



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Modelos estocásticos para las criptas intestinales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Físicas

Lic. Ernesto Federico Rotondo

Director: Dr. Alejandro Fendrik

Director Adjunto: Dr. Tomás S. Grigera

Consejero de estudios: Dr. Rafael Ferraro

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencias (ICI-UNGS)/IFLYSIB (IFLYSIB-CONICET-UNLP)

Fecha de defensa: 06/03/2024

Buenos Aires, 2024

Resumen

En este trabajo de tesis se presenta un análisis de la dinámica de población celular de organismos en estado de homeostasis. El primer caso considerado, debido a la mayor disponibilidad de datos experimentales, es el de la renovación celular en las criptas de Lieberkühn del epitelio intestinal, para lo cual se desarrolla un modelo de compartimentos, descrito por un sistema de ecuaciones diferenciales. Este estudio se amplía luego considerando ecuaciones maestras asociadas que permiten analizar la dinámica considerando su ruido intrínseco. En una segunda instancia se estudian modelos con características similares, pero generalizados de modo de poder ser aplicados a otros tejidos, más allá de las criptas intestinales. En algunos casos resulta posible considerar modelos simplificados, que pueden expresarse en términos de cadenas de Markov lo que posibilita resolverlos analíticamente. Los últimos capítulos se dedican al estudio de la dinámica de renovación celular en presencia de diversas mutaciones que ocurren aleatoriamente en alguna de las células involucradas. Se obtienen algunos resultados anti-intuitivos, pero que demuestran ser correctos bajo un análisis más concienzudo. El más destacable de estos resultados es el hecho de que en un proceso de renovación celular aquellos clones correspondientes a células que se renuevan más lentamente tienen mayores probabilidades de fijarse.

Estudiamos en primer lugar la dinámica de renovación celular en las criptas de Lieberkühn, que ha sido objeto de numerosos estudios experimentales y teóricos. Éstos han sido motivados no sólo por el interés en las anomalías e interrupciones en su funcionamiento normal relacionadas con desarrollo del cáncer de colon, sino también, para comprender el proceso de las divisiones celulares que aseguran su renovación en el régimen de homeostasis. De hecho, en los organismos multicelulares las divisiones celulares de células madre de diferentes linajes, deben proporcionar el número necesario de células para su correcto funcionamiento, con el fin de obtener una adecuada renovación celular y/o la reconstrucción en caso de daño (o el desarrollo en el caso de la embriogénesis) para los diferentes tejidos. En el caso del epitelio intestinal las células madre se hallan en el fondo de la cripta, y además de autorenovarse dan origen a la primera generación de células amplificadoras transitorias, que van migrando hacia arriba proliferando y diferenciándose. En la parte superior la proliferación genera células completamente diferenciadas, que cumplen sus funciones específicas y mueren luego dentro del lumen intestinal. Este ciclo tiene una duración aproximada de 5 días. La mayoría de las técnicas experimentales que proveen información han sido aplicadas en ratones, por lo que en el presente trabajo se consideran principalmente los datos obtenidos en estos animales. Un aspecto a destacar de los resultados experimentales es la gran dispersión de los datos reportados por diferentes autores. Esta dispersión de resultados se debe por un lado a la variedad de procedimientos experimentales de los distintos grupos de investigación pero, como muestran nuestros resultados, también a la dinámica estocástica propia de estos procesos de renovación. El modelo estocástico desarrollado en este trabajo para abordar la dinámica teniendo en cuenta la presencia de fluctuaciones aleatorias, permite explicar muy satisfactoriamente las observaciones experimentales, en particular la evolución hacia la

monoclonalidad.

En segundo lugar presentamos una generalización del modelo estocástico de renovación, que contempla la posibilidad que una de las células madre contenga alguna mutación que se vea representada en una alteración de alguno de sus parámetros (tasa de renovación, tasa de apoptosis, etc). Estudiamos cómo se ve afectado el sistema dinámico y como eventualmente cambia la probabilidad de fijación de dicha mutación. Esta generalización del modelo predice que aquellas mutaciones que ralentizan tasa de renovación tienen mayores chances de fijarse que las células no alteradas.

Finalmente consideramos la cuestión del envejecimiento de los organismos multicelulares en régimen homeostático. Ésta se caracteriza por la disminución de la capacidad regenerativa de todos los órganos y tejidos, disminución íntimamente relacionada con las funciones de las células madre encargadas de la renovación celular y que por lo tanto es más evidente en los tejidos en los que es necesaria una alta tasa de renovación, tales como los epitelios cutáneo e intestinal. Para abordar estos procesos de renovación se estudia en profundidad el marco de la dinámica de los procesos de nacimiento y muerte en una población de individuos distinguibles pero igualmente aptos, lo que lleva a que finalmente sobreviva la descendencia de sólo uno de los individuos originales. Estudiando un modelo de ecuaciones diferenciales, junto con el proceso estocástico asociado, se determina la probabilidad de fijación de células alteradas (mutadas). Luego de estudiar la estabilidad del sistema frente a fluctuaciones propias (ruido intrínseco), se obtiene una expresión analítica de la probabilidad de fijación de las células mutantes. Esta expresión se compara con los resultados de una simulación del proceso estocástico con el método de Gillespie, verificándose una notable coincidencia. Este resultado muestra que si se producen alteraciones celulares esporádicas en un conjunto homogéneo de células madre, tienden a fijarse con mayor probabilidad aquellas alteraciones (o mutaciones) que alargan el ciclo celular (por motivos estrictamente propios de la dinámica estocástica de renovación aún en ausencia de otras diferencias biológicas). Puesto que el efecto es acumulativo, el paulatino aumento de la longitud del ciclo celular y la disminución de las tasas de proliferación aparece como resultado de un efecto estocástico aún en ausencia de otras causas biológicas de envejecimiento.

Stochastic models for intestinal crypts

Abstract:

In this work we present an analysis of the dynamics of cellular population in organisms in a homeostatic state. Due to the greater availability of experimental data, we first consider cell renewal in the Lieberkühn crypts located in the intestinal epithelium. We first develop a compartmental model described by ordinary differential equations, then expand this by taking into account the intrinsic fluctuations of the renewal process through master equations associated to the original differential equations. We later consider similar models, but generalized so that they can be applied to other tissues, beyond the intestinal crypts. In some cases, it turns out that it is possible to employ simplified models, that can be expressed in terms of Markov chains that can be analytically solved. The last part is devoted to the study of the dynamics of cell renewal in the presence of various random mutations. Some results are rather un-intuitive, but a thorough analysis shows them to be correct. The most remarkable is the fact that in a cell renewal process, the clones that are most likely to fixate are those corresponding to cells for which the renewal rate is slower.

Our first results concern the dynamics of cell renewal in the Lieberkühn crypts, which have been the subject of numerous experimental and theoretical studies. This is due not only because of the interest in aberrations and interruptions in normal functioning related to the development of colon cancer, but also to understand the process of cellular divisions in the homeostatic regime that ensure the appropriate renewal of the crypts. In fact, in multicellular organisms, the cell divisions of stem cells of different lineages must provide the necessary number of cells for their proper functioning, in order to obtain adequate cell renewal and/or reconstruction in case of damage (or development in the case of embryogenesis) for the different tissues. In the case of the intestinal epithelium, the stem cells are found at the bottom of the crypt, and in addition to self-renewal, they generate the first generation of Transit Amplifying Cells, which migrate upwards, proliferating and differentiating, at the top eventually generating the full Differentiated cells, that perform their specific functions, and then die in the gut lumen. This entire cycle lasts approximately 5 days. Most of the experimental techniques that provide information on this process have been developed in mice, so that in the present work we have focused mainly on the data obtained in them. A surprising aspect in the experimental results is the great dispersion of the data reported by different authors. This dispersion can be ascribed in part to the different experimental techniques employed, but our results show that it should also be expected from the stochastic nature of the dynamics of the renewal processes. The model developed here can treat the dynamics taking into account the presence of random fluctuations, and can satisfactorily explain the experimental observations, in particular the evolution towards monoclonality.

We then generalize the stochastic renewal model, allowing for the possibility than one of the stem cells is mutated, so that one of its parameters (e.g. the rate of renewal or the rate of apoptosis) is altered with respect to the normal cells. We study how this mutation affects the dynamical system, and how the fixation probability changes for the mutated clone. This

generalization of the model predicts that mutations that cause a slowdown of the renewal rate have higher chance of fixation than the normal cells.

Finally, we consider the aging of multicellular organisms in a homeostatic regime. This is characterized by the decrease in the regenerative capacity of all organs and tissues, a decrease closely related to the functions of stem cells responsible for cell renewal, and for this reason more evident in tissues in which a high rate of cell renewal is necessary, such as the skin or the intestinal epithelia. This is extensively studied in the framework of the dynamics of birth and death processes in a population of distinguishable but equally fit individuals, leading to offspring of one of the original individuals ultimately surviving. By studying a differential equation model together with the associated stochastic process, the probability of fixation of altered (mutated) cells is computed. After studying the stability of the system against its intrinsic fluctuations (noise), an analytical expression for the probability of attachment of mutant cells is obtained. This is compared with numerical simulations of the stochastic process (using Gillespie's method), with remarkable coincidence between both results. This result shows that if sporadic cellular alterations occur in a homogeneous set of stem cells, those alterations (or mutations) that lengthen the cell cycle tend to be fixed with a greater probability, even in absence of other biological advantages, due to purely stochastic reasons. Since this is a cumulative effect, the gradual increase of the cell length cycle and the decrease of proliferation rates is found as a result of a stochastic effect, independently of other possible biological causes of aging.

Índice general

1. Introducción	11
1.1. Células y tipos celulares	11
1.2. Intestino y criptas colónicas.	14
1.2.1. Breve descripción de la cripta intestinal	15
1.3. Señalización, morfogénesis y diferenciación	18
1.3.1. Notch	20
1.3.2. Wnt	20
1.4. Dinámica de renovación de poblaciones	24
1.4.1. Homeostasis	25
1.4.2. Dinámica Evolutiva	26
1.4.3. Teoría sintética de la evolución	27
1.4.4. Teoría neutralista	29
1.4.5. Monoclonalidad	30
1.5. Objetivos y organización de la Tesis	31
2. Modelos y métodos	33
2.1. Modelos	33
2.2. Breve disertación sobre modelos determinísticos y aleatorios	33
2.2.1. Modelos determinísticos	34
2.2.2. Procesos estocásticos	35
2.3. Cadenas de Markov	36
2.3.1. Definición y algunas propiedades de Markov	36
2.3.2. Probabilidades de transición	37
2.4. Modelo compartimental para criptas intestinales	38
2.5. Modelo estocástico asociado	41
2.5.1. Introducción de las mutaciones	43
2.5.2. Algoritmo de Gillespie	44
2.6. Modelo General de un único compartimento.	47
2.6.1. Fijación de la población alterada	49
2.6.2. Modelo Markoviano de evolución poblacional	50
2.6.3. Modelo Markoviano simplificado de fijación de mutaciones	55

2.7. Funciones de Hill	58
3. Renovación de las criptas	61
3.1. Introducción	61
3.2. Dinámica de renovación en las criptas intestinales	65
3.2.1. Regulación de las tasas en los compartimentos de las células madre (SC) y transitorias de primera generación (TAC_1)	69
3.3. Resultados	72
3.3.1. Evolución temporal de la población en el régimen homeostático.	72
3.3.2. Deriva Neutral y tránsito hacia la monoclonalidad	72
3.3.3. Análisis del resto de compartimentos de la cripta.	77
3.4. Conclusiones.	85
4. Mutaciones y ruptura de neutralidad	87
4.1. Deriva Neutral y Mutaciones	87
4.2. Análisis de posibles mutaciones	90
4.3. Discusión y conclusiones	94
5. Renovación y extensión de ciclos celulares	97
5.1. Introducción	97
5.2. Modelo de renovación básico	99
5.3. Fijación de células alteradas	101
5.4. Modelo Simplificado	104
5.5. Análisis de la fijación de alteraciones sucesivas y sus efectos	108
5.5.1. Generalización a diferentes alteraciones	109
5.6. Proceso de renovación en tiempo continuo	111
5.7. Discusión y conclusiones	114
6. Conclusiones	117
A. Sobre la estabilidad estocástica	121
A.1. Ejemplo: de extinción por fluctuaciones	121
A.2. El potencial / campo de poblaciones	124
B. Nulclinas y bifurcación	127
C. Distribución de población	131

Agradecimientos:

Quisiera empezar por dar mi gratitud al ICI-UNGS por brindar el lugar de trabajo para este proyecto,

A L. Romaneli siempre acompañando el proyecto.

A Osvaldo Chara por haber dado ánimos para finalizar el trabajo en un momento particularmente difícil,

A Laurence por todo lo compartido y haber aguantado tanto tiempo,

A Amandine por toda la paciencia (siempre se puede un poquito más),

A Ceci por sostener la amistad a prueba de todo.

Un agradecimiento especial a todos los colegas y trabajadores del IFLYSIB de La Plata por brindar el espacio de trabajo y el acompañamiento en estos últimos tiempos.

Toda mi gratitud con Tomás Grigera por brindarse, dar todo su apoyo y permitir la finalización del proyecto.

Para finalizar va mi dedicación con especial afecto a Alejandro Fendrik, por todo lo que supo enseñar y transmitir.

Capítulo 1

Introducción

El objeto de estudio del presente trabajo es la dinámica de renovación en procesos celulares. Para ser más precisos la capacidad de renovación o auto-renovación de un tejido implica la conservación del potencial regenerativo del mismo. Esto es válido para prácticamente cualquier tejido, por ejemplo hematopoyético, epidérmico, etc. El presente trabajo se focaliza en un comienzo en el caso del tejido intestinal, más precisamente en la autorenovación en las criptas intestinales. En la presente introducción comenzaremos haciendo una muy breve descripción de lo que es una célula, luego una descripción de como interactúan con su entorno inmediato (señalización), proseguimos con una descripción del intestino y finalizaremos esta introducción con algunos conceptos de la propia dinámica poblacional entendiendo por esto la dinámica de las poblaciones celulares que conforman las criptas intestinales.

1.1. Células y tipos celulares

Comenzaremos entonces por una breve reseña del elemento fundamental de los procesos que estudiaremos en el presente trabajo. La célula la entendemos como aquella unidad estructural y funcional de cualquier ser vivo, en forma análoga a como entendemos al átomo como unidad constitutiva elemental de la materia [2].

La complejidad propia tan solo de una célula aislada y su funcionamiento interno, o de su interacción con el ambiente externo, su capacidad organizacional única, los procesos moleculares y bioquímicos que la posibilitan, etc son tan solo algunas de las innumerables líneas de estudio posibles (y cada una de ellas con innumerables sublíneas por cierto).

De los múltiples conceptos que abren estas innumerables *líneas de estudio* de las que hablamos nos interesa focalizarnos en dos de ellos vinculados entre sí y que son fundamentales en los diversos procesos de renovación celular:

- **La Potencia celular:** Entendemos por esto la capacidad de una unidad celular de generar una variedad de *tipos* celulares, con las más diversas funciones y características constitutivas. A mayor potencia celular mayor sera dicha variedad.

- **La Diferenciación celular:** Es aquel proceso por el cual las células varían de un tipo celular a otro. En principio cuanto mayor es la cantidad de *diferenciaciones* que ocurren las células van adquiriendo características funcionales más específicas a costa de perder potencialidad celular.

Como acabamos de señalar a medida que las células adquieren capacidades para realizar tareas y funciones específicas necesarias para el funcionamiento del conjunto (del ser vivo del que forman parte) lo hacen a costa de perder potencialidad celular. Bajo estos criterios podemos dividir a las células en tres grandes grupos en primera aproximación:

- Principales tipos celulares:
 - (i) **Células Madre:** Se caracterizan por poder autorenovarse (en principio indefinidamente) y a la vez generar diversos tipos de células más especializadas. A su vez a estas las podemos subdividir en diversos tipos de células madre de acuerdo a sus diversas potencialidades.
 - (ii) **Células Progenitoras:** Al igual que las células madre tienen capacidad de autorenovarse y generar células más especializadas. Las diferencias fundamentales con las células madre es que estas poseen menos potencialidad que las aquellas, y fundamentalmente la capacidad de autorenovarse se limita a un número finito de veces. También suelen cambiar la duración de los ciclos celulares respecto del de las células madre. Dentro de estas hay una enorme variedad de tipos con diversas características y potencialidades.
 - (iii) **Células Diferenciadas:** Estas células poseen funciones muy específicas y diversas (absorción de nutrientes, eliminación de tóxicos, defensa de elementos externos (virus, bacterias, etc), procesamiento de señales, etc). En general la adquisición de estas funcionalidades las lleva a perder la potencialidad (aunque esto nuevamente se da en diversos grados y matices). Mantienen la capacidad de autorenovarse, pero un número finito de veces, y son incapaces de generar un linaje.

Estas definiciones que presentamos son muy generales y lábiles sometidas a constantes cambios y muchas veces algunas de ellas se superponen [76]. Sin embargo, aún en continua revisión se hacen necesarias para el entendimiento de estos procesos.

Veamos ahora un poco más en detalle a las células madre. Para precisar un poco más podemos decir que una célula madre es una célula que posee las siguientes propiedades:

- La capacidad de autorenovarse para producir otras células madre.
- Una *potencialidad* de poder diferenciarse en diferentes tipos de células.
- La capacidad de generar todo un linaje de células.

Las células madre pueden ser Totipotentes, Pluripotentes, Multipotentes, Oligopotentes o Unipotentes. Según su origen se distinguen en células madre embrionarias, fetales, amnióticas o adultas.

- **Células madre Totipotentes:** Tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares, embrionarios o extra-embrionarios y una sola de estas puede dar lugar a todo un organismo viviente.
- **Células madre Pluripotentes:** Estas células tienen algo menos de potencialidad que las totipotentes, de alguna forma estas han subido un nivel la escala de diferenciación. Tienen la propiedad de ser capaces de generar células de tres líneas germinales: endodérmicas, mesodérmicas y ectodérmicas. Se puede decir que aún tienen la capacidad dar lugar a todo un organismo completo, pero no pueden suministrar el entorno propio para su desarrollo (los anexos embrionarios).
- **Células madre Multipotentes:** Estas tienen la capacidad de generar cualquier tipo celular pero únicamente de una línea celular a la cual pertenecen: endodermo, ectodermo o mesodermo. Son células propias de un organismo ya desarrollado.
- **Células madre Oligopotentes:** Conservan la capacidad de auto-renovarse y pueden diferenciarse en unos pocos tipos de células (ejemplos de estas son las células madre linfoides o mieloides).
- **Células madre Unipotentes:** Conservan la capacidad de auto-renovarse (en principio en forma ilimitada) pero en un solo tipo celular (aquel al que pertenecen) y al diferenciarse solo pueden generar un tipo muy específico de células.

Existe una variedad de criterios según autores y/o escuelas sobre la nomenclatura lo que a veces se presta a confusiones. Algunos solo hablan de células madre para el caso de las embrionarias (totipotentes). En el presente trabajo nos referiremos en forma más general a células madre como aquellas capaces de autorenovarse y regenerar un tejido por caso (sin especificar si se trata de una célula madre Multipotente, Oligopotente o Unipotente).

Subrayemos que mientras las células madre embrionarias (totipotentes por ejemplo) se encuentran implicadas en una dinámica de cambios drásticos que llevan a la constitución y crecimiento del ser vivo (aquí hablamos del reino animal) las células madre en un organismo animal *adulto* se ven embebidas en una dinámica radicalmente distinta que, muy resumidamente, intenta renovar y conservar (aunque los términos pueden sonar contradictorios, podemos pensarlo en términos de la paradoja de Teseo ¹) el organismo del cual forman parte.

¹La paradoja de Teseo plantea un dilema sobre la noción de identidad. Según la fábula griega los atenienses con el propósito de conservar el barco en el que Teseo retornó de Creta, luego de derrotar al minotauro, procedieron a reemplazar cada pieza de madera a medida que las mismas se iban desgastando, conservando de esta forma el barco original durante siglos. Sin embargo se plantea el interrogante de si uno reconstruyera

En un animal adulto las células madre son responsables del mantenimiento y la renovación de diferentes tejidos y órganos, ya desarrollados, que lo componen. En general dichas células madre residen en nichos especializados en cada tejido y son las encargadas de reponer las diferentes células que componen dicho tejido ante escenarios en los cuales esta población se ve amenazada, tanto en un estado homeostático como ante una lesión del mismo. Estas células madre se definen fundamentalmente por la capacidad de auto-renovarse y de generar todos los diversos tipos celulares (Transitorias y Diferenciadas) que componen el tejido en cuestión. Es importante tener presente que la capacidad de *auto-renovarse* no es exclusiva de las células madre ni lo que las define, ya que ciertas células progenitoras y diferenciadas también tienen esta propiedad. Ejemplos de esto son los progenitores gliales tempranos y los linfocitos maduros respectivamente.

Sin embargo las células madre tienen capacidad de generar todo un linaje, además de poseer un potencial de auto-renovación mucho mayor que los demás tipos celulares que puede mantenerse a lo largo de toda la vida del organismo en cuestión. Esta capacidad de una célula madre es debido a una compleja interacción entre señales intracelulares propias y extracelulares con el ambiente del nicho que la rodea.

El hecho de que las células madre tengan una gran capacidad de auto-renovación, no implica que bajo condiciones fisiológicas el proceso de auto-renovación sea constante. Un ejemplo de esto es el de las células madre hematopoyéticas, que poseen una notable capacidad de auto-renovación ante *lesiones* (por ejemplo se verifica experimentalmente en trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes), mientras que en condiciones fisiológicas, la mayoría de estas células madre permanecen en estado quiescente (por célula quiescente entendemos, dicho muy resumidamente, como un estado latente, aunque reversible, de *congelación temporal*) durante períodos prolongados y sólo algunas son sometidas a algunos ciclos de auto-renovación en un animal adulto.

En el presente trabajo nos centramos en el estudio de una dinámica de este último tipo (células madre en un organismo animal *adulto*). Debido fundamentalmente a la disponibilidad de datos experimentales el trabajo comenzó focalizado en la renovación de las criptas de Lieberkühn intestinales.

1.2. Intestino y criptas colónicas.

El intestino grueso, penúltima etapa del tubo digestivo, se encuentra compuesto por el ciego, el colon y el recto. El colon es una estructura tubular que se extiende desde el intestino delgado hasta el recto y su función principal radica en regular la absorción de agua y

el barco con las piezas viejas originales. ¿Cuál de los dos barcos sería realmente el “original”? Aquel que fue “conservado” reemplazando las piezas a medida que las mismas se desgastaban o el segundo reconstruido con las piezas originales naturalmente degradadas? Esta paradoja se cita solo con la intención de presentar que dos conceptos como la renovación y la conservación contradictorios en una primera lectura presentan una gama de matices en los que esta aparente contradicción se diluye.

nutrientes (para luego transferirlos a la sangre) y la secreción glandular. El proceso de absorción tiene lugar mediante una capa de células epiteliales que recubren el interior del intestino grueso. A lo largo del mismo, la superficie interna presenta una serie de pliegues de forma tal de maximizar la superficie de absorción de nutrientes.

La capa exterior del colon es una capa de músculo liso (*muscularis externo*). La función principal del muscularis externo es mover la materia a lo largo del intestino grueso a través de contracciones peristálticas. Dentro del muscularis externo existe una submucosa que contiene los vasos responsables de alimentar con un flujo sanguíneo al intestino grueso. Dentro de la submucosa, otra capa de músculo (“muscularis mucosae”) separa la submucosa de la parte más interna del intestino grueso (la mucosa). Incrustada en la mucosa existen muchas glándulas intestinales o criptas (ver Figuras:1.2 y 1.3).

El intestino delgado conecta el estomago con el intestino grueso y consta esencialmente de tres partes: el duodeno, el yeyuno y el íleon. Su función principal es también la absorción de agua y nutrientes.

Las criptas se encuentran también en el intestino delgado cumpliendo una función análoga a la descrita previamente. En los ratones existe una mayor cantidad de estudios experimentales de las criptas y su funcionamiento en el intestino delgado y los modelos presentados en estos trabajos fueron principalmente ajustados a dichos datos experimentales.

1.2.1. Breve descripción de la cripta intestinal

El epitelio intestinal y la membrana basal del colon se encuentran replegadas sobre ellas mismas de manera periódica y extremadamente densa. La unidad más esencial en estos repliegues es la cripta intestinal. Las criptas tienen una forma similar a un *dedal* (o un tubo de ensayo abierto sobre el *lumen intestinal*, entendido esto como la cavidad interna que forma el intestino.). El vacío en el centro de este *tubo de ensayo* es llamado *lumen de la cripta* (ver fig: 1.2). La cima de las criptas se ensancha y el epitelio y la membrana basal de cada cripta se unen. Se produce entonces una capa continua de células epiteliales asociadas a la membrana basal separando el medio exterior del interior. El conjunto de las criptas se encuentra en la propia lámina. Dentro del colon de un ratón adulto se cuentan alrededor de 250 *criptas/mm*² de pared intestinal [54] y la profundidad de la cripta es de alrededor de 200 μm [57]. Las criptas intestinales se encuentran, también, en la estructura próxima a la mucosa del intestino delgado, que es la porción del tubo digestivo situada por sobre el colon. Las criptas del intestino delgado han sido más estudiadas que aquellas del colon y son mejor conocidas.

En la base de las criptas, o sea en la parte más alejada del lumen intestinal se encuentra el nicho² de las células madre (ver Figura: 1.6). A medida que estas células se dividen van

²Los nichos son microambientes encargados de regular cantidad, destino y comportamiento de diversas células madre o progenitoras. En general se sostienen sobre una membrana basal constituida por una matriz extracelular especializada conformada por colágeno, laminina, etc. Desde el punto de vista funcional los nichos deben: i) proporcionar un espacio físico a un determinado número de células y ii) instruir a las células madre a la autorenovación o diferenciación. También se cree que modulan los ciclos y la migración de diversas células.

migrando hacia la cima de la cripta. A medida que se dividen y migran se diferencian (o especializan), en forma gradual, cada vez más. Una vez que arriban a la cima se desprenden como células completamente diferenciadas para cumplir sus funciones (Ver Figuras: 1.3, 1.4, 1.6).

Todo este proceso de renovación es bastante rápido, siendo, para un ratón adulto, de entre 3 y 5 días en el intestino delgado, y alrededor de 7 días en el colon.

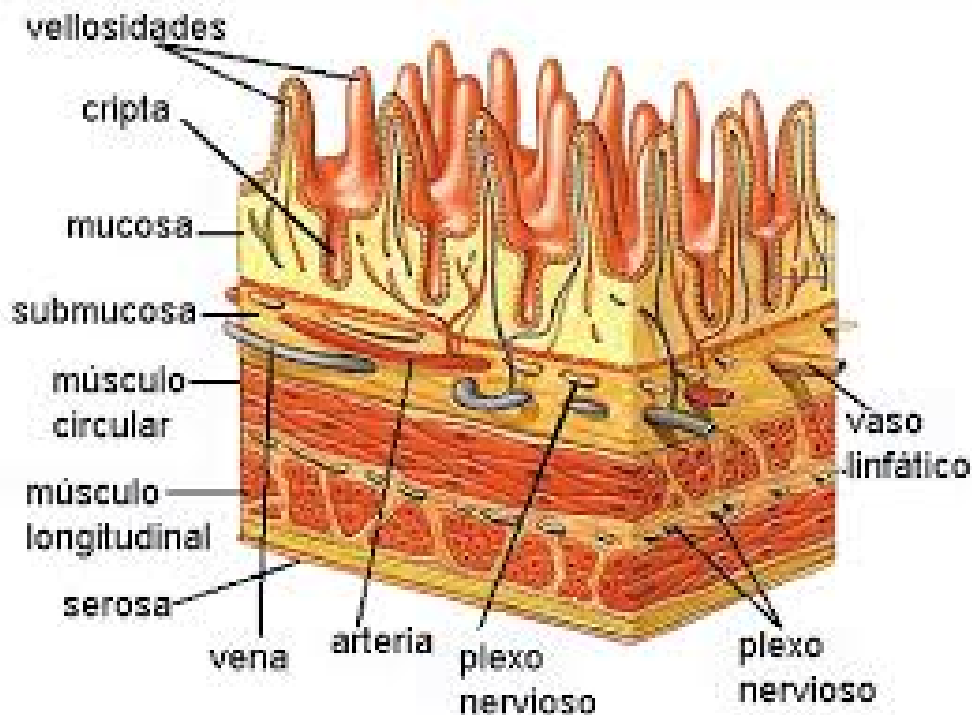


Figura 1.1: Diagrama de un corte del tejido intestinal. En el mismo se aprecian las vellosidades y las criptas en el conjunto del tejido.

Nicho de las células madre

Como un breve resumen podemos señalar que, en el caso del colon, el nicho se encuentra ocupado por células madre $Lgr5^+$ y $Reg4^+$ que sostienen la actividad de las células madre. En el intestino delgado no hay $Reg4^+$ sin embargo hay células con características semejantes llamadas células Paneth. Efectivamente las células Paneth son propias de las criptas del intestino delgado y no aparecen en las criptas del colon. La función principal de estas células es la de defensa y protección del tracto gastrointestinal secretando sustancias antibacterianas.

En los más diversos órganos se han identificado nichos: criptas intestinales, páncreas, médula osea, músculos, cerebro, etc.

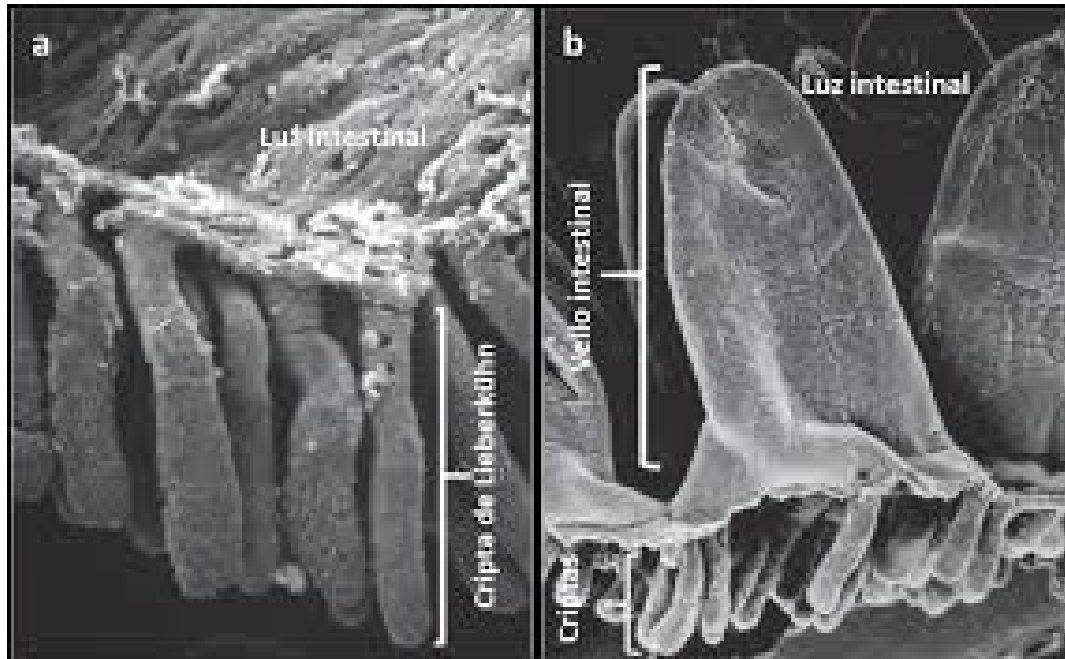


Figura 1.2: (a) Foto de Criptas de Lieberkühn en el Colon. (b) Criptas de Lieberkühn en el Intestino delgado

Tienen la particularidad de ser las únicas células diferenciadas ubicadas en el fondo de las criptas. Las células madre $Lgr5^+$ son las que dan lugar al nacimiento del conjunto de células del epitelio intestinal.

Células Transitorias de Amplificación

A medida que las células madre se diferencian y van migrando hacia arriba, entran en la zona de proliferación. En esta zona las células inician su diferenciación y devienen en células transitorias de amplificación, también denominadas células progenitoras o precursoras. Estas células transitorias amplificadoras se caracterizan por dividirse más rápidamente que las células madre lo que posibilita una renovación más veloz del epitelio intestinal. El proceso de diferenciación es gradual y define las distintas generaciones de transitorias amplificadoras o progenitoras hasta que finalmente dan lugar a las células completamente diferenciadas destinadas a su función específica. Las generaciones de transitorias se estiman entre cuatro y seis antes de decantar en las completamente diferenciadas.

Poblaciones de los distintos tipos celulares en las criptas.

En los diversos trabajos experimentales los resultados presentan una cierta variabilidad dado que son resultados de diferentes grupos que realizaron sus trabajos con diversos protocolos para el etiquetado y seguimiento de las células. Pero podemos presentar las cotas entre las que fluctúan esos datos. Para los intestinos delgados de ratones tenemos del orden de 10^6 criptas. En cada una de estas criptas el número de células (N_T) se encuentra entre las 200 y 350 ($200 \leq N_T \leq 350$), de las cuales entre 1 y 40 son células madre (SC) ($1 \leq SC \leq 40$), entre 150 y 250 proliferativas y entre 100 y 200 de estas células son diferenciadas ($100 \leq D \leq 200$).

A modo de ejemplo, de los diversos resultados reportados por distintos autores la población de células madre es de: entre 4 y 8 para Paulus et al [61], entre 4 y 6 para Barker et al [6], entre 4 y 16 para Li et al y Potten et al [46, 63], Yatabe et al entre 1 y 40 [96]. Como ya señalamos, aparte de las células madre existen otras células proliferativas (aunque menos *potenciales* que las células madre) que son las transitorias amplificadoras (TAC). A su vez, estas células transitorias amplificadoras, se dividen en generaciones (entre 4 y 6 generaciones según los diferentes trabajos [63]). El período del ciclo celular de una célula madre oscila entre las 12 y las 32 hs siendo la media de 24 hs mientras que el de las células transitorias amplificadoras lo hace entre las 10 y las 14 hs siendo la media de 12 hs (o sea aproximadamente la mitad del de las células madre en la media).

Si bien la gran dispersión en las poblaciones celulares exhibidas pueden atribuirse parcialmente a las distintas técnicas experimentales (marcadores de genes que identifican las células madre diferentes, etc) es importante considerar que están implícitas en la propia naturaleza del proceso y resulta relevante considerar estas fluctuaciones de las poblaciones en las criptas en el régimen homeostático.

Es interesante subrayar que existe un consenso en que la división resulta ser el principal motor de la migración celular en estos casos (aunque queda abierto el debate de la ponderación de otros factores).

Por otra parte ha sido objeto de especulación en los últimos años que la subdivisión del epitelio intestinal en millones de pequeños nichos, con pocas células madre, constituye una barrera natural para la fijación de mutaciones mejor adaptadas, que podrían ser cancerosas, la dinámica neutral puede prevalecer sobre la adaptación darwiniana como protección ante el potencial desarrollo de tumores [36]. Por lo tanto, es de interés un análisis de la posible fijación de clones mutantes en el marco de la deriva neutral. Sobre este punto se discutirá un poco más a fondo en el capítulo de Mutaciones en las criptas.

1.3. Señalización, morfogénesis y diferenciación

Los mecanismos internos de los procesos celulares y su interacción con el *medio-ambiente próximo* o cercano que disparan y/o anulan determinadas expresiones genéticas excede por mucho lo que pretende abarcar el presente trabajo que se focaliza en la dinámica poblacional

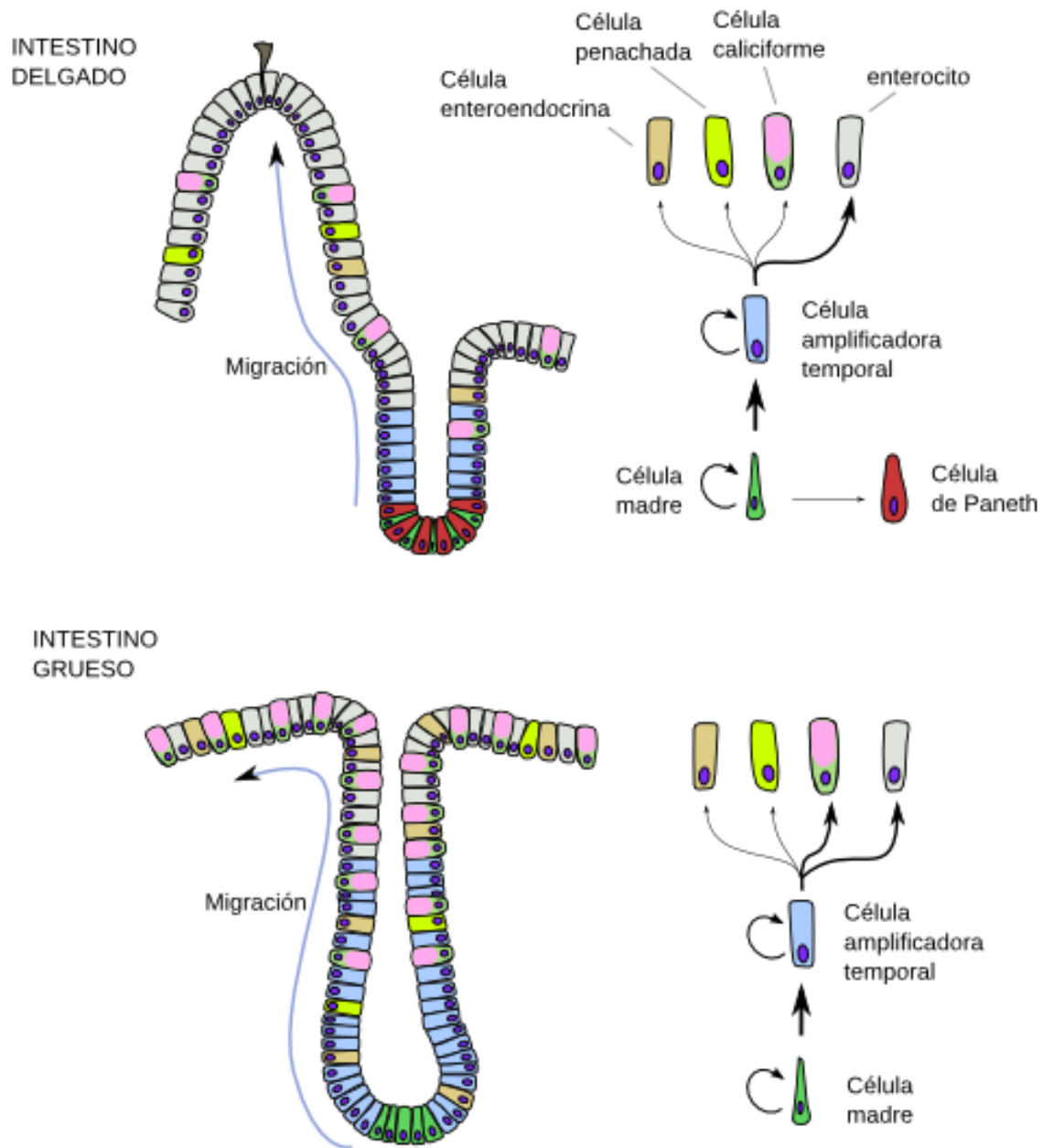


Figura 1.3: En este esquema vemos la estructura de la cripta, la distribución de los distintos tipos celulares y la migración. En la figura superior se aprecia para las criptas del Intestino Delgado. En la figura inferior para las Criptas ubicadas en el Colon. En los esquemas queda claro la definición de 3 zonas. i) abajo en el fondo de la cripta se ubican las células madre (verde). ii) La segunda zona, inmediatamente encima de las células madre, es la zona de las células transitorias amplificadoras (o progenitoras) (azul). iii) La tercer zona en la cima de la cripta es donde emergen las células completamente diferenciadas (enterocitos, calciformes, etc).

emergente. Sin embargo, para conseguir enmarcar lo aquí expuesto, intentaremos realizar un resumen de los procesos más relevantes que intervienen en los destinos celulares.

Como ya señalamos las células madre de las criptas se mantienen en las bases de las mismas y se encuentran principalmente reguladas por los ligandos *Notch* y las proteínas *Wnt* (a su vez expresadas por células accesorias implicadas en la regulación de las células madre). Veamos un poco más precisamente como intervienen:

1.3.1. Notch

Inhibición Lateral: En la regulación por Notch, que tiene diversas funciones e intereses, el aspecto más relevante que nos interesa en este caso es la inhibición lateral [9]. Notch es una proteína transmembranal, siendo sus ligandos principales *Dll1* y *Dll4*. Cuando interactúa en *trans* con uno de sus ligandos (esto significa, con un ligando portado por la membrana de otra célula) Notch activa en su propia célula la expresión de los genes bajo su control [72]. Además, inhibe la expresión de sus ligandos en su propia célula: este es el mecanismo clave de la inhibición lateral.

Por lo tanto, una célula cuya vía de Notch se activa en *trans* expresará pocos ligandos de Notch. La vía de Notch de las células vecinas no se activará entonces, lo que aumenta la expresión de los ligandos de Notch en estas células. Una célula en la que la expresión de genes activados por la vía de Notch es fuerte y la expresión de ligandos de Notch es débil se dice que es *fuerte en Notch*. Se dice que una célula que expresa pocos genes activados por la vía de Notch y muchos ligandos de Notch es *débil en Notch*. Por lo tanto, habría una amplificación de las fluctuaciones iniciales en la expresión de Notch y sus ligandos, lo que conduce a un patrón de alternancia entre células *débiles en Notch* y *fuertes en Notch*.

Células implicadas en la inhibición lateral: En la cripta, esta interacción tiene lugar entre las células de Paneth o células Reg4+ (bajo en Notch) y las células madre (alto en Notch). La activación de genes bajo el control de la vía Notch impide la diferenciación de las células madre y por tanto permite su mantenimiento. La inhibición lateral también regula el intercambio entre progenitores secretores (Notch bajo) y absorbentes (Notch alto) [86] [9]. Los progenitores de absorción continúan dividiéndose, lo que explica por que están presentes en mayor número en el epitelio. (Ver Figura 1.4 (B)). En la Figura 1.4 se habla de *Intestinal Stem Cells* (ISC) que a su vez engloban a las *Stem Cells* de la Cripta Base Columnar (CBC) (vinculadas a la expresión de *Lgr5*) y las *Stem Cells* señaladas como *+4 cells*. En el presente trabajo sin embargo solo hablamos de ellas como células madre (SC) sin entrar en estas distinciones.

1.3.2. Wnt

Caracterización de proteínas Wnt: Las proteínas Wnt se encuentran involucradas en la constitución de los nichos de células madre en diferentes tejidos en mamíferos. Se trata de proteínas secretadas que actúan sobre las células cercanas en pequeños entornos y son

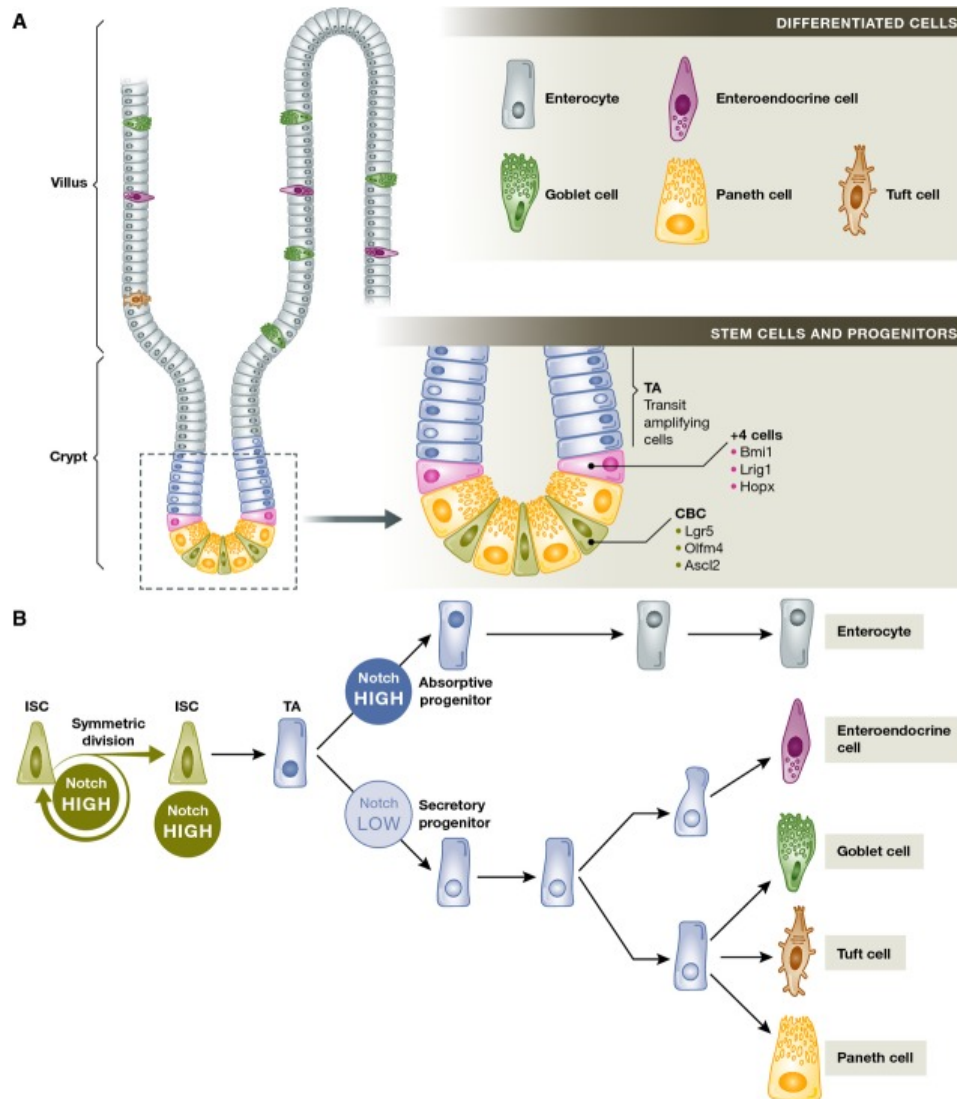


Figura 1.4: A) Diagrama esquemático de las diferentes poblaciones celulares en el epitelio del intestino delgado del ratón, semejante a los ya mostrados. En el intestino delgado de los mamíferos, una cripta y una vellosidad representan la unidad repetitiva fundamental. Las células madre son separadas en dos grupos, las señaladas como +4 y las CBC (por sus siglas en inglés *Cript Base Columnar*) generalmente vinculadas a la expresión *Lgr5*. Las células madre intestinales (CBC y células +4) y las células TAC (amplificadoras de tránsito) se ubican en la cripta, y las células diferenciadas (enterocitos, células caliciformes, enteroendocrinas, etc) se ubican a lo largo de la vellosidad. Las células de Paneth son un caso especial de células diferenciadas, ubicadas en la base de la cripta entre las células madre *Lgr5*.

(B) En este esquema se muestra el papel que juega la expresión del Notch en el linaje y la diferenciación. La señalización de Notch juega un papel crucial en la diferenciación de células madre intestinales y progenitoras. La señalización de Notch se dirige directamente a las células madre intestinales (ISC, por sus siglas en inglés) para mantener la proliferación y promover la supervivencia celular. Notch también actúa para promover la diferenciación al linaje de absorción, mientras que el estado bajo de Notch permite la diferenciación de las células secretoras. Este esquema fue extraído de la cita [72].

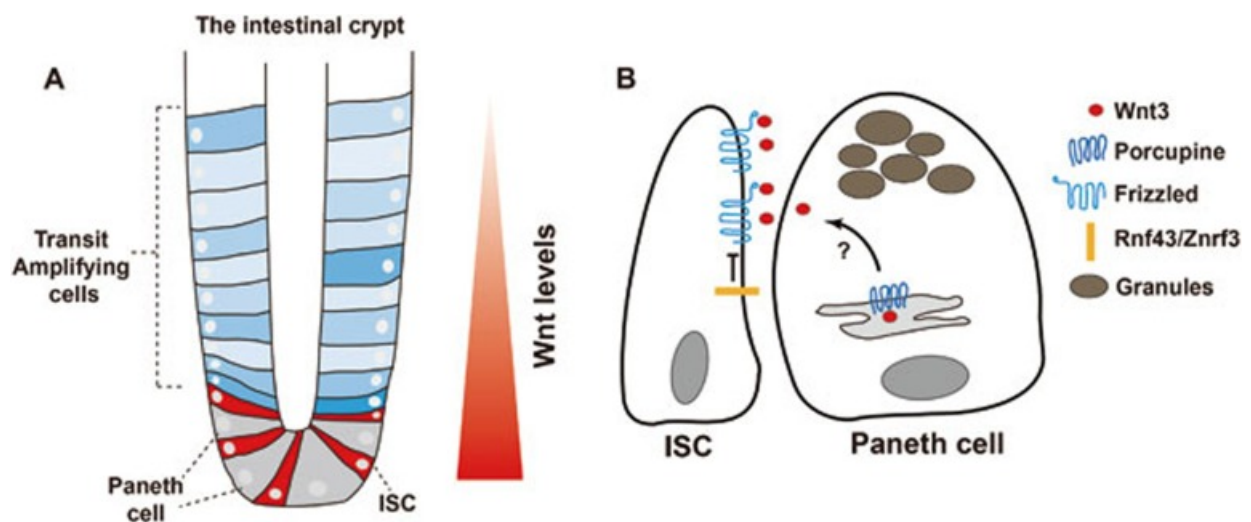


Figura 1.5: Vista esquemática de la cripta intestinal y la transferencia de Wnt desde las células de Paneth a las células madre intestinales (ISC). (A) Un gradiente de actividad de Wnt subdivide la cripta en una zona de células madre compuesta por ISC y células de Paneth en el fondo de la cripta y una zona de amplificación de tránsito compuesta por células progenitoras. (B) La secreción de Wnt en las células de Paneth depende en parte de Porcupine y, una vez liberados, los Wnt son capturados por los receptores Frizzled en los ISC. La rotación frizzled está mediada por Rnf43/Znrf3. Los mecanismos moleculares que subyacen a la secreción y transferencia de Wnt de las células de Paneth a las ISC siguen sin estar claros. Este esquema fue extraído de la cita [33].

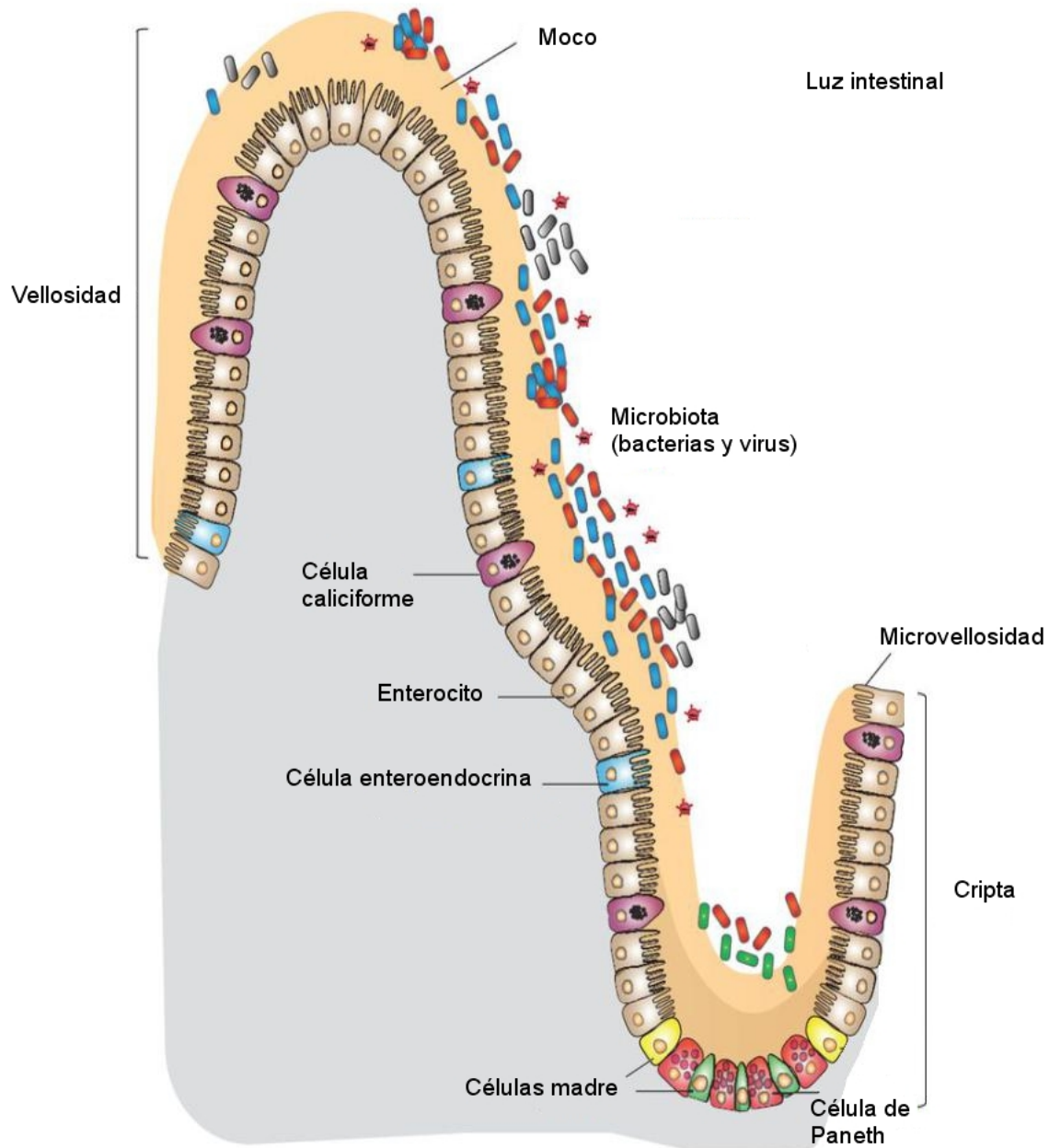


Figura 1.6: Perfil de las criptas. Vemos las células madre y Paneth en el fondo de la misma. En la parte superior de la cripta se aprecian las células diferenciadas (enterocito, calciforme y enteroendocrina). En el medio se encuentran las células transitorias. Se ve la emergencia de las vellosidades y las micro-vellosidades en las mismas células.

esenciales para la proliferación celular en la base de la cripta intestinal [26]. Se puede hacer una distinción entre, al menos, dos modos de acción: las vías canónica y no canónica. La llamada vía canónica es la que se activa en la homeostasis en las células Lgr5+ [20]. Mientras que la denominada vía no canónica se cree que es la principal responsable para regenerar el epitelio luego de una lesión [54].

Gradiente de Wnt a lo largo de la cripta: Diversos grupos han analizado el gradiente de Wnt3 en las criptas de los organoides del intestino delgado [25]. El Wnt3 secretado por las células de Paneth no se difunde en el medio sino que se transfiere (mediante un mecanismo no del todo comprendido hasta el momento) a las células adyacentes a la propia célula de Paneth, en proporción a la superficie de contacto. El Wnt3 en la membrana de una célula madre se transmite luego a las células hijas durante la división y su concentración disminuye gradualmente por dilución en la superficie de las células durante las sucesivas divisiones (también se degrada parcialmente). Diversos autores estiman una vida media de 24 hs para Wnt3 unido a la membrana. (Ver Figura: 1.5).

Resumiendo, los principales reguladores de la diferenciación en las criptas intestinales, Notch y Wnt, siguen los siguientes mecanismos:

- Notch principalmente participa en la inhibición lateral: las células *fuertes en Notch* (ej: células madre) inhiben las células vecinas *débiles en Notch* (ej: células Reg4+), lo que mantiene la distribución espacial de estos diferentes tipos de células en la cripta.
- En el caso del Wnt lo que se observa es que mediante un gradiente en su concentración a lo largo de la cripta se garantiza una regulación de la diferenciación desde la base hasta el borde superior de la misma.

Esto es un muy breve resumen de los mecanismos de interacción celular (Notch y Wnt en particular) que resultan notablemente ricos y complejos y si bien se comprenden parcialmente algunas de sus dinámicas aún se esta lejos de una comprensión plena. Por otro lado intervienen en un sinnúmero de procesos con sus diversas sutilezas.

Volvemos a subrayar que estos procesos de señalización no son objeto de estudio en el presente trabajo y solo se ha presentado este breve resumen de los mismos a efectos de completitud y puesta en contexto.

1.4. Dinámica de renovación de poblaciones

Dado que el foco principal del trabajo consiste en el análisis de la dinámica poblacional en la presente sección se expondrá un resumen de algunos de los conceptos clave acompañado de una breve contextualización histórica.

1.4.1. Homeostasis

El concepto de Homeostasis fue introducido en la biología por el fisiólogo francés Claude Bernard a en el siglo *XIX* quien lo describió como “la capacidad que tiene el cuerpo para mantener y regular las condiciones internas”. Este concepto fue retomado a principios del siglo *XX* por el fisiólogo estadounidense Walter Cannon quien hablo de la homeostasis como “La sabiduría del cuerpo”, más formalmente se definió como “El conjunto de procesos orgánicos que actúan para mantener el estado estacionario del organismo, dentro de su morfología y de sus condiciones internas, a pesar de las perturbaciones exteriores”.

Estas definiciones que se fueron modificando a lo largo del tiempo, surgieron a partir de la observación de variables o parámetros *macro* como la temperatura corporal, la presión arterial, el ritmo cardíaco, la glucosa en sangre, etc.

Una definición más general aceptada en la actualidad de la homeostasis es:

“La conjunción de procesos por los cuales un sistema se resiste a la degradación. Para esto se designan un conjunto de procesos regulatorios y correctivos que se oponen a tal degradación cuando esta comienza a producirse.”[10]

Tomemos por caso la temperatura corporal de un mamífero. La misma se ve sometida a un entorno exterior que podría llevarla a sufrir fluctuaciones (como ocurre con algunos animales coloquialmente llamados de sangre fría cuya temperatura se asemeja a la de su entorno inmediato). No solo por el medio-ambiente que lo rodea sino por diferentes ritmos de actividad física a los que se ve expuesto. Sin embargo existen mecanismos regulatorios notablemente eficientes como para procurar que la temperatura media del sujeto no se aleje de un intervalo aceptable (a modo de ejemplo, de 36,5° a 37° en un humano saludable). Más aún, cuando como reacción a un estímulo externo como puede ser una infección la temperatura corporal se eleva de ese promedio (la manifestación de fiebre) estos mecanismos de homeostasis procuran luego restablecer tales valores. En otras palabras la homeostasis implica mantener los valores de determinadas variables dentro de los límites vitales, más allá de los cuales se entra en lo que se calificaría como afección o dolencia.

Para que una acción compensatoria sea eficaz es necesario un “centro de control” que realice una respuesta compensatoria a una velocidad adecuada. Estos centros de control deben advertir los desequilibrios por medio de una red de comunicación con el entorno y decidir entonces una respuesta compensatoria adecuada para el restablecimiento de los valores adecuados de la variable biológica en cuestión.

De esta forma las características fundamentales de los procesos homeostáticos deben ser comprendidas en términos de sistemas regulados, que entenderemos como una estructura o conjunto de estructuras cuyo objetivo es mantener ciertas variables dentro de un rango de referencia.

Posteriormente, por analogía, el concepto de homeostasis se extendió a nivel celular donde las células y sus entornos en los diferentes órganos y tejidos se encuentran sometidos a constantes fluctuaciones ambientales que eventualmente los alejan de equilibrios y deben reaccionar con mecanismos que los compensen adecuadamente para retornar a los valores de

equilibrio.

Por caso cuando un tejido se ve dañado por un factor externo esto se traduce a nivel celular con la muerte de un conjunto de células que debe ser repuesto siendo el proceso homeostático el responsable de recomponer los valores previos a la lesión. De igual forma si un conjunto de células ve un crecimiento desmesurado el “centro de control” determinado deberá activar los mecanismos disponibles para frenar dicho crecimiento y eliminar el exceso de población celular.

En definitiva podemos decir que, a nivel celular, en tanto las células y demás actores realicen las actividades regulatorias, el organismo permanece en un *equilibrio dinámico* es decir en homeostasis. Si por el contrario las células no logran restablecer, en un lapso adecuado de tiempo, el equilibrio interno mediante la realización de acciones compensatorias adecuadas, aumentan las posibilidades de un gran desequilibrio que eventualmente podremos calificar de enfermedad.

En particular el mantenimiento del estado homeostático en lo que respecta a las poblaciones celulares, no es otra cosa que un equilibrio dinámico entre la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular, producido gracias a un intercambio continuo de señales entre los distintos tipos celulares y su ambiente o entorno.

1.4.2. Dinámica Evolutiva

En una dinámica evolutiva se plantea como dado un conjunto de poblaciones de distintas especies que interactúan entre sí y con un medio ambiente (estos pueden ser ecosistemas de grandes animales, pero también las poblaciones de bacterias, virus y/o células en un tejido cualquiera) se define un proceso de evolución como resultante de tres mecanismos fundamentales:

- Un mecanismo de replicación / reproducción que posibilite a los agentes reproducirse a si mismos.
- Un mecanismo de selección para que los *mejores* agentes se propaguen generación tras generación.
- Un mecanismo de mutación que permita el surgimiento de diversas variantes (en general pequeñas) de esos agentes.

Estos tres mecanismos fueron considerados los fundamentales desde la publicación de la obra de Darwin “*El Origen de las Especies*” [22]. Otro gran aporte a la obra de Darwin se agregó con lo realizado por Gregor Mendel en 1865, esto es *las Leyes de la herencia*. Pero fue ya entrado el siglo 20 en el que diversos matemáticos (algunos de ellos fueron Fisher, Malécot y Kimura) le dieron rigurosidad y sentaron las bases de una teoría que permitió no solo el mayor desarrollo de esta nueva rama de la ciencia sino trasladarla a diversas áreas. Más aún estas mismas ideas formuladas en principio para las diversas especies animales se pretendió

trasladarlas a diversas poblaciones interactuantes en dinámicas, en principio completamente distintas (escenarios sociales, económicos, lingüísticos, poblaciones de microbiomas o poblaciones celulares).

Sin embargo en la segunda mitad del siglo XX se reconoció la importancia de considerar un cuarto factor, ignorado hasta el momento, *La deriva genética*.

En todo proceso de replicación cuando las poblaciones son *pequeñas* toma relevancia el ruido implícito solo por cuestiones estadísticas. En general, en toda población finita surge un ruido debido al muestreo estadístico implícito en el proceso de replicación en juego. Ese ruido es lo que se conoce como deriva genética, y es en poblaciones reducidas donde su efecto toma mayor importancia.

Dos escenarios donde su trascendencia resulta evidente son:

- Efecto Cuello de Botella:

Esto se produce cuando en una población se produce una brusca reducción (sea por causas naturales o no, catástrofe ambiental, epidemias, guerra, abrupto cambio climático, etc) por motivos totalmente ajenos a la selección natural. Esta situación reduce drásticamente la variabilidad, ya que pueden desaparecer ciertos alelos y aumentar fuertemente la presencia de otros en la población. A modo de ejemplo en diversas especies de animales cuya población quedo drásticamente reducida producto de la caza indiscriminada, se aplicaron luego distintas políticas de protección y prohibición de su caza que permitieron su crecimiento y parcial recuperación poblacional. Dichas poblaciones terminan compartiendo una cantidad notable de genes homocigóticos.

- Efecto Fundador:

Si de una población original de tamaño N_0 se extrae una población pequeña ($n \ll N_0$) algunos alelos pueden quedar sobre-representados (aumentando así su frecuencia) y otros pueden quedar sub-representados o inclusive completamente ausentes. De esta forma, si esta población extraída y aislada de la original crece la misma tendría una composición genética completamente distinta del grupo originario.

Resumiendo, la deriva genética permitió poner de relieve la importancia del *ruido* en la dinámica evolutiva de pequeñas poblaciones, esto resulta particularmente crítico cuando las poblaciones atraviesan cuellos de botella evolutivos.

Más aún, se ha puesto en evidencia que la deriva genética toma un lugar relevante inclusive en situaciones normales y muchos autores le asignan a la evolución neutra, por deriva genética, ser la principal vía evolutiva en los organismos.

1.4.3. Teoría sintética de la evolución

El éxito de la teoría de Darwin a fines del siglo XIX llevó a la extensión de sus ideas fundamentales a otras ramas de la biología. Luego la interacción con otras ciencias como la

matemática y la física lograron darle una formulación más rigurosa a las ideas fundamentales de dicha teoría.

Cuando la teoría de la evolución fue formulada por Darwin la misma carecía de una explicación del proceso de herencia. Fue posteriormente que los avances en el campo de la genética posibilitaron explicar lo que la propia teoría de Darwin no había logrado justificar.

Es la combinación de los principios mendelianos con la teoría darwiniana la que da surgimiento a la *Genética de poblaciones*. Podríamos identificar como una de las contribuciones fundamentales de esta teoría el concepto de *población en conjunto*. Los organismos individuales dejan de ser considerados como eje principal de los procesos evolutivos; siendo ahora componentes de una población y como tales componentes *transitorios* de ese *conjunto*.

Lo que resulta importante para la genética de poblaciones es el de **conjunto de genes**, que resulta ser **la suma de todos los alelos de todos los genes de todos los individuos de la población**. Así se define el concepto de población.

Entonces la genética de poblaciones estudia el conjunto de genes, los cambios de su composición a lo largo del tiempo, y las causas que provocan dichos cambios. En esta nueva perspectiva cada individuo de una especie se puede ver como un portador de una muestra reducida del conjunto de genes. De esta forma en las poblaciones algunos alelos aumentan su frecuencia de generación en generación y otros la disminuyen. De esta forma la evolución, en el marco de esta teoría, resulta de los cambios acumulados en el conjunto de genes a lo largo del tiempo.

En dicho marco la eficacia de un *individuo* resulta de el número relativo de sus descendientes que sobreviven, o sea la cantidad de alelos de un genotipo presentes en las generaciones sucesivas.

La variabilidad y su importancia

Uno de los conceptos que resultan de vital importancia en la formulación de la teoría de evolución es la *variabilidad genética*. Por caso la variabilidad en una población de mamíferos de una especie dada se aprecia en los diferentes rasgos (cabello, color de piel, altura, contextura, ojos, etc) fácilmente apreciables a simple vista. No solo se presentan estas diferencias apreciables por una observación directa sino que existen también cientos, sino miles de diferencias fisiológicas y bioquímicas no tan evidentes (propensión o no a determinadas afecciones por ejemplo) que también son parte determinante del fenotipo de un individuo. A partir de su relevancia surge la necesidad de estudiar su naturaleza, esto es a que se debe y que factores la estimulan o por el contrario la atenúan y como interactúan entre si los diversos factores.

Más allá de la propia dinámica entre los diversos factores que empujan a un aumento y/o disminución de la variabilidad de una población en la historia surgieron dos corrientes o escuelas que procuraron explicar estos fenómenos.

Por un lado los **seleccionistas** que sostienen que toda variación afecta directa o indirectamente a la eficacia biológica, entendiendo por la misma el número de descendientes que un

individuo de una población deja en las generaciones futuras.

Por otro lado los **neutralistas** postulan que las variaciones observadas en las moléculas son pequeñas y por tanto no afectan la funcionalidad biológica y en consecuencia tampoco la selección natural se ve afectada. Por lo tanto, siempre según esta *escuela*, los alelos neutros se van acumulando como consecuencia de una serie de *procesos aleatorios* que incluyen las mutaciones.

1.4.4. Teoría neutralista

La conocida como teoría neutralista de evolución molecular surgió a fines de los 60's de la mano del genetista japonés Motoo Kimura. En esos años toda la cosmovisión de los procesos evolutivos (extrapolándolo a diversas escalas) se encontraba fuertemente dominada por variantes darwinistas. En 1967 realizó un trabajo donde combinó la información teórica proveniente de la genética de poblaciones con los datos moleculares; para dicho trabajo analizó las secuencias aminoacídicas de la hemoglobina y del *citocromo c* de varias especies de mamíferos. Observó que dentro de una misma población existía un elevado número de genes que presentaban polimorfismos (esto es una gran variedad de alelos diversos). A su vez, se encontró con que muchos de estos alelos no siempre originaban distintas proteínas aún siendo distintos en su secuencia de nucleótidos. Más aún, muchas de esas proteínas no diferían en su función a pesar de tener distintas estructuras primarias, como las denominadas isoenzimas. Los resultados obtenidos no eran del todo compatibles con algunos postulados de la teoría de la evolución por selección natural. Sobre la base de estos resultados Kimura publicó en 1968 "Evolutionary Rate at Molecular Level"[40] donde estableció los principios de la Teoría Neutralista de la Evolución. Sin embargo ante el malestar que provocó en una parte de la comunidad científica que veía en su trabajo un fuerte cuestionamiento a la Teoría de la evolución por selección natural de Darwin, Kimura sostuvo que ambas teorías no resultaban incompatibles "La teoría no niega el papel de la selección natural en la determinación del curso de la evolución adaptativa". Aún aclarando este último punto esta nueva teoría establecía que la mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular eran debidos fenómenos aleatorios frente a los atribuibles a la selección natural.

Las principales premisas de esta teoría son:

- La mayor parte de las mutaciones son deletéreas o carecen de efectos sobre el valor adaptativo (neutras). Las mutaciones deletéreas son rápidamente eliminadas por selección natural y por lo tanto carecen de una contribución significativamente al cambio evolutivo. Contrariamente los alelos neutros, varían su frecuencia aleatoriamente hasta su fijación o desaparición en el transcurso de las generaciones por efecto de la deriva genética.
- El polimorfismo resulta ser una etapa transitoria entre la fijación de variantes neutras a lo largo de la evolución de las especies. Bajo este modelo de Kimura de evolución

neutral, los polimorfismos no son adaptativos ni se mantienen a través de la selección de procesos determinísticos como la selección equilibradora.

- El nivel de polimorfismo es una función del tamaño efectivo poblacional y de la tasa de mutación neutra.

Hasta ese entonces, la teoría sintética (“neodarwinista”) sostenía que solo aquellas mutaciones que implicasen un valor adaptativo favorable serían susceptibles de fijarse genéticamente en una población. Dicho en otras palabras, solo se conservarían aquellos alelos que produjesen algún cambio en el fenotipo que redundase en un beneficio adaptativo.

Estas ideas, arraigadas hasta esos tiempos, fueron cuestionadas por la teoría neutralista que postularon que podían existir mutaciones que se difundieran en una población sin ventaja selectiva alguna. Yendo aún más lejos, Kimura postuló que el azar jugaba un papel más relevante. De esta forma se sostenía que “*Los cambios por la deriva genética serían tanto o más importantes que los debidos a la selección natural*”.

Los neutralistas pusieron en cuestión que determinadas características complejas puedan devenir de una sucesiva acumulación de mutaciones adaptativas. En cambio consideran que una eventual característica de ese tipo podría surgir luego de una acumulación de mutaciones neutras que posteriormente, combinándose con mutaciones de valor adaptativo favorable, fijen dicha característica que resulte finalmente con algún valor adaptativo.

Podríamos resumir que el principal aporte de Kimura consiste en observar que, a nivel genético molecular, cuando por ejemplo se imponen una secuencia de nucleótidos por sobre otros esto es debido más a una cuestión aleatoria (neutral) que a cuestiones *adaptativas*. En otras palabras la neutralidad parece ser lo más relevante, al menos a nivel molecular (aunque luego también se planteó su importancia en otras *escalas*). Las consecuencias de esto son profundas y en su momento empujaron al surgimiento de conceptos como el de los *paisajes adaptativos* [31].

Hoy en día, si bien ya se ha aceptado el papel relevante de la teoría neutralista, continúa la disputa entre los seleccionistas y neutralistas sobre la ponderación que se le asignan a cada una de las dinámicas en los procesos evolutivos.

Todo esto rompió con la idea predominante en aquellos años de que la evolución, en todas sus escalas, se debía casi exclusivamente a la selección natural.

1.4.5. Monoclonalidad

La monoclonalidad como concepto biológico se traduce en que un conjunto poblacional determinado es descendiente de un único progenitor. Más precisamente la monoclonalidad celular, como concepto, describe una línea celular proveniente de un único progenitor (de una única célula progenitora). Esto tiene interés en sí mismo para diversos desarrollos (por caso de la industria farmacéutica). Las formas de acceder a esta monoclonalidad son diversas siendo la más obvia el proceso de aislar una única célula progenitora de forma tal de garantizar su descendencia exclusiva. Sin embargo resulta particularmente interesante plantear la situación

donde entre una multitud de células progenitoras una se imponga por sobre todas las otras. Esta es una de las situaciones que analizamos en el presente trabajo.

Aquí, intentaremos explicar de la forma más sencilla y clara posible, porque la monoclonalidad es intrínseca a la dinámica de renovación celular que analizamos.

Una formulación de esta dinámica de renovación puede ser representada mediante un experimento lúdico. Podríamos partir de una situación con N células distinguibles, a los que denominaremos clones (o sea tenemos N clones distintos inicialmente). Si ninguna de estas células posee ventaja o desventaja alguna sobre las otras diremos que esta dinámica es neutral. Ahora podemos imaginar el proceso en el que una de ellas se elimina (en principio por un sorteo) mientras que otra suma un nuevo elemento a su población. Por lo tanto la cantidad de clones originales ira decreciendo a medida que se repita el proceso. Luego de un número de pasos lo suficientemente grande (dependiendo del número de clones originales) toda la población sera descendiente de un único clon de los N originales.

En definitiva esto lo podemos interpretar como un “juego”, que captura la esencia de un dinámica celular, en el que, partiendo de un estado con N clones distintos, todas las células participantes luego de un número de pasos suficientemente grande terminan siendo descendientes de una y solo una de las originales.

1.5. Objetivos y organización de la Tesis

La presente tesis analiza la dinámica de renovación de sistemas en estado homeostático. Para eso, por cuestiones previamente señaladas comenzamos analizando la renovación de las criptas colónicas del tejido intestinal. Sin embargo el trabajo va más allá del caso particular a un estudio de dinámicas de renovación más generales y algunas propiedades subyacentes en este tipo de procesos.

En el capítulo 2 **Métodos** se exponen lo más resumidamente posible los modelos matemáticos sobre los que se apoya la modelización y se realiza una breve disertación de sus alcances y la combinación de los mismos.

Ya en el capítulo 3 de **Renovación de las criptas** exponemos el estudio y diversos resultados sobre la renovación celular en las criptas intestinales. Estos resultados son contrastados con resultados experimentales de diversos autores citados en el trabajo. Entre otras cosas se muestra como el estado monoclonal al que se accede en las criptas intestinales según los diversos resultados experimentales es algo subyacente en la propia dinámica de renovación independientemente de otras cuestiones biológicas.

En el capítulo 4 **Mutaciones y ruptura de neutralidad** se va un paso más allá y estudiamos como se ve modificada la dinámica ante una mutación en alguna de las células madre que modifique uno o más de los *parámetros* que la caracterizan diferenciándola del resto de células madre (lo que vemos como una ruptura de la neutralidad original). Aquí emergen una serie de resultados sobre la posible variación de la dinámica de renovación (en este caso de las criptas intestinales) resultando algunos de estos resultados particularmente anti-intuitivos. El

principal de estos consiste en el hallazgo de que aquellas células con un mayor ciclo celular (esto es, más lentas en el proceso de renovación) resultan tener mayores chances de fijarse.

En el capítulo 5 **Renovación y extensión de los ciclos celulares** profundizamos el estudio de la ralentización en los procesos de renovación estudiando modelos más generales y analizando que tan básico resulta este fenómeno emergente en diversos procesos de renovación.

Finalmente en el capítulo 6 exponemos las **Conclusiones**, sintetizamos los aportes del trabajo, se discuten las líneas abiertas en la dinámica de procesos de renovación y se plantean posibles líneas de investigación a seguir.

Capítulo 2

Modelos y métodos

2.1. Modelos

Como ya señalamos en la introducción el trabajo consistió en el estudio y modelado de la dinámica poblacional de un tejido, centrándonos en un principio en las criptas de Liberkühn localizadas en el epitelio intestinal.

Para eso se procedió a construir un modelo compartimental que capture la dinámica de los distintos tipos celulares (células madre, transitorias, diferenciadas, etc) representados en los distintos compartimentos y a partir del mismo se construyó un sistema de ecuaciones diferenciales asociado. Por modelo compartimental entendemos lo que en rigor es una técnica para simplificar la modelización matemática, asignando a cada agente (variable) que interviene en la dinámica un compartimento y esquematizando en forma elemental la interacción entre los distintos agentes (variables). Suele asignarse su origen a un trabajo de Kermack y McKendrick sobre epidemiología a comienzos de 1927 [38] (aunque probablemente esta técnica haya sido previamente utilizada). Luego la dinámica se puede traducir a ecuaciones diferenciales, estocásticas, grafos, etc según amerite el tratamiento del problema.

2.2. Breve disertación sobre modelos determinísticos y aleatorios

Entendemos por modelo determinístico a todo aquel que se encuentra regido por leyes tales que sometido a unas dadas condiciones (por ejemplo condiciones iniciales) evoluciona de idéntica forma siempre. Típicamente estas leyes son formuladas como un conjunto de ecuaciones diferenciales cuya solución representa la evolución de aquella magnitud con la que se trabaja. En nuestro caso estas magnitudes serán las poblaciones de cada compartimento. El principal atributo de los modelos determinísticos formulados a partir de ecuaciones diferenciales es la cantidad de herramientas disponibles para su resolución, a veces analíticamente

y mayoritariamente en forma numérica. Pero no solo eso, sino que también es relativamente sencillo la construcción e interpretación de las ecuaciones, esto es interpretar física y/o biológicamente los términos que la componen. Estos son los principales motivos para la utilización de estas formulaciones aún en problemas que en principio serían no de naturaleza determinística sino estocástica. Hay problemas que podemos encuadrar como de naturaleza determinística. Estos problemas los podemos caracterizar como aquellos tales que definidas un conjunto de condiciones iniciales y/o de contorno tienen su evolución perfectamente definida.

Los problemas puramente estocásticos son aquellos cuya evolución es exclusivamente aleatoria.

Resulta válido también definir un tercer tipo de problemas a los que podemos caracterizar como aquellos que evolucionan estocásticamente aunque sus valores medios siguen alguna evolución determinista.

2.2.1. Modelos determinísticos

Para el estudio de una población y su evolución en el tiempo podemos caracterizar a la misma mediante un vector $\vec{X}(t) \in \mathbb{R}^n$ donde $1 \leq i \leq n$ define cada tipo poblacional por algún criterio establecido según el problema abordado (tipo celular, edad, tamaño, etc). En tales condiciones los valores reales de $X_i(t)$ representarían el valor medio de la población de tipo i a tiempo t . Sobre el conjunto de todas las poblaciones podemos suponer que las mismas evolucionan e interactúan entre si gobernadas por una función vectorial $\vec{F}(\vec{X}(t), t)$. De esta forma la evolución quedara determinada por:

$$\frac{d\vec{X}(t)}{dt} = \vec{F}(\vec{X}(t), t) \quad (2.1)$$

o formulado de otra forma, para intervalos de tiempo Δt suficientemente pequeños vale:

$$\vec{X}(t + \Delta t) \approx \vec{X}(t) + \vec{F}(\vec{X}(t), t)\Delta t \quad (2.2)$$

siendo esta segunda formulación 2.2 más adecuada si se desea discretizar el proceso. La función vectorial $\vec{F}(\vec{X}(t), t)$ que gobierna la evolución poblacional debe representar la interacción entre las diversas poblaciones entre si y con un medio-ambiente determinado. Para expresar más claramente la dependencia de la evolución con el medio-ambiente se puede reescribir la expresión 2.1 como:

$$\frac{d\vec{X}(t)}{dt} = \vec{F}(\vec{X}(t), \Phi(t)) \quad (2.3)$$

donde $\Phi(t)$ describe el medio-ambiente con el que interactúan las poblaciones (por ejemplo: humedad, temperatura, etc). Si pensamos a \vec{F} como un balance definido por un flujo poblacional entrante y uno saliente será válido reescribir la expresión 2.3 como:

$$\frac{d\vec{X}(t)}{dt} = [\mathbb{W}(\vec{X}(t), \Phi(t)) - \mathbb{U}(\vec{X}(t), \Phi(t))] \vec{X}(t) \quad (2.4)$$

Donde la matriz \mathbb{W} esta asociada al flujo entrante poblacional (nacimientos, migraciones, infecciones, etc) mientras que \mathbb{U} se vincula al flujo saliente (muertes, emigraciones, etc).

2.2.2. Procesos estocásticos

Consideremos un conjunto de estados en los cuales puede encontrarse un sistema, de forma tal que dicho sistema puede *evolucionar* de un estado a otro de acuerdo a una cierta *ley de movimiento*. Llamemos $X(t)$ el estado del sistema a tiempo t . Si dicha evolución esta gobernada, por ejemplo, por una función o la solución de un conjunto de ecuaciones diferenciales estaremos ante una evolución determinista. Si se considera que lo que define el valor de $X(t)$ a tiempo t es algún mecanismo azaroso estaremos ante un proceso estocástico. Las variables aleatorias que conforman el proceso estocástico no necesariamente son independientes entre sí, sino que pueden estar vinculadas entre sí por alguna *ley de evolución*, solo que tal *ley* asigna probabilidades a las transiciones entre distintos estados. Todas estas diversas formas en que pueden darse estas dependencias y/o vínculos son las que distinguen a los muy diversos procesos estocásticos [70].

Definición: *Un proceso estocástico es una colección de variables aleatorias $\{X_t : t \in T\}$ parametrizada por un conjunto T , llamado espacio parametral, en donde las variables toman valores en un conjunto S llamado espacio de estados.*

En el caso particular de un modelo estocástico referido a una dinámica poblacional, uno puede realizar una formulación estocástica para modelar la dinámica de una población de alguna forma equivalente a la formulación determinista dada por 2.4. Para esto, sea $\vec{X}(t)$ un vector del estado poblacional en el instante t y \vec{z} un vector de elementos enteros ($z_i \geq 0 \forall i$) de igual dimensión que $\vec{X}(t)$ y definimos $p(t, \vec{z})$ como la probabilidad de que $\vec{X}(t) = \vec{z}$. Si uno ahora plantea el hecho de que un individuo cualquiera de la población solo puede optar por tres eventos posibles: un nacimiento (determinado por \mathbb{W}), una muerte (determinado por \mathbb{U}) o que no se produzca ninguno de dichos eventos (o sea el complementario de ambos), se deriva una ecuación de $p(t, \vec{z})$. Así considerando la función generatriz $g(t, X_1, \dots, X_m)$ del proceso estocástico $\vec{X}(t)$ definida como [5]:

$$g(t, X_1, \dots, X_m) = \sum_{z_1 \dots z_m} p(t, z_1, \dots, z_m) X_1^{z_1}, \dots, X_m^{z_m} \quad (2.5)$$

que satisface:

$$\frac{\partial}{\partial t} g(t, X_1, \dots, X_m) = \sum_{i,j} [\mathbb{W}_{i,j}(\Phi(t)) X_j - \mathbb{U}_{i,j}(\Phi(t))] (X_i - 1) \frac{\partial}{\partial X_j} g(t, X_1, \dots, X_m) \quad (2.6)$$

Se puede demostrar que esto implica [5]:

$$\frac{d}{dt}\mathbb{E}(\vec{X}(t)) = [\mathbb{W}(\Phi(t)) - \mathbb{U}(\Phi(t))]\mathbb{E}(\vec{X}(t)) \quad (2.7)$$

donde \mathbb{E} denota la esperanza matemática. Se puede apreciar que la expresión 2.7 resulta equivalente a 2.4.

2.3. Cadenas de Markov

Fue el matemático ruso Andrey Markov en 1905 quién formulo el modelo de cadenas que llevan su nombre. Su intención fue la de crear un modelo probabilístico que permitiera analizar la frecuencia con la que aparecen las vocales en poemas y textos literarios. Este modelo tuvo una rápida difusión y *éxito* en el ambiente académico en una gran variedad de áreas tan diversas como física, economía, biología y sociales. La potencia del modelo que posibilitó esto puede asignarse principalmente a su capacidad de poder describir y analizar cuestiones intrincadas de complejos sistemas con una matemática relativamente sencilla, fundamentada en el Álgebra Lineal.

2.3.1. Definición y algunas propiedades de Markov

Vamos a considerar un proceso estocástico a tiempo discreto $\{X_n : n \geq 0\}$ llamemos a la probabilidad $P(X_n = x_n) = p(x_n)$ entonces definida esta notación la probabilidad condicional sera: $P(X_{n+1} = x_{n+1}|X_n = x_n) = p(x_{n+1}|x_n)$. Definida esta notación pasamos a dar la definición:

Definición: *LLamamos cadena de Markov a un proceso estocástico a tiempo discreto $\{X_n : n \geq 0\}$, con espacio de estados discreto, si satisface, $\forall n \geq 0$ y para cualesquiera estados x_0, x_1, \dots, x_{n+1} , la siguiente condición:*

$$p(x_{n+1}|x_0, x_1, \dots, x_n) = p(x_{n+1}|x_n). \quad (2.8)$$

Traducido a lenguaje coloquial, si al tiempo $n + 1$ lo consideramos como futuro, n el presente y $0, 1, \dots, n - 1$ el pasado, entonces 2.8 nos dice que la distribución de probabilidades en el futuro inmediato ($n + 1$) solo depende del estado presente a tiempo (n), siendo completamente independiente de la *historia previa a tiempos* $0, 1, \dots, n - 1$. Otra forma de enunciarlo es que los procesos de Markov tienen solo memoria inmediata.

Se puede demostrar que la condición (2.8) es equivalente a poder formular la distribución conjunta de variables X_0, X_1, \dots, X_n de la siguiente forma [18, 70]:

$$p(x_0, x_1, \dots, x_n) = p(x_0) \ p(x_1|x_0) \ \dots \ p(x_n|x_{n-1}). \quad (2.9)$$

2.3.2. Probabilidades de transición

Planteemos una cadena de Markov. Dada la misma tomemos dos estados i y j cualesquiera de esta cadena, entonces la probabilidad de transición del estado i a tiempo n al estado j a tiempo $n + 1$ estará dado por:

$$P(X_{n+1} = j | X_n = i) = p_{ij}(n, n + 1). \quad (2.10)$$

Cuando tenemos que $p_{ij}(n, n + 1)$ es independiente de n se dice que la cadena es estacionaria u homogénea temporalmente. En ese caso nos queda $p_{ij}(n, n + 1) = p_{ij}$ que describe la probabilidad de transición del estado i al estado j . Por lo tanto, si tenemos un número finito de estados pongamos $(N + 1)$ siendo estos $\{0, 1, \dots, N\}$ entonces $\{p_{ij}\} \quad \forall 0 \leq i, j \leq N$ determina la matriz de transición en un paso. La forma explícita de la matriz de de transición sera:

$$\mathbb{P} = \begin{bmatrix} p_{00} & p_{01} & p_{02} & \dots \\ p_{10} & p_{11} & p_{12} & \dots \\ p_{20} & p_{21} & p_{22} & \dots \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \end{bmatrix}. \quad (2.11)$$

Las propiedades que definen a estas matrices, esto es que capturan la condición (2.8) que definen a estos procesos estocásticos son:

Proposición: La matriz de probabilidades de transición $\mathbb{P} = \{p_{ij}\}$ cumple las siguientes propiedades:

- i) $0 \leq p_{ij} \leq 1 \quad \forall i \quad \text{y} \quad \forall j$
- ii) $\sum_j p_{ij} = 1 \quad \forall i$

Demostración: La primer condición es trivial por tratarse de probabilidades. La segunda condición nos dice que cualquiera sea el estado en el que nos encontremos, necesariamente transitaremos a algún otro en el paso siguiente (admitiendo también la probabilidad de autotransición). Esto se traduce en que la suma de todas las columnas de la matriz es necesariamente igual a 1. Efectivamente si comenzamos planteando la descomposición disjunta del universo de estados posibles:

$$\Omega = \bigcup_j (X_1 = j). \quad (2.12)$$

Por lo tanto nos queda que cualesquiera sean los estados i y j vale:

$$\begin{aligned}
P\left(\bigcup_j (X_1 = j) | X_0 = i\right) &= 1 \quad y, \\
P\left(\bigcup_j (X_1 = j) | X_0 = i\right) &= \sum_j P(X_1 = j | X_0 = i) = \sum_j p_{ij} \\
\therefore \sum_j p_{ij} &= 1 \tag{2.13}
\end{aligned}$$

2.4. Modelo compartimental para criptas intestinales

Para estudiar la dinámica poblacional de las criptas propusimos un modelo con ocho compartimentos. Uno de ellos corresponde a células madre (SC), los seis siguientes a cada generación de las células amplificadoras transitorias (TAC_{*i*}, *i* = 1 ... 6) y la última, a células totalmente diferenciadas (DC). El grado *especificidad* de las células transitorias se incrementa en cada generación definiéndose como un gradiente de especificidad de las células desde el fondo de las criptas donde se ubican las células madre hasta el *borde* de las mismas donde emergen las células diferenciadas con sus funciones definidas. En principio, podría suponerse, que la inclusión de cada generación de TAC en un compartimento diferente es algo superfluo o innecesario, sin embargo debe incluirse ya que se ajusta a los datos experimentales y al proceso natural de renovación de las criptas que se pretende representar [63]. Si bien el estado de cada TAC es transitorio, sus divisiones, dan lugar a dos células diferentes de ellos (aumentando el número de células implicadas en el proceso de diferenciación). De esta forma las TAC, como lo sugiere su *etiqueta* son las responsables de amplificar el proceso, y en consecuencia definen la velocidad de renovación del ciclo en su conjunto.

Para el estudio de una dinámica poblacional en forma compartimental primero uno debe comenzar por asignar un compartimento a cada tipo de población (de acuerdo a algún criterio determinado por cada problema en particular). Luego uno debe analizar como los diversos procesos alimentan, drenan o dejan invariante cada uno de los compartimentos. Finalmente se construye el sistema de ecuaciones diferenciales que vincula los diversos compartimentos (en este caso los diversos tipos poblacionales) y analiza la dinámica que emerge de dicho sistema.

La duración del ciclo celular de las transitorias (en el promedio de las 6 generaciones) es de alrededor de 10h-12h, esto es aproximadamente la mitad que el de las células madre (24h). La adición de dos generaciones en el mismo compartimento podría conducir a la existencia de criptas incluso cuando los SC se hubieran extinguido.

El número de células madre (*S*) se puede incrementar mediante divisiones simétricas SC-SC ($S \rightarrow S - S$) con una tasa de $M_{S,S}$, o por medio de un proceso de reprogramación celular (Plasticidad) de una célula transitoria de 1^{era} generación TAC₁ ($T_1 \rightarrow S - T_1$) a una tasa *P*. Los procesos que disminuyen la población de células madre (*S*) son: las divisiones simétricas

de SC en TAC_1 - TAC_1 ($S \rightarrow T_1 - T_1$) a una tasa M_{T_1, T_1} y por los procesos de apoptosis con una tasa A_S . La ecuación que describe este procesos es:

$$\frac{dS}{dt} = M_{S,S}S - M_{T_1, T_1}S - A_S S + PT_1, \quad (2.14)$$

Por otro lado el número de células transitorias de primera generación (T_1) se incrementa debido a las divisiones simétricas TAC_1 - TAC_1 ($S \rightarrow T_1 - T_1$) de células madre a una tasa M_{T_1, T_1} como señalamos previamente, y también podrían contribuir eventuales divisiones asimétricas de células madre ($S \rightarrow S - T_1$) a una tasa dada por M_{S, T_1} . El decrecimiento de T_1 resulta debido a las divisiones simétricas ($T_1 \rightarrow T_2 - T_2$) a una tasa de L_{T_1} y a la propia apoptosis a una tasa A_{T_1} . En definitiva la ecuación que gobierna el flujo poblacional en este compartimento resulta ser:

$$\frac{dT_1}{dt} = 2M_{T_1, T_1}S + M_{S, T_1}S - L_{T_1}T_1 - A_{T_1}T_1. \quad (2.15)$$

Estos dos compartimentos (S y T_1) son los fundamentales para, de alguna forma, regular el comportamiento de la cripta. En la Figura 2.1 puede verse claramente que estos dos compartimentos son los responsables de *alimentar* a todo el resto pudiendo desacoplarse para simplificar el análisis. En forma análoga se pueden construir las ecuaciones que gobiernan el resto de los compartimentos determinados por aquellos procesos que los alimentan o los drenan a cada uno de ellos. El modelo completo con los ocho compartimentos se presenta en el Cap. 3.

El sistema formado por el conjunto de compartimentos deberá tener una solución estacionaria asociada al estado homeostático. Pero estas soluciones deben ser estables en más de un sentido. El modelo debe garantizar no solo una estabilidad estructural, esto es frente a las fluctuaciones de los parámetros [53] sino que debe ser estable también frente al ruido propio, es decir frente a las fluctuaciones propias de las variables. Este último punto ha sido en prácticamente todos los modelos existentes hasta el momento desatendido. Esto resulta trascendente ya que un modelo que solo garantiza la estabilidad estructural y no así una frente al ruido propio, podría estar dando soluciones que en rigor ante la más mínima fluctuación poblacional extinga la cripta, resultando ser por tanto un modelo inviable. Es por eso que procuramos que las tasas de división, apoptosis, etc, garanticen ambos tipos de estabilidad.

Los procesos involucrados que garantizan ambas estabilidades, deben ser regulados / autoregulados por un sistema de control (feedback) dependiente de las poblaciones. Dicha regulación se introduce expresando las tasas mediante las llamadas funciones de Hill (ver sec. 2.7). En nuestro caso las expresiones son:

$$M_{S,S}(S, T_1) = \frac{K_{S,S}S_o^n}{(S_o^n + S^n)} \frac{T_1^n}{(T_o1^n + T_1^n)}, \quad (2.16)$$

$$M_{T_1, T_1}(S, T_1) = \frac{K_{T_1, T_1}S^n}{(S_o^n + S^n)} \frac{T_o1^n}{(T_o^n + T_1^n)}, \quad (2.17)$$

$$A_S(S) = \frac{\lambda S^n}{(S_o^n + S^n)}, \quad (2.18)$$

$$P(S) = \frac{\beta S_o^n}{(S_o^n + S^n)}, \quad (2.19)$$

$$M_{S,T_1} = K_{S,T_1}, \quad (2.20)$$

$$L_{T_1}(T_1) = \frac{\beta' T_1^n}{(T_{o1}^n + T_1^n)}, \quad (2.21)$$

$$A_{T_1}(T_1) = \frac{\lambda' T_1^n}{(T_{o1}^n + T_1^n)}. \quad (2.22)$$

Aquí $K_{S,S}$, K_{T_1,T_1} , K_{S,T_1} , S_o , T_{o1} , λ , λ' , β , β' , n son parámetros a determinar, de forma tal de resultar compatibles con los valores experimentales del estacionario y las tasas de divisiones celulares medidas en el estacionario.

En la figura 2.1 podemos ver el esquema del modelo compartimental que se analizará en el presente trabajo.

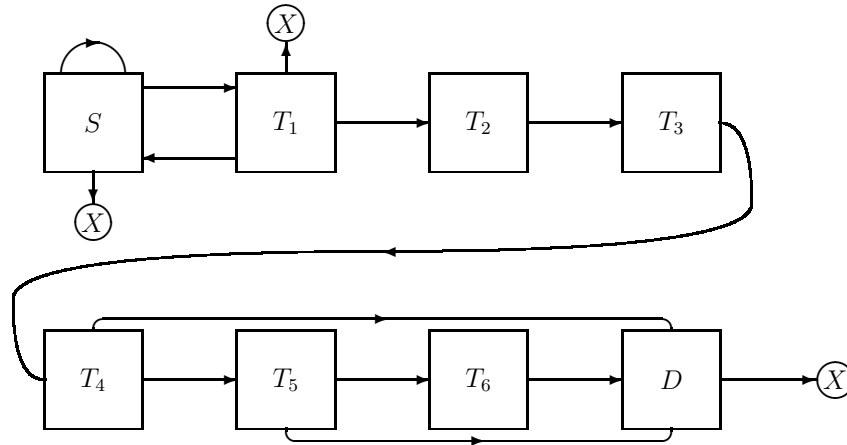


Figura 2.1: Diagrama de Compartimentos: Este es el diagrama de compartimentos del modelo que se aplicará en este trabajo a la dinámica de renovación de las criptas. Las flechas señalan las transiciones posibles entre compartimentos. El compartimento etiquetado como S corresponde a las células madre de la cripta (SC). Los compartimentos T_i corresponden a las diferentes generaciones ($1 \leq i \leq 6$) de células transitorias amplificadoras (TAC) cada vez más diferenciadas a medida que la generación se incrementa. El compartimento etiquetado como D corresponde al conjunto de células completamente diferenciadas (en sus diversas variantes). La X señala la muerte celular. Esta es debido a la apoptosis (muerte celular programada). En el diagrama se aprecia que los dos primeros compartimentos (S y T_1) son los responsables de *alimentar* a todo el resto pudiendo ser desacoplados del mismo. Por este motivo su dinámica es la principal y más relevante.

Hasta aquí el modelo compartimental se represento la dinámica de las diversas poblaciones y sus interacciones mediante ecuaciones diferenciales. Sin embargo debido al tamaño de las poblaciones y la propia naturaleza del proceso, resulta al menos incompleto modelar o representar el proceso solo mediante ecuaciones diferenciales ya que se ignoraría el ruido propio de esta dinámica.

Por este motivo se procedió a crear este protocolo consistente en dejar evolucionar estos procesos de forma estocástica un número suficientemente grande de veces y luego de asegurar que el ruido propio solo fluctúa alrededor de un valor medio (y no lleva a una extinción de las poblaciones y/o a un crecimiento fuera de control de las mismas) tomamos como representativos los resultados dados por la evolución del sistema ODES, que coinciden con la media alrededor de la cual fluctúan los procesos estocásticos. De esta forma, la aplicación de este protocolo nos permite retornar a las ecuaciones diferenciales asociadas y analizar el comportamiento, por ejemplo de los puntos fijos viendo si los mismos cambian o resultan invariantes (esto sería el caso si el conjunto de las ecuaciones diferenciales que los definen solo son multiplicadas por un factor constante) o si se producen bifurcaciones en el sistema.

Otro de los motivos que lleva al planteo estocástico del problema es que el fenómeno del transito a la monoclonalidad que se alcanza en el régimen estocástico es, por su propia naturaleza un fenómeno discreto y puramente estocástico, imposible de representar si nos restringimos solo a las ecuaciones diferenciales ordinarias.

2.5. Modelo estocástico asociado

En esta sección mostramos como construir el modelo estocástico asociado a las ecuaciones diferenciales y su resolución mediante un algoritmo basado en el método de Gillespie [32]. Como señalamos previamente son los dos primeros compartimentos (S y T_1) los que resultan ser los fundamentales para determinar el comportamiento de la cripta.

$$\frac{dS}{dt} = M_{S,S}S - M_{T_1,T_1}S - A_S S + PT_1, \quad (2.23)$$

$$\frac{dT_1}{dt} = 2M_{T_1,T_1}S + M_{S,T_1}S - L_{T_1}T_1 - A_{T_1}T_1 \quad (2.24)$$

Las ecuaciones diferenciales muestran los valores medios de los procesos, pero no reflejan que procesos como el representado resultan ser esencialmente estocásticos. Esto en muchos procesos puede ser válido y representativo, pero en un caso como este, debido a los tamaños de las poblaciones representadas puede terminar siendo un error fatal.

Procedemos entonces a construir un proceso estocástico que emerge a partir de estas ecuaciones diferenciales y permita analizar el comportamiento de las poblaciones celulares ante el ruido propio del sistema. Llamamos $S(t)$ y $T_1(t)$ al número de células madre y de transitorias de primer generación respectivamente en el instante t . Aquí introducimos la probabilidad condicional de que la célula j (las células son distinguibles, lo que nos permite etiquetarlas)

participe en un proceso dado que el mismo ocurre. Por ejemplo dado que se produce una división simétrica (SC-SC) la probabilidad de que la misma se produzca en la célula j estará dada por:

$$P_S(j/(\text{SC-SC})) = \frac{1}{S(t)}, \quad (2.25)$$

dado que suponemos a todas las células distinguibles pero con igual aptitud en lo que respecta a los procesos involucrados en el modelo. Lo mismo vale para cualquier otro proceso que involucre la participación de una célula madre (S) (sea una división simétrica $\text{TAC}_1\text{-TAC}_1$ o una apoptosis).

Análogamente sucederá en aquellos procesos que involucren las TAC_1 . Por ejemplo:

$$P_{T_1}(j/(\text{Plast.})) = \frac{1}{T_1(t)}, \quad (2.26)$$

representa la probabilidad de que dado un proceso de plasticidad el mismo se produzca en la célula j . Entonces, dadas ciertas condiciones iniciales, queremos determinar como evolucionarán las poblaciones en el tiempo. A tiempo t , las poblaciones totales $S(t)$ y $T_1(t)$ pueden ser escritas como:

$$\begin{aligned} S(t) &= \sum_i s_i(t), \\ T_1(t) &= \sum_i t_i(t); \end{aligned} \quad (2.27)$$

donde $s_i(t)$ y $t_i(t)$ son las células madre (SC) y las transitorias de primera generación (TAC_1) respectivamente presentes a tiempo t las cuales son descendientes de la i -ésima célula madre original (o lo que es lo mismo el i -ésimo clon). Entonces el i -ésimo clon tiene $s_i(t)$ SCs y $t_i(t)$ TAC_1 s a tiempo t .

Ahora las probabilidades condicionales de que el clon i -ésimo participe en un proceso, dado que el mismo ocurre (por ejemplo una división SC-SC de una célula madre o un proceso de plasticidad en una transitoria T_1) estarán dadas por:

$$\begin{aligned}
P_S(i\text{-th clon}/(\text{SC-SC})) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
P_S(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
P_S(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Plast.})) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}.
\end{aligned} \tag{2.28}$$

siendo expresiones análogas a estas válidas para cualquiera de los procesos que involucren a cada tipo de célula.

2.5.1. Introducción de las mutaciones

Recordemos que todos los clones son distinguibles y por ende a cada uno lo podemos etiquetar como el clon j -ésimo (con $1 \leq j \leq N$). Consideremos ahora que, debido a alguna mutación, alguno de los N clones (siendo N la población total de clones) tiene una conducta adaptativa diferenciada del resto. Es válido asumir, sin pérdida de generalidad, que dicho clon mutante es etiquetado como el N (esto es el N -ésimo clon). Las probabilidades condicionales dadas previamente dejan de ser válidas (2.28), siendo reemplazadas por las expresiones:

$$P_S(N \text{ clon}/(\text{SC-SC})) = \frac{m_1 s_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_1 s_N(t)}, \tag{2.29}$$

$$P_S(N \text{ clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) = \frac{m_2 s_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_2 s_N(t)}, \tag{2.30}$$

$$P_S(N \text{ clon}/(\text{Apop.})) = \frac{m_3 s_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_3 s_N(t)}, \tag{2.31}$$

$$P_{T_1}(N \text{ clon}/(\text{Plast.})) = \frac{m'_1 t_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_1 t_N(t)}, \tag{2.32}$$

$$P_{T_1}(N \text{ clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) = \frac{m'_2 t_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_2 t_N(t)}, \tag{2.33}$$

$$P_{T_1}(N \text{ clon}/(\text{Apop.})) = \frac{m'_3 t_N(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_3 t_N(t)}; \tag{2.34}$$

Las probabilidades de que dada una división SC-SC, una división TAC₁-TAC₁ o una apoptosis sea una célula madre del clon mutante N quién la sufra estarán dadas por expresiones: (2.29), (2.30) y (2.31) respectivamente, y análogamente dado que se produzca una plasticidad, una división TAC₂-TAC₂ o una apoptosis las probabilidades que sea en una T_1 del clon mutante N en quién se produzca estarán dadas por las expresiones: (2.32), (2.33) y (2.34) respectivamente. Los m_j con $j = 1, 2, 3$ son parámetros vinculados a las mutaciones que afectan a las células madre (S) y m'_j ($j = 1, 2, 3$) los vinculados a las mutaciones que afectan las células amplificadoras transitorias de 1^{er} generación (T_1).

Para el resto de los clones ($i = 1, \dots, N - 1$) las modificaciones son:

$$P_S(i\text{-th clon}/(\text{SC-SC})) = \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_1 s_N(t)}, \quad (2.35)$$

$$P_S(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) = \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_2 s_N(t)}, \quad (2.36)$$

$$P_S(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) = \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} s_j + m_3 s_N(t)}, \quad (2.37)$$

$$P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Plast.})) = \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_1 t_N(t)}, \quad (2.38)$$

$$P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) = \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_2 t_N(t)}, \quad (2.39)$$

$$P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) = \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{N-1} t_j + m'_3 t_N(t)}. \quad (2.40)$$

Es de destacar que, si $m_j = m'_j = 1$ ($\forall 1 \leq j \leq 3$) en Eqs.(2.29 - 2.40), recuperaríamos las Eqs.(2.28).

2.5.2. Algoritmo de Gillespie

Para obtener numéricamente la evolución del modelo estocástico empleamos el algoritmo de Gillespie [32] que describimos a continuación. Consideremos que la evolución de las poblaciones de células madre (S) y transitorias de primera generación (T_1) son resultado de un proceso estocástico en el que entran en juego la ocurrencia de seis eventos independientes con una probabilidad dada. Tres de estos eventos afectan a las células madre (S) y los tres restantes a las transitorias de primera generación (T_1).

Los eventos y sus probabilidades de ocurrencia son:

- La probabilidad de una división simétrica $S - S$ de una célula madre (S):

$$\begin{aligned} P_{S,S} &\propto M_{S,S} S = a(1), \\ S &\rightarrow S + 1, \\ T_1 &\rightarrow T_1 \end{aligned} \tag{2.41}$$

- La probabilidad de una división simétrica $T_1 - T_1$ de una célula madre (S):

$$\begin{aligned} P_{T_1,T_1} &\propto M_{T_1,T_1} S = a(2), \\ S &\rightarrow S - 1, \\ T_1 &\rightarrow T_1 + 2 \end{aligned} \tag{2.42}$$

- La probabilidad de apoptosis de una célula madre (S):

$$\begin{aligned} P_{A_S} &\propto A_S S = a(3), \\ S &\rightarrow S - 1, \\ T_1 &\rightarrow T_1 \end{aligned} \tag{2.43}$$

- La probabilidad de que se produzca plasticidad en una célula transitoria de primera generación (T_1) (esto también se puede ver como una división asimétrica $S - T_1$ de una transitoria T_1):

$$\begin{aligned} P_P &\propto P T_1 = a(4), \\ S &\rightarrow S + 1, \\ T_1 &\rightarrow T_1 \end{aligned} \tag{2.44}$$

- La probabilidad de una división simétrica $T_2 - T_2$ de una célula transitoria de primera generación (T_1):

$$\begin{aligned} P_{T_2,T_2} &\propto L_{T_1} T_1 = a(5), \\ S &\rightarrow S, \\ T_1 &\rightarrow T_1 - 1 \end{aligned} \tag{2.45}$$

- La probabilidad de apoptosis de una célula transitoria de primera generación (T_1):

$$\begin{aligned} P_{A_{T_1}} &\propto A_{T_1} T_1 = a(6), \\ S &\rightarrow S, \\ T_1 &\rightarrow T_1 - 1 \end{aligned} \tag{2.46}$$

Una vez sorteado cuál de estos eventos tendrá lugar, se determina mediante un nuevo sorteo cuál de los clones en juego participara de dicho proceso (o evento). En este proceso (también estocástico) se define la probabilidad de que sea una célula del clon k la participante en el proceso como proporcional su población s_k o t_k según el proceso involucre a las células madre S o transitorias T_1 .

En el algoritmo queda descartada la probabilidad de que ocurran eventos simultaneos. El tiempo entre los distintos pasos Δt responde a la distribución definida por la densidad de probabilidad:

$$\rho(\Delta t) = \exp \left[-\Delta t \sum_i a(i) \right]. \quad (2.47)$$

Para posibles participaciones en el evento del clon mutante (este sería el clon etiquetado como N) se asume que la probabilidad de participación en cada evento por parte de dicho clon resulta proporcional a $m_i s_N$ ($i = 1, 2, 3$) en el caso de que el evento involucre a las células madre (S) y $m'_i t_N$ ($i = 1, 2, 3$) en caso de que las involucradas sean las células transitorias de primera generación (T_1); mientras que si $k \neq N$ las mismas serán proporcionales solo a su población s_k o t_k según el proceso involucre a las células madre S o transitorias T_1 como se señaló previamente.

Si se asume que los factores regulatorios de cada evento (ec. (2.16)-(2.22)) no varían (esto es que solo dependen del número total de células madre (S) o transitorias de primera generación (T_1); por lo tanto al incluir las mutaciones se tiene que reemplazar:

- S por $\sum_{k=1}^{N-1} s_k + m_i s_N$ ($i = 1, 2, 3$) en las ecuaciones (2.41 - 2.43)
- T_1 por $\sum_{k=1}^{N-1} t_k + m'_i t_N$ ($i = 1, 2, 3$) en las ecuaciones (2.44 - 2.46)

Efectivamente si $m_i = m'_i = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3$ recuperamos el problema original sin mutaciones (ver Ecs. 2.28).

2.6. Modelo General de un único compartimento.

Consideremos en principio describir la dinámica de la población mediante ecuaciones diferenciales ordinarias siempre que las celdas de cada compartimento sean idénticas. La población obedece a la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dn}{dt} = [-f(n) + g(n)]n, \quad (2.48)$$

donde $n = n(t)$ es la población total en el momento t en el compartimento. Las tasas de desaparición y nacimiento son $f(n)$ y $g(n)$ respectivamente. Si estas poblaciones son pequeñas las mismas deberían ser estudiadas como procesos estocásticos y la trayectoria $n = n(t)$ correspondería al equilibrio alrededor del cual fluctúa la población. Para que dicho equilibrio exista estas funciones deben satisfacer:

$$-f(n_e) + g(n_e) = 0, \quad (2.49)$$

para algún o algunos n_e de forma tal de garantizar el equilibrio y,

$$\left[-\frac{df(n)}{dn} + \frac{dg(n)}{dn} \right] \Big|_{n=n_e} < 0, \quad (2.50)$$

para garantizar de esta forma que el punto de equilibrio sea linealmente estable en el sentido de Liapunov (o *Liapunov-estable*).

Además, debemos procurar que la ecuación 2.48 al ser descripción de un sistema biológico, tenga soluciones robustas frente a las fluctuaciones de los parámetros involucrados en las funciones $f(n)$ y $g(n)$. Por lo tanto si la población fuera pequeña, esta dinámica debe estudiarse como un proceso estocástico y las trayectorias definidas por $n = n(t)$, en el régimen de equilibrio, corresponden a las fluctuaciones alrededor de la población de equilibrio dadas por n_e .

La condición dada por la ecuación 2.50 para el proceso estocástico, puede resultar insuficiente para asegurar la estabilidad, ya que debido al tamaño de las fluctuaciones (ruido interno) n podría alejarse de su valor de equilibrio más allá del régimen de estabilidad lineal (ver [27]). Esto puede traducirse en escenarios como un crecimiento desmedido de n (lo cual podría interpretarse por ejemplo como un cáncer en un tejido) o un extinción de la población n (lo que puede interpretarse como un grave deterioro de un tejido y su capacidad de regeneración). En este escenario es natural preguntarse: ¿Qué pasará si surge una población diferente que rompe la homogeneidad? (por ejemplo en una población celular podría ser una mutación).

Para simplificar la nomenclatura nos referiremos a esta *nueva población* como s' , siendo s la población original y por lo tanto $n = s + s'$ la población total. A s' la podemos pensar como una *alteración* (en las propiedades y/o parámetros que la definen) de la población original s .

Supongamos que la tasa de desaparición (nacimiento) de la población alterada s' es $\beta_1 f(n)$ ($\beta_2 g(n)$). Claramente ante este nuevo escenario, la ecuación 2.48 deja de tener significado

porque la población pierde su condición de homogénea. Para estudiar la dinámica resultante, debemos considerarla como un proceso estocástico en el que las transiciones se definen entre cuatro eventos posibles:

- Desaparición de una unidad de la población normal.
- Nacimiento de una unidad de la población normal.
- Desaparición de una unidad de la población alterada.
- Nacimiento de una unidad de la población alterada.

La descripción de la dinámica de la población a través de una ecuación como la ecuación 2.48, se recuperará si la población original (s) o la población alterada (s') se extinguen, y por lo tanto se vuelve a tener homogeneidad en la población. En el último caso ($s' = n$), la ecuación 2.48 debe reemplazarse por:

$$\frac{dn}{dt} = [-\beta_1 f(n) + \beta_2 g(n)] n, \quad (2.51)$$

y ahora el equilibrio de la población sera definido por:

$$-\beta_1 f(n_e) + \beta_2 g(n_e) = 0, \quad (2.52)$$

Si ahora nos limitamos a considerar solo aquellas alteraciones donde $\beta_1 = \beta_2 = \alpha$. Entonces la Eq 2.51 se reduce a la Eq 2.48, y por lo tanto no hay cambios en la población de equilibrio y la Eq 2.51 la podemos re-escribir como:

$$\frac{dn}{dt} = [-f(n) + g(n)] \alpha n, \quad (2.53)$$

Redefiniendo $t \rightarrow \alpha t$ (que no es otra cosa que un re-escalo temporal) esta ecuación es idéntica a Eq 2.48, excepto que las poblaciones original y alterada tendrán distintas longitudes del ciclo de renovación. Si a estas poblaciones las pensamos como células madre lo que estamos diciendo es que las células madre alteradas tienen una longitud del ciclo celular (CCL) τ_m , mientras que el de las células madre normales es τ_w , manteniendo una relación tal que:

$$\frac{\tau_w}{\tau_m} = \alpha, \quad (2.54)$$

Dado que $\alpha < 1 \iff \tau_w < \tau_m$ la fijación de dicha alteración ralentiza los procesos de renovación celular, lo que resulta ser típico en el envejecimiento de los tejidos.

En la siguiente sub-sección discutimos las probabilidades de fijación de este tipo de células alteradas.

2.6.1. Fijación de la población alterada

Suponiendo que dentro del conjunto de n células madre hay s células madre normales (WSC) y s' células madre alteradas (ASC) ($n = s + s'$), los eventos mencionados en la sección anterior son:

- $(s, s') \rightarrow (s - 1, s')$.
- $(s, s') \rightarrow (s + 1, s')$.
- $(s, s') \rightarrow (s, s' - 1)$.
- $(s, s') \rightarrow (s, s' + 1)$.

Observemos que las probabilidades de nacimiento y muerte de una célula madre están reguladas por el número total de células madre presentes n y no por los números de ningún tipo en particular (s y s').

$$P(n \rightarrow n + 1) = \frac{g(n)}{g(n) + f(n)}, \quad (2.55)$$

$$P(n \rightarrow n - 1) = \frac{f(n)}{g(n) + f(n)}. \quad (2.56)$$

Esto mismo lo podemos formular en términos de las probabilidades condicionales involucradas para cada tipo de célula madre de la siguiente forma,

$$P(s \rightarrow s + 1/n \rightarrow n + 1) = P(s \rightarrow s - 1/n \rightarrow n - 1) = P_s, \quad (2.57)$$

$$P(s' \rightarrow s' + 1/n \rightarrow n + 1) = P(s' \rightarrow s' - 1/n \rightarrow n - 1) = P_{s'}. \quad (2.58)$$

Siendo

$$P_s = \frac{s}{s + \alpha s'}, \quad (2.59)$$

$$P_{s'} = \frac{\alpha s'}{s + \alpha s'}. \quad (2.60)$$

De esta forma, la probabilidad del primer evento resulta:

$$P_s^- = \frac{f(n)}{g(n) + f(n)} \frac{s}{s + \alpha s'}. \quad (2.61)$$

Las probabilidades para los cuatro eventos posibles quedan dadas en la tabla 2.1. Donde $\eta = [g(n) + f(n)](s + \alpha s')$.

Evento	Probabilidad
$(s, s') \rightarrow (s - 1, s')$	$P_s^- = \frac{f(n)}{\eta} s$
$(s, s') \rightarrow (s + 1, s')$	$P_s^+ = \frac{g(n)}{\eta} s$
$(s, s') \rightarrow (s, s' - 1)$	$P_{s'}^- = \frac{f(n)}{\eta} \alpha s'$
$(s, s') \rightarrow (s, s' + 1)$	$P_{s'}^+ = \frac{g(n)}{\eta} \alpha s'$

Cuadro 2.1: En esta tabla se muestran los eventos que definen la dinámica estocástica del proceso de renovación y sus correspondientes probabilidades de ocurrencia. Siendo s el número de células madre normales (WSC), s' el número de células alteradas (mutadas) (ASC), $n = s + s'$ el número total de células y $\eta = [g(n) + f(n)](s + \alpha s')$

Para evaluar el tamaño de las fluctuaciones se calculo se calculo la varianza $\langle \delta n \rangle^2$ usando la aproximación lineal [24] [75]:

$$\langle \delta n \rangle^2 = - \frac{f(n_e) + g(n_e)}{2 \frac{d}{dn} [g(n) - f(n)] |_{n=n_e}} \quad (2.62)$$

que se ve claramente es independiente de α .

2.6.2. Modelo Markoviano de evolución poblacional

Para el escenario descrito en la sección anterior definido para el que dada una población de n células madre con s células madre normales (WSC) y s' células madre alteradas (ASC) ($n = s + s'$), los eventos mencionados en la sección anterior son:

- $(s, s') \rightarrow (s - 1, s')$.
- $(s, s') \rightarrow (s + 1, s')$.
- $(s, s') \rightarrow (s, s' - 1)$.
- $(s, s') \rightarrow (s, s' + 1)$.

podemos definir la matriz de transiciones como:

$$\mathbb{T} = \begin{bmatrix} 1 & U_1 & 0_3 & 0_4 & 0_5 & \cdots \\ 0^2 & \mathbf{0} & U_2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \cdots \\ 0^3 & W_1 & \mathbf{0} & U_3 & \mathbf{0} & \cdots \\ 0^4 & \mathbf{0} & W_2 & \mathbf{0} & U_4 & \cdots \\ 0^5 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & W_3 & \mathbf{0} & \ddots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \ddots \end{bmatrix} \quad (2.63)$$

Siendo, 0_k (0^k) un vector fila nulo (columna) de dimensión k ; U_k y W_k submatrices de $k \times (k + 1)$ y $(k + 2) \times (k + 1)$ respectivamente.

Esta matriz es en principio infinita o dicha más precisamente su dimensión solo queda restringida por las regulaciones definidas por $f(n)$ y $g(n)$. También se puede apreciar que resulta tri-diagonal en bloques. De acuerdo a la tabla (2.1) los elementos de estas submatrices están definidas por:

$$\{U_k\}_{i,j} = \frac{f(k) [k + 1 - i]}{[f(k) + g(k)] [k + 1 - i + (i - 1)\alpha]} \delta_{ij} + \frac{f(k)\alpha i}{[f(k) + g(k)] [k - i + i\alpha]} \delta_{i(j-1)}. \quad (2.64)$$

$$\{W_k\}_{i,j} = \frac{g(k) [k + 1 - i]}{[f(k) + g(k)] [k + 1 - i + (i - 1)\alpha]} \delta_{ij} + \frac{g(k)\alpha(j - 1)}{[f(k) + g(k)] [k + 1 - j + (j - 1)\alpha]} \delta_{(i-1)j}. \quad (2.65)$$

Esta matriz de transición actúa sobre el vector de estados definido por:

$$\mathbf{P} = \begin{bmatrix} \mathbf{p}^0 \\ \mathbf{p}^1 \\ \vdots \\ \mathbf{p}^M \\ \vdots \end{bmatrix}. \quad (2.66)$$

Dónde:

$$\mathbf{p}^M = \begin{bmatrix} \Gamma_{M,0}^M \\ \Gamma_{M-1,1}^M \\ \vdots \\ \Gamma_{0,M}^M \end{bmatrix}. \quad (2.67)$$

Siendo $\Gamma_{M-n,n}^M$ la probabilidad de que el sistema tenga un total de M células de las cuales $M - n$ son células normales (WSC) y n son células mutantes (o alteradas) (ASC). Aquí vale subrayar que este proceso estocástico cambia la población total de células madre (S). De hecho cada evento consiste en la creación o destrucción de una célula madre.

Es fácil ver que la matriz de transición \mathbb{T} conecta estados pares (M par) con impares (M impar) y viceversa. Esto sugiere realizar un cambio de base conveniente (siendo de hecho no más que un reagrupamiento):

$$\hat{\mathbf{P}} = \begin{bmatrix} \mathbf{p}^0 \\ \mathbf{p}^2 \\ \vdots \\ \mathbf{p}^{2k} \\ \vdots \\ \mathbf{p}^1 \\ \mathbf{p}^3 \\ \vdots \\ \mathbf{p}^{2k+1} \\ \vdots \end{bmatrix}. \quad (2.68)$$

La matriz de transición en esta nueva base es $\tilde{\mathbb{T}}$ dada por:

$$\tilde{\mathbb{T}} = \left[\begin{array}{c|c} \mathbf{0} & \mathbf{B} \\ \hline \mathbf{A} & \mathbf{0} \end{array} \right] \quad (2.69)$$

siendo:

$$\mathbf{A} = \left[\begin{array}{c|c|c|c} 1 & & & \\ \hline 0 & U_2 & \mathbf{0}^{2 \times 5} & \dots \\ \hline 0^4 & W_2 & U_4 & \dots \\ \hline 0^6 & \mathbf{0}^{6 \times 3} & W_4 & \dots \\ \hline \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{array} \right] \quad (2.70)$$

$$\mathbb{B} = \left[\begin{array}{c|c|c|c} U_1 & 0_4 & 0_6 & \dots \\ \hline W_1 & U_3 & 0^{3 \times 6} & \dots \\ \hline 0^5 & W_3 & U_5 & \dots \\ \hline \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{array} \right] \quad (2.71)$$

$$\tilde{\mathbb{T}}^2 = \left[\begin{array}{c|c} \mathbb{B}\mathbb{A} & 0 \\ \hline 0 & \mathbb{A}\mathbb{B} \end{array} \right] \quad (2.72)$$

Por lo tanto, al tener $\tilde{\mathbb{T}}^2$ representaciones desacopladas en los espacios de estados pares ($\mathbb{B}\mathbb{A}$) e impares ($\mathbb{A}\mathbb{B}$) los cálculos se optimizan notablemente.

Sin embargo no debemos olvidar que, en el desarrollo plantea que las matrices \mathbb{A} y \mathbb{B} (y por lo tanto la propia \mathbb{T}) son, en principio, de dimensión infinita (o más precisamente de dimensión indefinida) y en consecuencia se debe establecer un criterio para truncarlas. Por otro lado dicha truncación debe garantizar el carácter estocástico de las matrices. Para satisfacer esta condición es necesario que:

$$\sum_{i=1}^{M^*} \{U_{M^*}\}_{ij} \longrightarrow 1 \quad \forall j. \quad (2.73)$$

$$\sum_{i=1}^{M^*+2} \{W_{M^*}\}_{ij} \longrightarrow 0 \quad \forall j. \quad (2.74)$$

Para algún M^* crítico. Esto dependerá fundamentalmente de las funciones previamente definidas $f(M)$ y $g(M)$ que regulan la muerte y el nacimiento de las células. **Fijémonos que en definitiva lo que imponen estas condiciones es que cuando la población de células supera cierto umbral (M^*) se detengan los nacimientos (2.74) y se gatillen las muertes (2.73).**

Las componentes no nulas del vector estacionario $\hat{\mathbf{P}}_e$ resultan ser $\Gamma_{M,0}^M$ y $\Gamma_{0,M}^M$ que son las probabilidades de fijación en el régimen homeostático de M células normales (WSC) y de M células mutantes (alteradas) (ASC) respectivamente. Entonces definimos:

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto M células mutantes (ASC) en condiciones homeostáticas son:

$$P_A(M) = \Gamma_{0,M}^M \quad (2.75)$$

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto M células normales (WSC) en condiciones homeostáticas son:

$$P_W(M) = \Gamma_{M,0}^M \quad (2.76)$$

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto M células normales (WSC) descendientes de *una* de las células madre normales del estado inicial (aquí asumimos que nuestro estado inicial se compone de n_e células de las cuales $(n_e - 1)$ son normales (WSC) y 1 es mutante (ASC)):

$$P'_W(M) = \frac{\Gamma_{M,0}^M}{(n_e - 1)} \quad (2.77)$$

- Las probabilidades de hallar el sistema con M células madre (SC) en condiciones homeostáticas:

$$P_T(M) = P_A(M) + P_W(M) \quad (2.78)$$

Por otro lado definimos:

- Las probabilidades de que *cualquiera sea la población total* se fijen las células mutantes (ASC):

$$P_A = \sum_{k=1} P_A(k) = \sum_{k=1} \Gamma_{0,k}^k \quad (2.79)$$

- Las probabilidades de que *cualquiera sea la población total* se fije la población descendiente de *una* de las células normales inicialmente presentes:

$$P_W = \sum_{k=1} P'_W(k) = \frac{\sum_{k=1} \Gamma_{k,0}^k}{(n_e - 1)} \quad (2.80)$$

2.6.3. Modelo Markoviano simplificado de fijación de mutaciones

Para una población total constante de células madre podemos pensar una dinámica que consiste en un sorteo (que involucra dos eventos más elementales), donde un clon disminuye su población en una unidad y otro la incrementa de forma tal que la población total N permanece constante. Esta dinámica puede ser capturada en una matriz de transición markoviana finita que afecta a los vectores de estado (de probabilidades). Las células las dividimos entre aquellas que consideramos *normales* (WSC) con una longitud de ciclo celular (CCL) dada por τ_w y mutadas (MSC) que tendrán un ciclo mitótico más rápido (menor CCL) o más lento (mayor CCL) dado por τ_m . Esta mutación (en rigor puede ser una o un conjunto de mutaciones) que lleva a las células madre mutadas (MSC) a tener un ciclo mitótico más rápido o más lento que las células madre normales (WSC) es representada por un parámetro $\alpha = \frac{\tau_w}{\tau_m}$ siendo que $\alpha > 1$ corresponde a ciclo mitótico más frecuente o rápido ($\tau_m < \tau_w$) y $\alpha < 1$ a uno menos frecuente o más lento ($\tau_w < \tau_m$). De aquí en más normalizamos la longitud del ciclo celular de las células madre normales (WSC) asignándole la unidad $\tau_w = 1$ sin perder generalidad.

Considerando que en este modelo simplificado (en el que cada evento involucra dos eventos del modelo original, la desaparición de cada célula madre es seguida del nacimiento de otra) mantiene la población total constante, las funciones f y g que regulaban las probabilidades de muerte y nacimiento respectivamente en el modelo original pierden sentido y desaparecen en este modelo simplificado.

Los estados posibles en este modelo son esencialmente caracterizados por $N - s'$ células madre normales (WSC) y s' células madre mutadas (MSC). Las transiciones estocásticas permitidas son entences:

- $(N - s', s') \rightarrow (N - s' - 1, s' + 1)$.
- $(N - s', s') \rightarrow (N - s' + 1, s' - 1)$.
- $N - s', s') \rightarrow (N - s', s')$.

El vector de estado estará dado por:

$$\mathbf{p} = \begin{bmatrix} P_{N,0} \\ P_{N-1,1} \\ P_{N-2,2} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ P_{0,N} \end{bmatrix} \quad (2.81)$$

Siendo $P_{N-s',s'}$ la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado $(N - s', s')$ (esto es, $(N - s')$ células madre normales (WSC) y s' células madre mutadas (MSC)). Las transiciones de estado posibles estarán definidas por la matriz de transición dada por:

$$\mathbb{T} = \begin{bmatrix} 1 & t_{1,2} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & & & & 0 \\ 0 & & \mathbb{W} & & 0 \\ \cdot & & & & \cdot \\ \cdot & & & & \cdot \\ \cdot & & & & \cdot \\ 0 & 0 & \dots & t_{N+1,N} & 1 \end{bmatrix} \quad (2.82)$$

Esta matriz de transición es una matriz tridiagonal $\mathbb{T} \in \mathbb{R}^{(N+1) \times (N+1)}$ cuyos elementos son:

$$\begin{aligned} t_{i,j} = & \frac{\alpha(N-i)i}{(N-i+\alpha)(N-i+(i-1)\alpha)} \delta_{i,j-1} + \\ & + \left[\frac{(N-i+1)(N-i)}{(N-i+1+(i-1)\alpha)(N-i+(i-1)\alpha)} + \frac{\alpha^2(i-1)(i-2)}{(N-i+1+(i-1)\alpha)(N-i+1+(i-2)\alpha)} \right] \delta_{i,j} \\ & + \frac{(N-i+2)(i-2)\alpha}{(N-i+2+(i-2)\alpha)(N-i+1+(i-2)\alpha)} \delta_{i,j+1} \end{aligned} \quad (2.83)$$

La submatriz $\mathbb{W} \in \mathbb{R}^{(N-1) \times (N-1)}$ cuyos elementos están definidos por: $\{\mathbb{W}\}_{i,j} = t_{i+1,j+1}$.

$$t_{1,2} = \frac{\alpha}{(N-1) + \alpha} \quad (2.84)$$

$$t_{N+1,N} = \frac{1}{(N-1)\alpha + 1} \quad (2.85)$$

La evolución de este sistema markoviano resulta gobernada por la matriz de transición $\mathbb{T} \in \mathbb{R}^{(N+1) \times (N+1)}$. Por lo tanto luego de k transiciones tendremos:

$$\mathbb{T}^k = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{v}\mathbb{A}_k & 0 \\ 0 & & 0 \\ 0 & & 0 \\ \cdot & \mathbb{W}^k & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ 0 & \mathbf{u}\mathbb{A}_k & 1 \end{bmatrix} \quad (2.86)$$

donde $\mathbf{v} \in \mathbb{R}^{(N-1)}$ y $\mathbf{u} \in \mathbb{R}^{(N-1)}$ son los vectores fila definidos por:

$$\mathbf{v} = (t_{1,2}, 0, \dots, 0) \quad (2.87)$$

$$\mathbf{u} = (0, \dots, 0, t_{N+1,N}) \quad (2.88)$$

y la submatriz $\mathbb{A}_k \in \mathbb{R}^{(N-1) \times (N-1)}$ queda definida por:

$$\mathbb{A}_k = \mathbb{I} + \sum_{i=1}^{i=k} \mathbb{W}^i \quad (2.89)$$

como $\forall \alpha > 0$ se cumple, el límite:

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbb{W}^k = \mathbb{O} \quad (2.90)$$

Se satisface la condición de convergencia de la serie, y resulta válida la identidad:

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbb{A}_k = (\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1} \quad (2.91)$$

Finalmente se obtiene:

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbb{T}^k = \begin{bmatrix} 1 & \mathbf{v}(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1} & 0 \\ 0 & & 0 \\ 0 & & 0 \\ \cdot & \mathbb{O} & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ 0 & \mathbf{u}(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1} & 1 \end{bmatrix} \quad (2.92)$$

Siendo la última fila de esta matriz $(0, \mathbf{u}(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1}, 1)$ la que nos señala la probabilidad de fijación de las células mutadas partiendo de un estado inicial con $N - s'$ células madre normales (WSC) y s' células madre mutadas (MSC). La primer fila resulta ser su complementario, esto es $(1, \mathbf{v}(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1}, 0)$ señala la probabilidad de que **no se fijen** las células mutadas (MSC) o lo que es lo mismo que se fijen cualesquiera de las células normales (WSC).

La propia construcción del vector \mathbf{u} (ver ec 2.88) lleva a que, en rigor, no sea necesaria el cálculo de toda la matriz $(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1}$, sino que alcanza con calcular su última fila.

$$\mathbf{u}(\mathbb{I} - \mathbb{W})^{-1} = \left(\frac{2}{(1 + \alpha)N}, \dots, \left[\frac{2(N - s')}{\alpha + 1} + (s' - 1) \right] \frac{s'}{N(N - 1)}, \dots \right) \quad \forall 1 \leq s' \leq N - 1 \quad (2.93)$$

Tomando $N = n_e$ siendo n_e la población media sobre la que se producen las fluctuaciones en el modelo de ecuaciones maestras, la probabilidad de transición desde un estado inicial con $n_e - s'$ células madre normales (WSC) y s' células madre mutadas (estado $(n_e - s', s')$), a un estado final con todas las células madre resultando clones de las mutadas (MSC) (estado $(0, n_e)$) resulta:

$$P_{0, n_e}^{n_e - s', s'} = \left[\frac{2(n_e - s')}{\alpha + 1} + (s' - 1) \right] \frac{s'}{n_e(n_e - 1)} \quad (2.94)$$

siendo válido $\forall 0 \leq s' \leq n_e$.

Es importante destacar que estas expresiones halladas solo son correctas para $\alpha > 0$ ya que para $\alpha = 0$ los límites de las expresiones (2.90), (2.91), (2.85) no son válidos.

Desde el punto de vista biológico $\alpha = 0$ se podría interpretar como el caso de células quiescentes, que no mueren ni se duplican, y por lo tanto no darían lugar a transiciones en la que nazca o muera una célula.

2.7. Funciones de Hill

Las llamadas funciones de Hill fueron introducidas por A. Hill [34] alrededor de 1910 para describir la unión del oxígeno a la hemoglobina. A partir de entonces la utilización de esta familia de funciones se extendió rápidamente al estudio de los equilibrios en la unión ligando-receptor. Posteriormente su utilidad para modelar y comprender diversos fenómenos llevo a adoptarlas en diversas áreas de la biología, biofísica, química, fisiología, etc. Lo que las hace particularmente pertinentes en esta clase de procesos es que representan los reguladores que activan y/o desactivan determinados procesos biológicos moleculares o químicos con mucha solvencia. Los procesos de regulación biológicos se suelen manifestar en forma más suave con tiempos de transición no despreciables y es por estos motivos que la representación de estos fenómenos resulta más adecuada por funciones de Hill que por ejemplo las función escalón de Heaviside (estas últimas son funciones que pueden ser más adecuadas en procesos de reacción más rápida como pueden ser procesos de señales o de electrónica). En resumen esta familia de funciones suele capturar en forma adecuada los diversos fenómenos de activación y/o desactivación de procesos de regulación biológicos.

Estas familias de funciones las podemos expresar como:

$$H^+(S) = \frac{S^n}{K^n + S^n} \quad (2.95)$$

$$H^-(S) = \frac{K^n}{K^n + S^n} \quad (2.96)$$

Las principales propiedades de $H^+(S)$ son: i) Estrictamente crecientes. ii) $H^+(0) = 0$. iii) $H^+(K) = \frac{1}{2}$. iv) $\lim_{S \rightarrow \infty} H^+(S) = 1 \forall n$. Análogamente las de $H^-(S)$ resultan ser: i) Estrictamente decrecientes. ii) $H^-(0) = 1$. iii) $H^-(K) = \frac{1}{2}$. iv) $\lim_{S \rightarrow \infty} H^-(S) = 0 \forall n$.

Estas funciones son las usadas en los modelos del presente trabajo para representar los diversos procesos de regulación poblacional.

A continuación, en las siguientes figuras 2.2, 2.3 se muestran estas familias de funciones normalizadas para distintos valores de n .

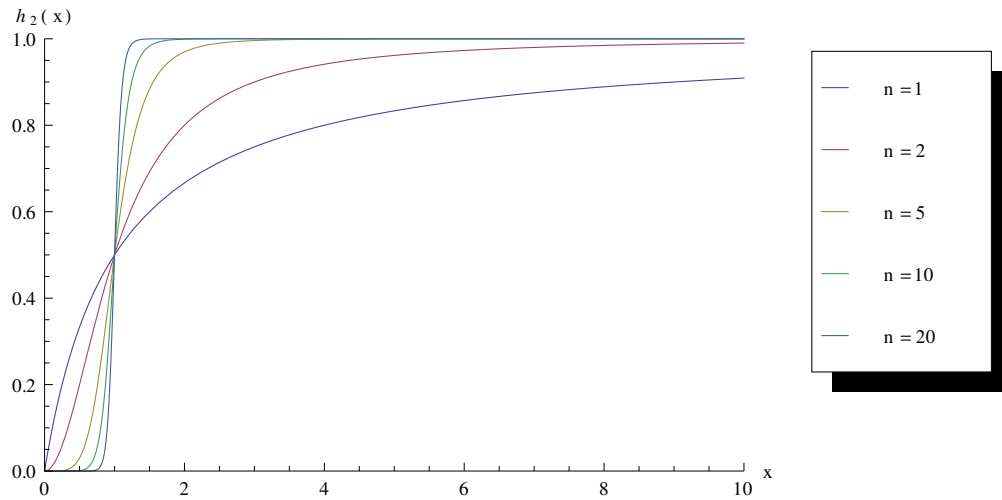


Figura 2.2: Familia de funciones renormalizadas $h_2(x) = H^+(Kx) = \frac{x^n}{1+x^n} \forall n$. Como vemos son una funciones cuyas propiedades principales son: i) Estrictamente crecientes. ii) $h_2(0) = 0$. iii) $h_2(1) = \frac{1}{2}$. iv) $\lim_{x \rightarrow \infty} h_2(x) = 1$

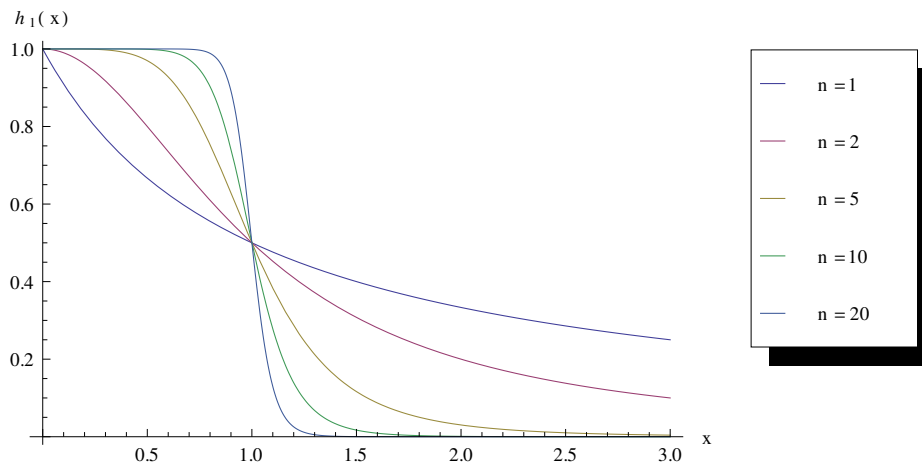


Figura 2.3: Familia de funciones renormalizadas $h_1(x) = H^-(Kx) = \frac{1}{1+x^n} \forall n$. Como vemos son una funciones cuyas propiedades principales son: i) Estrictamente decrecientes. ii) $h_1(0) = 1$. iii) $h_1(1) = \frac{1}{2}$. iv) $\lim_{x \rightarrow \infty} h_1(x) = 0$

Capítulo 3

Renovación de las criptas colónicas en el régimen homeostático

3.1. Introducción

En el presente capítulo se presenta un análisis de la renovación de un tejido adulto en régimen homeostático.

En los organismos multicelulares, las divisiones celulares de células madre de diferentes linajes deben proporcionar el número necesario de células para el correcto funcionamiento del organismo (lo que requiere una adecuada renovación celular) y también deben ser capaces de garantizar la reconstrucción de los diferentes tejidos en caso de daño.

Las estrategias y el ritmo de la mitosis, deben adaptarse a los requerimientos para cada caso específico. A modo de ejemplo, y simplificando mucho, podemos esquematizar las estrategias mitóticas de la siguiente forma. Durante el desarrollo embrionario, por regla general, las primeras mitosis originan el número suficiente de células madre embrionarias (indiferenciadas y por ende con un alto potencial) a través de las divisiones simétricas en células madre (SC-SC), de forma tal de satisfacer una muy alta producción de diferentes células en el futuro inmediato. En etapas intermedias son las divisiones asimétricas (SC-D) las que comienzan a tener mayor relevancia. Finalmente las divisiones simétricas en diferenciadas (D-D) son las que prevalecen en las etapas finales donde se requiere que las células adquieran propiedades y funciones muy definidas y específicas. Dicha especificidad, en general, tiene como costo la pérdida de potencialidad de las células [7, 84].

La renovación celular en el régimen homeostático es muy diferente. Aquí la estrategia debe conducir a un número estable (aunque posiblemente fluctuante) de diferentes poblaciones celulares [43].

Aquí, como instancia específica del segundo caso, nos concentramos en la dinámica de renovación celular en las criptas de Lieberkühn localizadas en el epitelio intestinal. La misma ha sido objeto de numerosos estudios experimentales y teóricos. Las motivaciones de tales estudios son tanto las anomalías e interrupciones en su funcionamiento normal, muchas de

ellas vinculadas al desarrollo del cáncer de colon, como así también el entendimiento del ritmo de las divisiones celulares en el régimen de homeostasis para asegurar su renovación.

Las colonias de criptas son formaciones (cuya forma es similar a un dedal) (ver figura: 1.2) donde tienen lugar los procesos de renovación. La organización espacial y la geometría de las criptas ha sido estudiada pero excede al presente trabajo.

En el fondo de cada cripta hay un pequeño conjunto de células madre. Estas células a medida que se dividen dan lugar a aquellas conocidas como células amplificadoras de tránsito, las cuales realizan entre cuatro y seis divisiones [63, 51] antes de finalmente generar las células diferenciadas del linaje (linaje secretorio: células globets, células enteroendocrinas y linaje absorbente: enterocitos). Por otro lado, a medida que se desarrolla el proceso mitótico, las células migran desde el fondo hasta la boca de la cripta, de modo que las células diferenciadas terminan en las proximidades del lumen intestinal.

Se estima que todo este proceso de renovación y migración de las células que conforman las criptas intestinales dura entre 3 y 5 días (siempre referidos a datos experimentales en ratones).

La mayoría de las técnicas experimentales que proveen información son desarrolladas en ratones, por lo que en el presente trabajo se ha centrado principalmente en los datos obtenidos en ellos. Vale remarcar que en los resultados experimentales se aprecia una considerable dispersión de los datos reportados por diferentes autores.

Por ejemplo, mientras que Potten y Loeffler establecen el número de células madre por cripta entre 4 y 16 [63], Paulus et al lo ubican entre 4 y 8 [61], Li et al en 4 [46], Yatabe et al [96] entre 1 y 40, mientras que los trabajos Potten et al [64] y Barker et al [6] las sitúan entre 4 y 6. Una dispersión semejante se encuentra también en el número total de células por cripta siendo que de acuerdo con Potten et al [63] dicho valor se encuentra entre 235 – 250 mientras que Drasdo et al [23] lo sitúan en 300. La fracción de células proliferativas por cripta es $\frac{2}{3}$ de acuerdo con [63], entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{4}{5}$ para [46], $\frac{1}{5}$ para [45] y $\frac{1}{3}$ para [71] Ro y Rannala y [37] Katz et al. Esta dispersión de los resultados obtenidos también se observa en otros parámetros en juego como, por ejemplo, la duración del ciclo celular.

Esta dispersión es parcialmente atribuible a las diferentes técnicas experimentales empleadas, dado que los marcadores de los genes y demás tecnologías utilizadas para identificar a las células madre son diversas y disímiles. Sin embargo también hay fuertes argumentos que empujan a creer que las propias fluctuaciones en la población de la cripta en el régimen homeostático son intrínsecas a la dinámica. Estas fluctuaciones pueden estar relacionadas con el carácter estocástico del destino celular [43].

El destino celular está determinado por diversos procesos bioquímicos (inherentemente estocásticos) que ocurren en el interior de la célula (ruido intrínseco), así como por las fluctuaciones que ocurren en el exterior de la misma, tales como la interacción con otras células, gradientes externos, etc (ruido extrínseco) [88].

Es por estos motivos que el estudio y la medición de las fluctuaciones en el sistema se vuelven tan relevantes como la determinación del comportamiento medio. Del mismo modo, cualquier enfoque teórico para estos sistemas debe tener en cuenta las fluctuaciones. Algunos

enfoques teóricos con los que se abordan estos fenómenos se revisan extensamente en [75].

Diversos trabajos experimentales realizados señalan que la dinámica transitoria de renovación de la cripta conduce al establecimiento de la monoclonalidad [79]. Este resultado es compatible con una competencia neutral entre células madre diferentes que originan diferentes clones, hasta que sólo uno sobrevive. Un modelo relativamente simple capaz de describir una dinámica estocástica que capture dicho tránsito hacia la monoclonalidad sería un modelo Markoviano simplificado (con una cantidad fija de células madre) similar al modelo de Moran [30].

Básicamente, este tipo de procesos estocásticos consiste en un proceso de sustitución aleatoria producido por eventos conjuntos, que definen una transición, de desaparición de alguna célula madre (SC) (esto se puede deber a una división simétrica de la célula madre en TAC-TAC o una apoptosis de la misma) seguido del nacimiento de otra célula madre (SC-SC división simétrica) en un conjunto de N células madre donde N es fijo. Las divisiones SC-TAC asimétricas son de alguna forma transparentes a estos procesos ya que dejan invariante el número de células madre N y la composición clonal de la cripta afectando tan sólo el tiempo de tránsito a la monoclonalidad.

La hipótesis fuerte del modelo descrito (que será aplicado en el Cap. 5.) es que el número de células N es constante (ya que en cada paso estocástico de dicho modelo –desaparición-nacimiento– se conserva N) resulta incompatible con la condición más razonable de un N fluctuante en las condiciones homeostáticas. En un proceso como el descrito no se contempla, por ejemplo, dos o más desapariciones (o nacimientos) consecutivos, y al tratarse de fluctuaciones importantes respecto de N las mismas pueden desatar procesos de extinción o divergencia (crecimiento sin control) de la población. Es por eso que no es posible desacoplar el valor medio de N del ruido propio del sistema.

Es debido a esta necesidad de contemplar el ruido intrínseco que se hace necesario un método que realmente refleje dichas fluctuaciones.

Por otro lado, se ha especulado recientemente que la subdivisión del epitelio intestinal en millones de pequeños nichos, cada uno de ellos con pocas células madre, constituye una barrera natural para la fijación de mutaciones *mejor adaptadas*, que podrían resultar cancerosas, la dinámica neutral puede prevalecer sobre la adaptación darwiniana como una forma de protección ante el potencial desarrollo de tumores [36]. Por lo tanto, es de interés un análisis de la posible fijación de clones mutantes en el marco de la deriva neutral. Más adelante retomaremos consideraciones sobre este punto.

Para estudiar la dinámica de las poblaciones celulares en la cripta (tanto en el régimen homeostático *ordinario*, como bajo alguna lesión y/o algún proceso cancerígeno), se han desarrollado básicamente dos tipos de modelos matemáticos: modelos espaciales y modelos de compartimentos [15, 59, 29, 52, 91]. En este capítulo se propone un modelo compartimental para las criptas colónicas, considerando únicamente la evolución temporal de las poblaciones celulares. Los valores medios de dichas poblaciones son modelados bajo un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. La solución estacionaria de estas ecuaciones diferenciales corresponde a los valores medios de las poblaciones celulares entradas en el régimen

Cuadro 3.1: Aquí mostramos las poblaciones celulares reportadas por diferentes fuentes. Todos los datos exhibidos en la tabla son referentes a las criptas del intestino delgado en ratones.

Tipo celular	Población	Fuente
Células madre (S)	4 – 16	Potten et al [63]
Células madre (S)	4 – 8	Paulus et al [61]
Células madre (S)	4	Li et al [46]
Células madre (S)	1 – 40	Yatabe et al [96]
Células madre (S)	4 – 6	Potten et al [64]
Células madre (S)	4 – 6	Barker et al [6]
Número total células ($N_T = S + \sum_{i=1} T_i + D$)	235 – 250	Potten et al [63]
Número total células ($N_T = S + \sum_{i=1} T_i + D$)	250	Li et al [46]
Número total células ($N_T = S + \sum_{i=1} T_i + D$)	300	Drasdo et al [23]

homeostático.

Sin embargo, el pequeño número de células implicadas y la propia naturaleza estocástica del proceso llevan a considerar el ruido interno propio del proceso llevan a plantear el modelo estocástico asociado al sistema compartimental (ver: 2.5) [32]. Esta es una condición necesaria para poder apreciar las fluctuaciones de las poblaciones y evaluar si tales fluctuaciones desestabilizan o no la solución. Por ejemplo, no deberían anular la población de células madre ya que esto implicaría la extinción de la cripta.

A continuación, en la siguiente sección del capítulo, se aplica el modelo de compartimentos discutido a las criptas colónicas. En principio nos focalizamos los dos primeros compartimentos (SC y TAC de primera generación) dado que, como veremos, son los responsables principales del destino de las criptas ya que alimentan al resto de los compartimentos (ver Fig: 2.1). Veremos como la dinámica neutral conduce a la monoclonalidad asumiendo una cripta normal (es decir, aquella en la cual todas las células madre poseen igual aptitud) [27].

Cuadro 3.2: Aquí mostramos las fracciones de células proliferativas reportadas por distintas fuentes.

Fracción de células proliferativas ($S + \sum_{i=1} T_i$)	Fuente
$\frac{2}{3}$	Potten et al [63]
$\frac{1}{2} - \frac{4}{5}$	Li et al [46]
$\frac{1}{5}$	Levin et al [45]
$\frac{1}{3}$	Ro et al [71]
$\frac{1}{3}$	Katz et al [37]

3.2. Dinámica de renovación en las criptas intestinales

El modelo propuesto tiene ocho compartimentos. Uno de ellos corresponde a una célula madre (SC), los seis siguientes a cada generación de transitorias amplificadoras ($TAC_i, i = 1..,6$) y el último a células totalmente diferenciadas (DC). La inclusión de las 6 generaciones de transitorias amplificadoras es acorde, en primera instancia, con lo reportado por las diversas fuentes experimentales [60, 63, 51]. Si bien el estado de cada TAC es transitorio, sus divisiones dan lugar a dos células diferentes de ellos aumentando de esta forma el número de células implicadas en el proceso de diferenciación.

El número de células madre (S) se puede incrementar mediante divisiones simétricas de células madre en células madre ($S \rightarrow S - S$) con una tasa de $M_{S,S}$ y por medio de un proceso de reprogramación celular (Plasticidad) de un célula transitoria de 1^{era} generación (TAC_1) siendo P la tasa de dicho proceso [90].

El las tablas 3.4 3.5 se representan algunos de los eventos mencionados señalando como se afectan los conjuntos poblacionales.

Los procesos que disminuyen a S son: las divisiones simétricas de células madre en transitorias de 1^{era} generación ($S \rightarrow T_1 - T_1$) a una tasa M_{T_1,T_1} y por los procesos de apoptosis con una tasa A_S ($S \rightarrow \emptyset$). La ecuación que describe este procesos es:

$$\frac{dS}{dt} = M_{S,S}S - M_{T_1,T_1}S - A_S S + PT_1, \quad (3.1)$$

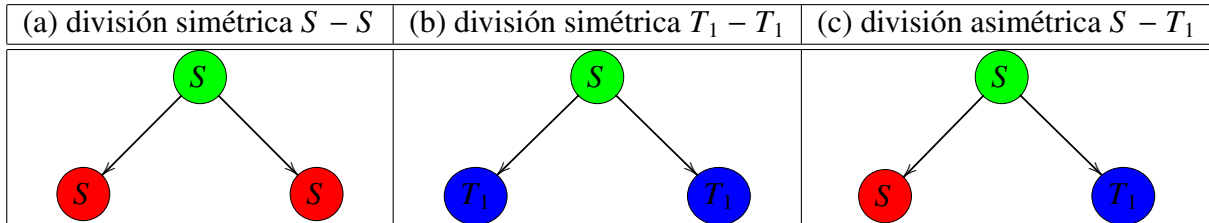
Por otro lado, el número de células transitorias de primera generación (T_1) se incrementa debido a las divisiones simétricas de células madre en transitorias de primer generación ($S \rightarrow T_1 - T_1$) a una tasa $2M_{T_1,T_1}$ y a las contribuciones de las divisiones asimétricas de células madre ($S \rightarrow S - T_1$) a una tasa M_{S,T_1} .

El decrecimiento de T_1 sera debido a las divisiones simétricas de las TAC_1 s ($T_1 \rightarrow T_2 - T_2$) a una tasa de L_{T_1} y a la propia apoptosis ($T_1 \rightarrow \emptyset$) a una tasa A_{T_1} . En definitiva la ecuación que gobierna el flujo poblacional en este compartimento es:

$$\frac{dT_1}{dt} = 2M_{T_1,T_1}S + M_{S,T_1}S - L_{T_1}T_1 - A_{T_1}T_1. \quad (3.2)$$

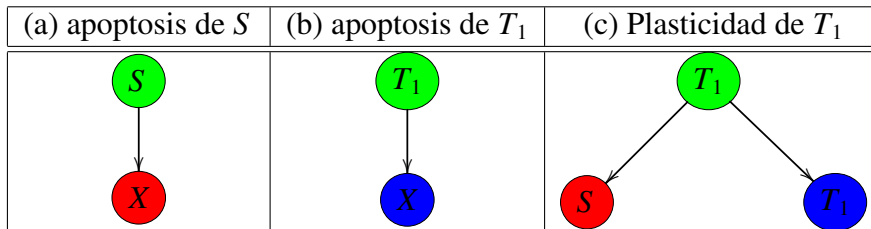
Cuadro 3.3: Aquí mostramos los eventos que involucran a las distintas poblaciones y sus respectivas tasas de ocurrencia (Esto es el número medio de ocurrencias de los respectivos eventos por unidad de tiempo) Eqs.(3.1) - (3.8)

Evento	Tasa
$S \rightarrow S - S$	$M_{S,S}$
$S \rightarrow T_1 - T_1$	M_{T_1,T_1}
$S \rightarrow S - T_1$	M_{S,T_1}
$S \rightarrow \emptyset$	A_S
$T_1 \rightarrow T_2 - T_2$	L_{T_1}
$T_1 \rightarrow T_1 - S$	P
$T_1 \rightarrow \emptyset$	A_{T_1}
$T_2 \rightarrow T_3 - T_3$	L_{T_2}
$T_3 \rightarrow T_4 - T_4$	L_{T_3}
$T_4 \rightarrow T_5 - T_5$	$\alpha_{T_5,T_5} L_{T_4}$
$T_4 \rightarrow T_4 - T_5$	$\alpha_{T_4,T_5} L_{T_4}$
$T_4 \rightarrow T_5 - D$	$\alpha_{T_5,D} L_{T_4}$
$T_4 \rightarrow D - D$	$\alpha_{D,D} L_{T_4}$
$T_5 \rightarrow T_6 - T_6$	$\alpha'_{T_6,T_6} L_{T_5}$
$T_5 \rightarrow T_5 - T_6$	$\alpha'_{T_5,T_6} L_{T_5}$
$T_5 \rightarrow T_6 - D$	$\alpha'_{T_6,D} L_{T_5}$
$T_5 \rightarrow D - D$	$\alpha'_{D,D} L_{T_5}$
$T_6 \rightarrow D - D$	L_{T_6}
$D \rightarrow \emptyset$	A_D



Cuadro 3.4: Aquí se muestra como, dada una población de S células madre y T_1 células transitorias de 1^{er} generación, distintos eventos modifican el estado poblacional $\{S, T_1\}$:

- (a) La división simétrica $S - S$ implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S + 1, T_1\}$.
- (b) La división simétrica $T_1 - T_1$ implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S - 1, T_1 + 2\}$.
- (c) La división asimétrica $S - T_1$ implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S, T_1 + 1\}$.



Cuadro 3.5: Aquí se muestra como, dada una población de S células madre y T_1 células transitorias de 1^{er} generación, distintos eventos modifican el estado poblacional $\{S, T_1\}$:

- (a) La apoptosis de una célula madre implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S - 1, T_1\}$.
- (b) La apoptosis de una célula transitoria implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S, T_1 - 1\}$.
- (c) La plasticidad de una célula implica una variación de las poblaciones $\{S, T_1\} \rightarrow \{S + 1, T_1\}$.

Estos dos compartimentos (S y T_1) son los fundamentales, para regular el comportamiento de la cripta, puesto que los compartimentos sucesivos son alimentados exclusivamente por estos dos (ver Figura: 2.1).

Las transitorias de segunda y tercera generación, TAC_2 y TAC_3 , solo se incrementan debido a las divisiones simétricas de aquellas transitorias de generación previa y disminuyen por la propia división simétrica:

$$\frac{dT_2}{dt} = 2L_{T_1}T_1 - L_{T_2}T_2, \quad (3.3)$$

$$\frac{dT_3}{dt} = 2L_{T_2}T_2 - L_{T_3}T_3. \quad (3.4)$$

A partir de la cuarta generación comenzamos a considerar no solo las divisiones simétricas responsables de generar la generación siguiente. Aquí son contempladas: la probabilidad de una división simétrica DC-DC, de una división simétrica TAC_5 - TAC_5 , de una división asimétrica TAC_4 - TAC_5 y una división asimétrica DC- TAC_5 . Este proceso está determinado por los factores α_{T_5,T_5} , α_{T_4,T_5} , $\alpha_{D,D}$ y $\alpha_{T_5,D}$ los cuales son fracciones de las divisiones mencionadas.

Los procesos involucrados en el balance de TAC_5 s son similares, siendo α'_{T_6,T_6} , $\alpha'_{D,D}$, α'_{T_5,T_6} y $\alpha'_{T_6,D}$ las fracciones de cada división. La última generación de transitorias, TAC_6 s, solo puede dividirse en células diferenciadas (DC). De esta forma las ecuaciones que gobiernan el flujo de cada uno de estos compartimentos son:

$$\frac{dT_4}{dt} = 2L_{T_3}T_3 - (\alpha_{T_5,T_5} + \alpha_{D,D} + \alpha_{T_5,D})L_{T_4}T_4, \quad (3.5)$$

$$\frac{dT_5}{dt} = (2\alpha_{T_5,T_5} + \alpha_{T_5,D} + \alpha_{T_4,T_5})L_{T_4}T_4 - (\alpha'_{T_6,T_6} + \alpha'_{D,D} + \alpha'_{T_6,D})L_{T_5}T_5, \quad (3.6)$$

$$\frac{dT_6}{dt} = (2\alpha'_{T_6,T_6} + \alpha'_{T_6,D} + \alpha'_{T_5,T_6})L_{T_5}T_5 - L_{T_6}T_6. \quad (3.7)$$

Finalmente el compartimento correspondiente a las células completamente diferenciadas (DC) se encuentra alimentado por TAC_4 s, TAC_5 s y TAC_6 s, y sometido a un sumidero determinado por A_D que representa la apoptosis o la entrada de las células especializadas en el lumen intestinal, para finalmente cumplir su destino funcional:

$$\frac{dD}{dt} = 2L_6T_6 + (2\alpha_{D,D} + \alpha_{T_5,D})L_{T_4}T_4 + (2\alpha'_{D,D} + \alpha'_{T_6,D})L_{T_5}T_5 - A_D D. \quad (3.8)$$

Este sistema debería conducir, en el régimen estacionario, a una solución que represente una población finita para cada tipo de células presentes. Aquí vale la pena mencionar que los coeficientes que representan las tasas para cada proceso no pueden ser constantes. Si acaso así fuera, tendríamos un sistema de ecuaciones diferenciales lineales de primer orden, cuya

solución general implicaría un comportamiento que aumenta o disminuye exponencialmente las poblaciones en el tiempo. En todo caso, solo eligiendo los parámetros adecuados en el modelo se podría evitar esto, pero aún en este caso dicho modelo sería completamente insatisfactorio, ya que cualquier fluctuación de estos parámetros alrededor de esos valores (muy pequeños de hecho) conduciría al crecimiento exponencial de algunas de las poblaciones. Dicho más resumidamente el sistema resultaría estructuralmente inestable [53].

Pero solucionar esto, conseguir un sistema estructuralmente estable resulta ser una condición necesaria, aunque no suficiente ya que además de la estabilidad frente a las fluctuaciones de los parámetros, se debe procurar también una contra el ruido interno presente en el sistema, esto es frente a las propias fluctuaciones de las variables (poblaciones).

Las poblaciones son cantidades discretas, mientras que los valores de S y T_1 que emergen como soluciones de las ecuaciones diferenciales son valores reales que son interpretados como el comportamiento promedio en la evolución temporal. Pero este comportamiento puede estar muy lejos del real si las poblaciones involucradas son pequeñas, como de hecho lo son en las criptas.

Como se acaba de señalar las ecuaciones (3.1) y (3.2), correspondientes a los compartimentos SC y TAC₁, están fuertemente acopladas y alimentan el resto de los compartimentos. Es por este motivo que en principio nos centramos en el estudio de los parámetros y las soluciones para el sistema de estas dos ecuaciones para luego analizar la solución con las seis restantes.

3.2.1. Regulación de las tasas en los compartimentos de las células madre (SC) y transitorias de primera generación (TAC₁)

Aquí analizaremos como los procesos, involucrados en el modelo propuesto, deben ser regulados por un proceso de retroalimentación dependiente de las poblaciones. Como ya advertimos previamente, dicho proceso de retroalimentación debe garantizar no solo una estabilidad estructural de la solución del sistema (esto es frente a las fluctuaciones de los parámetros), sino también una estabilidad frente al ruido intrínseco de las ecuaciones.

Para introducir dicha regulación se recurrió a las siguientes funciones de Hill:

$$M_{S,S}(S, T_1) = \frac{K_{S,S} S_o^n}{(S_o^n + S^n)} \frac{T_1^n}{(T_o1^n + T_1^n)}, \quad (3.9)$$

$$M_{T_1,T_1}(S, T_1) = \frac{K_{T_1,T_1} S^n}{(S_o^n + S^n)} \frac{T_o1^n}{(S_o^n + T_1^n)}, \quad (3.10)$$

$$A_S(S) = \frac{\lambda S^n}{(S_o^n + S^n)}, \quad (3.11)$$

$$P(S) = \frac{\beta S_o^n}{(S_o^n + S^n)}, \quad (3.12)$$

$$M_{S,T_1} = K_{S,T_1}, \quad (3.13)$$

$$L_{T_1}(T_1) = \frac{\beta' T_1^n}{(T_{o1}^n + T_1^n)}, \quad (3.14)$$

$$A_{T_1}(T_1) = \frac{\lambda' T_1^n}{(T_{o1}^n + T_1^n)}. \quad (3.15)$$

donde $K_{S,S}, K_{T_1,T_1}, K_{S,T_1}, S_o, T_{o1}, \lambda, \lambda', \beta, n$ son parámetros a determinar a partir de la información de los diversos reportes experimentales.

Vale la pena señalar que la tasa de división asimétrica fue tomada como una constante (i.e. no regulada), dado que este proceso deja invariante el número de células madre. El exponente n se considerara el mismo para todas las funciones de Hill involucradas y se determina de forma tal de garantizar la estabilidad de la solución frente a los ruidos internos, eligiendo n más pequeño que garantizara dicha estabilidad.

El resto de los parámetros fueron determinados de forma tal que los valores SC (S) y $TAC_1(T_1)$ correspondientes a la solución estacionaria se encuentren cercanos a 15 para cada caso, coincidiendo de esta manera con valores reportados por diversos grupos experimentales. Otro factor tenido en cuenta (sobre el cual hay un consenso importante) fue que la tasa de divisiones celulares para las células madre en el estacionario resulta ser aproximadamente 1/24hs. Por otro lado también se encuentra en la gran mayoría de los reportes experimentales [79, 35] que el ciclo de divisiones de las transitorias *en conjunto*, promediado sobre las 6 generaciones de $TACs$, es aproximadamente la mitad que la de las células madre ($\sim 10h-12h$). En definitiva se procuro que todos los parámetros elegidos se encontraran dentro de los rangos compatibles con los reportados experimentalmente por diversos trabajos.

Es importante advertir que la duración del ciclo celular de las transitorias de primer generación TAC_1 resulto ser mayor que los valores experimentales reportados en la literatura (10h-12h). Sin embargo estos valores hacen referencia solo a las TAC_1 , mientras que los reportados en la literatura se refieren a la duración promedio del ciclo celular de las 6 generaciones de $TACs$. En las siguientes secciones veremos que los parámetros de los otros compartimentos de forma tal que la duración promedio del ciclo celular de las $TACs$ resulta ser de aproximadamente 10h lo que resulta acorde con aquellos valores reportados [79, 35].

Aquí un detalle fundamental a considerar, es la velocidad de evolución hacia la monoclonalidad en un rango de tiempos cortos.

El modelo propuesto es sensible al parámetro K_{S,T_1} (tasa de divisiones asimétricas). De hecho queda claro que, si todas las divisiones fueran de este tipo no existiría posibilidad alguna de un transito hacia la monoclonalidad. Por el contrario la velocidad de tránsito hacia la monoclonalidad se maximiza (respecto de este parámetro) cuando dichas divisiones no existen ($K_{S,T_1} = 0$).

Esta velocidad fue medida experimentalmente para 15 células madre inicialmente marcadas (ie 15 clones iniciales con una población de una célula por clon) resultando ser el tiempo de transición hacia la monoclonalidad de entre 6 y 14 días [79].

Más aún, nos encontramos que el mejor ajuste a los datos experimentales de [79] efectivamente corresponden a ($K_{S,T_1} = 0$). Esto nos señala que de ser válidos los resultados experimentales levantados por [79] una lectura interesante del modelo aquí propuesto sería

Cuadro 3.6: Parámetros de las funciones de control 3.9-3.15 insertas en las ecuaciones poblacionales 3.1 y 3.2

$K_{S,S} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$K_{T_1,T_1} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$K_{S,T_1} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	S_o	T_{o1}
$7,53 \times 10^{-2}$	$9,58 \times 10^{-2}$	0	17,56	19
$\lambda \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\lambda' \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\beta \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\beta' \text{ (h}^{-1}\text{)}$	n
$1,33 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-1}$	2

que la naturaleza, de alguna forma, procura minimizar el tiempo de tránsito hacia la monoclonalidad.

En resumen, en el modelo propuesto el proceso de renovación de criptas en el régimen homeostático, es resultado del balance regulado de las divisiones simétricas de las células madre (SC-SC y TAC₁-TAC₁).

Los valores numéricos de los parámetros de las funciones de control 3.9-3.15 insertas en las ecuaciones poblacionales 3.1 y 3.2 son mostrados en la Tabla 3.6.

Los resultados mostrados en el trabajo corresponden a estos valores numéricos, que como señalamos previamente se satisfacen las condiciones de estabilidad estructural (frente a variaciones de los propios parámetros) y estocástica (y por tanto frente ruidos *internos*) ajustándose también a los datos obtenidos de reportes experimentales (por ejemplo, como ya fue destacado ($K_{S,T_1} = 0$) resulto ser el mejor ajuste frente a lo reportado por [79]). Vale destacar que también se satisface:

$$M_{S,S}(S_h, T_{h1}) + M_{T_1,T_1}(S_h, T_{h1}) + K_{S,T_1} \approx \frac{1}{24h} . \quad (3.16)$$

Que muestra que la duración del ciclo de una célula madre de alrededor de 24hs (en el estado estacionario (S_h, T_{h1})).

Para el caso de las transitorias de primera generación obtenemos:

$$L_{T_1}(T_{h1}) + P(S_h) \approx \frac{1}{19h} . \quad (3.17)$$

En principio este resultado puede parecer contradictorio con los reportes experimentales que señalan que el ciclo de las transitorias es de alrededor de (10hs-12hs) pero recordemos que eso corresponde al promedio sobre las 6 generaciones de transitorias, y siendo como veremos luego, que esto último se satisface (ver 3.29).

3.3. Resultados

3.3.1. Evolución temporal de la población en el régimen homeostático.

Aquí se mostrarán y discutirán los resultados emergentes de las ecuaciones de evolución poblacional de SCs y TAC₁s. La solución de este sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) tiene un punto fijo estable cuyas coordenadas aproximadas son ($S_h = 15, T_{h1} = 15$) y describe el comportamiento de la población promedio en condiciones homeostáticas (ver Figura 3.1).

Las figuras 3.2 (a) y (b) muestran la solución de las ecuaciones (Eqs.(3.1) y (3.2)) para las poblaciones de células madre normales (S) y transitorias de primera generación (T_1) como función del tiempo partiendo de una condición inicial ($S = 1, T_1 = 1$).

La solución del proceso estocástico surgido a partir de estas ecuaciones diferenciales, fue obtenida mediante un algoritmo basado en el método de Gillespie [32] (ver sec. 2.5).

En las figuras 3.3 (a) y (b) se muestra una realización de la solución estocástica usando el algoritmo ya mencionado de las ecuaciones (Eqs.(3.1) y (3.2)) para las poblaciones de células madre normales (S) y transitorias de primera generación (T_1) como función del tiempo. Se puede apreciar claramente que, si bien las poblaciones son fuertemente fluctuantes, tales fluctuaciones no llevan a la extinción de la cripta. De esta forma se prueba la estabilidad del modelo frente al ruido intrínseco. Además puede verse que las fluctuaciones se producen alrededor de la solución estacionaria del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias asociado (línea gruesa de trazo continuo).

La distribución de probabilidades $P(S)$ para la población S fue calculada a partir de las frecuencias procedentes de las 10^6 simulaciones realizadas. La distribución resultante se muestra en la Fig.3.4.

Su valor medio ($\langle S \rangle$) y su desviación standard (σ) están dadas por:

$$\langle S \rangle = \sum_s S P(S) = 14,54, \quad (3.18)$$

$$\sigma = \sqrt{\langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle} = 3,2. \quad (3.19)$$

3.3.2. Deriva Neutral y tránsito hacia la monoclonalidad

Hasta aquí nos centramos en la construcción de un modelo robusto, en el sentido de garantizar una estabilidad estructural y frente al ruido intrínseco al proceso de renovación. Analicemos ahora un poco más en detalle este proceso de renovación.

En primera instancia todas las células son idénticas (distinguibles pero con igual aptitud) en lo que respecta a los procesos involucrados en el modelo. En principio podríamos tomar a cada célula madre de una población inicial e identificarla (definiendo un clon).

Aquí introducimos la probabilidad condicional de que la célula j (al ser distinguibles podemos etiquetarlas) participe en un proceso, dado que el mismo ocurre.

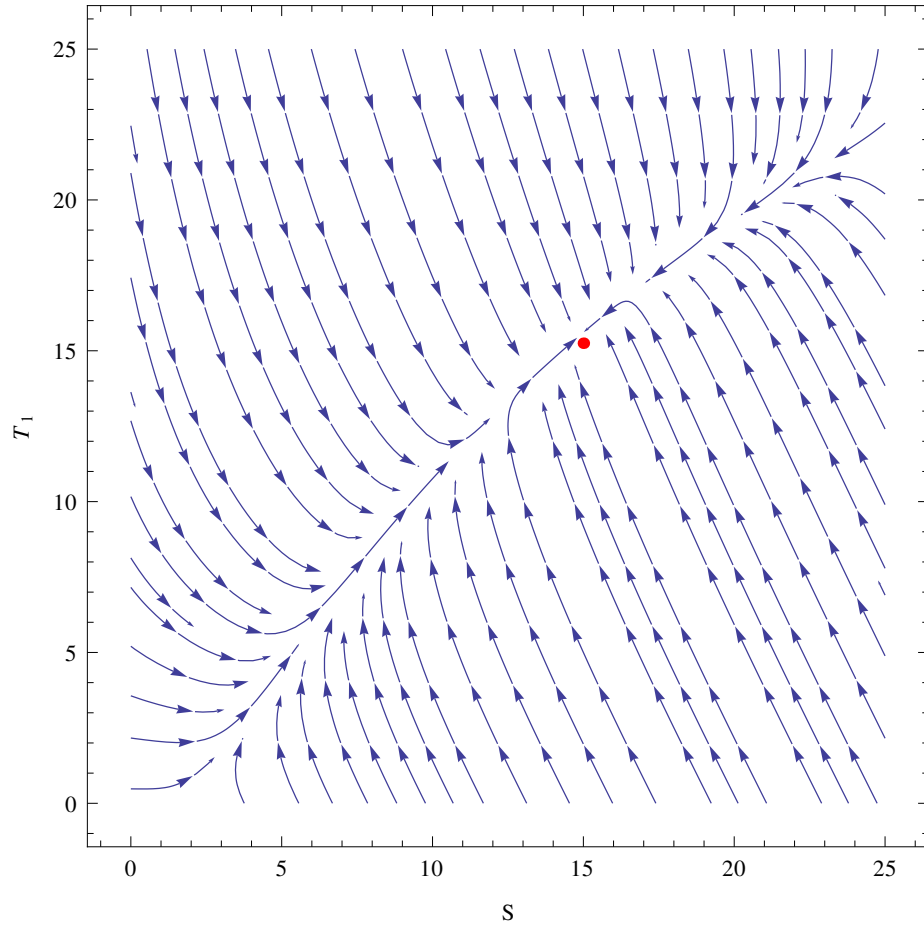


Figura 3.1: Aquí apreciamos las líneas de flujo que señalan la existencia de un atractor estable correspondiente a las poblaciones de células madre (S) y transitorias de 1^{er} generación (T_1). ($S_h \approx 15, T_{h1} \approx 15$)

Para una división simétrica (TAC_1 - TAC_1 o SC - SC), un proceso de apoptosis etc, dicha probabilidad está dada por:

$$\begin{aligned}
 P_S(j/(SC-SC)) &= \frac{1}{S(t)}, \\
 P_S(j/(TAC_1-TAC_1)) &= \frac{1}{S(t)}, \\
 P_S(j/(Apop.)) &= \frac{1}{S(t)};
 \end{aligned}
 \tag{3.20}$$

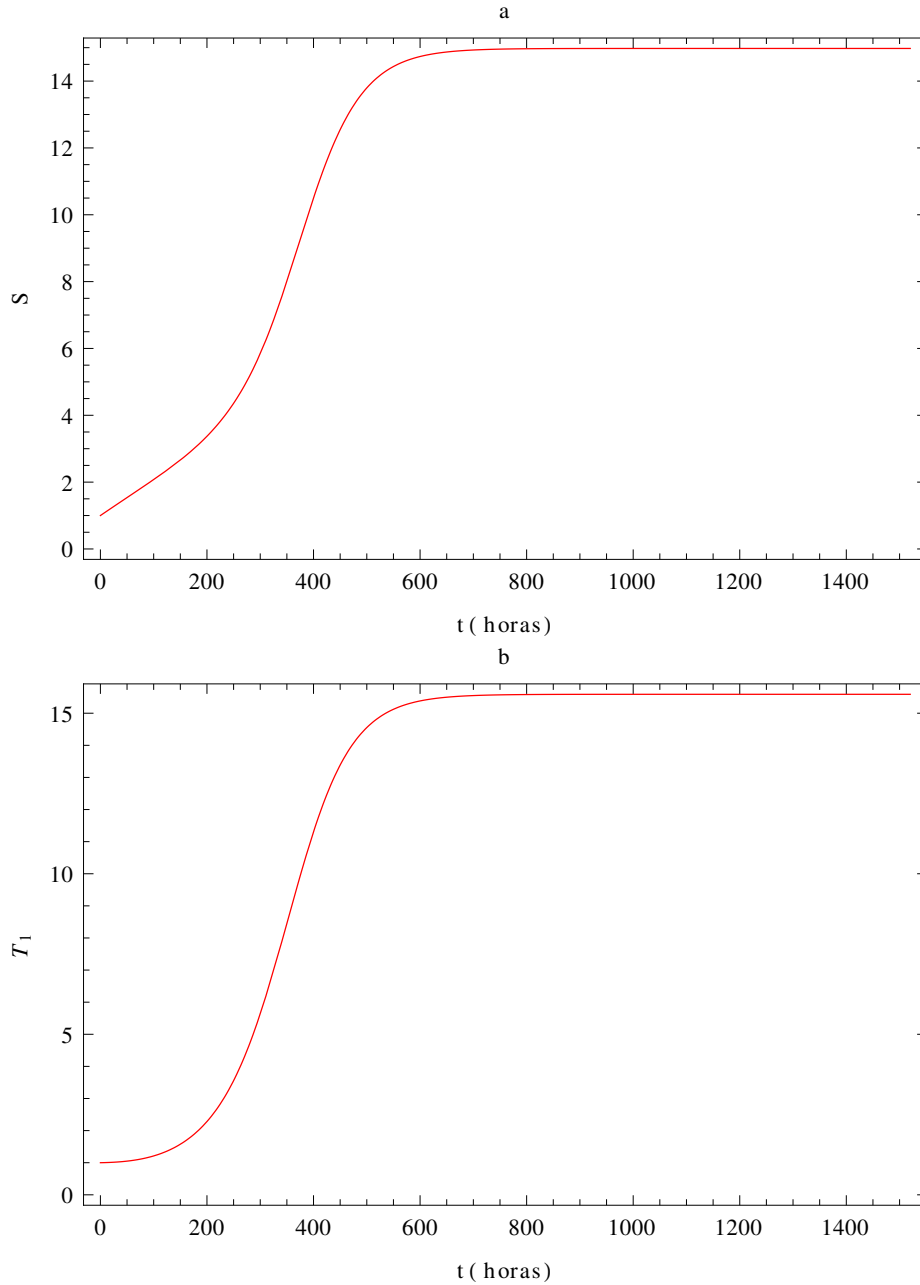


Figura 3.2: Podemos apreciar las poblaciones de células madre (S) y transitorias de 1^{er} generación (T_1) alcanzando el estado estacionario ($S_h \approx 15$, $T_{h1} \approx 15$)

lo mismo vale para los procesos que involucran una TAC_1 :

$$\begin{aligned}
 P_{T_1}(j/(\text{Plast.})) &= \frac{1}{T_1(t)}, \\
 P_{T_1}(j/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) &= \frac{1}{T_1(t)}, \\
 P_{T_1}(j/(\text{Apop.})) &= \frac{1}{T_1(t)}.
 \end{aligned}
 \tag{3.21}$$

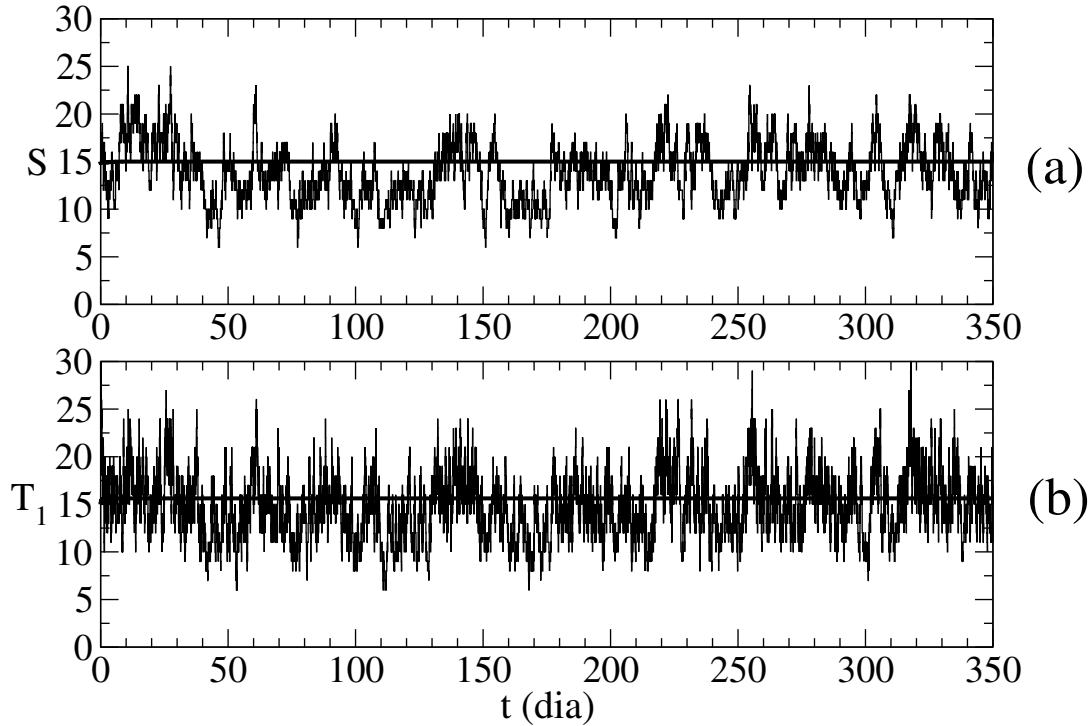


Figura 3.3: (a) Evolución temporal de la población de células madre (S). La línea horizontal en $S = 15$ corresponde a la solución estacionaria del sistema ODES. El ruido alrededor de esta curva corresponde a una realización del proceso estocástico asociado al sistema de ecuaciones diferenciales (ver 2.5).

(b) Idem (a) referido a la población de células transitorias de 1^{ra} generación (T_1).

Como condiciones iniciales vamos a suponer que partimos de N células madre distintas, esto es N clones cada uno con una población inicial de una única célula. Entonces a $t = 0$ tenemos $s_i(0) = 1 \forall i$ con $1 \leq i \leq N$ y, por lo tanto $S(t = 0) = N$. También es posible fijar a $t = 0$, $T_1(t = 0) = N'$ nacidas de las células madre (o sea del mismo clon).

Bajo estas condiciones se determina como evolucionará su descendencia en el tiempo.

A tiempo t , las poblaciones totales $S(t)$ y $T_1(t)$ pueden ser escritas como:

$$\begin{aligned} S(t) &= \sum_i s_i(t), \\ T_1(t) &= \sum_i t_i(t); \end{aligned} \quad (3.22)$$

donde $s_i(t)$ ($t_i(t)$) son las células madre (SCs) (Transitorias amplificadoras de primer generación, TAC₁s) presentes a tiempo t las cuales son descendientes de la i -ésima célula madre original. Entonces, el i -ésimo clon tiene $s_i(t)$ SCs y $t_i(t)$ TAC₁s a tiempo t .

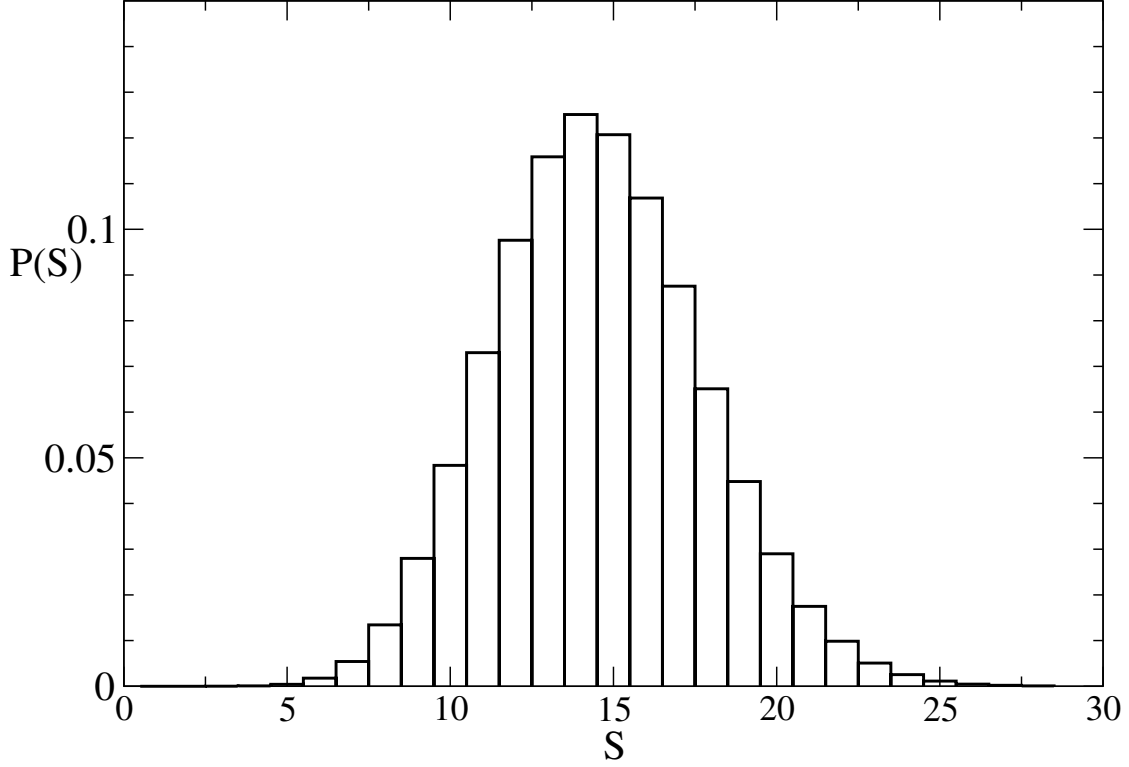


Figura 3.4: Distribución de probabilidades de una población de células madre (S) en régimen homeostático. Esta distribución fue obtenida a partir de 10^6 diferentes realizaciones del proceso estocástico.

Ahora, las probabilidades condicionales de que el clon i –esimo participe en un proceso, dado que el mismo ocurre estarán dadas por:

$$\begin{aligned}
 P_S(i\text{-th clon}/(\text{SC-SC})) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
 P_S(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
 P_S(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{s_i(t)}{S(t)}, \\
 P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Plast.})) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}, \\
 P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}, \\
 P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{t_i(t)}{T_1(t)}.
 \end{aligned} \tag{3.23}$$

De esta manera, al resolver las ecuaciones mediante el algoritmo estocástico, no solo se describe el evento que ocurre a cada paso, sino que también se elige aleatoriamente el clon participante en cada caso.

El tamaño promedio de los clones, $\langle q \rangle$ esta definido por:

$$q(t) = \frac{\sum_i s_i(t)}{M(t)} ; \quad (3.24)$$

donde $M(t)$ es el número de clones a tiempo t . Inicialmente tenemos $q(0) = 1$ ya que partimos de N clones con una célula madre cada uno.

Si bien debido a las fluctuaciones q para una sola cripta resulta igualmente fluctuante, es válido afirmar que por su propia definición es una magnitud creciente y acotada ($1 \leq q(t) \leq N(t)$). Se calculó la media $\langle q(t) \rangle$ sobre 10^6 criptas comenzando con 15 clones distintos con una célula madre cada uno a tiempo $t = 0$.

En la figura 3.5 se muestra la evolución temporal de $\langle q \rangle$.

El panel (a) muestra $\langle q \rangle$ para tiempos cortos junto a los datos experimentales obtenidos de [79]. Vale remarcar que la sola existencia de divisiones asimétricas SC-TAC₁ (i.e $K_{S,T_1} > 0$) en Eq.3.2 lleva a un menor acuerdo con los resultados respecto de los datos experimentales obtenidos.

En el panel (b) mostramos la curva completa.

Para evaluar el tiempo característico de tránsito hacia la monoclonalidad, se realizó un ajuste de la curva como:

$$\langle q(t) \rangle = 14,54(1 - \exp(-t/\tau)), \quad (3.25)$$

obteniéndose $\tau = 25,56$ días como el valor óptimo de dicho ajuste.

Otra forma de evaluar el tiempo de tránsito hacia la monoclonalidad consiste en calcular la fracción de criptas monoclonales f como función del tiempo t en un ensamble de ellas (los resultados presentados fueron calculados sobre un ensamble de tamaño 10^6).

La figura 3.6 muestra dicha fracción. Para calcular el tiempo característico aquí se realizó un ajuste de la curva:

$$f(t) = \frac{t^p}{(t_m^p + t^p)}. \quad (3.26)$$

obteniendo $p = 3,04$ y $t_m = 34,32$ días, donde t_m representa el tiempo en el que la mitad de las criptas resultan ser monoclonales y $\frac{p}{t_m}$ es proporcional a la velocidad del proceso en dicho instante ($f'(t_m) = \frac{p}{4t_m} = 0,022 \frac{1}{d}$).

3.3.3. Análisis del resto de compartimentos de la cripta.

Mostraremos ahora los resultados correspondientes al resto de los compartimentos de la cripta (Eq (3.3 - 3.8)) los cuales son alimentados por los dos primeros compartimentos. Como ya discutimos, evaluamos y mostramos previamente la monoclonalidad solo depende de esos dos primeros compartimentos.

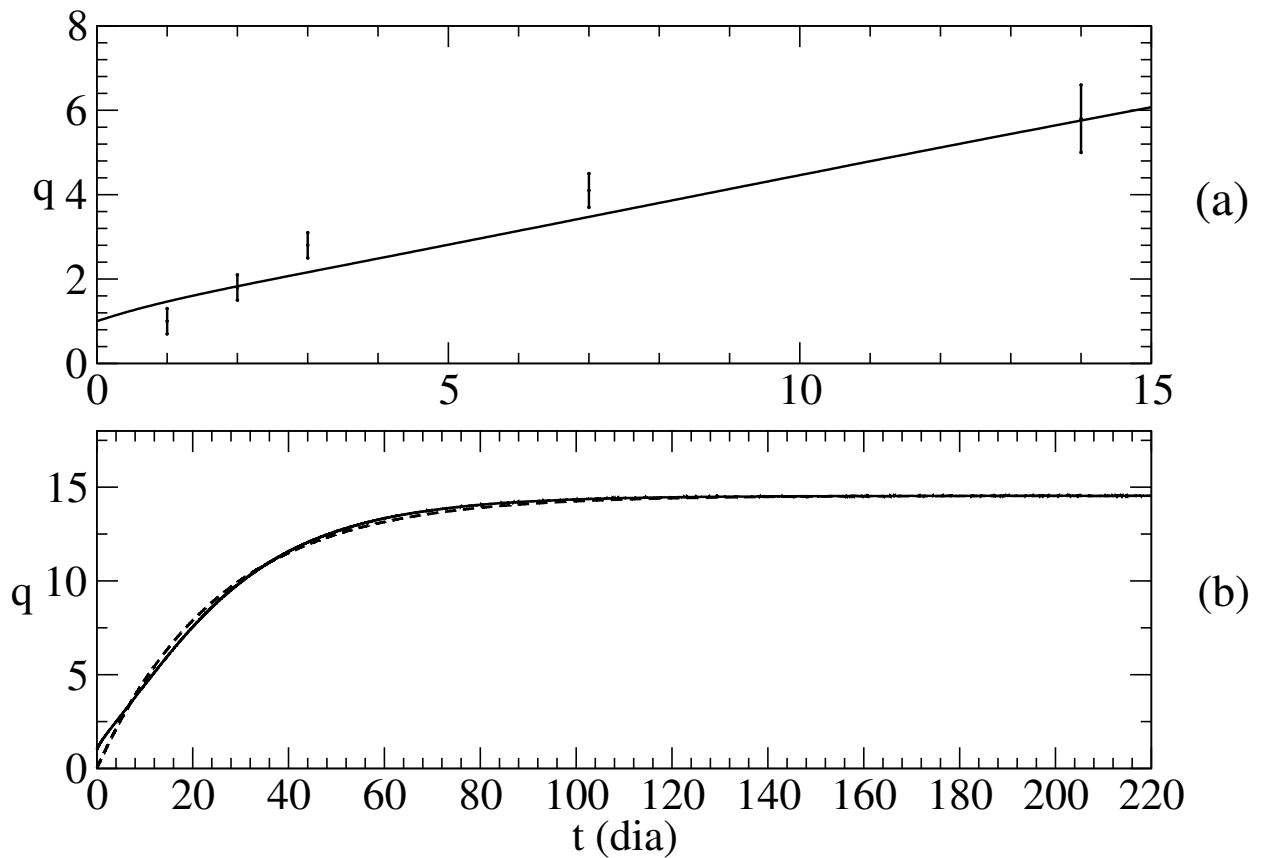


Figura 3.5: (a) Tamaño medio de $\langle q \rangle$ para tiempos cortos los puntos con sus respectivas barras de errores corresponden a datos experimentales reportados por [79]. Notar que la curva teórica se ha obtenido suponiendo que la tasa de divisiones asimétricas es nula. Introducir una tasa $K_{S,T_1} > 0$ empeora el acuerdo con los datos experimentales.

(b) Misma curva que en (a) pero para tiempos en los cuales se alcanza el régimen homeostático (curva continua). La curva a trazos corresponde al mejor ajuste (fiteo) de la forma funcional $\langle q(t) \rangle = 14,54(1 - \exp(-t/\tau))$ siendo $\tau = 25,56$ días.

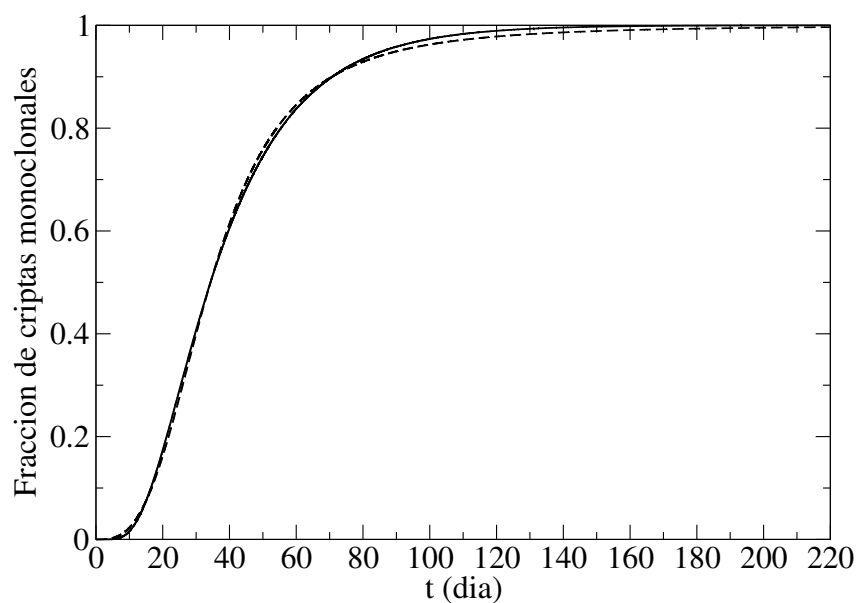


Figura 3.6: Fracción de las criptas monoclonales como función del tiempo (curva continua). Para determinar el tiempo característico se realizó un ajuste (fiteo) de la curva con la función $f(t) = \frac{t^p}{(t_m^p + t^p)}$ obteniendo de dicho ajuste los parámetros $p = 3,04$ y $t_m = 34,32$ días, siendo t_m el tiempo en el que la mitad de las criptas alcanzan el estado monoclonal (curva a trazos)

A partir de aquí ya no hay posibilidad de revertir el destino clonal del proceso ya que cada división celular produce células cada vez más comprometidas en el proceso de diferenciación. Dicho en otras palabras, a partir de la segunda generación de células transitorias amplificadoras (TACs) no hay procesos de reprogramación celular (plasticidad) que puedan revertir su destino.

Aquí (TAC_{*i*} 2 ≤ *i* ≤ 6) las únicas variaciones en el proceso poblacional solo dan lugar la producción a partir de una TAC de una generación anterior o su desaparición ya que cada mitosis solo da lugar a una TAC de generaciones posteriores o a una célula completamente diferenciada (esto último a partir de la cuarta generación).

Por supuesto que simultáneamente a esto ocurren complejos procesos en los cuales intervienen interacciones entre distintas células, gradientes externos, etc donde se define el destino final funcional de cada célula, dando lugar a distintos fenotipos de las células diferenciadas. Los detalles y precisiones de este proceso quedan excluidos del presente modelo.

Ahora supongamos que las tasas de estos procesos quedan regulados por:

$$L_{T_i}(T_i) = \gamma_i + \frac{B_i T_i}{T_{0i} + T_i} \quad \forall \quad 2 \leq i \leq 6. \quad (3.27)$$

Hasta el desarrollo de este trabajo no se tiene conocimiento de resultados experimentales sobre las poblaciones de equilibrio detalladas de cada generación de células transitorias TAC_{*i*}, ni tampoco sobre las fracciones de divisiones celulares que dan origen a las células diferenciadas (DC) en las generaciones 4 y 5. Por ese motivo los parámetros involucrados en dichos procesos fueron elegidos de forma tal de resultar compatibles con los valores promedio conocidos previamente citados [63, 61, 46, 96, 64, 6, 23, 71] (en líneas generales hay un cierto acuerdo en diferentes trabajos experimentales en que la población de las criptas es alrededor de 300 células de las cuales unas 15 serían células madre).

Lo relevante es ver que manejándonos con una elección razonable de los parámetros se verifica la existencia de un punto fijo para las ecuaciones que *gobiernan* las poblaciones celulares de las criptas, siendo estas poblaciones estables frente al *ruido interno*

Cuadro 3.7: Parámetros de las Eqs.(3.3 - 3.8) y 3.27 usados en los cálculos

<i>i</i>	2	3	4	5	6
$\gamma_i \quad (h^{-1})$	$3,8 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-1}$	$5,063 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-1}$
$B_i \quad (h^{-1})$	$3,8 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-1}$	$5,063 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-1}$
T_{0i}	20	20	20	20	20

α_{T_5, T_5}	$\alpha_{D, D}$	$\alpha_{T_5, D}$	α'_{T_6, T_6}	$\alpha'_{D, D}$	$\alpha'_{T_5, D}$	$A_D \quad (h^{-1})$
0,1	0,8	0,1	0,1	0,8	0,1	0,1

Como ya señalamos los datos experimentales para determinar los parámetros son dispersos. Teniendo esto en cuenta los parámetros fueron determinados para satisfacer ciertos valores medios sobre los que se encuentra algún consenso y resultan razonables.

Estas condiciones a satisfacer fueron las siguientes:

- La población total, alcanzado el régimen homeostático, es de alrededor de 300 células:

$$S_h + \sum_{i=1}^6 T_{hi} + D_h \approx 300. \quad (3.28)$$

donde S_h , T_{hi} y D_h son las poblaciones medias alcanzadas en el estacionario correspondientes al régimen homeostático.

- La población total de diferenciadas es de alrededor de 150 ($D_h \approx 150$)
- El promedio del ciclo celular sobre todas las TACs es de alrededor de 10 hs:

$$\frac{[A_{T_1}(T_{h1}) + P(S_h)] T_{h1} + \sum_{i=2}^6 L_{T_i}(T_{hi}) T_{hi}}{\sum_{i=1}^6 T_{hi}} \approx \frac{1}{10h}. \quad (3.29)$$

En tales condiciones los resultados de todas las poblaciones medias alcanzadas en el régimen homeostático se muestran en la siguiente tabla:

Cuadro 3.8: Poblaciones medias de cada uno de los *tipos* celulares en régimen homeostático

S_h	T_{h1}	T_{h2}	T_{h3}	T_{h4}	T_{h5}	T_{h6}	D_h	N_{hT}
15	15,62	24,54	24,54	24,54	26,88	24,54	158,41	314,07

En la figura 3.8 se muestran los valores medios de estas poblaciones y sus fluctuaciones en una realización de la ecuación maestra asociada. En la figura 3.9(a) se hace lo mismo con la población total N_T de una cripta. En la figura 3.9(b) se muestra la distribución de la población N_T .

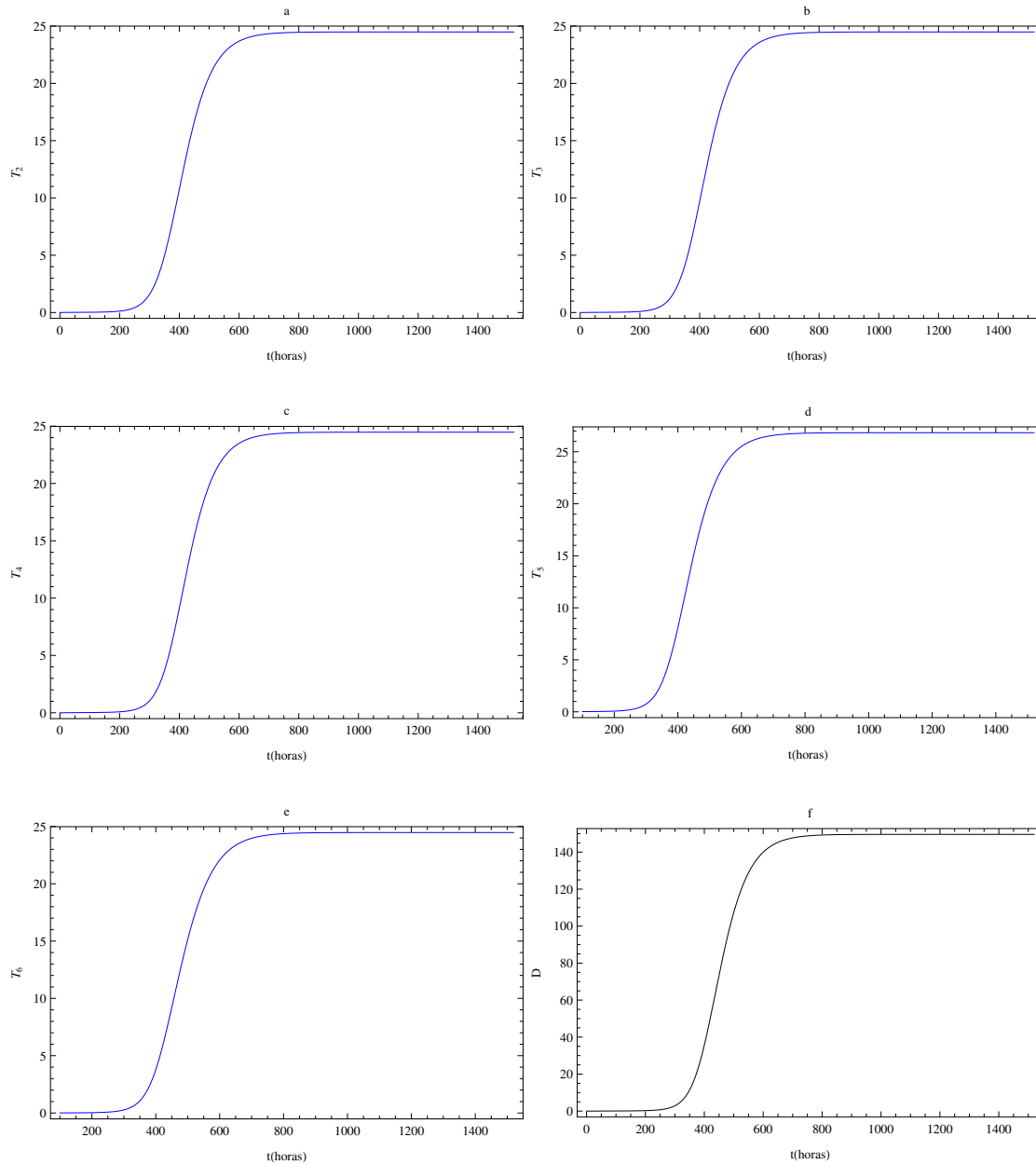


Figura 3.7: Aquí vemos las poblaciones de las células transitorias amplificadoras (desde la 2^{da} a la 6^{ta} generación) y la población de diferenciadas alcanzando el estado estacionario. (a) TAC₂. (b) TAC₃. (c) TAC₄. (d) TAC₅. (e) TAC₆. (f) Completamente diferenciadas (D). Estas poblaciones de equilibrio en el estado estacionario corresponden a los valores medios en el régimen homeostático.

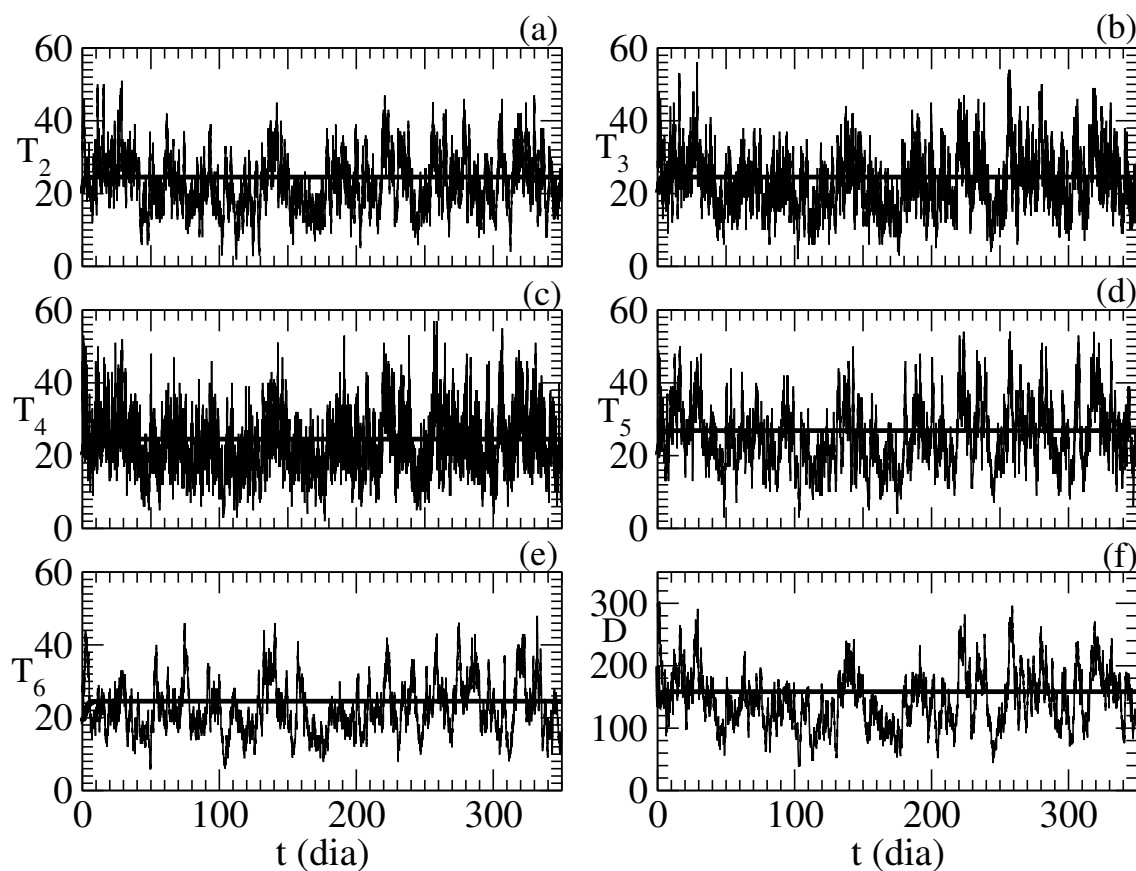


Figura 3.8: Población celular como función del tiempo. En las figuras (a)-(e) se aprecian las poblaciones de células transitorias amplificadoras de la generación indicada. (a) TAC_2 . (b) TAC_3 . (c) TAC_4 . (d) TAC_5 . (e) TAC_6 . (f) Células completamente diferenciadas (D). Las líneas horizontales corresponden a las poblaciones de equilibrio (Solución estacionaria del sistema ODES) y las fluctuaciones a una simulación del proceso estocástico asociado.

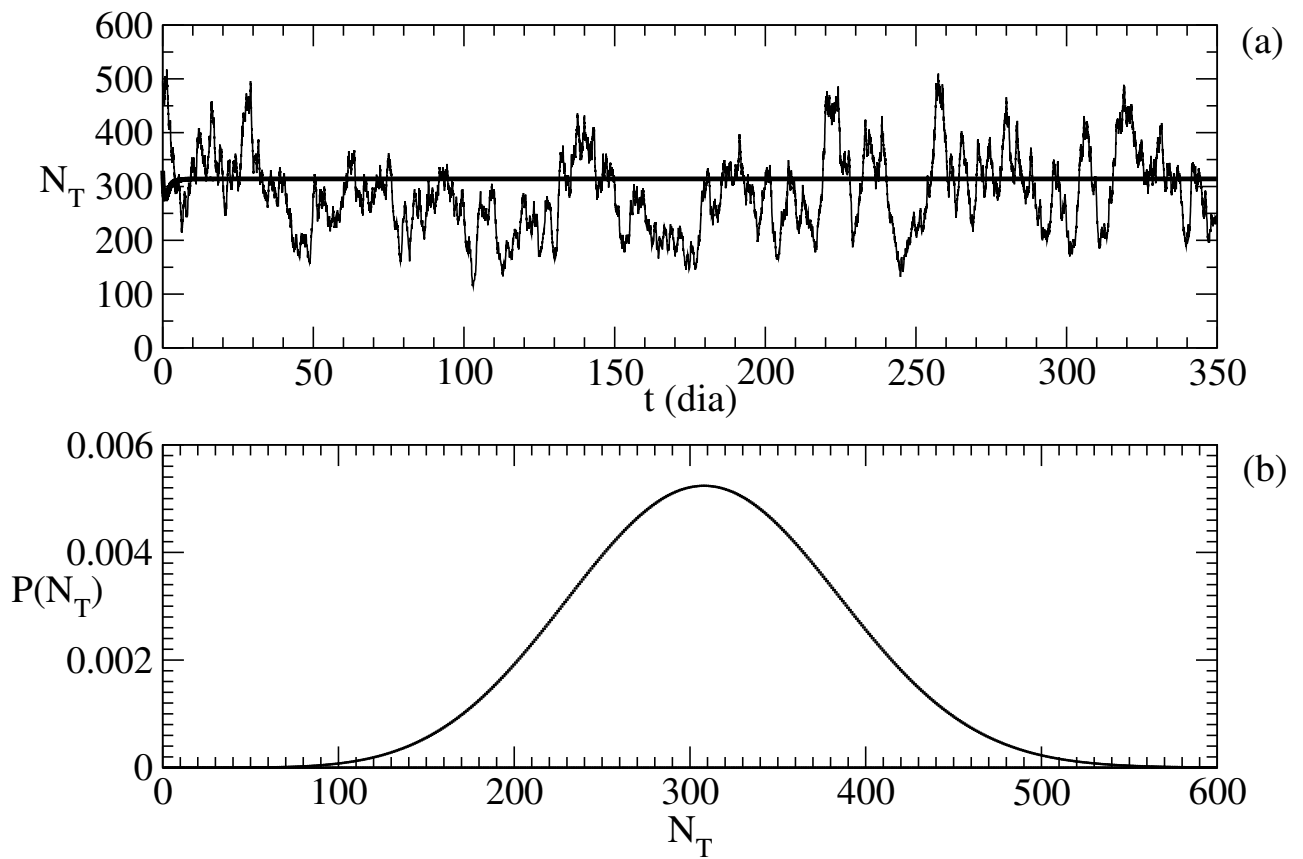


Figura 3.9: (a) Población total celular de una cripta ($N_T = S + \sum_{i=1}^6 T_i + D$) en función del tiempo (t). La línea horizontal corresponde a la población de equilibrio obtenida del sistema de ecuaciones diferenciales.

(b) Frecuencia relativa de la población total (N_T) sobre 10^6 realizaciones

3.4. Conclusiones.

Nos hemos centrado en presentar un modelo robusto no solo estructuralmente (frente a variaciones de los parámetros del sistema) sino también frente a las fluctuaciones intrínsecas a la propia dinámica de renovación.

Alcanzado el régimen homeostático se verificó que en el modelo estocástico se producen fluctuaciones alrededor de una población media que resulta ser la solución estacionaria del sistema de ecuaciones diferenciales asociado. Más allá de las fluctuaciones estocásticas el modelo se muestra estable ante las mismas.

Se puede apreciar claramente que alcanzado el régimen homeostático se llega a un estado monoclonal, siendo algo propio de la dinámica del proceso.

Resulta algo remarcable el hecho de que los datos experimentales llevan, en el modelo propuesto y de acuerdo a un ajuste con los datos experimentales reportados [79] a una tasa nula de divisiones asimétricas. Siendo estos resultados susceptibles de interpretarse como que la dinámica de renovación de las criptas, en régimen homeostático, procura minimizar el tiempo de tránsito hacia la monoclonalidad.

El proceso de tránsito hacia la monoclonalidad es representado y cuantificado en las figuras 3.5 y 3.6.

Este proceso de fluctuaciones estocásticas que lleva a la monoclonalidad puede eventualmente fijar o extinguir un clon mutante. En caso de producirse la fijación de un clon mutante esto podría manifestarse en disfuncionalidades diversas según la mutación en cuestión. Esto será abordado más profundamente en el siguiente capítulo.

Con el presente modelo se consigue explicar en forma consistente el proceso de acceso a la monoclonalidad como resultado de la deriva neutral y a la vez el acceso al régimen homeostático que aún sometido a fuertes fluctuaciones resulta estable ante las mismas.

Capítulo 4

Mutaciones en las criptas colónicas y ruptura de la neutralidad

4.1. Deriva Neutral y Mutaciones

En el capítulo previo se mostró que la deriva neutral conduce, ineludiblemente, a la monoclonalidad.

En el ejemplo exhibido el estado inicial de la cripta consistía en 15 clones con una población de una célula madre (SC) y una transitoria de primera generación (TAC_1) cada uno. Luego de dejarlo evolucionar alcanzamos un estado final en el que todas las células madre presentes (al igual que las transitorias de primera generación) correspondían a un único clon. Tal como mostramos en el capítulo anterior la dinámica de renovación del modelo propuesto lleva naturalmente a la monoclonalidad y resulta acorde a los resultados experimentales de diversos trabajos [79, 35, 59, 30].

En el presente capítulo generalizamos al modelo presentado la posibilidad de ocurrencia de mutaciones que afecten diversos parámetros de la dinámica celular en el proceso de renovación.

Nos interesa ahora analizar que es lo que sucede cuando uno de los clones que intervienen en la dinámica de renovación es sometido a alguna mutación o alteración que lo lleva a adquirir un comportamiento en la dinámica de renovación diferente del resto de los clones (lo cual se traduce en parámetros que definen la dinámica de renovación distintos del resto de los clones). Para eso en este capítulo nos centramos en mutaciones que afectan las tasas de los diversos procesos que juegan en la dinámica. Más precisamente, las mutaciones que consideraremos son diversas combinaciones para afectar las tasas de ocurrencia de los procesos en juego (divisiones simétricas, apoptosis, etc). A modo de ejemplo, en el caso (3) de la siguiente sección consideramos una mutación que incrementa la fracción de mitosis $SC - SC$ respecto de las $TAC_1 - TAC_1$ en comparación al resto de los clones.

Un comentario aparte (debido al resultado anti-intuitivo al que llevan, como veremos más adelante) merecen las dos primeras mutaciones que son presentadas en la siguiente sección.

Estas mutaciones consisten en afectar **todos** los procesos (divisiones simétricas, apoptosis, etc) en igual proporción lo cual tiene como consecuencia que la célula mutante adquiera una frecuencia de ocurrencia mayor (menor) que el resto de las células. En este sentido estos procesos serán más (menos) eficientes que el resto de los clones. Otra forma de verlo es que el ciclo mitótico del clon mutante resulta ser más rápido (lento) que el de los clones normales. En definitiva se está afectando la frecuencia de ocurrencia de los eventos.

Las frecuencias relativas de monoclonalidad propias de cada clon $f(i)$ con $i = 1, 2, \dots, 15$ son iguales en un escenario neutral en el que todos los clones de las células madre intervinientes son igualmente aptos, en particular en el ejemplo propuesto $f(i) = 1/15 \quad \forall 1 \leq i \leq 15$, como puede verse en la Fig:4.1(a) obtenida a partir de los resultados de las simulaciones realizadas.

Consideremos ahora que, debido a alguna mutación, alguno de los 15 clones tiene una conducta adaptativa diferenciada del resto. Podemos asumir, sin pérdida de generalidad, que dicho clon es etiquetado como el 15. Las probabilidades condicionales dadas por Eqs.(3.23) dejan de ser válidas, siendo reemplazadas por las expresiones:

$$\begin{aligned}
 P_S(15 \text{ clon}/(\text{SC-SC})) &= \frac{m_1 s_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_1 s_{15}(t)}, \\
 P_S(15 \text{ clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) &= \frac{m_2 s_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_2 s_{15}(t)}, \\
 P_S(15 \text{ clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{m_3 s_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_3 s_{15}(t)}, \\
 P_{T_1}(15 \text{ clon}/(\text{Plast.})) &= \frac{m'_1 t_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_1 t_{15}(t)}, \\
 P_{T_1}(15 \text{ clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) &= \frac{m'_2 t_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_2 t_{15}(t)}, \\
 P_{T_1}(15 \text{ clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{m'_3 t_{15}(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_3 t_{15}(t)};
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

donde m_k y m'_k para $k = 1, 2, 3$ son los parámetros vinculados a la mutación.

Para los otros clones ($i = 1, \dots, 14$) las modificaciones son:

$$\begin{aligned}
P_S(i\text{-th clon}/(\text{SC-SC})) &= \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_1 s_{15}(t)}, \\
P_S(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_1\text{-TAC}_1)) &= \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_2 s_{15}(t)}, \\
P_S(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{s_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} s_j + m_3 s_{15}(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Plast.})) &= \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_1 t_{15}(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{TAC}_2\text{-TAC}_2)) &= \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_2 t_{15}(t)}, \\
P_{T_1}(i\text{-th clon}/(\text{Apop.})) &= \frac{t_i(t)}{\sum_{j=1}^{14} t_j + m'_3 t_{15}(t)}.
\end{aligned} \tag{4.2}$$

Notar que, si todos los m_k y m'_k fueran iguales a uno en Eqs.(4.1) y (4.2) recuperaríamos las Eqs.(3.23).

Consideremos que se parte de un estado inicial en el que $s_i(0) = t_i(0) = 1 \forall 1 \leq i \leq 15$. Dicho coloquialmente tenemos una población determinada de 15 clones distinguibles siendo que cada uno de ellos tiene una célula madre (SC) y una transitoria de primera generación (TAC₁). Si se lo deja evolucionar un tiempo suficiente se verifica que al acceder al régimen homeostático se llega a un estado tal que $s_i(t) = 0$ y $t_i(t) = 0 \forall i \neq k$ para un k cualquiera. Resultando por lo tanto:

$$\begin{aligned}
S(t) &= s_k(t), \\
T_1(t) &= t_k(t).
\end{aligned} \tag{4.3}$$

Esto es que llegado el régimen homeostático toda la población sera descendiente de un único clon (el clon k). Si $k \neq 15$ la cripta sera normal, en caso contrario la cripta habrá sufrido una mutación. En este último caso ($k = 15$) las ecuaciones diferenciales serán las mismas (ver: 3.1 - 3.2) pero con los parámetros propios de la mutación dados por:

$$K_{S,S}^{(m)} = m_1 K_{S,S}, \quad K_{T_1,T_1}^{(m)} = m_2 K_{T_1,T_1}, \quad \lambda^{(m)} = m_3 \lambda, \tag{4.4}$$

$$\beta^{(m)} = m'_1 \beta, \quad \beta'^{(m)} = m'_2 \beta', \quad \lambda'^{(m)} = m'_3 \lambda'. \tag{4.5}$$

Es así que, debido a la eventual fijación de un clon mutante, se pueden producir variaciones en las poblaciones de equilibrio y por ende afectarse la estabilidad de las mismas (siendo posible la extinción de la población de una cripta en algún caso).

En la siguiente sección pasaremos a analizar diversos escenarios ante posibles mutaciones.

4.2. Análisis de las posibles mutaciones que eventualmente modifiquen algunos de los parámetros de la dinámica de renovación.

Consideremos 7 posibles mutaciones vinculadas a la variación de los parámetros m_i y m'_i .

$$(1) m_i = m'_i = 4 \quad \forall 1 \leq i \leq 3$$

Esto significa que las células madre (S) y las células transitorias de primera generación (T_1) del clon 15 son cuatro veces más *eficientes* que los otros clones en el proceso considerado (para ser más precisos hablamos de eficiencia en términos de que su tasa de renovación es cuatro veces mayor que la de los clones normales). Las consecuencias de esta mutación pueden apreciarse en la Fig.4.1(b). Lo que vemos aquí es que esta mutación termina conspirando contra la fijación del clon mutante ya que la probabilidad de fijación del mismo disminuye considerablemente frente a cualquiera de los clones *normales*. En caso de fijación del clon mutante la configuración del equilibrio resulta invariante, aunque la renovación de dicha cripta es más rápida.

$$(2) m_i = m'_i = 0,25 \quad \forall 1 \leq i \leq 3$$

Aquí tenemos lo que sería la mutación *opuesta* a la anterior, el clon mutante posee un cuarto de la *eficiencia* del resto de los clones en todo el proceso (en otras palabras la tasa de renovación del clon mutante es 1/4 de la tasa de renovación de los clones normales). Efectivamente, en este caso, la mutación resulta favorable a la fijación de dicho clon Fig.4.1(c) (la probabilidad de fijación del clon mutante es apreciablemente superior a la del resto). Al igual que en el caso anterior, la fijación del clon mutante deja invariante la configuración del equilibrio, aunque en dicho caso la renovación de la cripta resulta más lenta.

$$(3) m_1 = 1,5 \quad m_2 = 0,5 \quad m_3 = m'_i = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3$$

En este caso la mutación incrementa la fracción de mitosis SC-SC respecto de las TAC₁-TAC₁ en comparación con el resto de clones. Como es de esperar la frecuencia monoclonal del clon mutante se incrementa pronunciadamente Fig.4.1(d). Obsérvese el cambio de escala en en el eje de las ordenadas). En caso de que el régimen monoclonal sea establecido por el clon mutante la configuración de equilibrio sí se vería afectada, siendo que el atractor del sistema de ecuaciones diferenciales resultaría ser el *punto* ($S_s = 26,98, T_{s1} = 17,87$), resultando entonces las poblaciones en el régimen homeostático fluctuantes alrededor de dichos valores.

$$(4) m_1 = 0,5 \quad m_2 = 1,5 \quad m_3 = m'_i = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3$$

Al contrario del caso anterior, esta mutación disminuye la fracción de mitosis SC-SC y aumenta las mitosis TAC₁-TAC₁ en comparación con el resto de clones. En consecuencia la frecuencia monoclonal del clon mutante decrece considerablemente ($2,2 \times 10^{-5}$). Esto resulta tres ordenes de magnitud más chico que en el caso un clon normal ($7,2 \times 10^{-2}$) Fig.4.1(e). En caso de que el régimen monoclonal sea establecido por el clon mutante el atractor del sistema de ecuaciones diferenciales resulta ser el *punto* ($S_s = 8,4, T_{s1} = 11,22$) y por lo tanto la población celular fluctuará alrededor de estos valores.

$$(5) m_i = m'_3 = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3 \quad m'_1 = 0,9 \quad m'_2 = 1,1$$

Esta mutación afecta las tasas de mitosis de las transitorias de primera generación TAC₁ en lugar de las células madre. Más precisamente la mutación implica una perdida de plasticidad en favor de una mayor mitosis TAC₂-TAC₂ que en el resto de clones. Esto lleva a que la frecuencia monoclonal del clon mutante decrezca Fig.4.1(f). En caso de fijarse el clon mutante, la configuración de equilibrio se ve afectada y el punto fijo resulta ser $S_s = 13,5, T_{s1} = 14$.

$$(6) m_i = m'_3 = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3 \quad m'_1 = 1,1 \quad m'_2 = 0,9$$

Como en el caso anterior, con esta mutación, se ven afectadas las tasas de las TAC₁s pero no las de las SCs. Pero contrariamente al caso previo el clon mutante gana plasticidad a costa de una menor mitosis TAC₂-TAC₂ que el resto. En consecuencia, la frecuencia monoclonal del mutante se incrementa Fig.4.1(g) y el atractor en caso de fijarse el clon mutante resulta ser $S_s = 16,67, T_{s1} = 17,42$.

$$(7) m_i = m'_2 = m'_3 = 1 \quad \forall 1 \leq i \leq 3 \quad m'_1 = 0$$

En este caso en el mutante se produce una pérdida completa de la plasticidad. Esto produce una drástica caída en la probabilidad de fijación del mutante ($6,36 \times 10^{-4}$, dos ordenes de magnitud menos que en el caso de los clones normales $7,14 \times 10^{-2}$, como puede apreciarse en Fig.4.1(h)). A diferencia de los casos previos aquí se produce un cambio en el carácter estable del atractor, perdiendo el mismo dicha estabilidad (esto tiene su interpretación biológica en la *pérdida de estabilidad de la cripta*) lo que lleva a una pronta extinción de la misma en caso de fijarse el clon mutante (ver Apéndice B). La Fig 4.1(i) corresponde a la frecuencia de fijación de los clones que sobreviven. Para clarificar este punto, en las Fig.4.2 (b) y (c) reproducimos los mismos gráficos reescalando el eje de las ordenadas Figura 4.2(a) muestra la fracción de criptas sobrevivientes a la extinción como función del tiempo. Como puede apreciarse $\frac{6}{10000}$ de las criptas se extinguen, y esto no es otra cosa que la frecuencia de fijación del clon mutante (ver Fig.4.2 (b)).

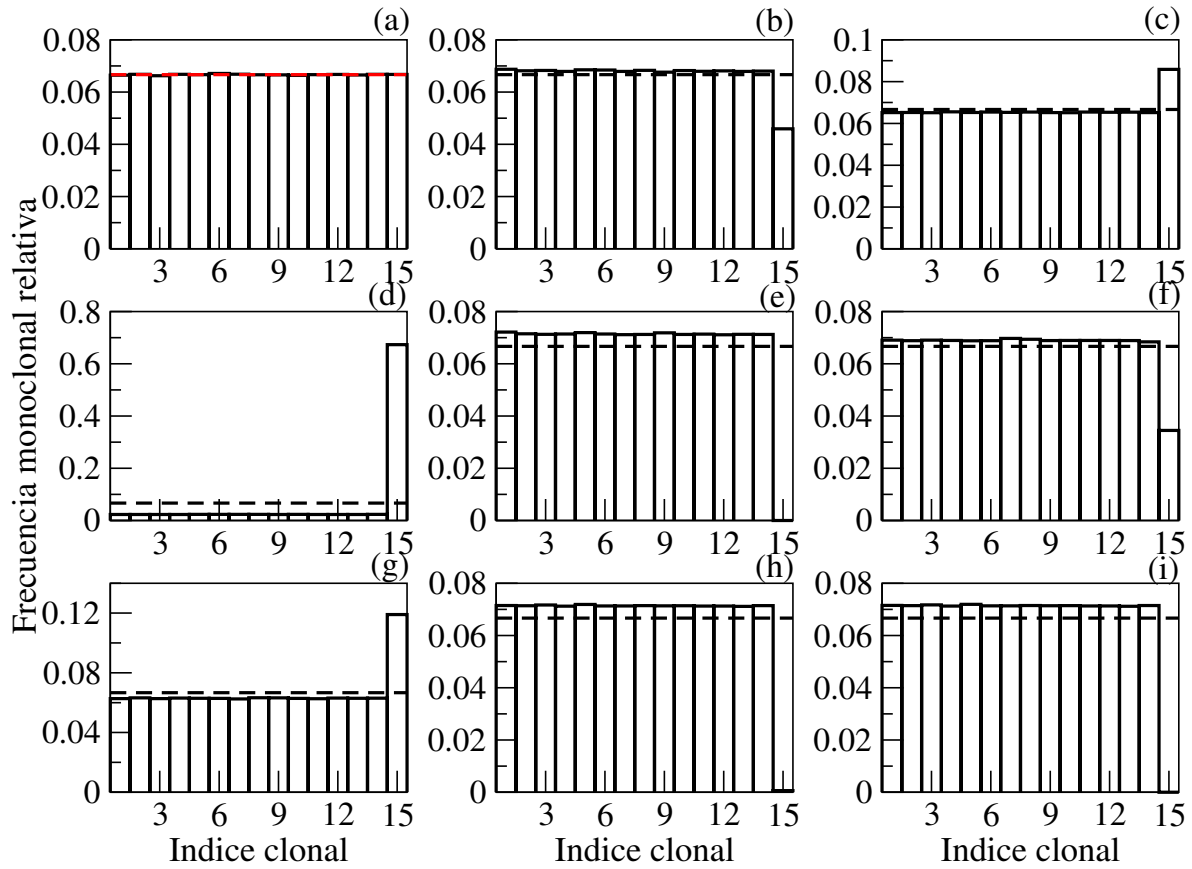


Figura 4.1: Frecuencias de fijación relativa de cada clon. En todos los casos del (b) en adelante el clon mutante corresponde al 15. (a) Todos los clones son idénticos. (b) $m_i = m'_i = 4$, $\forall 1 \leq i \leq 3$. (c) $m_i = m'_i = 1/4$, $\forall 1 \leq i \leq 3$. (d) $m_1 = 1,5, m_2 = 0,5, m_3 = m'_i = 1$, $\forall 1 \leq i \leq 3$. (e) $m_1 = 0,5, m_2 = 1,5, m_3 = m'_i = 1$, $\forall 1 \leq i \leq 3$. (f) $m_i = m'_3 = 1$, $\forall 1 \leq i \leq 3, m'_1 = 0,9, m'_2 = 1,1$. (g) $m_i = m'_3 = 1, i = 1, 2, 3, m'_1 = 1,1, m'_2 = 0,9$, (h) $m_i = m'_2 = m'_3 = 1, i = 1, 2, 3, m'_1 = 0$. (i) Idem que en (h) pero para las criptas sobrevivientes.

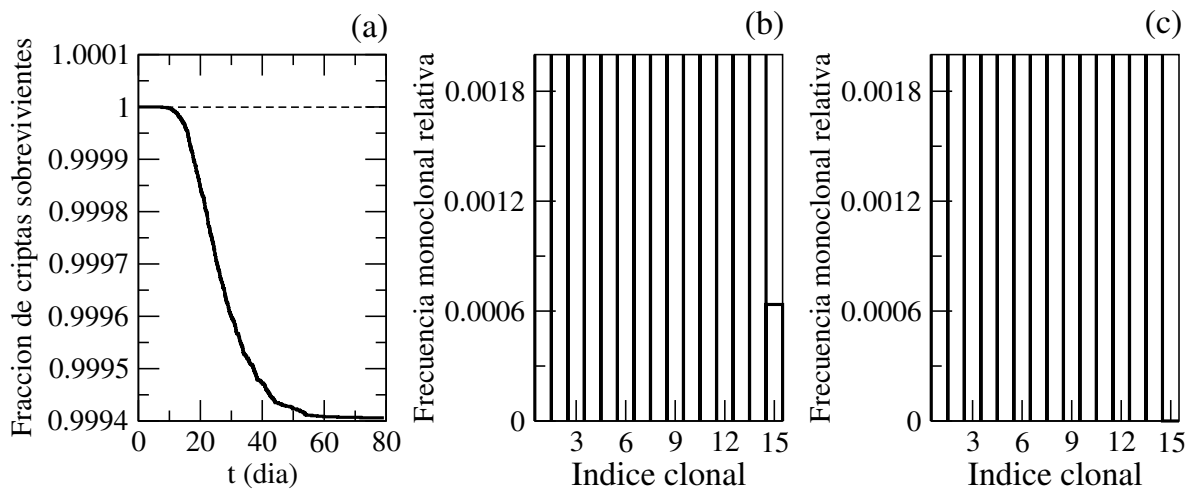


Figura 4.2: (a) Fracción de las criptas sobrevivientes en función del tiempo cuando el clon mutante tiene plasticidad nula ($m'_1 = 0$). Las criptas que se extinguen corresponden a aquellos casos en los que se fija el clon mutante.

(b) Corresponde al mismo gráfico que el de la Fig 4.1 (h) pero con una escala más precisa en el eje de las ordenadas. Se puede ver claramente que la fracción de criptas extintas coincide con la frecuencia de fijación del clon mutante ($\frac{6}{10000}$).

(c) Corresponde al mismo gráfico que el de la Fig 4.1 (i) pero con una escala más precisa en el eje de las ordenadas.

4.3. Discusión y conclusiones

Hemos generalizado el modelo del capítulo previo, realizando un análisis detallado de como se ve afectada la dinámica de las criptas ante las distintas mutaciones con una conducta adaptativa diferenciada.

Esto permitió analizar no solo como se ve afectado el régimen homeostático en los casos en los que se fije una mutación sino la probabilidad de que tal evento suceda. Este enfoque permitió desacoplar dos aspectos afectados por las mutaciones que rompen con la neutralidad:

- Por un lado tenemos la *eficiencia* del clon mutante en fijarse (esta *eficiencia* está vinculada a la probabilidad de fijarse de dicho clon. Es importante subrayar que sin embargo no es la *eficiencia* de las mutaciones como nos referimos arriba, donde se hacía referencia a su *velocidad* o *frecuencia de renovación*).
- El segundo aspecto a resaltar es como, fijada una mutación, se modifican (o no) las poblaciones del régimen homeostático.

Se planteó un modelo compartimental para la evolución de las distintas poblaciones celulares en las criptas colónicas. Dicho modelo consta de ocho ecuaciones diferenciales, asociadas a la población de las células madre (SC), las correspondientes a las células transitorias amplificadoras (TAC, seis generaciones) y las células completamente diferenciadas (DC). Las ecuaciones las células madre S y las transitorias de primera generación T_1 están acopladas entre sí y son las responsables de *alimentar* el resto de los *compartimentos* (ver figura:2.1). La necesidad de considerar un compartimento para cada generación de TACs está relacionada con el hecho de que estos estados celulares son intermedios y transitorios. Los diversos trabajos experimentales citados son los que sustentan la existencia de las diferentes generaciones de transitorias amplificadoras que a medida que se dividen se comprometen más en su *especialización*.

Tanto el tamaño poblacional de las criptas, la evidencia experimental de su carácter monoclonal en condiciones de homeostasis [79, 27] y la dispersión de los datos experimentales disponibles, sugirieron la necesidad de no contentarse con un planteo apoyado exclusivamente en ecuaciones diferenciales, sino de plantear ecuaciones estocásticas asociadas pasibles de resolverse mediante simulaciones de Monte Carlo [32].

La versión estocástica del modelo permitió estudiar los efectos de posibles mutaciones que eventualmente pueden ocurrir en alguna de células que participan del proceso de renovación celular. Dado que la deriva neutral conduce a la monoclonalidad, ese clon mutante puede fijarse o extinguirse. Entonces la eventual fijación de clones mutantes habilita la posibilidad de dar lugar a *criptas atípicas* con poblaciones medias diferentes como indicio de disfuncionalidades, siendo incluso factible la extinción total de la cripta como puede verse en el caso de que se fije un clon mutante sin plasticidad (caso (7)) (ver fig: 4.2).

Hemos considerado también mutaciones (casos (1) y (2) de 4.2) que no se traducen en una modificación de las poblaciones medias (resultando estas invariantes), sino en ciclos celulares

más lentos o más rápidos. Un tanto anti-intuitivamente, hemos visto que los clones con ciclos celulares más *lentos* son los que tienen mayores chances de fijarse. Dedicaremos el próximo capítulo a profundizar en este resultado y su interpretación.

El carácter estocástico de estos sistemas de renovación celular queda fuertemente apun-talado ya que entre otras cosas el modelo estocástico logra reproducir la estabilidad de los mismos ante las fluctuaciones propias. Aquí podemos retomar la discusión sobre la *evolución no darwiniana* dominada por la deriva neutral en la renovación de las criptas. Algunos auto-res [36] han planteado que esta dinámica es una forma de proteger al tejido de los peligros que entraña la eventual fijación de células cancerígenas.

Lo que diversos trabajos como el citado han planteado es un intento de realizar un análisis comparativo entre una *dinámica darwiniana* (entendiendo por esto una selección de las más aptas siendo en estos casos células madre y eventuales mutaciones más o menos benefi-ciosas) y una *dinámica o evolución no darwiniana* (entendiendo por esto una *deriva neutral* de carácter esencialmente estocástico). Uno de los argumentos que se esgrimen en dichos planteos es que mediante una *evolución darwiniana* aquellas células madre con mutaciones nocivas no letales podrían ser eliminadas mediante una *selección*, que por ejemplo mitigue el *envejecimiento* celular. Sin embargo estas células madre con mutaciones “beneficiosas” se podrían volver dominantes y predisponer a la tumorogénesis. La selección debería empujar a que con el tiempo se fijen aquellas células madre con una renovación más veloz, sin embargo ocurre lo contrario. Esto es debido a que la *evolución no darwiniana* (deriva neutral) es la que gobierna mayormente estas renovaciones.

Más aún cuanto más pequeñas las poblaciones más difícil se hace eliminar mutaciones perjudiciales o corregir mutaciones “beneficiosas”(que como discutimos previamente pue-den no ser tan beneficiosas y llevar a una posible tumorogénesis). Efectivamente el tamaño relativamente pequeño de las poblaciones celulares en las criptas hace que aún habiendo un balance entre el azar (deriva neutral) y la selección como mecanismos intervinientes, sea la deriva neutral la que tome mayor relevancia.

Los resultados de esta Tesis refuerzan los argumentos en esta dirección ya que dado que la deriva neutral tiende a fijar aquellas células madre con una tasa de renovación más lenta y esto serviría como un mecanismo que contribuiría a evitar posibles *focos* de tumorogénesis (una de las características de las células tumorales es su alta tasa de renovación).

Es interesante ver que una jerarquización de los *tipos* celulares en función de su *potencia-lidad* ayuda a limitar la acumulación de mutaciones ya que solo una pequeña fracción de las células que conformen el *órgano* o *tejido* en cuestión son células madre (por ejemplo menos del 5 % en el caso de las criptas). De esta forma las mutaciones que se dan en células que no son células madre están destinadas morir y no propagarse más allá del linaje limitado de dicha célula.

Para el caso de las células madre una forma de defensa contra eventuales mutaciones consiste en la denominada fidelidad de replicación del ADN con *la hipótesis de la hebra inmortal* [13], un escenario en donde cualquier error de replicación se diluye porque las hebras de ADN recién sintetizadas se distribuyen asimétricamente a las hijas que no son

células madre.

La otra alternativa para minimizar las posibilidades de eventuales mutaciones en células madre consiste en minimizar la actividad de las mismas haciendo que la división celular sea muy poco frecuente (estado de quiescencia). Las células madre también se encuentran expuestas al daño del ADN, y en consecuencia las células madre mutantes podrían eliminarse por apoptosis.

Sin embargo *la hipótesis de la hebra inmortal*¹ en el caso de las criptas intestinales resulta cuanto menos controvertida, con defensores [69, 66, 21, 78, 65] y detractores [44, 74, 81, 39] de la misma. Por otro lado la hipótesis del estado de quiescencia no es compatible con la mayor parte de las observaciones experimentales en el caso de la cripta donde las células madre *Lgr5+* se estima que tienen una tasa de mitosis de alrededor de una al día [6] (aunque puede haber otras que si permanezcan quiescentes [19]).

Más precisamente aquellos que cuestionan la hipótesis de la hebra inmortal plantean que dada la inevitabilidad de las mutaciones, el nicho de las células madre en la cripta es una forma de imponer una *evolución no darwiniana* como un mecanismo posterior para gestionar tales mutaciones.

Plantean que dado que la cuestión crítica es si las mutaciones sean resultan perjudiciales o beneficiosas en primera instancia terminen siendo más peligrosas en el régimen homeostático. Muchas mutaciones somáticas *perjudiciales* pueden ser toleradas por las células mientras que la propagación de mutaciones somáticas beneficiosas (en un principio) puede representar una mayor amenaza para la supervivencia.

Según este enfoque la renovación de células madre de nicho puede aprovechar un mecanismo de evolución no darwiniano (deriva neutral) para proteger fácilmente contra mutaciones letales y ayudar a que las mutaciones beneficiosas que podrían conducir al cáncer a menudo sean descartadas.

Resulta interesante ver a estas mutaciones como una ruptura espontánea de simetría y consecuentemente de la deriva neutral.

¹Esta hipótesis propone que las células madre de tejidos adultos se dividen principalmente en forma asimétrica, de forma tal que las eventuales mutaciones no son transferidas a la nueva célula madre, sino a la otra célula (transitoria o diferenciada) minimizando de esta forma la acumulación de mutaciones.

Capítulo 5

Procesos estocásticos de renovación celular y extensión de los ciclos celulares

5.1. Introducción

En el presente capítulo se exhibirá el estudio de la ralentización del proceso de renovación celular desde una perspectiva más general sin focalizarnos en un tejido en particular (viéndolo como un fenómeno colectivo y macroscópico). Independientemente de los cambios que se dan en determinadas células con el envejecimiento [62, 1], se mostrará que la propia dinámica de renovación celular favorece la fijación de células con ciclo celular más largo (lo cual implica procesos de renovación celular más lentos) [28].

El efecto del envejecimiento en organismos multicelulares en régimen homeostático se caracteriza por la disminución de los procesos de renovación celular en todos los órganos y tejidos [42, 48, 68, 14, 95]. Esta disminución está estrechamente relacionada con las funciones de las células madre responsables de la renovación celular y es más evidente en tejidos con una alta tasa de renovación, tales como la piel o el epitelio intestinal. Esto es debido a que dichos tejidos se encuentran expuestos en forma permanente a un *medioambiente hostil* del cual necesitan reponerse en forma continua.

Se conocen algunas variaciones en el comportamiento de las células madre con la edad y se estudiaron desde diferentes puntos de vista, como genómico [92, 94, 47], epigenómico [89, 80] y proteómico [67, 17, 12], sin embargo los alcances y las consecuencias de estos cambios no han sido bien establecidos. Hoy en día el acortamiento de los telómeros como consecuencia de replicaciones de ADN semiconservativo en sucesivas mitosis, es considerado como un marcador eficiente de la senescencia celular y conduce a una teoría del envejecimiento celular más ampliamente aceptada [8], aunque existen otras teorías alternativas como la mitocondrial [83, 49]. Como suele suceder en aquellos procesos que denominamos como *Procesos Complejos*, el envejecimiento celular es impulsado, no por una sola causa, sino por una combinación de fenómenos, eventualmente vinculados entre sí [93, 98].

Pasemos ahora a considerar un tejido o parte de él, cuyos procesos de renovación celular

proviene de un pequeño conjunto de células madre (SC) (como en las criptas intestinales que analizamos en el capítulo precedente). Los procesos dinámicos de nacimiento y muerte en una población de *individuos* (células en nuestro caso) distinguibles pero igualmente aptos han sido estudiados en distintos marcos. Se ha visto que dichos procesos conducen a la supervivencia de los descendientes de solo uno de los individuos originales con idéntica probabilidad. Esto constituye una ruptura espontánea de la simetría, debida a un fenómeno puramente estocástico. Esto resulta válido para explicar el carácter monoclonal de las criptas observado experimentalmente por diversos autores [79, 50], como un proceso de renovación celular neutral

Dentro del proceso de renovación celular en las criptas ocurre un fenómeno similar, ya sea cuando la mitosis simétrica origina dos células que están involucradas en el proceso de diferenciación (división D-D), lo cual significa la eliminación de una célula madre, o cuando la división simétrica que origina dos células madre (S-S división) que puede ser considerado como el nacimiento de una célula madre. Por lo tanto, nos encontramos ante un escenario donde la renovación celular en régimen homeostático queda determinada por un delicado equilibrio del surgimiento de divisiones celulares simétricas de cada tipo. Entonces, para preservar la población de células madre finita y evitar su extinción, o su crecimiento desmesurado, la ocurrencia de estos eventos debe ser adecuadamente regulada.

Para estudiar esta dinámica, se suelen adoptar dos puntos de vista alternativos. En uno de ellos, en régimen homeostático, el número de células madre se considera constante y la regulación se toma como *perfecta*, es decir, a cada división simétrica D-D (en rigor nos referimos tanto a una D-D como a una TAC-TAC) de una célula madre (es decir, su desaparición) le sigue una división S-S simétrica de otra célula madre (un nacimiento), asegurando de esta forma un *balance perfecto*. Esto conduce al conocido modelo de Moran [55] o similares, ampliamente utilizado para estudiar el efecto de la deriva genética en un pequeño grupo de población y, más recientemente, para modelar la fijación de mutaciones somáticas neutrales en el marco del desarrollo de diversos tipos de cáncer dentro de los procesos de renovación celular [87].

El otro punto de vista (aplicado en los precedentes capítulos 3 y 4) consiste en asumir algún tipo de regulación para la ocurrencia de posibles eventos para la población de células madre y sus células hijas, que dan lugar al linaje completo del tejido en consideración. Se conocen como modelos compartimentales para una población homogénea de cada fenotipo celular. Tales modelos se describen mediante un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODES) para las poblaciones de cada compartimento [53, 91, 59, 27, 15]. La solución estacionaria de estas ODES corresponde al comportamiento promedio de las poblaciones en condiciones homeostáticas. Como ya hemos dicho, en estas condiciones se hace necesario contemplar que, para poblaciones pequeñas, las soluciones de estas ecuaciones podrían perder sentido si acaso las fluctuaciones alrededor de ese valor promedio desestabilizaran la población conduciendo a la extinción o a un crecimiento exponencial.

Por lo tanto se debe considerar a estas fluctuaciones como procesos estocásticos, en principio no descritos por estas ecuaciones diferenciales, y analizarlos como tales. Recién luego de probar la robustez de dichos procesos ante las propias fluctuaciones estocásticas (esto es

que las fluctuaciones producidas entorno de un valor medio dado no conducen a ningún colapso) tales fluctuaciones pudieran verse como un ruido alrededor de la solución estacionaria, entonces sería plausible ignorar dichas fluctuaciones alrededor del equilibrio y proponer un modelo Markoviano simplificado (tipo Moran, ver sec. 2.6.3) de renovación alrededor de ese valor de equilibrio previamente hallado.

Si se introduce una inhomogeneidad (como una célula madre mutada), el proceso de extinción o fijación de esa célula alterada resulta necesariamente estocástico, por lo que ni las ODES ni el modelo Markoviano simplificado con una población total constante (similar al de Moran) pueden plantearse a priori, ya que la población de equilibrio y sus fluctuaciones dependerán de si la alteración se fija o no (la población de equilibrio es indefinida). Sin embargo, hay una excepción a esto último: cuando la alteración se fija pero la misma deja invariante el punto de equilibrio (ver: 4.2 casos: (1) y (2)).

Este es el caso que estudiaremos en este capítulo. Las alteraciones bajo nuestra consideración cambiarán la *longitud del ciclo celular* (CCL) pero no el equilibrio o la regulación entre diferentes eventos posibles.

A continuación se propone una ecuación diferencial asociada a un compartimento de células madre y la familia de mutaciones en estudio y calcularemos las probabilidades de fijación de estas células alteradas mediante el estudio del proceso estocástico asociado. Esto lo haremos de dos formas: muestreando sobre realizaciones del proceso (algoritmo de Gillespie ver 2.5) y calculando el vector de probabilidad de fijación celular de la matriz estocástica asociada que representa el proceso estocástico de nacimiento y muerte (ver 2.6.2).

Luego de comprobar la estabilidad del sistema frente al ruido intrínseco, se propone un modelo markoviano simplificado con la población total de células madre invariante (ver: 2.6.3), para obtener una expresión analítica de la probabilidad de fijación de células alteradas, ya que la alteración no cambia ni el punto de equilibrio ni las fluctuaciones a su alrededor. Finalmente, se muestra el efecto que provoca la acumulación de fijaciones de este tipo de células [28].

5.2. Modelo de renovación básico

El modelo propuesto para la dinámica de la población mediante ecuaciones diferenciales ordinarias tiene sentido siempre que las células de cada compartimento sean idénticas (compartimento homogéneo). Consideremos ahora un compartimento correspondiente a las células madre cuya población obedece a la siguiente ecuación diferencial [28]:

$$\frac{dn}{dt} = [-f(n) + g(n)]n, \quad (5.1)$$

donde n es el número total de células madre presentes en el momento t en el compartimento. Las tasas de desaparición y nacimiento de células madre son $f(n)$ y $g(n)$ respectivamente. Como soluciones estacionarias tenemos:

$$\left. \frac{dn}{dt} \right|_{n=n^*} = 0 \Rightarrow \begin{cases} n^* = 0 & \text{trivial} \\ n^* = n_e > 0 / -f(n_e) + g(n_e) = 0 & \text{no trivial} \end{cases} \quad (5.2)$$

Siendo la solución trivial la correspondiente a la extinción de la población (estado absorbente) y aquellas soluciones no triviales corresponden a un balance entre las tasas de nacimiento y muerte. Si estas poblaciones son pequeñas las mismas deberían ser estudiadas como procesos estocásticos y la trayectoria $n = n(t)$ correspondería al equilibrio alrededor del cual fluctúa la población.

Estas poblaciones deben satisfacer:

$$-f(n_e) + g(n_e) = 0, \quad (5.3)$$

en algún (o algunos) n_e de forma tal de garantizar el equilibrio y,

$$\left[-\frac{df(n)}{dn} + \frac{dg(n)}{dn} \right] \Big|_{n=n_e} < 0, \quad (5.4)$$

para garantizar de esta forma que el punto de equilibrio sea linealmente estable en el sentido de Liapunov (o *Liapunov-estable*) (ver apéndice A.2).

Además, debemos procurar que la ecuación 5.1 al ser descripción de un sistema biológico, tenga soluciones robustas frente a las fluctuaciones de los parámetros involucrados en las funciones $f(n)$ y $g(n)$. Por lo tanto si la población de células madre fuera pequeña, esta dinámica debe estudiarse como un proceso estocástico y las trayectorias definidas por $n = n(t)$, en el régimen de equilibrio, corresponden a las fluctuaciones alrededor de la población de equilibrio dadas por n_e .

La condición dada por la ecuación 5.4 puede ser insuficiente para garantizar la estabilidad del proceso estocástico, ya que las fluctuaciones intrínsecas podrían alejar a n de su valor de equilibrio más allá del régimen de estabilidad lineal [27]. En este escenario es natural preguntarse: qué pasará si surge una célula madre diferente? (por ejemplo debido a una mutación somática o cualquier otra alteración). Aquí cabe aclarar que en lo que sigue nos referiremos indistintamente a mutaciones y/o alteraciones.

Supongamos que la tasa de desaparición (nacimiento) del mutante es $\beta_1 f(n)$ ($\beta_2 g(n)$). Claramente ante este nuevo escenario, la ecuación 5.1 pierde significado porque la población de células madre pierde su condición de homogénea. Para estudiar la dinámica resultante, debemos considerarla como un proceso estocástico de cuatro eventos posibles:

- Desaparición de una Célula Madre Normal (WSC, por sus siglas en ingles).
- Nacimiento de una Célula Madre Normal (WSC).

- Desaparición de una Célula Madre Alterada (ASC, por sus siglas en ingles).
- Nacimiento de una Célula Madre Alterada (ASC).

La descripción de la dinámica de la población a través de una ecuación como 5.1, se recuperará si las células madre alteradas (ASC) o las células madre normales (WSC) se extinguen, y por lo tanto recuperamos la homogeneidad en la población. En el último caso, la ecuación 5.1 debe reemplazarse por:

$$\frac{dn}{dt} = [-\beta_1 f(n) + \beta_2 g(n)] n \quad (5.5)$$

y ahora el equilibrio de la población sera definido por:

$$-\beta_1 f(n_e) + \beta_2 g(n_e) = 0 \quad (5.6)$$

Si ahora nos limitamos a considerar solo aquellas mutaciones donde $\beta_1 = \beta_2 = \alpha$. Entonces la Eq 5.5 se reduce a un múltiplo de la Eq 5.1, y por lo tanto no hay cambios en la población de equilibrio y Eq 5.5 la podemos re-escribir como:

$$\frac{dn}{dt} = [-f(n) + g(n)] \alpha n \quad (5.7)$$

Redefiniendo $t \rightarrow \alpha t$ esta ecuación es idéntica a Eq 5.1, excepto que las células madre mutadas (o alteradas) tienen una longitud del ciclo celular τ_m , mientras que el de las células madre normales es τ_w tal que

$$\frac{\tau_w}{\tau_m} = \alpha. \quad (5.8)$$

Entonces dado que $\alpha < 1 \Leftrightarrow \tau_w < \tau_m$ tenemos que si $\alpha < 1$ la eventual fijación de dicha alteración ralentizaría los procesos de renovación celular, lo que resulta ser típico en el envejecimiento de los tejidos.

En la siguiente sección se discute las probabilidades de fijación de este tipo de células alteradas.

5.3. Fijación de células alteradas

Suponiendo que dentro del conjunto de n células madre hay s células madre normales (WSC) y s' células madre alteradas (ASC) ($n = s + s'$), los eventos mencionados en la sección anterior son:

- $(s, s') \rightarrow (s - 1, s')$.
- $(s, s') \rightarrow (s + 1, s')$.

- $(s, s') \rightarrow (s, s' - 1)$.
- $(s, s') \rightarrow (s, s' + 1)$.

Observemos que las probabilidades de nacimiento y muerte de una célula madre están reguladas por el número total de células madre presentes n y no por los números de ningún tipo en particular (s y s').

$$P(n \rightarrow n + 1) = \frac{g(n)}{g(n) + f(n)}, \quad (5.9)$$

$$P(n \rightarrow n - 1) = \frac{f(n)}{g(n) + f(n)}. \quad (5.10)$$

Esto mismo lo podemos formular en términos de las probabilidades condicionales involucradas para cada tipo de célula madre de la siguiente forma:

$$P(s \rightarrow s + 1/n \rightarrow n + 1) = P(s \rightarrow s - 1/n \rightarrow n - 1) = P_s, \quad (5.11)$$

$$P(s' \rightarrow s' + 1/n \rightarrow n + 1) = P(s' \rightarrow s' - 1/n \rightarrow n - 1) = P_{s'}. \quad (5.12)$$

Siendo

$$P_s = \frac{s}{s + \alpha s'}, \quad (5.13)$$

$$P_{s'} = \frac{\alpha s'}{s + \alpha s'}. \quad (5.14)$$

De esta forma, la probabilidad del primer evento resulta:

$$P_s^- = \frac{f(n)}{g(n) + f(n)} \frac{s}{s + \alpha s'}. \quad (5.15)$$

Las probabilidades para los cuatro eventos posibles quedan dadas en la tabla 5.1 (donde $\eta = [g(n) + f(n)](s + \alpha s')$).

Para evaluar el tamaño de las fluctuaciones se calculó la varianza $\langle \delta n \rangle^2$ usando la aproximación lineal [24, 75]:

$$\langle \delta n \rangle^2 = -\frac{f(n_e) + g(n_e)}{2 \frac{d}{dn} [g(n) - f(n)] \Big|_{n=n_e}} \quad (5.16)$$

que se ve claramente es independiente de α .

Evento	Probabilidad
$(s, s') \rightarrow (s - 1, s')$	$P_s^- = \frac{f(n)}{\eta} s$
$(s, s') \rightarrow (s + 1, s')$	$P_s^+ = \frac{g(n)}{\eta} s$
$(s, s') \rightarrow (s, s' - 1)$	$P_{s'}^- = \frac{f(n)}{\eta} \alpha s'$
$(s, s') \rightarrow (s, s' + 1)$	$P_{s'}^+ = \frac{g(n)}{\eta} \alpha s'$

Cuadro 5.1: En esta tabla se muestran los eventos que definen la dinámica estocástica del proceso de renovación y sus correspondientes probabilidades de ocurrencia. Siendo s el número de células madre normales (WSC), s' el número de células alteradas (mutadas) (ASC), $n = s + s'$ el número total de células y $\eta = [g(n) + f(n)](s + \alpha s')$

Para analizar como se fijan las mutaciones (alteraciones) consideramos las tasas correspondientes a las divisiones simétricas (D-D y SC-SC) dadas por las funciones de Hill (ampliamente utilizadas tanto en modelos compartimentales como en redes regulatorias genéticas [27, 73, 4, 11, 16, 97]).

$$f(n) = \frac{a^l n^l}{n^l + n_f^l}$$

$$g(n) = \frac{b^l}{n^l + n_g^l}. \quad (5.17)$$

Para este tipo de regulaciones las fluctuaciones quedan dadas por:

$$\langle \delta n \rangle^2 = \frac{n_e}{l} \left[\frac{(n_e^l + n_g^l)(n_e^l + n_f^l)}{n_f^l(n_e^l + n_g^l) + n_e^l(n_e^l + n_f^l)} \right], \quad (5.18)$$

Es fácil verificar que si $n_f \approx n_g$ la expresión se reduce a:

$$\langle \delta n \rangle^2 \approx \frac{n_e}{l}. \quad (5.19)$$

O sea que las fluctuaciones son lineales con n . Las ecuaciones (5.17) satisfacen las condiciones de estabilidad anteriormente mencionadas para $l \geq 2$ (para $l = 1$ el tamaño de las fluctuaciones del proceso estocástico (5.19) lleva a que la población se extinga).

En el presente trabajo los valores asignados a los parámetros fueron los siguientes: $a = \frac{1}{\sqrt{d}}$ y $b = 10 \frac{1}{\sqrt{d}}$ (d la unidad temporal de 1 día) de forma tal que las unidades de la ecuación (5.1) son $1/d$, $n_f = n_g = 10$, siendo por lo tanto $n_e = 10$ y la longitud del ciclo celular (CCL) es $\tau = 1d$ para el sistema homogéneo inicial bajo condiciones homeostáticas.

Vale la pena destacar que los resultados son completamente independientes de la elección de $f(n)$ y $g(n)$ siempre y cuando satisfagan las condiciones de estabilidad ya mencionadas y dejen invariante n_e en la ecuación (5.3). En el trabajo realizado se partió de un estado inicial con $(n_e - 1)$ células madre normales y solo una mutante (ASC), esto es $(n_e - 1, 1)$.

A partir de esto se estudiaron las probabilidades de fijación de dos formas:

- Calculando la frecuencia de fijación sobre 10^6 realizaciones de simulación de un proceso estocástico [32].
- Determinando el autovector de la matriz estocástica construida a partir de las probabilidades mostradas en la tabla 5.1.

Las probabilidades de fijación de las células madre alteradas (mutantes), $P_A^{(n_e-1,1)}$, y las de una de las células madre normales (WSC), $P_W^{(n_e-1,1)}$ como función de α se muestran en la figura 5.1

Es de destacar que las curvas obtenidas por ambos métodos, esto es el método de Gillespie y el Markoviano *exacto*, coinciden notablemente. Apreciamos que para $\alpha = 1$, esto es cuando no hay ninguna célula mutante (alterada), las probabilidades de fijación son idénticas para cada una de las células madre inicialmente presentes.

En la figura 5.1 se aprecia el resultado, en principio anti-intuitivo, que las probabilidades de fijación de las células mutantes o alteradas (ASC) se incrementan respecto de las probabilidades de fijación de las células normales (WSC), para $\alpha < 1$. Esto significa que en los procesos de renovación a partir de divisiones simétricas la fijación de aquellas células con un mayor ciclo celular (τ) (o sea menor frecuencia de renovación) resultaran favorecidas.

En lo que sigue se propone un modelo simplificado que permite hallar la dependencia de las probabilidades de fijación respecto de α en forma de una expresión algebraica.

5.4. Modelo Simplificado

Aquí planteamos que cumplida la estabilidad de la población frente a las fluctuaciones (ver apéndice A) y dado que la fijación de células alteradas o mutantes (ASC) deja invariante tanto el valor de la población de equilibrio (n_e) como las fluctuaciones, podemos simplificar el modelo manteniendo fijo el número total de células madre ($s + s' = n_e$).

Considerando ahora el proceso estocástico como un conjunto de eventos de *nacimientos* y *muerdes* de forma tal de mantener constante el número de células madre ($n = n_e$). Los eventos de este modelo simplificado involucran dos eventos del modelo original. Esto es, a la desaparición de una célula madre le sigue el nacimiento de otra dejando invariante la población total. En consecuencia las funciones f y g que regulan las probabilidades de desaparición y nacimiento respectivamente en el modelo anterior, son innecesarias en este modelo.

Los estados de este modelo quedan caracterizados por $n_e - s'$ para las células madre normales (WSC) y s' para las células madre alteradas o mutadas (ASC). Por lo tanto se tienen las siguientes transiciones posibles entre eventos:

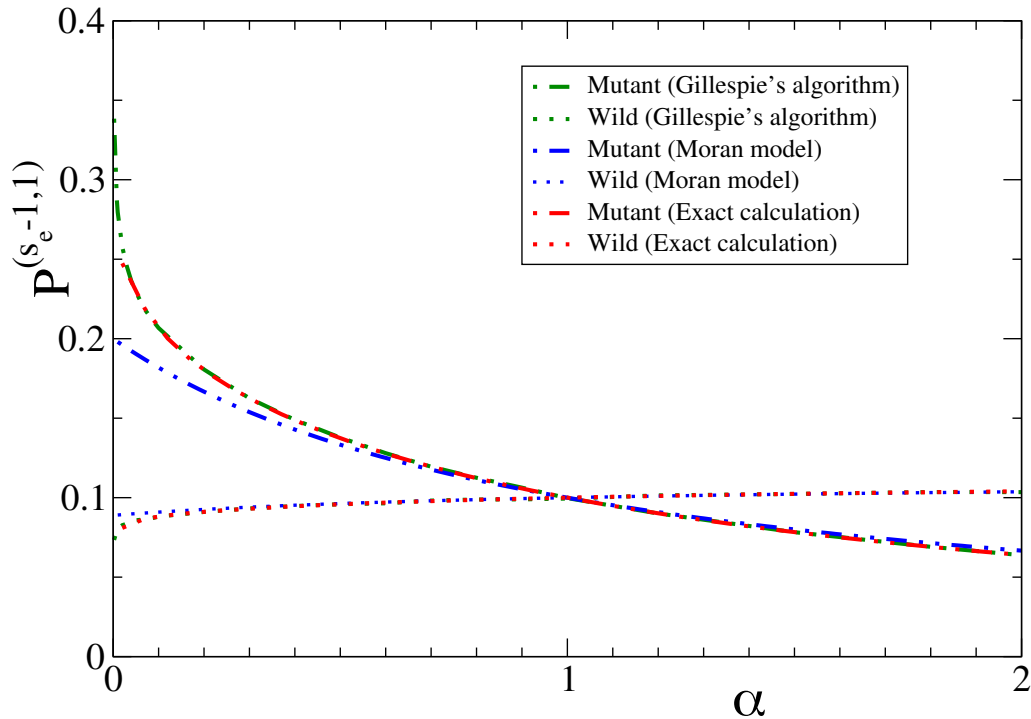


Figura 5.1: Probabilidad de fijación como función de α . Las curvas corresponden a la probabilidad de fijación de una célula alterada (mutante) (ASC) y de *cada una* de las células normales (WSC) partiendo desde el estado $s_e - 1$ células normales y 1 célula alterada $((s_e - 1), 1)$. Los resultados correspondientes al proceso estocástico cuyas probabilidades de transición están dadas por la tabla 5.1 (con $s_e = 10$) se dieron a través de dos procedimientos: (a) A través de un muestreo sobre 10^6 realizaciones del proceso utilizando técnicas del Algoritmo de Gillespie (ver: 2.5) (color verde), siendo el trazo punteado el correspondiente a la probabilidad de fijación de un clon normal (Wild Cell) y el trazo *punto -línea* el correspondiente a la probabilidad de fijación del clon mutante (alterada). (b) Mediante el modelo markoviano (*exacto*) de las probabilidades de fijación dadas por la matriz estocástica de transición (ver: 2.6.2) (color rojo) nuevamente el trazo punteado corresponde a la probabilidad de fijación de un clon normal y el trazo *punto -línea* a la probabilidad de fijación del clon mutante. Por último (en azul) mostramos las curvas correspondientes a la probabilidad de fijación en un proceso estocástico markoviano simplificado (Tipo Moran) del cual se pueden extraer expresiones algebraicas de transición (ver tabla 5.2) (ver: 2.6.3).

Evento	Probabilidad
$(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s' - 1, s' + 1)$	$\frac{(n_e - s')}{(n_e - s' + \alpha s')} \frac{(\alpha s')}{(n_e - s' - 1 + \alpha s')}$
$(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s' + 1, s' - 1)$	$\frac{(n_e - s' + \alpha(s' - 1))}{(n_e - s')} \frac{(n_e - s' + \alpha s')}{(\alpha s')}$
$(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s', s')$	$\frac{(n_e - s')}{(n_e - s' + \alpha s')} \frac{(\alpha(s' - 1))}{(n_e - s' - 1 + \alpha s')} + \frac{(n_e - s' + \alpha s')}{(n_e - s' + \alpha s')} \frac{(\alpha(s' - 1))}{(n_e - s' + \alpha(s' - 1))}$

Cuadro 5.2: En esta tabla se exhiben los eventos posibles en el modelo simplificado y sus correspondientes probabilidades de ocurrencia. Aquí se ve el proceso estocástico como dos eventos sucesivos (*nacimiento* y *muerte*) del modelo original de forma tal de mantener constante el número de células madre ($n = n_e$). Esto es, a la desaparición de una célula madre le sigue el nacimiento de otra de forma tal de dejar invariante la población total.

- $(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s' - 1, s' + 1)$.
- $(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s' + 1, s' - 1)$.
- $(n_e - s', s') \rightarrow (n_e - s', s')$.

La tabla 5.2 muestra las probabilidades asociadas a dichas transiciones.

La dinámica asociada a la matriz estocástica resultante tiene dos estados absorbentes $(n_e, 0)$ y $(0, n_e)$ (esto es, o todas las células normales (WSC) o todas células alteradas (ASC) respectivamente) (ver 2.6.3).

Partiendo del estado inicial $(n_e - s', s')$ la probabilidad de finalizar en el estado $(0, n_e)$ resulta ser (ver 2.6.3).

$$P_{(0, n_e)}^{(n_e - s', s')} = \left[\frac{2(n_e - s')}{\alpha + 1} + (s' - 1) \right] \frac{s'}{n_e(n_e - 1)} \quad \forall \alpha > 0. \quad (5.20)$$

y obviamente su complementario resulta ser la probabilidad de finalizar en $(n_e, 0)$

$$P_{(n_e, 0)}^{(n_e - s', s')} = 1 - P_{(0, n_e)}^{(n_e - s', s')}, \quad (5.21)$$

Clarifiquemos que la expresión 5.21 corresponde a la probabilidad de que se fije cualquiera de las $n_e - s'$ células normales (WSC), por lo tanto la probabilidad de que se fije una de ellas resulta:

$$\hat{P}_{(n_e, 0)}^{(n_e - s', s')} = \frac{P_{(n_e, 0)}^{(n_e - s', s')}}{n_e - s'}. \quad (5.22)$$

Una vez conseguidas estas expresiones se plantea analizar las mismas cuando surge una mu-

tación en una de ellas, esto es partiendo del estado $(n_e - 1, 1)$:

$$\begin{aligned} P_{(0, n_e)}^{(n_e-1, 1)} &= \frac{2}{(\alpha + 1)n_e} \\ \hat{P}_{(n_e, 0)}^{(n_e-1, 1)} &= \frac{(\alpha + 1)n_e - 2}{(\alpha + 1)n_e(n_e - 1)}, \end{aligned} \quad (5.23)$$

Las gráficas de estas expresiones como función de α deben ser comparadas con las obtenidas en el modelo de la sección previa $P_A^{(n_e-1, 1)}$ y $P_W^{(n_e-1, 1)}$.

Reforzando la consistencia de las expresiones obtenidas, podemos apreciar en las mismas que la probabilidad de fijación resulta ser $\frac{1}{n_e}$ para $\alpha = 1$ (esto es si la alteración es neutral). Vemos también que la probabilidad de fijación de las alteradas se incrementa para $\alpha < 1$. En la figura 5.1 se muestra la curva correspondiente, y puede apreciarse una significativa concordancia con los resultados de la sección previa en un rango amplio de valores de α .

Sin embargo puede verse los resultados comienzan a diferir para valores *pequeños* de α . La explicación de esto radica en que, a medida que α disminuye (o sea aumenta la longitud del ciclo celular, esto es τ crece) los eventos se hacen cada vez mas espaciados en aquellas células alteradas (ASC) respecto de las células normales (WSC). Pero mientras que en el modelo de Gillespie y el markoviano original se contempla la posibilidad de eventos como varios *nacimientos* o *muertes* sucesivos, en el modelo markoviano simplificado (tipo Moran), por su propia construcción, estos eventos quedan excluidos. Esto conduce a que a medida que α disminuye la extinción de las células normales (WSC) (debido a sucesivas desapariciones) toma cada vez más relevancia respecto de las células alteradas (ASC) lo cual lleva a una mayor probabilidad de fijación de las células alteradas en los modelos de Gillespie y markoviano original que la dada por el modelo markoviano simplificado.

Más aún, en el límite $\alpha \rightarrow 0$ las células alteradas (ASC) quedarían en un estado quiescente mientras que las células normales (WSC) se extinguirían en tiempos suficientemente grandes. En el modelo markoviano simplificado esto no puede ser reflejado porque la población total permanece constante (recordemos que cada evento de este modelo es un nacimiento y una muerte).

Un comentario aparte merece el caso límite en el que $\alpha = 0$. En este caso la población original de células alteradas (ASC) se fijaría pero en un estado quiescente (esto es nunca participaría de ningún evento ya que $\tau \rightarrow \infty$) mientras que las células normales (WSC) si lo harían con lo que a tiempos suficientemente grandes se extinguirían. Mientras que en el modelo markoviano simplificado en $\alpha = 0$ el estado inicial de ambas poblaciones resultaría invariante ($\tau \rightarrow \infty$) en el tiempo ya que la población inicial de células madre n_e es constante y por lo tanto ninguna se fijaría. El estado inicial, en nuestro ejemplo $(n_e - s', s')$, queda “congelado”(invariante en el tiempo).

5.5. Análisis de la fijación de alteraciones sucesivas y sus efectos

Resulta interesante ahora analizar como la fijación de las células madre lentas se retroalimenta, reforzando un procesos de reducción de la tasa de renovación celular. Efectivamente en las secciones previas se muestra como la propia dinámica tiende a fijar más aquellas células madre cuyas longitudes del ciclo celular (CCL) resultan inferiores a la media. Ahora consideremos la ocurrencia de sucesivas alteraciones y sus efecto en el CCL. La figura 5.2 muestra un diagrama de árbol generado por un proceso de sucesivas alteraciones.

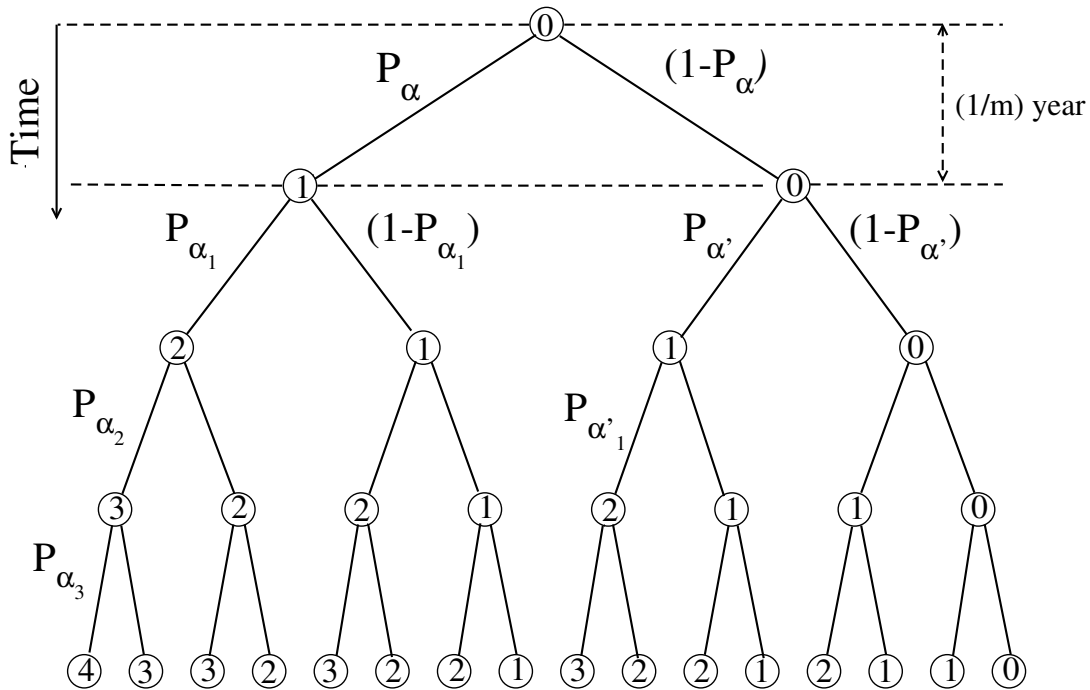


Figura 5.2: Diagrama de árbol para un proceso de mutaciones (alteraciones) sucesivas. En el diagrama se ilustran los posibles estados finales de un sistema luego de cuatro alteraciones sucesivas, asumiendo que ocurren m mutaciones al año (en promedio). Los números indican la cantidad de fijaciones de la mutación.

Para esto asumimos que estas alteraciones sucesivas tienen una tasa de ocurrencia de m por año y que el efecto de cada alteración es el mismo para cada población homogénea ya establecida. Dicho de otra forma, el efecto es una persistente variación de la longitud del ciclo

5.5. ANÁLISIS DE LA FIJACIÓN DE ALTERACIONES SUCESIVAS Y SUS EFECTOS 109

celular (CCL) en el mismo porcentaje $\alpha = \frac{\tau_w}{\tau_m}$. Por lo tanto $\alpha_1 = \dots = \alpha_i = \dots = \alpha'_i = \dots = \alpha$.

Como consecuencia de esto, luego de k fijaciones de alteraciones la longitud del ciclo celular (CCL) estará dada por $\alpha^k = \frac{1}{\tau}$ (asumiendo como unidad el CCL de la población original).

Dado esto ahora podemos plantear k fijaciones de alteraciones de un total de N lo cual resulta ser:

$$P_k^N = \binom{N}{k} (1 - P_\alpha)^{(N-k)} P_\alpha^k, \quad (5.24)$$

con P_α la probabilidad de fijación de una célula alterada. Por ende el promedio de $\frac{1}{\tau}$ luego de N alteraciones es:

$$\left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle_N = \sum_{k=0}^{k=N} \binom{N}{k} (1 - P_\alpha)^{(N-k)} P_\alpha^k \alpha^k = [1 - (1 - \alpha) P_\alpha]^N, \quad (5.25)$$

Si ahora sustituimos la expresión (5.23) obtenemos:

$$\left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle_N = \left[1 - (1 - \alpha) \frac{2}{n_e(1 + \alpha)} \right]^N, \quad (5.26)$$

5.5.1. Generalización a diferentes alteraciones

Ahora generalizamos los resultados obtenidos y suponemos dos tipos diferentes de alteraciones que estarán caracterizadas por α y α' siendo que aquella alteración asociada a α ocurre con probabilidad p_+ mientras que aquella otra asociada a α' lo hace con probabilidad p_- . Dado que ambos sucesos son complementarios tenemos $p_+ + p_- = 1$.

Por lo tanto ahora el promedio de $\frac{1}{\tau}$ luego de N alteraciones resulta:

$$\left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle_N = [1 - (1 - \alpha) p_+ P_\alpha - (1 - \alpha') p_- P_{\alpha'}]^N. \quad (5.27)$$

Ahora podemos plantear que la alteración asociada a α consiste en aumentar la longitud del ciclo celular (CCL) τ mientras que aquella asociada a α' consiste en disminuirlo de forma tal que $\alpha + \alpha' = 2$ ¹.

¹Esta restricción es arbitraria aunque razonable. En definitiva $\alpha + \alpha' = k$ (con $2 \leq k$, $0 < \alpha \leq 1$ y $1 < \alpha' < k$) implica que por cada que a cada posible mutación que eventualmente ralentice el ciclo de renovación (aumentando la longitud del ciclo celular) se le contrapone otra que eventualmente lo acelere.

De esta forma la expresión del promedio de $\frac{1}{\tau}$ nos queda:

$$\begin{aligned} \left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle_N &= \left[1 - \frac{2(1-\alpha)(3p_+ - p_- - \alpha)}{n_e(1+\alpha)(3-\alpha)} \right]^N \\ &= \left[1 - \frac{2(1-\alpha)(4p_+ - 1 - \alpha)}{n_e(1+\alpha)(3-\alpha)} \right]^N. \end{aligned} \quad (5.28)$$

En la figura 5.3 se muestran los resultados de esta expresión para distintas probabilidades de ocurrencia p_+ luego de 100 alteraciones, es decir para $m = 1$ (considerando una vida media de 100 años).

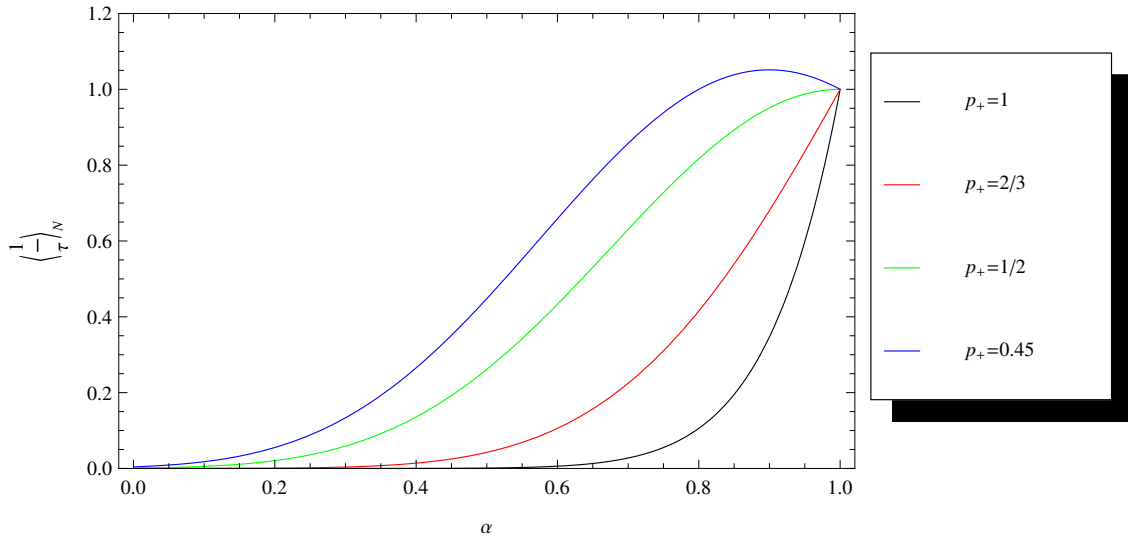


Figura 5.3: Longitud del Ciclo Celular (CCL) τ en función de α luego de 100 alteraciones (en rigor aquí por practicidad graficamos la inversa del ciclo celular promedio $\left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle$ en función de α). Recordemos que m es el número de mutaciones al año en promedio, entonces tomando $m = 1$, en una vida de alrededor de 100 años tendremos 100 mutaciones (alteraciones). En este caso estamos viendo como se afecta la longitud del ciclo celular luego de 100 mutaciones suponiendo que puede haber 2 tipos de estas. Una de dichas alteraciones aumenta el τ con probabilidad p_+ ($\alpha < 1$) mientras que la otra lo disminuye con probabilidad p_- ($\alpha' > 1$). El trazo continuo negro corresponde a $p_+ = 1$, $p_- = 0$; el rojo a $p_+ = 2/3$, $p_- = 1/3$; el verde a $p_+ = 1/2$, $p_- = 1/2$ y el azul a $p_+ = 0,45$, $p_- = 0,55$

A partir de la figura 5.3 podemos apreciar cuando solo se producen alteraciones que alargan el CCL ($p_+ = 1$, $p_- = 0$, curva azul en trazo continuo) el CCL se incrementa a medida α disminuye. Es notable que para $\alpha \leq 0,5$ el estado promedio de las células madre

sería prácticamente de una total quiescencia ($\langle 1/\tau \rangle \rightarrow 0$), mientras que si $\alpha = 0,8$ la longitud del ciclo celular promedio $\langle \tau \rangle$ (luego de 100 años) resulta aproximadamente 10 veces más grande que el correspondiente a un conjunto de células madre *joven*.

En cuanto se comienza a considerar alteraciones esporádicas que eventualmente acorten la longitud del ciclo celular ($p_- \neq 0$) los efectos del incremento del CCL a medida que α decrece se conservan (aunque disminuyendo su intensidad) en el rango $p_+ > p_-$ (siempre considerando entornos pequeños de $\alpha < 1$ pero $\alpha \approx 1$). Siguiendo en ese entorno cercano a $\alpha \approx 1$ tenemos que la longitud del ciclo celular (CCL) pasa a decrecer ante el decrecimiento de α cuando $p_+ < p_-$. Sin embargo a nivel global los efectos del incremento de la longitud del ciclo celular a medida que α decrece se conservan aún para $p_+ < p_-$.

Todos los resultados expuestos y discutidos en esta sección se basan en las probabilidades de fijación del modelo markoviano simplificado que nos ha permitido obtener las expresiones algebraicas. Como ya señalamos las probabilidades de fijación de las células mutantes en este modelo son menores, para valores pequeños de α , que las obtenidas en la sección 5.3 (ver figura 5.1). Efectivamente el efecto de alargamiento de la longitud del ciclo celular (CCL) a través del tiempo resulta aún mayor que lo mostrado en el modelo markoviano simplificado.

5.6. Proceso de renovación en tiempo continuo

Para finalizar, consideramos un modelo poblacional en tiempo continuo muy simple, que nos permite ganar más intuición acerca del resultado del progresivo incremento de la longitud del ciclo celular. A la discusión y resultados presentados hasta el momento podemos añadir una perspectiva adicional. Planteamos ahora el análisis de una dinámica poblacional en tiempo continuo desprovista de estructura espacial [85].

Consideremos las configuraciones posibles definidas por el valor entero n (de células, partículas, productos, población, etc) de un tipo S a tiempo t . Si uno considera las reacciones a primer orden con una *producción* ($S \rightarrow S + S$) con tasa σ , y una muerte espontánea ($S \rightarrow \emptyset$) con tasa κ . Estas reacciones a primer orden definen una dinámica markoviana cuyas tasas de transición correspondientes a los procesos de ramificación resultan, en primera instancia, proporcionales a la población en juego $W_{n \rightarrow n+1} = n\sigma$ y $W_{n \rightarrow n-1} = n\kappa$.

Las correspondientes ecuaciones maestras para la evolución de las probabilidades de transición a tiempo continuo $P_n(t)$ resultan:

$$\frac{\partial P_n(t)}{\partial t} = \sigma(n-1)P_{n-1}(t) - (\sigma + \kappa)nP_n(t) + \kappa(n+1)P_{n+1}(t) \quad \forall n \geq 1. \quad (5.29)$$

A partir de la función generatriz (ver [85]) y con el desarrollo de los momentos de la misma se puede demostrar que la probabilidad de extinción es:

$$P_0(t) = \begin{cases} \left[\frac{(e^{(\kappa-\sigma)t} - 1)}{(e^{(\kappa-\sigma)t} - \frac{\sigma}{\kappa})} \right]^{N_0} & \text{si } \sigma \neq \kappa \\ \left[\frac{\sigma t}{1 + \sigma t} \right]^{N_0} & \text{si } \kappa = \sigma \end{cases} \quad (5.30)$$

Donde N_0 es la población inicial del proceso, σ la tasa de producción y κ la tasa de apoptosis.

La probabilidad de extinción crece (disminuye) exponencialmente en el tiempo si $\kappa > \sigma$ ($\kappa < \sigma$), con una escala de tiempo característica $\tau_c = 1/|\kappa - \sigma|$. Por lo tanto cuando el parámetro de control $\kappa/\sigma \rightarrow 1$, τ_c diverge y $P_0(t)$ en principio sigue una ley de potencia. En este sentido, el modelo de dimensión cero muestra características que se asemejan al comportamiento crítico cerca de una transición de fase continua. Como posible parámetro de orden, se puede utilizar la probabilidad de supervivencia asintótica.

$$P_{asint} = 1 - \lim_{t \rightarrow \infty} P_0(t) = \begin{cases} 1 - \left[\frac{\kappa}{\sigma}\right]^{N_0} & \text{si } \kappa < \sigma \\ 0 & \text{si } \kappa \geq \sigma \end{cases} \quad (5.31)$$

Finalmente se puede determinar que el tamaño medio de la población es: $\langle n(t) \rangle = n_0 \exp [(\sigma - \kappa)t]$, consecuentemente la población media asintótica $\lim_{t \rightarrow \infty} \langle n(t) \rangle$ diverge si $\sigma > \kappa$ y se extingue si $\sigma < \kappa$ y resulta $\langle n(t) \rangle = n_0$ la población media en el umbral de extinción en el punto crítico $\sigma = \kappa$. Resulta interesante mostrar que en el punto crítico $\sigma = \kappa$ vale:

$$[\Delta n]^2 = 2n_0\kappa t. \quad (5.32)$$

que muestra el crecimiento lineal de la varianza con el tiempo (ver Ec: 5.18, 5.19).

Observemos que para el caso crítico podemos interpretar $P_0(T) = \left[\frac{\sigma T}{1 + \sigma T}\right]^{N_0}$ como la probabilidad de extinción de una colonia de tamaño N_0 a tiempo T . O viéndolo de otro modo se puede leer como la fracción de colonias, de tamaño inicial N_0 , extintas a tiempo T para un número (suficientemente grande) de colonias dado. Su complementario $1 - P_0(T)$ sera por lo tanto la probabilidad de supervivencia o podrá ser interpretado como la fracción de colonias sobrevivientes.

Podemos plantear, para una población inicial N y una tasa crítica σ dadas, el espectro temporal en el cuál sobrevive una fracción determinada de la población original será como el mostrado en la figura 5.4.

Análogamente se puede plantear la fracción de células colonias sobrevivientes vs σ para una población inicial N y un tiempo T dados (ver figura 5.5).

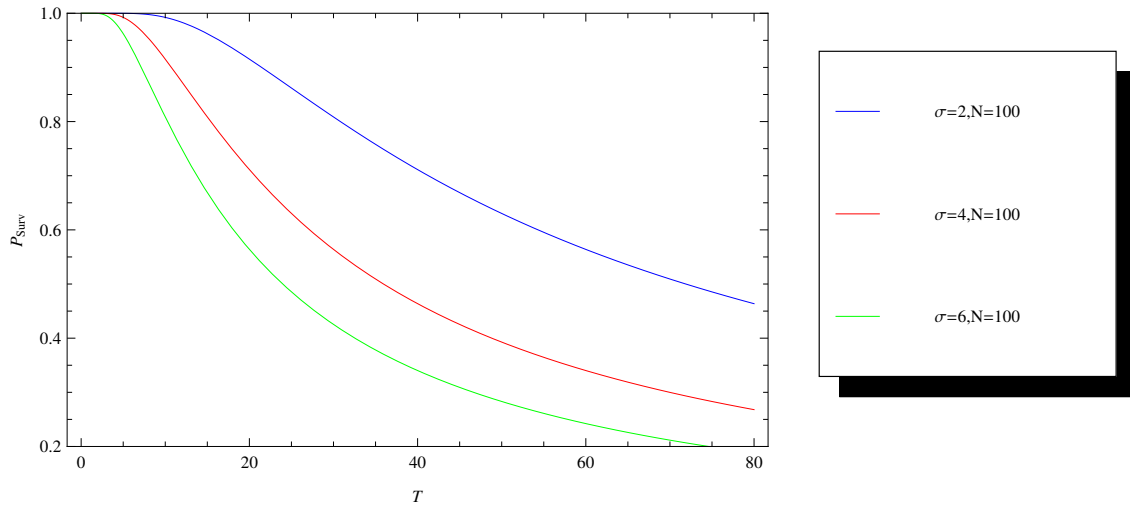


Figura 5.4: Fracciones de las colonias sobrevivientes en función del tiempo según el modelo de población continuo, para diversas tasas σ en el punto crítico ($\kappa = \sigma$) con una población inicial $N = 100$. Se aprecia que aquellas poblaciones con una tasa de renovación más baja (más *lentas* en el proceso) tienen mayores probabilidades de sobrevivir.

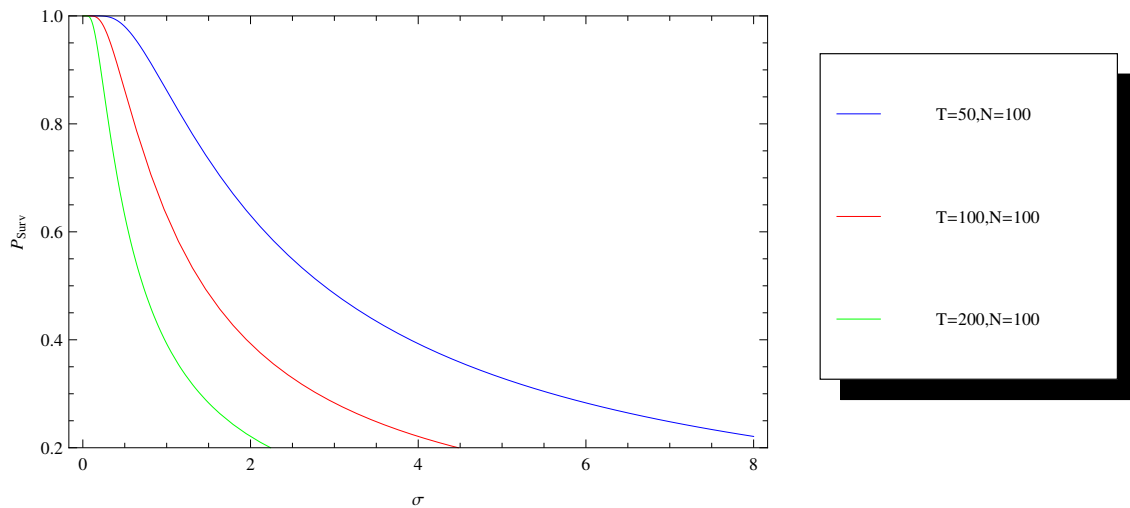


Figura 5.5: Fracciones de las colonias sobrevivientes en función de la tasa de renovación crítica σ para diversos tiempos T con una población inicial $N = 100$. Nuevamente se aprecia que la probabilidad de sobrevivencia de las colonias decae con la tasa de renovación. Esto muestra que poblaciones más *lentas* en el proceso de renovación tendrán mayores chances de sobrevivir y por tanto de fijarse.

5.7. Discusión y conclusiones

En este capítulo se profundizó el análisis de la dinámica de renovación celular y de cómo la misma se ve afectada ante determinadas alteraciones. Para eso se planteó un caso genérico de renovación en un compartimento y se pudo demostrar que la propia dinámica estocástica favorece la fijación de aquellas células madre con mayor Longitud de Ciclo Celular τ (CCL) haciendo en consecuencia más lenta la renovación a medida que pasa el tiempo. Sin embargo vale remarcar que estos efectos también se manifiestan incluyendo otros compartimentos y procesos (como la plasticidad) tal como puede apreciarse en capítulos precedentes (3, 4) [27, 28].

Es importante subrayar que no se está afirmando que la senescencia celular se deba exclusivamente a las características de la dinámica renovadora. Puede haber otros factores, tal vez más relevantes, de carácter puramente biológico como el acortamiento de los telómeros. Sin embargo, aún admitiendo que las causas de la senescencia replicativa *externas* puedan eliminarse, en este trabajo se demuestra que la dinámica intrínsecamente conduce a la ralentización de la tasa de renovación celular.

Se vuelve a remarcar que este efecto es completamente diferente del producido por el acortamiento de los telómeros (límite de Hayflick [58]) por el cual la tasa de renovación celular se ve ralentizada debido a la existencia de una longitud crítica en el que las células entrarían en una repentina y permanente quiescencia (senescencia replicativa).

En algunos trabajos [56] basados en la proliferación en cultivos celulares, usando un modelo de población de Wright-Fisher con una población que crece exponencialmente los autores extrapolan para tiempos más largos los resultados experimentales al CCL. Concluyen entonces que la dinámica favorece la fijación de células de una longitud de ciclo celular τ más corto. Sin embargo la dinámica del trabajo reportado por los citados autores [56] resulta absolutamente diferente de lo que ocurre en procesos de renovación en régimen homeostático (por ejemplo de un tejido adulto). En tal caso, bajo un régimen homeostático la población media de células madre permanece constante (con fluctuaciones propias alrededor de una *población media*) siendo completamente distinto al crecimiento constante de la referencia anterior [56]. Queda pendiente evaluar la relevancia de los fenómenos mostrados en este capítulo en un trabajo experimental a realizarse sobre algún tejido adulto.

Para reforzar aún más la relevancia de este fenómeno intrínseco a las dinámicas de renovación agregamos el análisis a tiempos continuos de conjuntos de poblaciones celulares en los que ha podido apreciarse que son aquellas poblaciones con una tasa de renovación más *lenta* quienes tienen mayores chances de sobrevivencia (ver sección: 5.6).

Hay algunos datos experimentales sobre el alargamiento de la longitud del ciclo celular con la edad durante el desarrollo embrionario en mamíferos [84, 3] pero en tales casos, la dinámica del proceso también es completamente diferente a los casos homeostáticos analizados en el presente trabajo.

Una futura tarea a realizar es la evaluación y ponderación de la relevancia del efecto mostrado en este trabajo en un tejido vivo. Para esto sería necesario un relevamiento experimental

a realizarse tejidos adultos.

Por último vale marcar que si bien este trabajo se ha realizado considerando la renovación celular a partir de divisiones simétricas de células madre y ha excluido las divisiones asimétricas, la inclusión de las mismas [77, 82] no variaría el balance poblacional expresado por la ecuación 5.1 correspondiente al compartimento de células madre. Además llevaría a que no todas las mitosis participen de la dinámica descrita y por tanto solo se conduciría a un alargamiento efectivo de la longitud del ciclo celular τ reforzando aún más el fenómeno descrito².

²Recordemos que una división asimétrica de una célula madre S por lo tanto solo dilataría el tiempo hasta alcanzar la renovación completa de la población

Capítulo 6

Conclusiones

Los sistemas biológicos en general se constituyen por su propia esencia como capaces de auto-organizarse, de renovarse y de mantener una resiliencia que les permite resistir y recuperarse de condiciones adversas. La dinámica que permite tales características es una dinámica de Sistemas Complejos. Dentro del conjunto de sistemas biológicos la renovación celular resulta particularmente relevante. Vale subrayar que estos sistemas son por su propia naturaleza sistemas dinámicos alejados del equilibrio.

En particular en el presente trabajo se estudió la dinámica de la renovación de las criptas de Lieberkühn. Este sistema fue elegido por tres razones principales. En primer lugar, es uno de los tejidos más estudiados a nivel experimental, por lo que existen datos publicados explorando un rango mayor de los parámetros involucrados respecto de otros tejidos. En segundo lugar, este tejido se destaca por su alta tasa de renovación que ha posibilitado el seguimiento en tiempo real del proceso de renovación. Finalmente, debido al *tamaño* poblacional (número de células), que sitúa al sistema en una *escala mesoscópica* que no permite una modelización estadística típica de valores medios (lo cual podría ser válido escalas mayores), ni un abordaje completamente analítico, posible en algunos modelos suficientemente pequeños.

Para representar el sistema dinámico de renovación de las criptas de Lieberkühn se construyó un modelo robusto en dos sentidos: estructuralmente (es decir frente a variaciones de los parámetros del sistema) y estocásticamente (esto es frente a las fluctuaciones intrínsecas, o ruido interno).

La idea central del modelo construido para representar y estudiar la dinámica de renovación celular de tejidos adultos en régimen homeostático consistió en la construcción de un conjunto de ecuaciones diferenciales que modelan y representan los valores medios de las poblaciones en juego. Este enfoque permite asignar a cada tipo celular diferentes compartimentos y analizar la dinámica de interacción entre los mismos viendo como se alimentan y retroalimentan los distintos flujos poblacionales y como estos repercuten en las poblaciones de equilibrio. Este modelo también permite realizar un análisis de las fluctuaciones frente a la variación de los parámetros en juego (por caso las tasas de apoptosis no tienen un valor determinado sino que varían en torno a un valor medio).

Luego, a partir de dichas ecuaciones diferenciales se construyó un modelo de un proceso de Markov (resuelto con el algoritmo de Gillespie) que permite estudiar la robustez del sistema ante las fluctuaciones propias. Este punto, a veces pasado por alto en otros modelos, resulta insoslayable en dinámicas poblacionales en las que el tamaño poblacional las hace potencialmente inestables frente a las fluctuaciones propias, ya que estas podrían conducir a la extinción de un porcentaje alto de las muestras sin que esto se refleje en el comportamiento de la población media.

En primer lugar hemos desarrollado un modelo compartimental capaz de mostrar la evolución de las distintas poblaciones celulares en las criptas colónicas (capítulo 3). El modelo consiste en ocho ecuaciones diferenciales, asociadas a la población de células madre, seis generaciones de transitorias y células completamente diferenciadas. Las ecuaciones correspondientes a la célula madre (S) y las transitorias de primera generación (T_1) están acopladas entre sí y son las responsables de alimentar al resto de las ecuaciones. La necesidad de considerar un compartimento para cada generación de células transitorias se encuentra vinculada a la existencia de un gradiente de diferenciación que lleva a que las células hijas estén expuestas ante cada división a un mayor índice de diferenciación que sus progenitoras. Este modelo se mostró capaz de reproducir los resultados experimentales reportados por diversas fuentes. Más allá de reproducir los valores medios poblacionales compatibles con los resultados experimentales, resultó particularmente relevante comprender y reproducir la dinámica que de acuerdo a los experimentos lleva la población de las criptas al estado monoclonal. Efectivamente el trabajo consiguió este objetivo, como se discute en la sección 3.3.2. Esta transición al régimen monoclonal en el estado homeostático se muestra en la curva de la evolución del tamaño promedio de los clones (ver Fig. 3.5). La curva fue ajustada con los datos experimentales reportados por el trabajo de Snippert et al [79] (ver Fig. 3.5 (a)). Encontramos que la inexistencia de divisiones asimétricas de las células madre ($K_{S,T_1} = 0$) en el modelo construido resultaba ser la que mejor se ajustaba con estos resultados experimentales reportados. Una lectura de estos resultados consiste en que el sistema procura minimizar el tiempo de transición hacia la monoclonalidad, ya que efectivamente la existencia de divisiones asimétricas ($K_{S,T_1} > 0$) implica un aumento de dicho tiempo característico. Vale apreciar que también el tiempo característico de acceso al estado monoclonal de la curva ajustada al modelo resulta compatible con los resultados experimentales reportados. Esta evolución al régimen monoclonal surge naturalmente de la dinámica estocástica del proceso de renovación.

Tanto la propia naturaleza estocástica del proceso como la dispersión de datos experimentales sobre las poblaciones celulares de las criptas reforzaron la motivación a considerar la modelización del proceso no solo con ecuaciones diferenciales sino con un proceso estocástico asociado que permitiera observar la robustez del sistema ante las fluctuaciones propias en torno a un valor medio, que es el descrito por el estado estacionario de las ecuaciones diferenciales.

Otro punto interesante de los resultados obtenidos es que dada la inevitabilidad de las mutaciones en caso de que primara una dinámica darwiniana aquellas células con mutacio-

nes “beneficiosas”(esto sería con una mayor tasa de renovación) tenderían a imponerse (a fijarse) lo que de suceder conduciría al desarrollo de un cáncer en el tejido [36]. La dinámica de fijación estocástica sería una forma de minimizar las probabilidades de dar lugar a una tumorigénesis y las criptas, como nichos pequeños de células madre, podrían ser una “estrategia” para que esta dinámica estocástica se imponga sobre la darwiniana y de esta forma reducir las chances del desarrollo de un cáncer. Los resultados del trabajo refuerzan esta línea ya que se muestra que la dinámica estocástica da menos chances de fijación a aquellos clones con una tasa de proliferación más alta, lo cual es una característica típica de las células cancerígenas.

En segundo lugar (capítulo 4), se extendió el modelo para incluir posibles mutaciones en algunas de las células que alimentan el proceso de renovación celular (S y T_1). La idea central fue analizar como se vería modificada la dinámica ante mutaciones que afectaran las diversas tasas de división celular, apoptosis, etc. Se mostró como la eventual fijación de los clones mutantes puede dar lugar a criptas atípicas, con poblaciones medias diferentes, lo que puede indicar posibles disfuncionalidades o incluso una extinción de la cripta (posterior a su fijación). Un ejemplo de esto último sería la fijación de un clon mutante sin plasticidad (ver: Apéndice B).

Es en la sección 4.2 donde nos encontramos que las mutaciones (1) y (2) arrojaron resultados en principio “anti-intuitivos”. Recordemos que la mutación de esta sección citada referida como (1) ($m_i = m'_i = 4$) implica que el clon mutante resulta ser 4 veces más eficiente (en el sentido de que los procesos en dicho clon resultan ser 4 veces más rápidos) que los clones normales. La mutación referida como (2) ($m_i = m'_i = \frac{1}{4}$) implica contrariamente que el clon mutante resulta ser 4 veces menos eficiente (en el sentido de que resultan ser 4 veces más lentos los procesos involucrados en dicho clon) que los clones normales. Ante estos escenarios se calcularon las probabilidades de fijación de cada una de estas mutaciones resultando que aquellos procesos mitóticos más lentos (de menor frecuencia de renovación o dicho en otras palabras aquellas con un ciclo celular más largo) poseen una mayor probabilidad de fijación (ver Fig.4.1(b) y (c)).

Para comprender mejor estos resultados realizamos por último un estudio más general del este fenómeno de ralentización de la renovación. Es para esto que en el capítulo 5 se comienza por plantear una dinámica de renovación celular para un caso genérico. En el estudio se analizó la evolución de una población, en principio en estado homeostático, ante una mutación que eventualmente modificara la longitud del ciclo celular (τ_m). Concluimos que la propia dinámica favorece la fijación de aquellas células madre con una longitud de ciclo celular (CCL) mayor haciendo más lenta la renovación celular a medida que pasa el tiempo.

Asumiendo que la longitud del ciclo celular de un conjunto de células madre idénticas, obedece a una distribución y no a un valor fijo, el efecto resulta acumulativo favoreciendo siempre aquellas células madre con mayor longitud del ciclo celular (CCL). Como consecuencia de este efecto se produce una desaceleración gradual y constante del ritmo de renovación celular con el paso del tiempo. Entonces, si existieran pequeñas mutaciones prácti-

camente inocuas, pero que alteraran levemente la longitud del ciclo celular produciendo una distribución de la misma alrededor de un valor medio, la propia dinámica favorecería siempre la fijación de aquellas células madre con mayor longitud de ciclo celular.

Vale subrayar que el alargamiento de la longitud del ciclo celular que presentamos en el presente trabajo es un fenómeno intrínseco a la dinámica de renovación completamente independiente al que se produce por el acortamiento de los telómeros (límite de Hayflick) que también lleva a una ralentización de la renovación celular pero debido a una longitud crítica alcanzada la cual las células entran en una repentina senescencia replicativa [58].

A estos resultados se ha llegado considerando solo los procesos más relevantes que ocurren en un compartimento de las células madre, sintetizados en una *fente* de células madre ($g(n)$) y un *sumidero* ($f(n)$) (ver eq:5.1). Sin embargo estos efectos también se manifiestan cuando son incluidos otros compartimentos y procesos (como la plasticidad) tal como puede apreciarse en capítulos precedentes.

Finalmente, observamos que este fenómeno está presente en una dinámica poblacional a tiempo continuo desprovista de estructura espacial (sección: 5.6). Vimos que también en esta dinámica en la que surge una singularidad ante el balance de las tasas de nacimiento σ y muerte κ ($\sigma \approx \kappa$ lo que sería asimilable a las condiciones de homeostasis en un proceso de renovación celular) emerge el fenómeno de ralentización manifiesto en el hecho de que resultan aquellas poblaciones con tasa de renovación más baja (más lentas en el proceso) las que tienen mayor probabilidad de sobrevivir (ver Fig: 5.4, 5.5).

Queda abierta la línea de evaluar cuánto es el peso de este fenómeno implícito en las propias dinámicas en la ralentización de la renovación en los procesos celulares bajo regímenes homeostáticos. Con este objetivo sería relevante para contrastar los resultados de este trabajo a nivel experimental en forma más detallada el seguimiento de la renovación celular en un tejido adulto. De esta forma se podría por ejemplo evaluar el peso sobre la ralentización de la renovación atribuible al acortamiento de los telómeros (límite de Hayflick) y el correspondiente al fenómeno presentado en este trabajo.

Por otro lado al ser la ralentización de la renovación un fenómeno propio de la dinámica de renovación se abre la posibilidad de ver como se manifiesta en otras áreas de la biología (como puede ser a nivel genético-molecular, o a nivel de ecosistemas poblacionales) y eventualmente en otras disciplinas. En este trabajo también se puso de manifiesto el solapamiento y competencia entre dinámicas de renovación darwinianas (o seleccionistas) y dinámicas de renovación neutrales. Esto significa que como bien dijo el propio Kimura [40] [41] ambas dinámicas no son necesariamente excluyentes. Sin embargo es un debate abierto el peso de cada una de las citadas dinámicas en diversos procesos y a diversas escalas (genética-molecular, celular, tejidos, etc). Queda abierto ver como repercuten los resultados del presente trabajo en el citado solapamiento de estas dinámicas y contrastarlo con diversos resultados experimentales.

Apéndice A

Sobre la estabilidad estocástica

La descripción de modelos poblacionales por medio de ecuaciones diferenciales es muy útil y válida, de hecho es una herramienta fuertemente utilizada en el presente trabajo, pero se debe realizar con las debidas precauciones. No solo es necesario verificar la estabilidad local de los puntos de equilibrio y la estabilidad estructural del sistema (frente a la variación de los parámetros que lo definen), sino también se debe analizar la estabilidad del sistema frente a fluctuaciones estocásticas de las variables (por ejemplo un ruido interno). Si acaso las soluciones del estado estacionario implican grandes poblaciones esto posiblemente resulte irrelevante. Pero al considerar poblaciones de tamaño pequeño (como en el caso de las criptas) esto resulta crucial. Esto es debido a que en modelos poblacionales como los analizados la varianza presenta un crecimiento en el tiempo (ver Ec: 5.18 5.19 5.32) al menos lineal y por lo tanto los procesos al presentar fuertes fluctuaciones quedan expuestos a eventuales colapsos.

A.1. Ejemplo: de extinción por fluctuaciones

A modo de ejemplo podemos analizar la ecuación diferencial propuesta para la evolución de la población de células madre (N_0) en un interesante trabajo de un modelo compartimental de criptas [53]. Los autores proponen el siguiente modelo para el compartimento correspondiente a las células madre (el trabajo citado separa la cripta en tres compartimentos, N_0 para las células madre, N_1 para las transitorias y N_2 para las diferenciadas. Aquí solo nos interesa analizar el compartimento que ellos proponen para las células madre.):

$$\frac{dN_0}{dt} = (\alpha_3 - \alpha_2 - \alpha_1) N_0 - \frac{k_0 N_0^2}{1 + m_0 N_0}. \quad (\text{A.1})$$

donde: $\alpha_1 = 0,1$, $\alpha_2 = 0,3$, $\alpha_3 = 0,686$, entonces $\alpha = \alpha_3 - \alpha_2 - \alpha_1 = 0,286$, $k_0 = 0,1$, $m_0 = 0,1$.

Los autores discuten y analizan que para que la solución estacionaria de las células madre (N_0 en su notación), correspondiente a la homeostasis, sea estable (y por ende la existencia de las criptas sea viable) alcanza con la condición:

$$0 < \alpha < \frac{k_0}{m_0}. \quad (\text{A.2})$$

lo cual se satisface con los valores presentados, siendo la solución estacionaria:

$$N_{h0} = \frac{\alpha}{k_0 - m_0\alpha} \approx 4. \quad (\text{A.3})$$

Resultando esta una solución estable (y estructuralmente estable).

Sin embargo, cuando uno resuelve el sistema con el algoritmo estocástico propuesto (ver: 2.5) resulta claro que las criptas se extinguen, teniendo las mismas una vida media de 98,63 días como puede verse en la figura A.1 poniendo en cuestión la viabilidad de las criptas en ese modelo.

Esto se exhibe a modo de ejemplo para subrayar la importancia de analizar en estos modelos su estabilidad frente a las propias fluctuaciones como se hizo en los modelos expuestos en el presente trabajo.

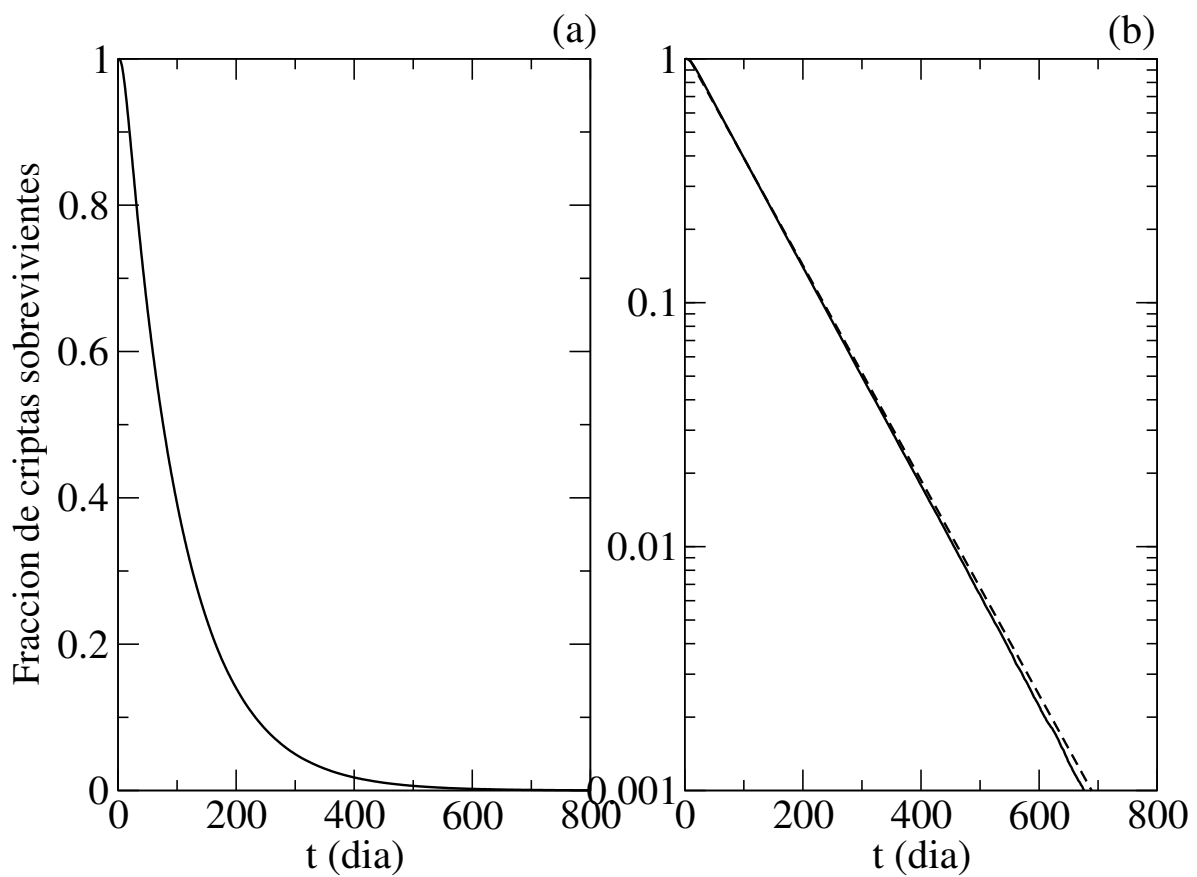


Figura A.1: (a) Fracción de las criptas sobrevivientes en función del tiempo (en días).
(b) Idem (a) pero en escala log-lin. La línea a trazos corresponde al fito exponencial óptimo.

A.2. El potencial / campo de poblaciones

Otra forma de analizar la estabilidad de las soluciones, esto es de las poblaciones, respecto de su estabilidad frente a fluctuaciones es en considerar un *potencial* $V(n)$:

$$V(n) = - \int_0^n [-f(s) + g(s)] s ds \quad (\text{A.4})$$

El *gradiente* (en rigor $-\frac{d}{dn}$) de este *potencial* se podría interpretar como un *campo de poblaciones*. Las poblaciones de dicho *campo de poblaciones* correspondientes a los mínimos del *potencial* serían aquellas poblaciones estables correspondientes a estados homeostáticos y los parámetros del pozo de potencial (profundidad, anchura, etc) determinarían un criterio del nivel de estabilidad de dicha población (Ver Figura A.2). Es importante subrayar que este recurso se restringe a aquellos campos de poblaciones que sean conservativos (lo cual se cumplirá en un número reducido de casos). Por ejemplo para el campo de poblaciones propuesto en este trabajo en el capítulo 3 ($\vec{F}(S, T_1) = (F_S(S, T_1), F_{T_1}(S, T_1))$) (ver eq: 3.1 y 3.2) se puede demostrar fácilmente que resulta ser no conservativo ¹ y en consecuencia no existe ningún potencial $V(S, T_1)$ tal que su gradiente sea dicho campo. Sin embargo se puede demostrar que los campos poblacionales de la forma $\vec{F}(n) = F(n)\hat{n}$ (esto es un campo central) si resultan ser conservativos.

¹Una forma sencilla de verificar esto es ver que: $\frac{\partial F_{T_1}}{\partial S} \neq \frac{\partial F_S}{\partial T_1}$

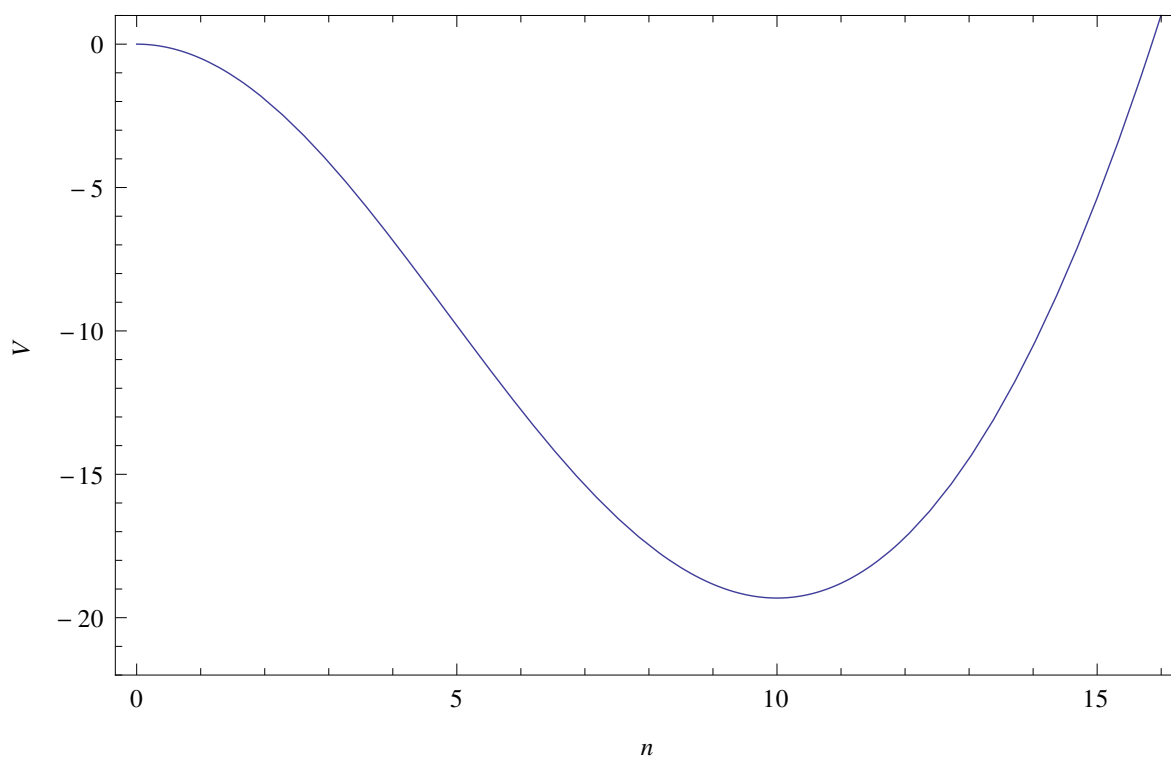


Figura A.2: V vs n . Se puede apreciar que la población de equilibrio ($n = 10$) se corresponde con el mínimo de *potencial* V . Los principales parámetros (profundidad, anchura, etc) del pozo de potencial estarán vinculados a la estabilidad de la población frente a perturbaciones (*ruido*)

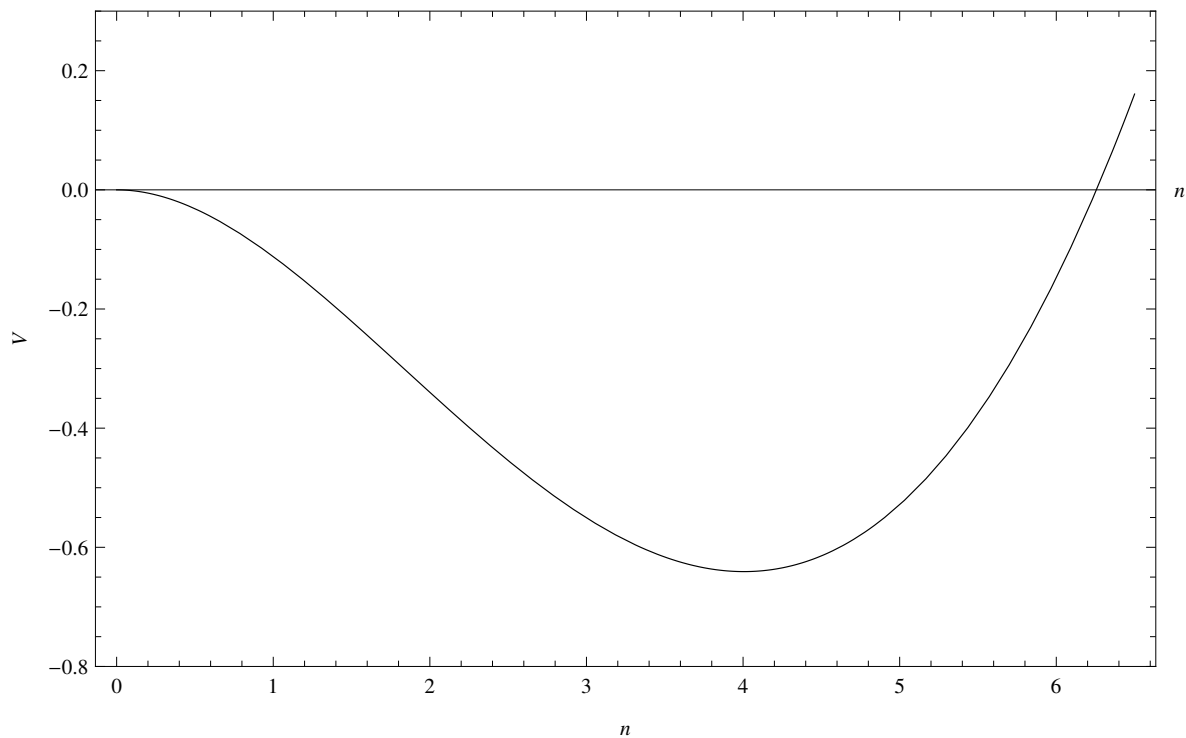


Figura A.3: V vs n . Aquí tenemos el potencial $V(n)$ correspondiente al trabajo citado de Johnston et al [53]. Se puede apreciar que la población de equilibrio ($n = 4$) se corresponde con el mínimo de potencial V . Vemos que la profundidad del pozo de potencial es notablemente inferior al ejemplo construido en el trabajo (ver Figura: A.2) reforzando la noción de que esto se vincula a la estabilidad de la población frente a perturbaciones (*ruido*)

Apéndice B

Nulclinas y bifurcación

Para un sistema de ecuaciones diferenciales dado por $\frac{d\vec{X}(t)}{dt} = \vec{F}(\vec{X}(t))$ llamamos nulclina de la componente j a la curva definida por la ecuación $\frac{dX_j(t)}{dt} = 0$. La intersección de todas las nulclinas del sistema define (en caso de que exista) un punto fijo del sistema.

Aquí mostramos las nulclinas que corresponden a las ecuaciones que describen la evolución temporal de las células madre S (ver eq: 3.1) y las transitorias de primera generación T_1 (ver eq: 3.2). En la siguiente figura se muestran las nulclinas definidas por $\frac{dS}{dt} = 0$ y $\frac{dT_1}{dt} = 0$. Dado que en el trabajo las variables $S(t)$ y $T_1(t)$ son poblaciones estas quedan naturalmente restringidas al primer cuadrante ($S \geq 0, T_1 \geq 0$).

Si bien hemos insistido reiteradamente en que para describir el tránsito a la monoclonalidad es indispensable tener en cuenta las fluctuaciones estocásticas, una vez alcanzada la monoclonalidad y verificado que las fluctuaciones de equilibrio no comportan riesgo de extinción (o lo hacen con probabilidad muy baja), es válido utilizar los puntos fijos de las ecuaciones diferenciales para obtener el valor medio de la población en el régimen estacionario.

Si el clon fijado es un clon normal las ecuaciones diferenciales tendrán los mismos parámetros que el sistema original (en nuestro caso los valores de los parámetros dados por la tabla 3.6). Si por el contrario se fija un clon mutante los parámetros del sistema serán los correspondientes a dicho clon mutante. Aquí presentamos un caso particular en el que el clon fijado presenta una mutación que afecta su plasticidad. En este caso la plasticidad cambia $P \rightarrow m'_1 P$. Lo que lo hace particularmente interesante es que al variar la plasticidad (ergo variar m'_1) se produce una bifurcación del sistema en $m'_1 = 0$ asociada a la ya vista extinción de la cripta cuando se produce dicha mutación.

En la figura B.2 se aprecian las nulclinas asociadas a cuatro escenarios distintos. En B.2 (a) vemos las nulclinas correspondientes al caso en el que se fija una cripta normal. En B.2 (b) vemos lo que sucede en el caso en el que se fije una mutación que atenúe la plasticidad ($m'_1 < 1$). Se puede apreciar que los valores para el equilibrio de las poblaciones disminuyen.

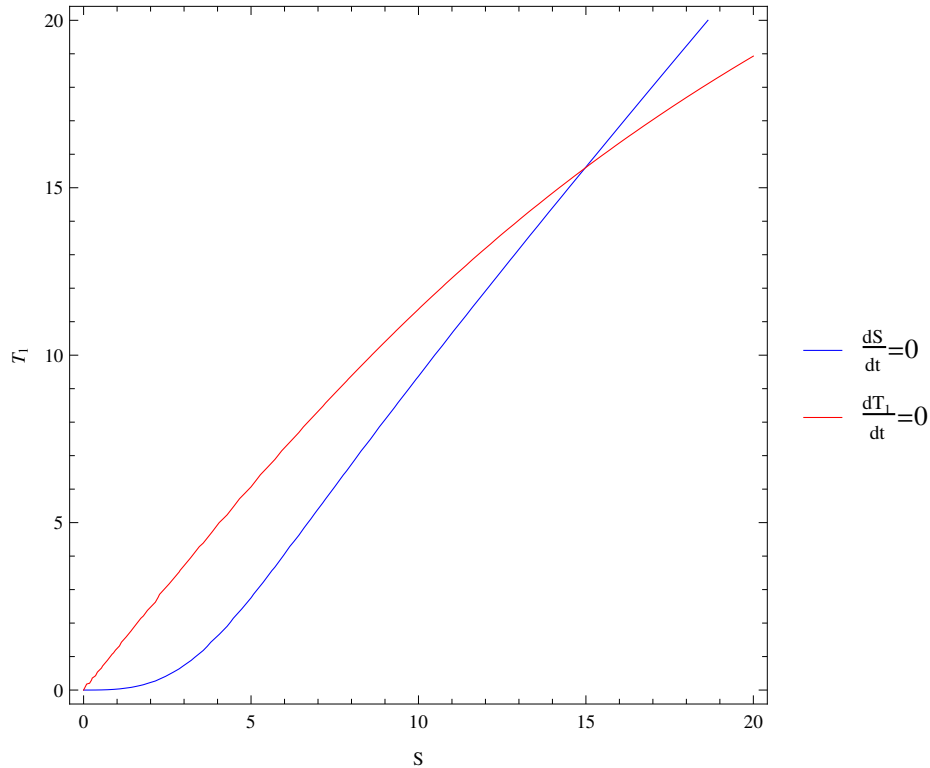


Figura B.1: Nulclinas definidas por $\frac{dS}{dt} = 0$ y $\frac{dT_1}{dt} = 0$. Las intersecciones de las curvas definen los puntos de equilibrio del sistema aunque no su estabilidad. La estabilidad de los puntos de equilibrio dependerá, en una primera instancia, del signo de los autovalores asociados al sistema linealizado en dichos puntos. Aquí nos restringimos al primer cuadrante que es donde tiene sentido biológico.

En B.2 (c) vemos el caso límite en el que se fija un clon carente de plasticidad ($m'_1 = 0$). Se aprecia que en este caso el punto de equilibrio estable desaparece. Esto significa que en caso de fijarse un clon sin plasticidad la cripta se extingue. Por completitud se muestra B.2 (d) ($m'_1 < 0$) lo que estaría asociado a una “plasticidad negativa” aunque carece de sentido biológico.

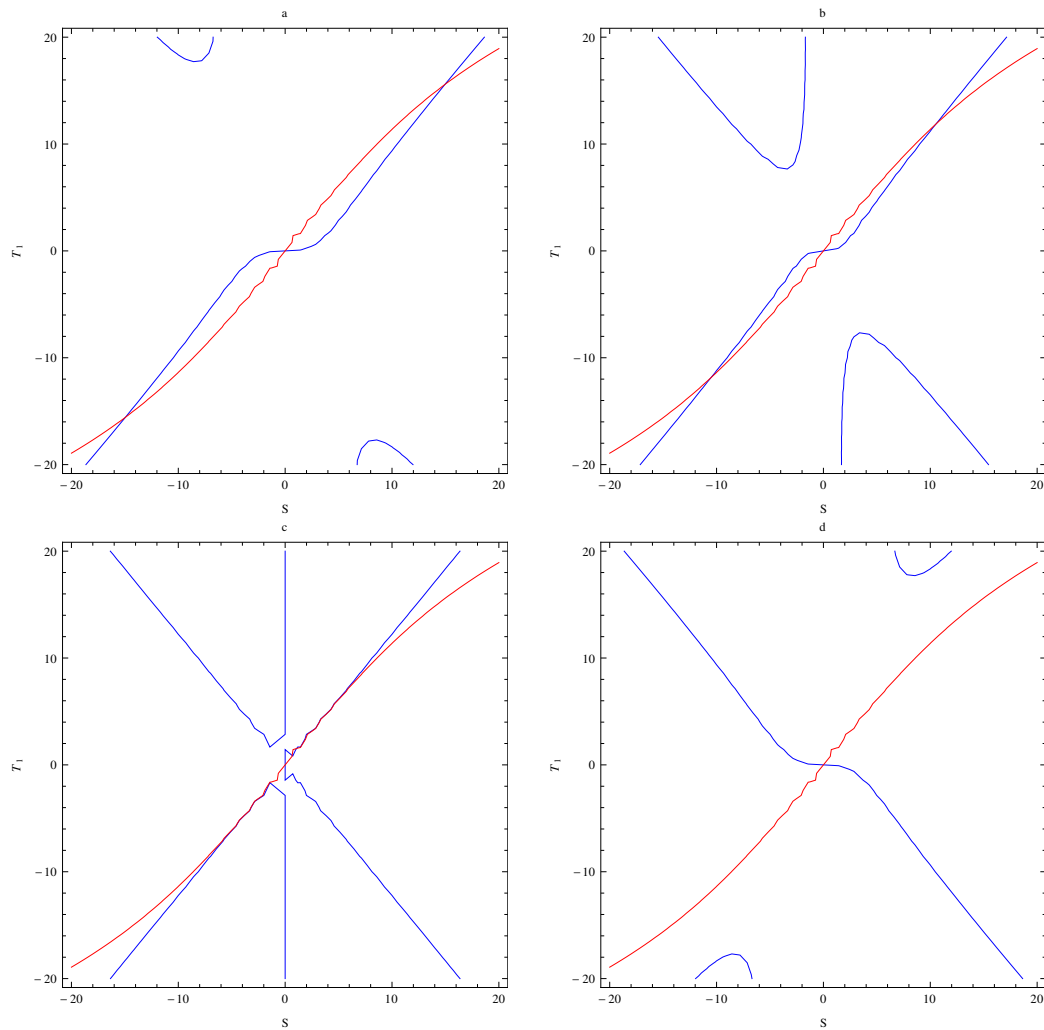


Figura B.2: Como en las figuras previas la curva azul corresponde a la nulclina definida por $\frac{dS}{dt} = 0$ y la roja a $\frac{dT_1}{dt} = 0$. (a) Nulclinas correspondientes a una cripta *normal* ($m'_1 = 1$). (b) En este caso las nulclinas corresponden a una fijación de un clon mutante $0 < m'_1 < 1$. Se puede apreciar que los valores para el equilibrio de las poblaciones disminuyen. (c) nulclinas correspondientes a $m'_1 = 0$. Como se puede apreciar en $m'_1 = 0$ desaparece el punto fijo estable asociado a las poblaciones lo cual esta asociado a la extinción de la cripta. (d) nulclinas para $m'_1 < 0$.

Apéndice C

Distribución de población

En este apéndice mostramos la distribución de la población de células madre en un régimen homeostático en el modelo markoviano original (*exacto*) (ver sección: 2.6.2). Recordemos que en el modelo markoviano original la población total fluctúa libremente alrededor de un valor medio a diferencia del modelo markoviano simplificado donde la población total permanece constante (ver sección: 2.6.3). En la sección 2.6.2 habíamos definido:

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto N células mutantes (ASC) en condiciones homeostáticas son:

$$P_A(N) = \Gamma_{0,N}^N \quad (\text{C.1})$$

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto N células normales (WSC) en condiciones homeostáticas son:

$$P_W(N) = \Gamma_{N,0}^N \quad (\text{C.2})$$

- Las probabilidades de que se fijen en el conjunto N células normales (WSC) descendientes de *una* de las células madre normales del estado inicial (aquí asumimos que nuestro estado inicial se compone de n_e células de las cuales $(n_e - 1)$ son normales (WSC) y 1 es mutante (ASC)):

$$P'_W(N) = \frac{\Gamma_{N,0}^N}{(n_e - 1)} \quad (\text{C.3})$$

- Las probabilidades de hallar el sistema con N células madre (SC) en condiciones homeostáticas:

$$P_T(N) = P_A(N) + P_W(N) \quad (\text{C.4})$$

En el siguiente gráfico C.1 (obtenido a partir del método desarrollado en la sección 2.6.2) mostramos las probabilidades de encontrar el sistema con N células madre, en condiciones homeostáticas, como función de N .

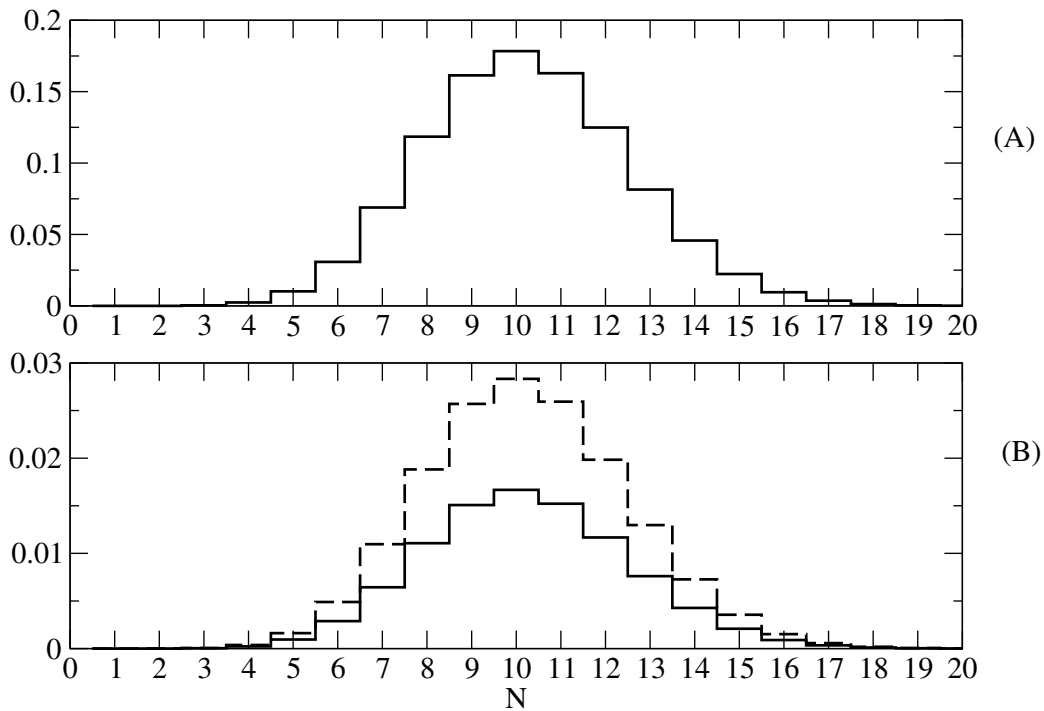


Figura C.1: (A) Probabilidad de hallar el sistema con N células madre $P_T(N)$ como función de N (ver C.4). (B) Probabilidades de hallar el sistema con N células madre mutantes o alteradas $P_A(N)$ (línea a trazos) y las probabilidades de hallar el sistema N células madre descendientes de uno de las células madre inicialmente presentes $P'_W(N)$ (línea continua). Estos resultados fueron obtenidos partiendo de un estado inicial de una población total de $N = 10$ con 9 células madre normales (WSC) y 1 célula madre mutante (ASC) y con $\alpha = 0,3$.

Bibliografía

- [1] S.I Ahmed, H.C.M Sheng, S Wasnik, D.J Baylink, and Lau K-H.W. Effect of aging on stem cells. *World J. Exp.Med*, 7:1–10, 2017.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M Raff, K Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 5 edition, 2008.
- [3] M.R Alexiades and C Cepko. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of rat retina. *Dev. Dyn*, 205:293–307, 1996.
- [4] S Assieh and A Reka. A comparative study of qualitative and quantitative dynamics models of biological regulatory networks. *Eur. Phys. J. Nonlinear. Biomed. Phys*, 4(1), 2016.
- [5] N Bacaër and E Ait Dads. On the probability of extinction in a periodic environment. *J Math Biol*, 2012.
- [6] Nick Barker, Johan H. Van Es, and Jeroen Kuipers. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *lgr5*. *Nature*, 449:1005–1007, 2007.
- [7] A Barton, A.J Fendrik, and E Rotondo. A stochastic model of neurogenesis controlled by a single factor. *J. Theor. Biol*, 355:77–82, 2014.
- [8] A Bernadotte, V.M Mikhelson, and I.M Spivak. Markers of cellular senescence. telomere shortening as a marker of cellular senescence. *AGING*, 8:3–11, 2016.
- [9] U Binshtok and D. Sprinzak. Molecular mechanisms of notch signaling. *Adv Exp Med Biol.*, 1066:79–98, 2018.
- [10] Jean-Micheal Boque. *L'organization en tant que système paradoxal*. •, • edition, 1993.
- [11] S Bottani and R.A Veitia. Hill function-based models of transcriptional switches: impact of specific, nonspecific, functional and non functional binding. *Biol Rev*, 92:953–63, 2017.
- [12] C.J Brown, Kaufman T, J.C Trinidad, and D.E Clemmer. Proteome changes in the aging drosophila melanogaster head. *Int. J. Mass. Spectrom*, 425:36–46, 2018.

- [13] J Cairns. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.*, 255(5005):197–200, 1975.
- [14] J Campisi. Aging, cellular senescence and cancer. *Annu. Rev. Physiol.*, 75:685–705, 2013.
- [15] A.J Carulli, L C Samuelson, and S. Schnell. Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integr. Biol.*, 6:243–57, 2014.
- [16] D.A Charlebois and G Balazsi. Modeling cell population dynamics. *Silico Biol*, 13:21–39, 2018.
- [17] H Chen, E Paradies, N, M Fedor-Chaiken, and R Brackenbury. E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J Cell Sci*, 110(3):345–356, 1997.
- [18] K.L Chung. *Markov chains with stationary transition probabilities*. Springer, 1 edition, 1960.
- [19] H Clevers. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.*, 154:274–284, 2013.
- [20] H Clevers, K. M Loh, and R Nusse. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science.*, 346(6205), 2014.
- [21] MJ Conboy, AO Karasov, and TA. Rando. High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol.*, 5:e102, 2007.
- [22] C. R. Darwin. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured in the Struggle for Life*. 1859.
- [23] D. Drasdo and M. Loeffler. Individual-based models to growth and folding in one-layered tissues: Intestinal crypts and early development. *Nonlinear Analysis*, 47:245–256, 2001.
- [24] J Elf and M Ehresenberg. Fast evaluation of fluctuations in biochemical network with the linear noise approximation. *Genome Res*, 13:2475–84, 2003.
- [25] H. F Farin et al. Visualization of short-range wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature.*, 530(7590):340–343, 2016.
- [26] H. F Farin, J. H Van Es, and H Clevers. Redundant sources of wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of paneth cell. *Gastroenterology.*, 143(6):1518–1529, 2012.

- [27] A.J Fendrik, L Romanelli, and E Rotondo. Neutral dynamics and cell renewal of colonic crypts of homeostatic regime. *Physical Biology*, 175:036005–20, 2018.
- [28] A.J Fendrik, L Romanelli, and E Rotondo. Stochastic cell renewal process and lengthening of cell cycle. *Physical Biology*, 17:016004, 2019.
- [29] A.G Fletcher, P.J Murray, and P.K Maini. Multiscale modelling of intestinal crypt organization and carcinogenesis. *Math. Models Methods Appl. Sci*, 3:2563–8, 2015.
- [30] Alexander G. Fletcher, C.J.W. Beward, and S. Jonathan Chapman. Mathematical modeling of monoclonal conversion in the colonic crypt. *Journal of Theoretical Biology*, 300:118–133, 2012.
- [31] S Gavrillets. *Fitness Landscapes and Origin of Species*. Princeton University Press, 2004.
- [32] D.T Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reaction. *J. Phys. Chem*, 81:2340–61, 1977.
- [33] A Gregorieff and J.L Wrana. Seeing is believing: Wnt3 localization in the gut epithelium. *Cell Res.*, 26(5):515–516, 2016.
- [34] A. V. Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol*, 40, 1910.
- [35] Adam Humphries and Nicholas.A Wright. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(6):415–424, 2008.
- [36] J Kang and D Shibata. Direct measurement of human colon crypt stem cell niche genetic fidelity: The role of chance in non-darwinian mutation selection. *Front. Oncol*, 3:264–, 2013.
- [37] P Katz, J, N Perreault, G Goldstein, B, S Lee, C, A Labosky, P, W Yang, V, and H Kaestner, K. The zinc-finger transcription factor klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, (129):2619–2628, 2002.
- [38] William Ogilvy Kermack and A.G. McKendrick. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society*, 115:700–21, 1927.
- [39] MJ Kiel and others. Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain brdu. *Nature.*, 449:238–242, 2007.
- [40] M. Kimura. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217:624–626, 1968.
- [41] M. Kimura. *The neutral theory of molecular evolution*. 1983.

- [42] T.B.L Kirkwood. Understanding the odd science of agings cell. *Cell.*, 120:437–47, 2006.
- [43] A.M. Klein and B.D Simons. Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues. *Development*, 138:3103–11, 2011.
- [44] PM Lansdorp. Immortal strands? give me a break. *Cell.*, 129:1244–1247, 2007.
- [45] B Levin and G.P. Young. How should we follow up premalignant condition? colorectal cancer in clinical practice: Prevention, early detection and management. (*London:Martin Dunitz Ltd*), pages 67–76, 2002.
- [46] Y.Q Li, S.A Roberts, U Paulus, M Loeffler, and C.S Potten. The crypt cycle in mouse small intestinal epithelium. *J. Cell Sci*, 107:3271–9, 1994.
- [47] G Lidzbarsky, D Gutman, H A Shekhidem, L Sharvit, and G Atzmon. Genomic instabilities, cellular senescence, and aging: in vitro, in vivo and aging-like human syndromes. *Front Med*, 5:104, 2018.
- [48] J Liu, L Wang, Z Wang, and J-P Liu. Roles of telomere biology in cell senescence, replicative and chronological ageing. *Cells.*, 8:54–, 2019.
- [49] L Liu and T.A Rando. Manifestations and mechanisms of stem cell agings. *J. Cell. Biol*, 193:257–66, 2011.
- [50] C Lopez-Garcia, A.M Klein, B.D Simons, and I Winton. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science*, 330:822–25, 2010.
- [51] E. Marshman, C. Booth, and C. S. Potten. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays*, 24:91–98, 2002.
- [52] De Matteis, A Graudenzi, and M. Antoniotti. A review of spatial computational models for multi-cellular systems, with regard to intestinal crypts and colorectal cancer development. *J. Math. Biol*, 66:1409–62, 2013.
- [53] Johnston M.D, Edwards C.M, Bodmer W.F, Maini P.K, and Chapman S J. Mathematical modeling of cell population dynamics in the colonic crypt and colorectal cancer. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 104:4008–13, 2007.
- [54] H Miyoshi et al. Wnt5a potentiates tgf beta signaling to promote colonic regeneration after tissue injury. *Science*, 338(6103):108–13, 2012.
- [55] P.A.P Moran. *The Statistical Process of Evolutionary Theory*. Oxford: Clanderon, 1 edition, 1962.

- [56] M Mura et al. Mathematical modelling reveals unexpected inheritance and variability patterns of cell cycle parameters in mammalian cells. *PLoS Comput. Biol.*, 15:e1007054, 2019.
- [57] P.A Neumann, S Koch, et al. Gut commensal bacteria and regional wnt gene expression in the proximal versus distal colon. *American Journal of Pathology*, 184:592–99, 2014.
- [58] A.M Olovnikov. Telomeres, telomerase end aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*, 31:443–48, 1996.
- [59] A Parker, O.J McLaren, A.J Fletcher, et al. Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *FASEB J*, 31(2):636–49, 2017.
- [60] U Paulus, M Loeffler, and S Potten, C. A model of the control of cellular regeneration in the intestinal crypt after perturbation based solely on local stem cell regulation. *Cell Proliferation*, 25:559–578, 1992.
- [61] U Paulus, M Loeffler, J Zeidler, G Owen, and C S Potten. The differentiation and lineage development of goblet cells in the murine smallintestinal crypt: experimental and modelling studies. *Journal of Cell Science*, 106:473–484, 1993.
- [62] J.M Phillip et al. The mechanobiology of aging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 17:113–41, 2015.
- [63] C. S. Potten and M. Loeffler. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. lessons for and from the crypt. *Development*, 110:1001–1020, 1990.
- [64] C.S Potten, C Booth, G.L Tudor, D Booth, G Brady, P Hurley, G Ashton, R Clarke, S Shin-Ichi, and O. Hideyuki. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker musashi-1. *Differentiation*, 71:28–41, 2003.
- [65] CS Potten, G Owen, and Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template dna strands. *J Cell Sci.*, 115:2381–2388, 2002.
- [66] AJ Quyn and others. Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell.*, 6:175–181, 2010.
- [67] R Raghunathan et al. Glycomic and proteomic changes in aging brain nigrostriatal pathway. *Mol. Cell. Proteomics*, 17:1778–87, 2018.
- [68] T.A Rando. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature.*, 441:1080–, 2006.
- [69] TA Rando. The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell.*, 129:1239–1243, 2007.

- [70] Luis Rincon. *Introducción a los procesos estocásticos*. UNAM, 2012.
- [71] S Ro and B Rannala. Methylation patterns and mathematical models reveal dynamics of stem cell turnover in the human colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, (98):10519–10521, 2001.
- [72] R Sancho, C.A Cremona, and A. Behrens. Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports.*, 16:571–81, 2018.
- [73] M Santillan. On the use of the hill functions in mathematical models of gene regulatory networks. *Math. Model. Nat. Phenom*, 3:85–95, 2008.
- [74] AG Schepers et al. Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J.*, 30:1104–1109, 2011.
- [75] D Schnoerr, G Sanguinetti, and R Grima. Approximation and interference method for stochastic biochemical kinetics - a tutorial review. *J. Phys. A: Math Theor.*, 50:093001–80, 2017.
- [76] R.M Seaberg and D Van Der Kooy. Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences*, 26:125–131, 2003.
- [77] L Shahriyari and N.L Komarova. Symetric versus asymetric stem cell divisions: an adaptation against cancer. *PLoS One*, 8:e76195, 2013.
- [78] V Shinin, B Gayraud-Morel, D Gomes, and S Tajbakhsh. Asymmetric division and cosegregation of template dna strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol.*, 8:677–687, 2006.
- [79] Hugo J Snippert, Laurens G van der Flier, Toshiro Sato, Johan H van Es, Maike van den Born, Carla Kroon-Veenboer, Nick Barker, Allon M Klein, Jacco Van Rheenen, Benjamin D Simons, and Hans Clevers. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing lgr5 stem cells. *Cell*, 143:134–144, 2010.
- [80] S Song and F.B Johnson. Epigenetic mechanisms impacting aging: a focus on histone levels and telomeres. *Genes*, 9:201–, 2018.
- [81] PA Sotiropoulou, A Candi, and C. Blanpain. The majority of multipotent epidermal stem cells do not protect their genome by asymmetrical chromosome segregation. *Stem Cells.*, 26:2964–2973, 2008.
- [82] C Stamp et al. Predominant asymmetrical stem cell fate outcome limits the rate of niche succession in human colonic crypts. *EBio Med*, 31:166–73, 2018.

- [83] N Sun, R.J Youle, and T Finkel. The mitochondrial basis of aging. *Mol. Cell*, 61:654–66, 2016.
- [84] T Takahashi, R.S Nowakowski, and V.S Caviness. The leaving or q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J. Neurosci*, 16:6183–96, 1996.
- [85] Uwe.C Täuber. *Critical Dynamics. A Field Theory Approach to Equilibrium and Non-Equilibrium Scaling Behavior*. Cambridge University Press, 1 edition, 2014.
- [86] B Toth et al. Early commitment and robust differentiation in colonic crypts. *Molecular Systems Biology*, 13:902, 2017.
- [87] A Traulsen et al. On the dynamics of neutral mutations in a mathematical model for a homogeneous stem cell population. *J. R. Soc. Interface*, 10:20120810, 2012.
- [88] L.S Tsimring. Noise in biology. *Rep. Prog. Phys*, 77:1–62, 2014.
- [89] D Uzar and Benayoun B.A. Aging epigenetic, changes and challenges. *Transl. Epigenetics*, 4:3–32, 2018.
- [90] J.H van Es, T Sato, et al. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.*, 14:1099–1104, 2012.
- [91] I.I.M van Leeuwen, H.M Byrne, et al. Crypt dynamics and colorectal cancer: advances in mathematical modelling. *Cell Proliferation*, 39:157–81, 2006.
- [92] A Viñuleta et al. Age-dependent changes in mean and variance of gene expression across tissues in a twin cohort. *Hum. Mol. Genet.*, 27:732–41, 2018.
- [93] S Victorelli and J.F Passos. Telomeres and cell senescence-size matter not. *E. Bio. Med*, 21:14–20, 2017.
- [94] J Vijg and C Montagna. Genome instabilities and aging: cause or effect. *Transl. Med. Aging*, 1:5–11, 2017.
- [95] W Wagner et al. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4:e5846–, 2009.
- [96] Y Yatabe, S Tavar, and D Shibata. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *PNAS*, 98:10830–44, 2001.
- [97] R Ziraldo and L Ma. Computing intrinsic noise of the genetic regulation modeled by hill functions. *J. Comp. Sys. Bio.*, 3:101, 2018.
- [98] E Zole and R Ranke. Mitochondria, its dna and telomeres in ageing and human population. *Biogerontology*, 19:189–208, 2018.