suma un ruido gaussiano a las curvas de evolución temporal, con un desvío estándar de 0.02, recordando que θ es una proporción y va entre 0 y 1, se corresponde con un error relativo del %2 del máximo valor

de θ . Esto se hizo para simular el error de medición de las curvas temporales. En la *Figura 21* se muestra un ejemplo de los datos simulados.

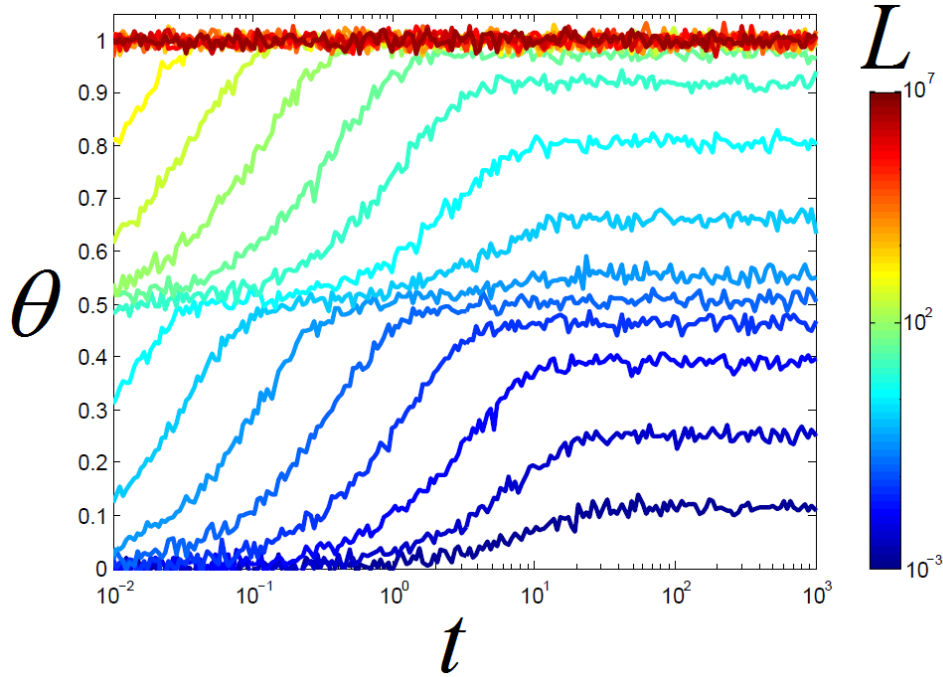


Figura 21: Ejemplo de datos simulados. Se tomaron datos de NC con $k = 10.14$, $l = 0.067$ y $\omega = 0.0044$.

7.2 Resultados

Se aplicaron ambos protocolos (Protocolo Fit y Protocolo Hill) a los datos simulados y se obtuvieron los resultados que muestra la *Figura 22* de donde se fijaron los indicadores $P_{Fit} = \frac{2}{3}$ y $P_{Hill} = 0.05$. En el primer caso se privilegió que el protocolo no arroje una respuesta incorrecta mientras que en el segundo que hubiera mayor cantidad de definiciones (donde puede decidir entre uno u otro modelo). Esto se hizo así debido a que luego se diseñó un tercer protocolo combinando ambos, que toma los casos donde el Protocolo Fit no define y aplica el Protocolo Hill (ver *8 Protocolo combinado*). Los resultados de la prueba de protocolos para los valores tomados de P_{Fit} y P_{Hill} se encuentran en la *Tabla 1*. Un resultado interesante es que ambos protocolos funcionan mejor cuando se trata de datos provenientes de IB, y esto se debe a que este modelo cuenta con un parámetro más que NC, de manera que dada una curva cualquiera

de datos proveniente de **NC**, el modelo **IB** tiene 4 grados de libertad para realizar el ajuste (cuando se utiliza el Protocolo Fit) contra los 3 que tendría **NC**, haciendo que sea más probable un ajuste bueno e incorrecto. La misma idea se observa utilizando el Protocolo Hill, donde si se observan las distribuciones de la *Figura 19*, se concluye que dada una curva cualquiera de la distribución de **NC**, es muy posible que en el desorden de la distribución de **IB** se encuentre una curva parecida, mientras que no vale la recíproca debido al ordenamiento de la distribución de **NC** con el parámetro ω .

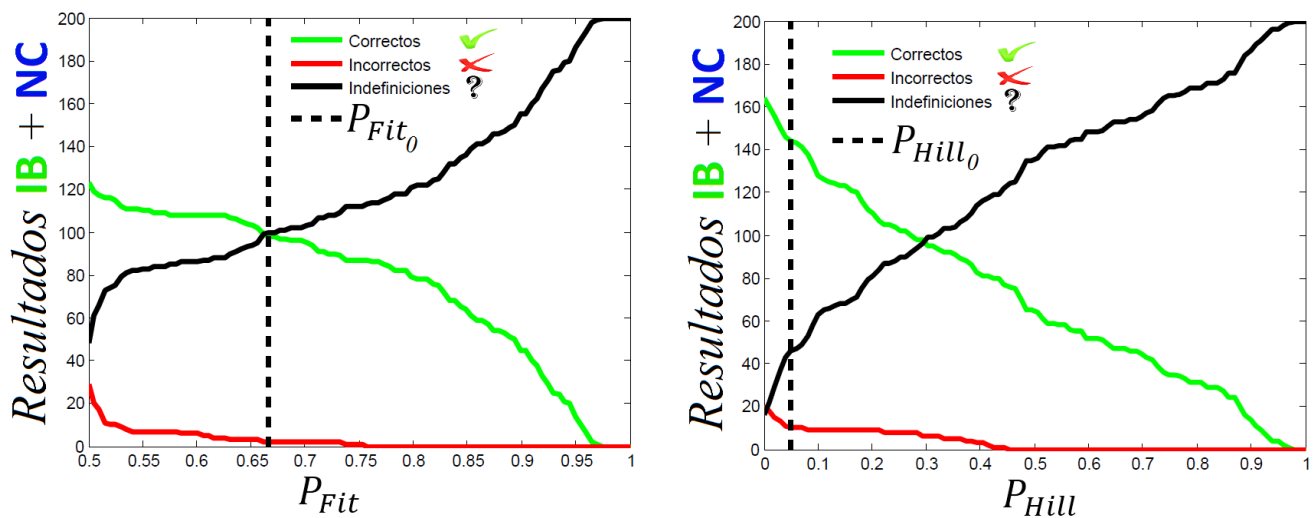


Figura 22: Resultados de aplicar ambos protocolos (Protocolo Fit a la izquierda y Protocolo Hill a la derecha) a los 200 sets de datos simulados (100 por cada modelo), en función de los indicadores libres $P_{Fit,Hill}$ que fueron fijados en los valores marcados en cada gráfico $P_{Fit_0} = 2/3, P_{Hill_0} = 0.05$. De esta manera, el Protocolo Fit es más confiable debido a que casi no elige incorrectamente mientras que el Protocolo Hill puede equivocarse más pero se define en la mayor parte de los casos.

Otro detalle a tener en cuenta en el diseño del Protocolo Hill fue la cantidad de curvas de la base de datos de ambas distribuciones (*Figura 19*). Esta cantidad debía ser suficientemente alta como para encontrar siempre curvas cercanas a las provenientes de los datos experimentales, y para asegurarse de esto, se aplicó la prueba de los protocolos nuevamente, aumentando desde 1000 a 10000 la cantidad de curvas de la base de datos. Los resultados se observan en la *Figura 23*, donde se obtuvo, como se esperaba, un aumento en la cantidad de aciertos del Protocolo Hill

a medida que aumentaba la cantidad de curvas de la base de datos, a expensas de una disminución en el número de indefiniciones. Esta mejoría cesa para valores superiores a los 10000 sets de parámetros de las curvas de la base de datos, lo que deja un remanente de indefiniciones y equivocaciones que también se esperaba debido al problema intrínseco del número de grados de libertad de cada modelo. Es por esto que se decidió tomar 10000 curvas para la base de datos del Protocolo Hill.

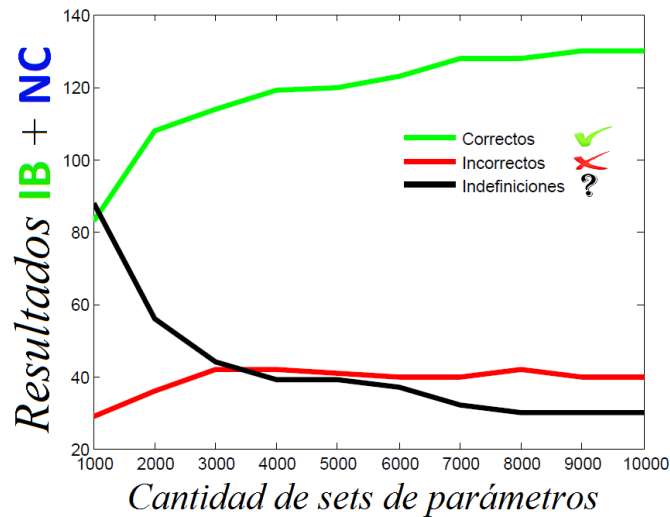


Figura 23: Resultados del Protocolo Hill en función de la cantidad de sets de la base de datos de las curvas mostradas en la Figura 19. Puede verse que alcanzando los 10000 sets los resultados correctos alcanzan un valor máximo y constante mientras que los incorrectos y las indefiniciones un valor mínimo. Es por esto que se decidió no tomar más de 10000 sets.

	Fit			Hill		
Datos	✓	✗	?	✓	✗	?
NC	26	0	74	68	2	30
IB	73	2	25	78	9	13
Total (%)	49,5	1	49,5	73	5,5	21,5

Tabla 1: Resultados de la prueba de los protocolos con los 100 sets de datos simulados para cada modelo. Puede observarse que mientras que el Protocolo Hill es más certero y determinante, el Protocolo Fit es más confiable, pero solo determina la mitad de los casos.

8. Protocolo combinado

A partir de los protocolos anteriores y de la prueba de los mismos se decidió diseñar un tercer protocolo que combine las ventajas de ambos. El mismo se detalla a continuación:

- 1) Obtener las curvas dosis-respuesta tanto en el equilibrio como en el pre-equilibrio.
- 2) Con los datos obtenidos aplicar el Protocolo Fit.
- 3) En caso de que el Protocolo Fit se defina por un modelo, tomar este resultado, en caso de que no haya definición, aplicar el Protocolo Hill y tomar el nuevo resultado.

Esta sencilla combinación de ambos protocolos tiene como ventaja que en casi la mitad de los casos bastará con sólo aplicar el Protocolo Fit para obtener un resultado con certeza, además de que la otra mitad no queda indefinida sino que es sometida al Protocolo Hill, el cual es más determinante.

El nuevo protocolo combinado se probó utilizando los mismos datos simulados para la prueba de los protocolos anteriores, programando un nuevo código en Matlab que sigue las indicaciones detalladas anteriormente. Los resultados de esta prueba se encuentran en la *Tabla 2*, mientras que en la *Tabla 3* se resumen los resultados de los tres protocolos. Cabe destacar que las indeterminaciones se deben más que nada a los casos indefinidos de **NC**, y que es esperable que las mismas sean intrínsecas al problema más que a los protocolos, debido al número de grados de libertad con que cuenta el modelo **IB**.




Protocolos	Combinado		
			
Datos			
NC	77	2	21
IB	84	11	5
Total (%)	80,5	6,5	13

Tabla 2: Resultados de la prueba del Protocolo Combinado. Puede verse que aumentó tanto el poder de determinación como las definiciones correctas con respecto a los protocolos anteriores, pero a expensas de un leve aumento también en las definiciones equivocadas.




Protocolos	Resultados		
			
Fit	49,5	1	49,5
Hill	73	5,5	21,5
Combinado	80,5	6,5	13

Tabla 3: Resultados de las pruebas de todos los protocolos. Puede observarse que si bien el Protocolo Combinado es el que más veces se equivoca, también es el que tiene mayor poder de determinación y mayor efectividad en la misma.

Es importante notar también que tanto del Protocolo Fit como del Protocolo Hill se obtienen dos distancias mínimas entre las curvas de cada modelo con la curva de los datos, y que estos valores podrían combinarse de diferentes maneras para diseñar diferentes protocolos combinados. La combinación con la que se trabajó fue elegida solo por simpleza y es posible que pueda mejorarse teniendo esto en cuenta.

9. Eficiencia de los protocolos con el error de los datos

Si bien los datos simulados en los estudios anteriores contenían un error, éste fue siempre un error gaussiano con un desvío estándar fijo del 2%, que puede asociarse a un error experimental como el que se muestra en la *Figura 24*¹⁹ cuyo gráfico contiene datos experimentales reales. Sin embargo, datos experimentales reales pueden contener errores instrumentales de diferente índole (con más desvío estándar, por ejemplo) e incluso ruido asociado a las fluctuaciones térmicas de las partículas involucradas en las reacciones. Para estudiar cómo influyen estas variables en los protocolos se procedió, primero, a rehacer la prueba de los mismos para distintos valores de desvío estándar del error gaussiano, y segundo, se simularon los modelos en el programa Copasi²⁵ con el fin de agregar términos estocásticos en las ecuaciones diferenciales, simulando el ruido térmico.

9.1 Dependencia con el desvío estándar del error gaussiano

Se estudió la dependencia de la efectividad de los protocolos con un error gaussiano que podría representar el error instrumental asociado a los datos experimentales. Para esto, se repitió la prueba de los protocolos (ver *Prueba de protocolos*) variando el desvío estándar del error gaussiano sumado a los datos experimentales simulados numéricamente. Se tomaron valores de 0, 0.02, 0.05 y 0.1 para el desvío estándar lo que se corresponde con errores relativos de 0%, 2%, 5% y 10% con respecto al máximo valor de la proporción de sitios ocupados (recuérdese que θ está entre 0 y 1). Los resultados se observan en la *Figura 25*, donde puede verse que la eficiencia de los tres protocolos disminuye con el desvío estándar del error, como era esperable. También que el Protocolo Combinado siempre es más confiable que los Protocolos Fit y Hill, pero que con un error en los datos de más del 10% la cantidad de definiciones correctas baja a la mitad, con un cuarto de definiciones incorrectas, de manera que para datos experimentales que contengan un error superior a este valor no es recomendable la utilización de ninguno de los protocolos de distinción.

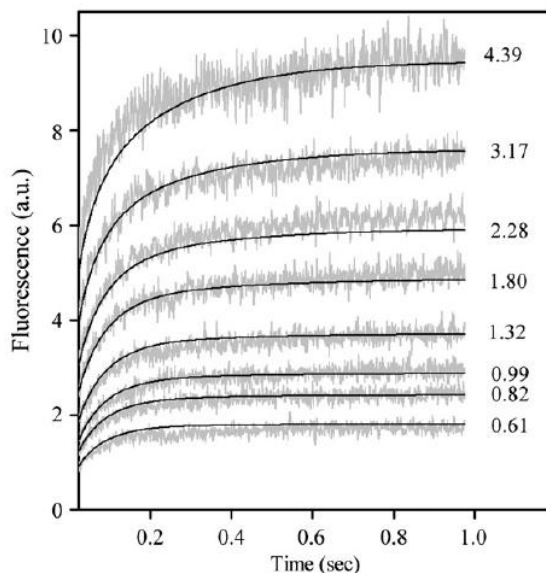


Figura 24¹⁹: Ejemplo de mediciones experimentales de reacción de pegado de 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato (ligando) sobre albúmina de suero bovino (proteína receptora) medido por fluorescencia.

Una última observación consiste en que en el caso de datos experimentales ideales (sin error), mientras que el Protocolo Fit funciona casi a la perfección debido a que consiste en un ajuste, el Protocolo Hill define correctamente solo unas tres cuartas partes de los casos. Esto proviene de que aún con error nulo, puede verse en la biblioteca de datos (*Figura 19 A*) que existirán curvas de evolución temporal de coeficiente de Hill pertenecientes al modelo **IB** que se solaparán con las del modelo **NC**, resultando en distancias a la curva de datos muy similares para ambos casos. Esto puede visualizarse de igual manera observando la *Figura 19 B*, donde siempre se encuentran puntos verdes entre los azules. Sin embargo, la dependencia del Protocolo Hill con el error de los datos es menor que la del Protocolo Fit, lo que resulta en que la eficiencia del Protocolo Combinado no disminuye tanto con el error de los datos experimentales como lo hace la del Protocolo Fit.

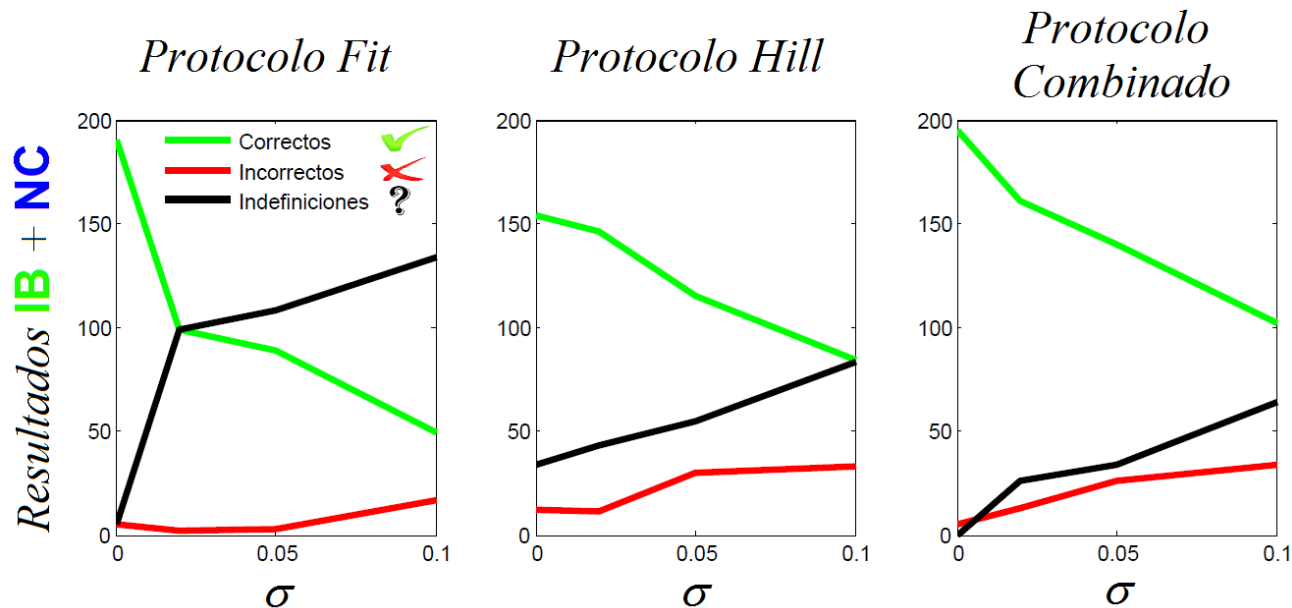


Figura 25: Dependencia de los resultados de los Protocolos Fit, Hill y Combinado con el desvío estándar del error gaussiano sumado a los datos experimentales simulados numéricamente (σ). Puede observarse que en los tres casos el número de definiciones incorrectas e indefiniciones aumenta con σ , mientras que el número de definiciones correctas disminuye, como era esperable. Cabe destacar que si los datos tienen un error del %10 entonces el Protocolo Combinado define de manera correcta aproximadamente la mitad de los casos e incorrectamente poco más de un cuarto de las veces, lo que indica que para datos con errores mayores el Protocolo Combinado no es confiable, y menos aún son el Protocolo Hill y Fit.

9.2 Ruido térmico

Con el fin de estudiar cómo podría afectar el ruido térmico a los protocolos diseñados, se utilizó el programa Copasi para resolver las ecuaciones diferenciales de los modelos. Este programa permite agregar términos estocásticos que modelan las fluctuaciones debidas a la probabilidad de que las partículas de los reactivos (receptor y ligando) se encuentren para dar lugar a la reacción, dado que existe un número finito de las mismas. Se corrió el programa para obtener las soluciones para varias concentraciones de ligando. Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 25, donde puede observarse que las fluctuaciones ocurren mayormente en el equilibrio, siendo casi despreciables en el pre-equilibrio. Esto podría deberse a que durante el pre-equilibrio el número de partículas de receptor es grande, aumentando las probabilidades de encuentro con una partícula de ligando, pero, ya en el equilibrio, las únicas partículas de receptor disponibles serán las pocas donde se den la reacción de despegado, de manera que las

probabilidades de encuentro disminuirán considerablemente. De este hecho se deduce que probablemente el ruido térmico no afecte a los protocolos, que toman la información del pre-equilibrio, dado que allí es cuando las fluctuaciones no son considerables. Además, para el ajuste inicial en equilibrio de ambos protocolos, puede medirse la concentración durante un período tan largo como se desee, hasta tener suficientes datos como para contrarrestar las fluctuaciones del equilibrio.

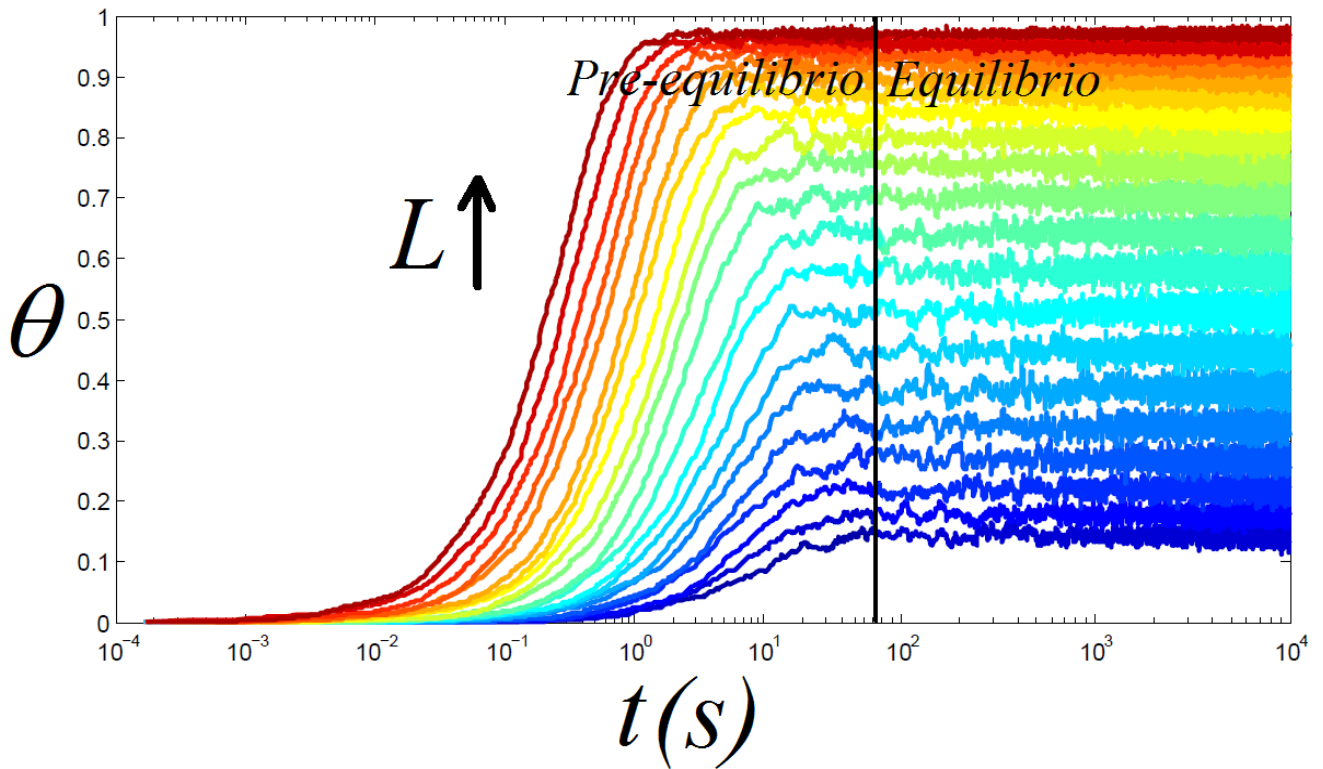


Figura 26: Simulación de datos con ruido térmico. Puede observarse que las fluctuaciones son mucho mayores en los valores de equilibrio que en el pre-equilibrio. Esto podría deberse a que a tiempos cortos, la mayor parte de las partículas de receptor se encuentran libres, aumentando la probabilidad de que existan encuentros con las partículas de ligando y que ocurra el pegado. Luego, cuando se alcanza el equilibrio, la mayor parte de los receptores se encuentran ocupados, haciendo que el número total de partículas de receptor libre sea más bajo (solo estarán desocupados aquellos donde ocurra la reacción de despegado), disminuyendo así las probabilidades de que exista un encuentro con las partículas de ligando. Los valores elegidos fueron de 10^3 partículas de receptor y entre 10^7 y 10^9 de ligando (espaciadas logarítmicamente), en un volumen de 10^{-12} ml. Todas las tasas de pegado fueron fijadas en $1 \text{ ml}/\text{mmol}\cdot\text{s}$ y las de despegado en 0.1 1/s .

10. Conclusiones

Motivados por los resultados del trabajo antecesor⁹ en cuanto a la posibilidad de distinguir los diferentes microestados de **IB** y **NC** utilizando información en el pre-equilibrio, y teniendo en cuenta además la importancia de esta información para el funcionamiento de los mecanismos de señalización⁵, se intentó entender el origen bioquímico del problema de la indistinguibilidad, haciendo foco primero en el estudio analítico del subespacio de parámetros donde el problema existe y después en el diseño de los protocolos de distinción. Para esto último, fue necesario contar con un abanico de métodos que nos permitieran resolver las ecuaciones diferenciales de los modelos numéricamente y analizar los datos para encontrar índices de distinción genéricos, válidos para cualquier set de parámetros.

En síntesis, se detallan a continuación las contribuciones de este trabajo al problema de la indistinguibilidad:

- El estudio a partir de la ley de acción de masas en lugar de un enfoque termodinámico.
- El hallazgo del subespacio de parámetros donde existe la indistinguibilidad y la interpretación del origen bioquímico del problema.
- La implementación algorítmica del protocolo propuesto por el trabajo antecesor⁹ y su estudio en el subespacio de parámetros frente a datos simulados numéricamente.
- El hallazgo de la diferencia en las distribuciones de las curvas de evolución temporal del coeficiente de Hill y la confección de la biblioteca de datos de las mismas.
- El diseño e implementación algorítmica del Protocolo Hill basado en la diferencia anterior y su estudio en el subespacio de parámetros frente a datos simulados numéricamente.
- El diseño e implementación algorítmica de un primer protocolo combinado sencillo pero que demostró ser efectivo.
- El estudio de la efectividad de los protocolos implementados con las fluctuaciones de los datos, provenientes tanto del error experimental como del ruido térmico.

Debido a la dimensionalidad del sistema (con 5 parámetros libres) fue necesario resolver las ecuaciones numéricamente, utilizando tanto Matlab como Copasi, de donde se obtuvieron

una gran cantidad de datos. Para extraer información relevante de los mismos, se utilizaron criterios estadísticos, de modo que fue necesario diseñar los algoritmos computacionales que realizaran las tareas detalladas a continuación:

- Graficar el subespacio de parámetros.
- Realizar un barrido de parámetros y guardar sets que cubrieran el subespacio homogéneamente.
- Tomar estos sets y resolver los sistemas de ecuaciones de los dos modelos para cada set, guardando las curvas dosis respuesta a cada tiempo.
- Calcular diversos índices a las curvas mencionadas (el coeficiente de Hill, el EC_{50} , el tiempo de equilibrio, etc.) y hallar relaciones entre éstos y los parámetros.
- Obtener la base de datos de las distribuciones de las curvas temporales del coeficiente de Hill de ambos modelos, barriendo el subespacio de parámetros lo más exhaustivamente posible de acuerdo a las capacidades computacionales.
- Reproducir y guardar datos experimentales mediante simulaciones numéricas.
- Implementar los 3 protocolos utilizando los datos simulados.
- Reproducir las fluctuaciones térmicas con modelos estocásticos.

Cabe mencionar que ninguno de los códigos programados conlleva grandes costos computacionales, tardando siempre menos de 5 minutos las corridas de unos 100 sets de parámetros en una PC normal (AMD Phenom(tm) 8450 Triple-Core Processor 2.10 GHz – 3.25 GB RAM). Esto último es a excepción de la confección de la base de datos de las curvas de evolución temporal de coeficiente de Hill, las cuales debían realizarse en un barrido exhaustivo del subespacio de parámetros. Sin embargo, una vez obtenidas y guardadas las 10000 curvas de cada modelo (en alrededor de una semana), ya no se necesita repetir el procedimiento nuevamente.

Son muchas las preguntas que aún quedan abiertas. Si bien el resultado final muestra que el Protocolo Combinado logra distinguir los modelos en el 80,5% de los casos, con errores solo en un 6,5% e indeterminaciones en el restante 13%, cabe destacar que estos resultados dependen del tipo de ruido de los datos simulados. En esta tesis se sumó simplemente un ruido gaussiano a las curvas temporales, donde el desvío estándar relativo fue del 2%, pero las pruebas variando este valor indican que el Protocolo Combinado continúa siendo aplicable en datos con hasta un 10% de este tipo de error gracias al aporte del Protocolo Hill diseñado en este trabajo.

Resultaría interesante, además, considerar en las simulaciones de datos tanto el error experimental como las fluctuaciones debidas al ruido térmico y la depleción del ligando en conjunto, ya que si el número de partículas de ligando es poco en comparación con el de partículas de receptor, la cantidad de ligando libre irá disminuyendo a medida que aumente la cantidad de receptor ocupado, disminuyendo también la probabilidad de encuentro y aumentando el ruido térmico²¹. Es esperable, como se vio en este trabajo, que esto no afecte considerablemente los protocolos debido a que el fenómeno es más notorio en el equilibrio, pero faltaría demostrar esto último volviendo a realizar la prueba con datos que modelen todos estos fenómenos en conjunto.

Otro aporte necesario consiste en hacer una nueva prueba de los protocolos, pero utilizando datos de experimentos reales en lugar de simulaciones, y constatando de ser posible si los protocolos definen correcta o incorrectamente mediante otros métodos.

Posibles continuaciones de este trabajo van en dos direcciones diferentes. Por un lado, se propone considerar, además de la depleción del ligando en conjunto con el ruido térmico y el error experimental, otras combinaciones más complejas de los protocolos con el fin de mejorar la efectividad de la distinción entre los modelos. Si bien es esperable que la misma no pueda ser ideal debido a los grados de libertad del modelo **IB**, tanto el Protocolo Fit como el Hill calculan índices que pueden relacionarse a la probabilidad de que sea uno u otro modelo, de modo que es posible diseñar una mejor combinación de estas probabilidades para hacer la distinción.

Por otro lado, y en vistas de aplicar los protocolos a datos experimentales reales, también sería provechoso extender el estudio a un modelo de receptores con 3 sitios de ligadura en lugar de 2. Si bien esto complicaría el análisis, el trabajo serviría para una mayor cantidad de mecanismos de señalización y sobre todo para aprovechar datos ya publicados¹⁹. Incluso no solo en cuanto a receptores, ya que este trabajo puede generalizarse a otras reacciones de pegado, como por ejemplo a la unión entre diferentes oligonucleótidos de ARN¹².

En conclusión, el aporte fundamental de esta tesis es el descubrimiento de indicadores de distinción, utilizando información en el pre-equilibrio, entre **IB** y **NC**, dentro del subespacio de parámetros donde la indistinguibilidad en equilibrio existe. Además, el desarrollo y prueba de los protocolos que aprovechan estos indicadores para distinguir los microestados.

11. Anexos

A continuación se transcriben los códigos programados en Matlab que fueron utilizados a lo largo de todo el trabajo.

11.1 Código de resolución de IB y NC

Este código fue programado para resolver los sistemas de las ecuaciones 15 y 16 de cada modelo. Se muestra sólo el caso de IB ya que el de NC es análogo. Para hacerlo diagonaliza la matriz de cada sistema haciendo uso del código auxiliar diagonal.

El programa calcula también los valores de EC_{10} , EC_{50} , EC_{90} mediante el código auxiliar ECX que se transcribe más abajo junto con diagonal y utiliza el método de bisección. También calcula el coeficiente de Hill a partir de la ecuación 7.

```
1 - clear all;close all
2
3 %% Inicialización
4 - param=load('param.mat'); %Toma un set de parámetros
5 - R_0=[1 0 0 0]; %Condiciones iniciales del receptor (receptor libre)
6 - RT=sum(R_0); %Cantidad total de receptor
7 - resL=500; %nº de barridos en la concentración de ligando
8 - rest=200; %resolución temporal
9 - LL=logspace(-3,7,resL); %vector con valores de concentración de ligando
10 - time=logspace(-8,4,rest); %vector con valores de tiempo
11 - R=zeros(length(time),length(LL),3); %3 Matrices para las 3 variables
12
13 %% Resolución del Sistema IB
14 - k10=param(1);l10=param(2);k01=param(3);l01=param(4); %Defino los parámetros IB
15
16 - for j=1:length(LL) %Resuelve el sistema para cada concentración de ligando
17 - L=LL(j);
18 - %Matriz de IB
19 - A =[-(l10+(k10+k01)*L) (-k10*L) (l01-k10*L); (-k01*L) -(l01+(k10+k01)*L)...
... (l10-k01*L); (k01*L) (k10*L) -(l10+l01)];
20 - b=[k10*L*RT; k01*L*RT; 0]; %Término Independiente
21 - %Programa que diagonaliza matriz (A) y halla autovalores y autovectores
22 - [N]=diagonal(A,b,L,time,R_0(2:4));
23 - %Define 3 variables por los 3 estados de receptor
24 - R(:,j,1)=real(N(:,1)); %Sitio 10 Ocupado
25 - R(:,j,2)=real(N(:,2)); %Sitio 01 Ocupado
26 - R(:,j,3)=real(N(:,3)); %Sitios 10 y 01 Ocupados
27 - end
```

```

28
29     %Define la proporción de sitios ocupados
30 -   for i=1:length(time)
31 -       tita(i,:)=(2*R(i,:,3)+R(i,:,2)+R(i,:,1))/2;
32 -   end
33
34     %Calcula EC50, EC10 e EC90 numéricamente usando el método de bisección
35 -   for i=1:length(time)
36 -       X=50;[EC50(i)]=ECX(tita(i,+)/2,LL,X); %EC50
37 -       X=90;[EC90(i)]=ECX(tita(i,+)/2,LL,X); %EC90
38 -       X=10;[EC10(i)]=ECX(tita(i,+)/2,LL,X); %EC10
39 -       H(i)=log(81)/log(EC90(i)/EC10(i)); %Calcula el coeficiente de Hill
40 -   end
41
42     %Guarda todo en una estructura
43 -   IB=struct('EC50',EC50,'EC10',EC10,'EC90',EC90,'H',H,'tita',tita);

```

El siguiente es el código auxiliar diagonal donde se resuelve el sistema de ecuaciones.

```

1     % Toma la matriz del sistema A, el término independiente b, la concentración
2     % de ligando L, el vector de tiempo time y las condiciones iniciales de receptor R0
3     function [R]=diagonal(A,b,L,time,R0)
4 -     [C,lambda]=eig(A); % Toma A y devuelve matriz de cambio de base C y autovalores lambda
5 -     v0=inv(C)*R0'; % Cambia de base las condiciones iniciales (v0)
6 -     Cb=inv(C)*b; % Cambia de base el término independiente (Cb)
7 -     for i=1:3 % Define los vectores de evolución temporal
8 -         veq(i)=Cb(i)/lambda(i,i); % Solución en Equilibrio
9 -         v(i,:)=(v0(i) + veq(i))*exp(lambda(i,i).*time) - veq(i);
10 -     end
11 -     for i=1:length(time) % Devuelve las soluciones en la base original
12 -         R(i,:)=C*v(:,i);
13 -     end
14 - end

```

El siguiente es el código auxiliar ECX donde se aplica el método de bisección²⁴.

```
1      % Toma la curva tita(LL) donde LL es el vector de concentraciones de
2      % ligando y X el valor deseado de ECX (10, 50 o 90)
3      function [EC]=ECX(tita,LL,X)
4      % Define una condición para calcular ECX, que la curva alcance el
5      % máximo y el mínimo (que se encuentre en el rango dinámico)
6      if (tita(length(LL))-tita(length(LL)-1))/tita(length(LL))<(10^-3) &&...
7      ... (tita(2)-tita(1))/tita(length(LL))<(10^-3)
8          % Corre la curva verticalmente de manera que la raíz de la curva sea
9          % el ECX (f(ECX)=0)
10         f=tita-(tita(1)+(tita(length(LL))-tita(1))*X/100);
11         xa=LL(1); % Toma el primer valor de LL (negativo)
12         xb=LL(length(LL)); %Toma el último valor de LL (positivo)
13         r=1; % Define un índice para comenzar el loop
14         fc=1; % Define un índice para comenzar el loop
15         while abs(fc)>10^(-10) && r<40
16             EC=0.5*(xb+xa); % Calcula el promedio del primer y último valor
17             fc=interp1(LL,f,EC); % Evalúa f en el promedio
18             if fc<0; % Si f da negativo define el promedio como el primer valor
19                 xa=EC;
20             else % Si f da positivo define el promedio como el último valor
21                 xb=EC;
22             end
23             r=r+1;
24             % Vuelve al loop hasta repetir 40 veces o llegar a la raíz (fc<10^-10)
25         end
26     else
27         EC=NaN; % Si la curva no contenía máximo o mínimo, es imposible definir ECX
28     end
end
```

11.2 Código para obtener los sets de parámetros

El código transcrito a continuación fue programado para elegir los sets de parámetros de ambos modelos, utiliza el método de *Latin Hypercube Sampling* (con la función `lhsdesign`) y hace la elección de manera de obtener dos modelos indistinguibles, haciendo uso de las condiciones de indistinguibilidad (ecuaciones 13 y 14).

```
1 - N=10000; % Define cantidad de sets de parámetros
2 - % Elije 5 vectores de dimensión N, con números entre 0 y 1 elegidos
3 - % azarosamente y mediante el método de Latin Hypercube Sampling
4 - X=lhsdesign(N,5);
5 -
6 - for i=1:N % Define los Nx7 parámetros
7 -     % Calcula primero los parámetros de NC, espaciados logarítmicamente
8 -     l(i)=10^(4*X(i,1)-2);
9 -     k(i)=10^(4*X(i,2)-2);
10 -    w(i)=10^(5*X(i,3)-5);
11 -    % Calcula las constantes de disociación para utilizar las condiciones
12 -    % de indistinguibilidad en la elección de los parámetros de IB
13 -    K(i)=l(i)/k(i);
14 -    K01(i)=K(i)/w(i)*(1+sqrt(1-w(i)));
15 -    K10(i)=K(i)/w(i)*(1-sqrt(1-w(i)));
16 -    % Calcula los parámetros de IB
17 -    l01(i)=10^(4*X(i,4)-2);
18 -    l10(i)=10^(4*X(i,5)-2);
19 -    % Despeja las tasas de pegado a partir de las condiciones de
20 -    % indistinguibilidad
21 -    k01(i)=l01(i)/K01(i);
22 -    k10(i)=l10(i)/K10(i);
23 - end
24 - param=[k10',l10',k01',l01',k',l',w']; % Guarda todos los sets de parámetros
```

11.3 Código para el ajuste en equilibrio

A continuación se transcribe el código programado para llevar adelante los ajustes en equilibrio, el cual es el primer paso de todos los protocolos diseñados y consiste en el ajuste de las curvas dosis-respuesta en equilibrio con las correspondientes a las curvas de cada modelo dadas por las ecuaciones 11 y 12. El objetivo de este código es obtener las constantes de disociación que mejor ajustan (los valores de $K, K/\omega, K_{01}, K_{10}$). Luego de realizar ambos ajustes (uno por cada modelo), el programa chequea que los valores obtenidos cumplan con las condiciones de indistinguibilidad (ecuaciones 13 y 14), además de graficar el ajuste realizado.

```
1 - data=load('data.mat'); % Carga los datos simulados (las curvas dosis-respuesta)
2
3 - % Define los valores iniciales de los parámetros del ajuste
4 - p0NC=[1 0.01]; % [K omega]
5 - p0IB=[1 1]; % [K10 K01]
6
7 - TOLF=1e-6; % Define valor máximo tolerado entre distancia de la curva de datos y
8 - % la teórica para aceptar el ajuste
9 - % Ajusta los datos simulados con la función dosis-respuestaNC que
10 - % corresponde a las curvas teóricas para el modelo NC en equilibrio.
11 - % Utiliza el método de cuadrados mínimos con la norma 2 como distancia.
12 - % Devuelve el vector con los parámetros K y omega obtenidos del ajuste(pNC)
13 - [pNC]=fminsearch('dosis-respuestaNC',p0NC,optimset('TolFun',TOLF,'TolX',1e-8),data,data.LL);
14
15 - % Repite para IB con la función dosis-respuestaIB que corresponde a las
16 - % curvas teóricas para el modelo IB en equilibrio.
17 - % Devuelve el vector con los parámetros K10 y K01 obtenidos del ajuste(pIB)
18 - [pIB]=fminsearch('dosis-respuestaIB',p0IB,optimset('TolFun',TOLF,'TolX',1e-8),data,data.LL);
19
20 - % Define variables para chequear que los parámetros obtenidos de ambos
21 - % modelos cumplen con las condiciones de indistinguibilidad
22 - subespacio(1)=pNC(1)/pNC(2)-(pIB(1)+pIB(2))/2;
23 - subespacio(2)=pNC(1)^2/pNC(2)-(pIB(1)*pIB(2));
24
25 - % Grafica el ajuste realizado sobre los datos simulados
26 - figure()
27 - for i=1:n...
```

11.4 Código del Protocolo Fit

El código transcrito a continuación toma los valores obtenidos ($K, K/\omega, K_{01}, K_{10}$) del ajuste en equilibrio para continuar con el Protocolo Fit realizando el ajuste en el pre-equilibrio y determinar a cuál de los dos modelos pertenecen los datos simulados.

```
1 - data=load('data.mat'); % Carga los datos simulados de NC ó de IB
2
3 % Carga las constantes de disociación obtenidas en el ajuste en equilibrio
4 - PNC=load('pNC'); % Carga K y omega
5 - PIB=load('pIB'); % Carga K10 y K01
6 - K=PNC(1); w=PNC(2); K10=PIB(1); K01=PIB(2); % Redefine los nombres
7
8 % Define parámetros iniciales para el ajuste en pre-equilibrio, 1 parámetro
9 % para NC (ya tiene K=l/k y omega) y 2 para IB (tiene K10=l10/k10 y K01=l01/k01)
10 - p0NC=1;p0IB=[1 1];
11
12 - TOLF=1e-6;% Define valor máximo tolerado entre distancia de la curva de datos y
13 % la teórica para aceptar el ajuste
14 % Realiza el ajuste de los datos simulados con SistemaNC que contiene el
15 % sistema de ecuaciones diferenciales del modelo NC para completar los 3
16 % parámetros de este modelo (ya tiene omega y K=l/k).
17 % Devuelve los parámetros obtenidos del ajuste y el valor correspondiente a
18 % la distancia que minimiza el ajuste. Se tomó como distancia la norma 2.
19 - [pNC,distanciaNC]=fminsearch('SistemaNC',p0NC,optimset('TolFun',TOLF,'TolX',1e-8),...
...data.tita,data.LL,data.time,K,w);
20 % data.tita es la proporción de sitios ocupados de los datos simulados
21 % data.LL es el vector de concentraciones de ligando de los datos simulados
22 % data.time es el vector de tiempos de los datos simulados
23
24 % Realiza el ajuste de los datos simulados con SistemaIB que contiene el
25 % sistema de ecuaciones diferenciales del modelo IB para completar los 4
26 % parámetros de este modelo (ya tiene K10=l10/k10 y K01=l01/k01).
27 - [pIB,distanciaIB]=fminsearch('SistemaIB',p0IB,optimset('TolFun',TOLF,'TolX',1e-8),...
...data,data.LL,data.time,K10,K01);
28
29 % Define el indicador Ifit para después definir a qué modelo pertenecen los
30 % datos y si el protocolo fue correcto o incorrecto. Se muestra sólo un
31 % ejemplo para datos tomados de IB, para NC es análogo.
32 - if distanciaIB<=distanciaNC
33 -     Ifit=distanciaNC/(distanciaIB+distanciaNC);
34 -     if Ifit>Pfit
35 -         Resultado='Incorrecto';
36 -     else
37 -         Resultado='No Define';
38 -     end
39 - else
40 -     Ifit=distanciaIB/(distanciaIB+distanciaNC);
41 -     if Ifit>Pfit
42 -         Resultado='Correcto';
43 -     else
44 -         Resultado='No Define';
45 -     end
46 - end
```

11.5 Código del Protocolo Hill

El código transcrito a continuación toma los 100 sets de datos simulados de alguno de los modelos (se muestra solo el caso de **IB**, **NC** es análogo) y sus correspondientes valores de ω obtenidos del ajuste en equilibrio. Además, carga la base de datos con las distribuciones de las curvas de evolución temporal del coeficiente de Hill, con el fin de comparar cada curva de los datos simulados con ambas distribuciones para continuar con el Protocolo Hill y determinar, al final, a qué modelo pertenecen los datos simulados.

```
1 - load curvasdatos.mat % Carga los datos simulados
2 - pre_td=time; % Define el vector de tiempo de los datos
3 - load param.mat % Carga los parámetros de los datos
4 - load out.mat % Carga la base de datos de las distribuciones de curvas
5 - % de coeficiente de Hill en función del tiempo para NC e IB
6
7 - for g=1:100; % Loop sobre los 100 datos de cada modelo
8 -     key='IB' % IB si lee dato simulado de IB ó NC si lee de NC
9 -     if key=='IB'
10 -         x=HIB(g,:); % Toma la curva dato del coeficiente de Hill (t)
11 -         wdat=wIB(g); % Toma el parámetro omega de esa curva, obtenido previamente
12 -             % de un ajuste en equilibrio
13 -     else
14 -         x=HNC(g,:); % Análogo para NC
15 -         wdat=wNC(g);
16 -     end
17 -     Dw=0.2; % Define el ancho intervalo de omega (en escala log) donde filtrará
18 -         % las curvas de la base de datos
19 -     x=smooth(x,0.1,'loess'); % Filtra el ruido de los datos
20 -     vw=param(:,7); % Toma todos los parámetros omega de las curvas de la base de datos
21
22 -     r=0; % Filtra las curvas de la base de datos de NC acuerdo al intervalo de omegas
23 -         % elegido y las guarda en una matriz M, con sus omegas en el vector w_in
24 -     for k=1:length(vw)
25 -         if log10(vw(k))<log10(wdat)+Dw & log10(vw(k))>log10(wdat)-Dw
26 -             r=r+1;
27 -             M(r,:)=interp1(time,NC(k).H,td);
28 -             w_in(r)=vw(k);
29 -         end
30 -     end
31
32 -     % Calcula distancia de cada curva de M a la curva de los datos x (dNC)
33 -     % La distancia utilizada está definida en la función fdist
34 -     for nw=1:length(M(:,1))
35 -         dNC(nw)=fdist(M(nw,:),x',td);
36 -     end
37 -     % -----
```

```

37 % -----
38 % Repite análogamente para calcular las distancias a las curvas de la base de datos
39 % de IB. Se omite el código.
40 % -----
41 - [dminIB, iIB]=min(dIB); % Toma la distancia mínima del modelo de IB a la curva dato
42 - [dminNC, iNC]=min(dNC); % Toma la distancia mínima del modelo de NC a la curva dato
43 - rr=dminIB-dminNC; % Calcula la diferencia entre las minimas distancias rr
44 % Si rr<0 entonces IB es mas chica que NC, si rr>0 NC es mas chica que IB
45
46 % Define a qué modelo pertenece el dato simulado
47 - if (abs(rr)/max(dminIB,dminNC))<PHill
48 -     keyout='NS' % Si el error relativo es menor que PHill no define
49 - else
50 -     if rr>0
51 -         keyout='NC'; % Si rr>0 define que el dato pertenece al modelo NC
52 -     elseif rr<0
53 -         keyout='IB'; % Si rr<0 define que el dato pertenece al modelo IB
54 -     end
55 - end
56 - end

```

11.6 Código para la simulación de datos

El código transcrito a continuación fue programado para simular datos experimentales que luego serían utilizados para llevar adelante la prueba de todos los protocolos de distinción. Utiliza las funciones auxiliares `diagonal` y `ECX` que pueden encontrarse en *11.1 Código de resolución de IB y NC*.

```
1 - paramNC=load('paramNC.mat'); % Carga parámetros de NC para crear datos simulados
2 - paramIB=load('paramIB.mat'); % Carga parámetros de IB para crear datos simulados
3 - n=100; % Define cantidad de sets de datos a crear
4 - R_0=[1 0 0 0]; % Define condiciones iniciales del receptor (receptor libre)
5 - RT=sum(R_0); % Define cantidad de Receptor total
6 - resL=20;rest=200; % Define resolución temporal y de concentración de ligando
7 - sigma=0.05; % Define desvío estándar del error gaussiano que sumará a los resultados
8 - LL=logspace(-3,7,resL); % Define vector de concentraciones de Ligando
9 - time=logspace(-2,3,rest); % Define vector de tiempo
10 - %-----
11 - % Simulación de datos IB
12 -
13 - % Define parámetros
14 - k10=paramIB(1);
15 - l10=paramIB(2);
16 - k01=paramIB(3);
17 - l01=paramIB(4);
18 -
19 - for j=1:length(LL) % Resuelve el sistema para cada concentración de ligando
20 -     L=LL(j);
21 -     % Matriz de IB
22 -     A =[-(l10+(k10+k01)*L) (-k10*L) (l01-k10*L); (-k01*L) -(l01+(k10+k01)*L)...
23 -         ... (l10-k01*L); (k01*L) (k10*L) -(l10+l01)];
24 -     b=[k10*L*RT; k01*L*RT; 0]; % Término independiente
25 -     % Programa que diagonaliza la matriz (A) y halla los autovalores y autovectores
26 -     [N]=diagonal(A,b,L,time,R_0(2:4));
27 -     % Define 3 variables para los 3 estados de receptor
28 -     M(:,j,1)=real(N(:,1)); % Sitio 10 ocupado
29 -     M(:,j,2)=real(N(:,2)); % Sitio 01 ocupado
30 -     M(:,j,3)=real(N(:,3)); % Sitios 10 y 01 ocupados
31 - end
32 -
33 - nL=(2*M(:, :, 3)+M(:, :, 2)+M(:, :, 1))/2; % Define la proporción de sitios ocupados (t,L)
34 - nLruido=nL+sigma*randn([length(time) length(LL)]); % Suma ruido gaussiano
35 -
36 - % Calcula EC10(t), EC90(t) numéricamente usando el método de bisección
37 - for i=1:length(time)
38 -     X=90; [EC90(i)]=ECX(nLruido(i, :)/2,LL,X);
39 -     X=10; [EC10(i)]=ECX(nLruido(i, :)/2,LL,X);
40 -     Hruido(i)=log(81)/log(EC90(i)/EC10(i)); % Calcula el coeficiente de Hill
41 - end
42 -
43 - % Guarda las curvas dosis respuesta en equilibrio y pre-equilibrio para
44 - % utilizar en el Protocolo Fit y la evolución temporal del coeficiente de
45 - % Hill para el Protocolo Hill
46 - IB=struct('nLruido',nLruido,'H',H,'Hruido',Hruido);
```


12. Agradecimientos

Bueno, llegué a la parte probablemente más difícil de explicar de toda la tesis (y la que será, de seguro, la menos lograda).

Primero, y principalmente, a Ale, por ofrecerme y mostrarme un trabajo tan lindo. Por darme el espacio y las herramientas para desarrollarlo, pero más aún por guiarme día a día con una calidez humana que me confirma que serán 5 años agotadoramente hermosos para trabajar. Estoy muy ansioso por empezar lo que se nos viene.

A Juan, por la respuesta inmediata a cada una de mis preguntas y más aún, por sus preguntas, consejos y por aportar tanto tiempo de tu trabajo y experiencia a esta tesis.

A todo el grupo de ACL por escuchar y aportar tanto a nuestro trabajo, por preguntar siempre si alguno ya almorzó y esperarme si tengo que bajar a comprar comida.

Más allá de este trabajo, para mí significa un cierre de una etapa muy feliz de mi vida que aprovecho para agradecer a quienes más formaron parte de ella y lograron que así sea.

A mi abuela y al juguete Kapla, por incentivarme a jugar construyendo cosas y a pensar para resolver problemas.

A Cristina, la maestra que me enseñó a estudiar y a mis amigos de la primaria, los Matis y tweety (por siempre, tweety).

A mis amigos del secundario, por romperme tan inhumanamente para que les explicara física horas antes de los exámenes que me obligaron a estudiar los temas que más me interesaría aprender. Al secundario, por no ocuparse de que hubiera un adulto responsable explicando esos temas. Quiero agradecer en particular a Juampi por las incontables madrugadas quinceañeras de debates sobre el tiempo y el espacio, donde el contexto podía ser la caminata de retorno de una fiesta a la que no entrábamos, la espera del 93 que tanto relativizaba el tiempo, o una simple noche de choco-krispis en el paraíso. A Lukitas, con quien siempre, al final, hay un encuentro conmovedor. A Axel, por estar siempre y junto a Johan y a Seba, por las aventuras más grandes e inolvidables que me tocaron vivir. A Gonza, por romper siempre las pelotas para hacer alguna.

A Yeyu, por tus pensadísimos regalos y por compartir mi amor por los juegos de mesa y pensar en combinaciones con la parrilla.

A Soph, por atravesar la peor de todas las situaciones y alzarte más enérgica y vital que cualquiera, por querer seguir escuchándome y aconsejándome después de todo. A Graciela, por ser un ejemplo para mí y para todos nosotros.

A “el paraíso” y todos sus miembros, vitalicios y no vitalicios, que hicieron que su nombre no exagerara.

A Luis, el profesor de astronomía que me introdujo en el pensamiento físico-matemático y a Migue y Anto por intentar acompañarme a las clases de los viernes entrando la noche.

A Carl Sagan, Albert Einstein y Adrián Paenza, por incentivar me a la ciencia.

A mis docentes durante la carrera, Miguel Larrotonda, Ariel Chernomoretz, Ángel Marzocca, Claudia Lederman, Rafael Ferraro, Lidia Rodríguez, Guillermo Frank y César Moreno, con quien tuve el inmenso honor de aprender como alumno y docente.

A la Universidad de Buenos Aires y a la educación pública que me formó en todas las etapas de mi vida desde la escuelita de Conde. Al pueblo argentino por bancarlo, espero poder devolverles lo que me dieron en mi vida profesional.

Al Conicet y de nuevo al pueblo argentino, por el futuro.

A mis amigos “#lospibes” de la facu (sisi, con el “hashtag” y todo). Con muchos de ustedes compartí incontables horas de cursada, pero si me preguntaran uno por uno del grupo, me costaría mucho decir con cuáles cursé y con cuáles sólo compartimos mates o tererés en la biblioteca. Sucede que, después de la primera vez, jamás volví a entrar a este templo de “estudio” sin estar seguro de que una de entre las cientos de mesas sería la mía, la nuestra, la que nos reunía leyendo, contándonos cosas locas de nuestras carreras, cosas en común, cosas sueltas, jugando a las cartas (mea culpa) o simplemente, y la mayoría de las veces, charlando de los temas más distantes a las materias. Uno entra a la biblioteca Leloir para estudiar con sus compañeros de cursada las guías de ejercicios que entrarán en el siguiente examen, pero pasa tanto tiempo allí, tantas horas, tantos mates, tanta charla y ejercicios que este compañerismo interesado se va transformando en solidaridad y apoyo mutuo, en juegos para relajar y vaquitas

para el vauquita, las gomitas, las donsa, las todody o las pitucas. Pasan tantas victorias (y derrotas) conjuntas en la lucha contra los libros que uno va olvidando quiénes son sus compañeros, relación inútil e insípida cuando va surgiendo, entre la ceniza de las batallas, la amistad. Cuando me dispuse a estudiar física, cometí la ingenuidad de dirigirme al departamento de orientación vocacional de la UBA, donde la primer idea que me dijeron fue que la física era una carrera solitaria. Ustedes son mi contraejemplo predilecto. Hicieron de la facultad un hogar para mí y el lugar más ameno para atravesar mis días de estudiante.

A la FIFA y a todos los que aportaron su tiempo y sus ganas, en mayor o menor medida, a organizar y pensar como estudiantes de física. Gracias a todos por ser un ejemplo para mí de pensamiento crítico, por enseñarme que la práctica de los recursos es, ineludiblemente, política. A I❤️NY, Papá tranza, Mati, Belu, Leo, Esteban, Fiore, Bruno, el Ruso, Manu, Gus, Nico, Lucas, Batman, Mono, Fede, Di Turbio, Ro, Lara y tantos otros. Gracias por Carlos Paz, por Bariloche, por Tandil, por Merlo y por Tucumán. Todos ustedes hacen que siempre exista una mesa en el comedor del 1 donde sé que el almuerzo será un buen momento. Gracias también por darme las tareas de organizar un viaje de 70 personas, por encargar 120 docenas de churros (“docenas? Tas seguro? No serían 120 churros, no?” “Sisi, docenas, es docenas”) por conseguir aulas, proyectores y todo para congresos nuestros, por el viaje a La Tablada, Ezeiza, cargando 6 cajones de cerveza, por los debates de presupuesto, fondos buitres, por los Qué Noche Teté. En fin, gracias por demostrar que la organización estudiantil de base y horizontal no es solo posible sino inimaginablemente fructífera.

A Emi y a Ro, por estar siempre y con la mejor onda. No hay nadie que me haya guiado tanto en la carrera como ustedes. En especial a Emi por la enorme cantidad de veces que me diste alguna mano, con una opinión, con información, con algún contacto. Sos la persona más desinteresada que conozco y también una de las más dispuestas a ayudar y ponerse del lado del otro siempre. Espero que pronto consigas lo que estoy seguro que te merecés y espero también poder devolverte algo de todo lo que me das.

A Tincho y al Cangrejo Team con Vero y Maicol. Todas personas que conocí gracias a Emi y con quienes disfruté y aprendí muchísimo sobre ciencia y sigo disfrutando muchísimo con asados. Muchas gracias Tincho por estar siempre tan abierto a discutir sobre cómo verían los cangrejos este brillito, aquel reflejo, este píxel, ese borde, pero más gracias por estar más atento a que estuviéramos bien, contentos, comidos, felices.

A los Gordos K-pos, esa banda que tuvo su bautismo de fuego en la frase “Tenemos que ir a Tucumán? Paramos en Rosario a almorzar un pescado en la costanera” y a partir de allí no quedó satisfecha jamás (sólo temporalmente).

Quiero agradecer particularmente a la Negrita, por ser aquello que minimizó la acción entre mi casa y la facultad, incluso al CBC. Espero que, en donde sea que te hayan llevado, sigas rodando las calles.

A Nico, por ser el personaje de ficción que tiene la facultad y por protagonizar esta historia:

Amaicha del Valle, Jujuy. “360 días de sol al año” se lee en el cartel de la plaza del pueblo, mojado por la lluvia, al lado de una parada de colectivos. Allí esperan, recostados en sus mochilas, un grupo de viajantes. Uno de ellos le pregunta al otro “Vos qué estudiás?”, a lo que el otro responde “Física”. Pese a no estar ni en su primer año, había recibido muchas expresiones ya frente a esta respuesta, siempre diferentes, ninguna normal. Esta vez, no hubo expresión más que una sonrisa seguida de “Ja, yo también”. Resulta que el Universo está gobernado por el azar (pregúntenle sino, a este personaje) y el azar es lo que posibilita al destino tomar el camino más sorprendente, llegando al día en que nuestros protagonistas se reciben en el mismo espacio, en la misma aula, con una diferencia temporal de apenas pocas horas.


A Max, por lo diferente en tu pensar. Siempre hacés de cualquier debate algo más objetivo, ordenado y provechoso, incluso con los temas más difíciles y sensibles. Gracias por ser el distinto, tanto si hablamos de gustos de helado como de cuán pesado puede llegar a ser un solo bocado.

A Juan, más allá de compartir las comilonas de #lospibes, por todas las aventuras que nos dejaron F2, labo 2, 3 y 4. Fuiste un enorme compañero de trabajo, siempre dispuesto a arremangarte y siempre cumpliendo en tiempo y forma, de manera impecable, cualquier responsabilidad. Gracias también por los miles de viajes en el 42, donde habrá habido casi tanta charla como en la facultad, espero con mucha expectativa volver a trabajar contigo.

A Rago, por el humor más sagaz y original, intrínseco a cualquier escena que te tenga por personaje.

Al Richar, por compartilo todo, serenamente.

A Lizaso. Confieso que cada vez que lo escribo tengo que chequear con Facebook el tema de la z y la s. Gracias por ser el estudiante de nuestra generación más dispuesto a poner el cuerpo por todos, y por ponerlo. Gracias por enseñarme con el ejemplo a llevar las cosas adelante con viento en contra. Gracias por llevar el testeo tan lejos y por ser el receptor de nuestras locuras.

A I  NY, por la mística del personaje. Gracias por las anécdotas, por “permitirme” narrarlas, por ser la persona que mejor entendió eso de que hay que reírse de uno mismo. Gracias por ser la fuente inagotable de (además de anécdotas) propuestas, debates y por tu eterna mano organizativa, incluso a horas de licenciarte.

Al Barba, por la joda, la risa, el boludeo. Por ser el compañero que siempre tiene en mente si la configuración azarosa de personas en la mesa da para un chin, un gallo, un clásico, un pica-pica/redondo o, mejor aún, un memonchón.

A Mati pati, por llevar cualquier charla de merienda a lo más profundo.

A Orne, esa 9 de alma, por tu risa descontrolada y aguante inquebrantable.

A Mati moto, gracias por abrirme las puertas de tu casa siempre, conmigo y con todos, y por transformar el paisaje más lindo del mundo en el patio de atrás de tu casa y la nuestra.

A Emi, por compartirme el norte y el sur, por mostrarme las maravillas naturales de tus pagos verdaderos, por ser quien está cuando falta uno para el fútbol, para el básquet. Gracias por ser simplemente la persona más buena que conozco.

A la Chacha, la Zaza, que nada la traspasa. Gracias por estar siempre al frente de todos, gracias por el fútbol, por muchas comilonas, por 2001 en el Colón... por los chismes. Gracias por ponerte a la cabeza de tantos buenos momentos.

A la vida porque tarde o temprano me obligaría a conocer a Agus. Gracias por coparte en cualquier propuesta sin nunca alguna objeción, por escuchar siempre y tan atenta y sinceramente, dando el consejo que uno más necesita escuchar. Gracias por las meriendas-intervalo, por seguir intentando ganarme al chin por tanto tiempo y por asustarte tan tentadoramente fácil, **oj0**. Gracias por arrancar las distracciones.

A Giuly. Gracias por el norte, el sur, el este y el oeste. Gracias por recorrer conmigo casi todo este espectacularmente inmenso país. Gracias por colmar cualquier momento y lugar con alegría

y emoción. Por querer jugar donde sea, cuando sea y como sea. Gracias por caminarnos todo este tiempo, gracias por todo.

A Juli. Si agarramos todos los conjuntos de personas que forman parte de mi vida, sos el único elemento presente en la intersección de todos ellos. Para empezar, gracias por el mate en mateúno. Me parece un buen formato para revelarte que el mate amargo no me gustaba en aquella época, así como no me gustaba la cerveza hasta hace poco. Gracias por la torpeza como destructora de la cotidianeidad de la cursada, por la termo-dinámica, por el respaldo sin respaldo, por el murmullo en las cursadas, grabado o no grabado. Gracias por Córdoba, por acercarme a la FIFA y por cambiar mi manera de pensar todos los días. Gracias por tu “a la burocracia, ni cabida” y por todas la inabarcable cantidad de anécdotas de las que sólo voy a rescatar el mejor pacto que se haya hecho: “Pará, entonces vos cursá relatividad y yo cuántica, pero después nos explicamos todo y los dos metemos las dos”. Estoy feliz de saber que van a multiplicarse en los próximos años.

A mi prima Sol y a mi tía Silvita, por ayudarme ambas a estudiar en el pasado y por confiar tanto en que las voy a hacer millonarias aún con el sueldo de becario de Conicet.

A mi hermano, por preguntarme sobre aspectos de la física y contarme y hacer escuchar las maravillas de la música. Ambos tocamos de oído en la disciplina del otro pero nos basta para darnos cuenta de que son más las similitudes en lo que hacemos que las diferencias.

A mi hermana, por obligarme a explicar y aprender mejor acerca de todo desde mis 3 años.

A mis pas. No construyeron una casa, hasta “hogar” me suena a poco. Montaron un lugar que me permiten llenar y muchas veces desbordar con todos los grupos de personas que fui conociendo en la vida. Gracias por bancarse nuestras invasiones. Sin ellas, muy pocos de estos renglones habrían sido escritos. Gracias por el lienzo y las pinturas, no sólo soy sino que soy feliz gracias a ustedes. “No es poco”.

13. Referencias

1. Alberts, B. *et al.* *Biología Molecular de la Célula*. (Omega, 1983).
2. Lauffenburger, D. A. (University of I. & Linderman, J. J. (University of M. *Receptors, Models for Binding, Trafficking and Signaling*. (1993).
3. Lim, W. A. Designing customized cell signalling circuits. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 393–403 (2010).
4. Keener, J. P. & Sneyd, J. *Mathematical Physiology*. Book 580 (2008). doi:10.1007/978-0-387-79388-7
5. Ventura, A. C. *et al.* Utilization of extracellular information before ligand-receptor binding reaches equilibrium expands and shifts the input dynamic range. doi:10.1073/pnas.1322761111
6. Ferrell, J. E. Q&A: Cooperativity. *J. Biol.* 8, 53 (2009).
7. Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecule of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, iv–vii (1910).
8. Ferrell, J. E. & Ha, S. H. Ultrasensitivity part I: Michaelian responses and zero-order ultrasensitivity. *Trends Biochem. Sci.* 39, 496–503 (2014).
9. Cattoni, D. I., Chara, O., Kaufman, S. B. & Flecha, F. L. G. Cooperativity in binding processes: New insights from phenomenological modeling. *PLoS One* 10, (2015).
10. Whitty, A. c o m m e n t a r y Cooperativity and biological complexity. 4, 435–440 (2008).
11. Martini, J. W. R., Diambra, L. & Habeck, M. Cooperative binding: a multiple personality. *J. Math. Biol.* 72, 1747–1774 (2016).
12. Ha, S. H. & Ferrell, J. E. Thresholds and ultrasensitivity from negative cooperativity. *Science (80-.)*. 352, 990–993 (2016).

13. Acerenza, L. & Mizraji, E. Cooperativity: A unified view. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1339, 155–166 (1997).
14. Hunter, C. A. & Anderson, H. L. What is cooperativity? *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 7488–7499 (2009).
15. De Meyts, P. Insulin/receptor binding: The last piece of the puzzle?: What recent progress on the structure of the insulin/ receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation P. D. Meyts. *BioEssays* 37, 389–397 (2015).
16. Stefan, M. I. Cooperativity: a competition of definitions. *J. Math. Biol* 2–4 (2016). doi:10.1007/s00285-016-1069-2
17. Abeliovich, H. On Hill coefficients and subunit interaction energies. *J. Math. Biol.* 73, 1399–1411 (2016).
18. Holt, J. M. & Ackers, G. K. in *Methods in Enzymology* 455, 193–212 (2009).
19. Cattoni, D. I., Kaufman, S. B. & Flecha, F. L. G. Kinetics and thermodynamics of the interaction of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate with proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794, 1700–1708 (2009).
20. Wyss, G. D. & Jorgensen, K. H. *A User's Guide to LHS: Sandia's Latin Hypercube Sampling Software. Other Information: PBD: Feb 1998* (1998). doi:98-0210
21. Sontag, E. D. *Lecture Notes on Mathematical Systems Biology.* 1–216 (2011).
22.
<http://journals.plos.org/plosone/article/comment?id=10.1371/annotation/b7e42ef3-c4e2-406c-93db-d4cc71612458>
23. *Matlab R2013a.* <https://es.mathworks.com/products/matlab.html>

24. <http://www.ma3.upc.edu/users/carmona/teaching/clases/08-09/trabajos/metodo%20biseccion.pdf>
25. <http://copasi.org/>