



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Ritmos colectivos en sistemas biológicos: los casos de oscilaciones neuronales y de desarrollo embrionario

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

Lic. Marcos Wappner

Director de tesis: Dr. Luis G. Morelli

Consejero de estudios: Dr. Pablo D. Mininni

Lugar de trabajo: IbioBA – Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos
Aires – CONICET – partner Institute of the Max Plank Society

Buenos Aires, 2025

Fecha de defensa: 30/05/2025

A Meli, a mis viejes.

RESUMEN

Los ritmos colectivos son una propiedad fundamental de los sistemas biológicos, observándose en múltiples escalas espaciales y temporales. Desde ritmos circadianos y oscilaciones cardíacas hasta la formación de patrones durante el desarrollo embrionario y la coordinación de individuos a escalas poblacionales, la sincronización entre unidades individuales es esencial para generar comportamientos autoorganizados y coordinados. Comprender estos mecanismos es clave para entender la formación de patrones y la organización de los sistemas biológicos.

Esta tesis estudia ritmos colectivos en dos contextos biológicos. En la primera parte, nos enfocamos en el cerebro de la mosca de la fruta, caracterizando oscilaciones espontáneas en una población de neuronas individuales. Mediante registros de la actividad eléctrica de las neuronas, mostramos que estas oscilaciones dependen de señales externas, provenientes de otras neuronas. Construimos un modelo teórico, consistente con la evidencia experimental, y que predice sincronización con relación de fase fija entre pares de neuronas, lo que confirmamos con registros simultáneos. Estos resultados sugieren la posible existencia de ondas cerebrales en esta región.

En la segunda parte, abordamos la segmentación embrionaria y el rol de la vía de señalización Notch en coordinar oscilaciones bioquímicas. Basados en datos de pez cebra, proponemos un modelo de osciladores acoplados mediante diferentes variantes del ligando Delta. Consideramos dos escenarios: uno en que Notch es activado por dímeros, y otro por monómeros. Ambos escenarios son consistentes con los fenotipos experimentales, pero asignan roles distintos a uno de los ligandos. Discutimos experimentos que podrían diferenciar estas posibilidades.

En conjunto, este trabajo contribuye a entender cómo interacciones locales entre osciladores generan ritmos colectivos, y cómo la diversidad molecular de una vía puede modular la respuesta del sistema en distintos contextos biológicos.

PALABRAS CLAVE: ritmos colectivos, sincronización, entrainment, oscilaciones neuronales, ondas cerebrales, reloj de segmentación, desarrollo embrionario

COLLECTIVE RHYTHMS IN BIOLOGICAL SYSTEMS: STUDY CASES OF NEURONAL OSCILLATIONS AND OF EMBRYONIC DEVELOPMENT

Collective rhythms are a fundamental property of biological systems, observed across multiple spatial and temporal scales. From circadian rhythms and cardiac oscillations, to pattern formation during development and coordination of individuals in a population, synchronization between individual units enables self-organized behaviors. Understanding these mechanisms is key to the understanding of pattern formation and organization of biological systems.

This thesis explores collective rhythms in two biological contexts. In the first part, we focus on the brain of the fruit fly, characterizing spontaneous oscillations in a population of individual neurons. Through recordings of neural electrical activity, we show that these oscillations depend on external signals from other neurons. We construct a theoretical model consistent with experimental evidence, which predicts phase-locked synchronization between pairs of neurons—confirmed through simultaneous recordings. These findings suggest the possible existence of brain waves in this region.

In the second part, we address embryonic segmentation and the role of Notch signaling in coordinating biochemical oscillations. Based on zebrafish data, we construct a model of coupled oscillators mediated by different variants of the Delta ligand. We consider two scenarios: one in which Notch is activated by dimers, and another by monomers. Both scenarios are consistent with experimental phenotypes but assign different roles to one of the ligands. We discuss experiments that could distinguish between these possibilities.

Together, this work contributes to understanding how local interactions between oscillators give rise to collective rhythms, and how molecular diversity within a signaling pathway can modulate system responses in different biological contexts.

KEYWORDS: collective rhythms, synchronization, entrainment, neural oscillation, cerebral waves, segmentation clock, embryo development

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mis viejes y a Meli. Uno siempre escucha que “esto no habría sido posible sin...”, pero la medida en que *esto no habría sido posible* sin su ayuda pocos la saben. Mis viejes me acompañaron siempre, con apoyo incondicional, charlas largas, consejos. Hicieron un esfuerzo gigante por que mi hermano y yo tuviéramos una educación de calidad. Con Meli compartimos una parte enorme de nuestra vida, ya la mitad en este punto. Crecimos a la par en muchos aspectos, nos ayudamos en todo momento, nos alimentamos mutuamente, y nuestras carreras científicas se nutrieron a la par de este crecimiento.

Le agradezco también al resto de mi familia: mi hermano, mis primos, mis abuelos, mis tíos. Siempre estuvieron pendientes de mi crecimiento académico y general, acompañando, preguntando, interesándose.

Le agradezco a mis compañeres de la facultad. Primero Nico, Sofi, Sofi, Flor, Lei y Tomi, con quienes compartí la carrera hasta casi el final. Las esiones de estudio, las charlas, las risas aportaron a que aprendiéramos lo que aprendimos, a desafiarnos, a interesarnos. Después a Aye, Gabo y toda la trup de ese lado, que me acompañaron y ayudaron con las etapas más desafiantes.

Le agradezco a mis compañeres de doctorado. A Agus y Maqui, que me integraron tan generosamente al grupo extendido de neuron en el instituto. Sin esta amistad, la mitad de esta tesis probablemente no habría sucedido, y habría virado hacia otros lados. El grupo que se formó, y al que me integraron –Giula, Lucca, Sol, Cami, Pedro, luego Cane, Emi y las recientes incorporaciones– hicieron del trabajo que culmina en esta tesis un placer.

Pasando de pares a mentores, le agradezco a Luis. Me acompañó de cerca en mi formación como investigador. Charlas profundas, reflexiones, discusiones interesantes están en el centro de sus aportes a mi crecimiento académico. Pero las conversaciones sobre curiosidades, nerdeadas y música fortalecieron mi crecimiento más integral.

De la misma forma le agradezco a mis amigues del ámbito musical: Nati, Cris, Mata, Edu, Agus y Magui. Elles aportaron a mi crecimiento extra-académico, pero siempre respetando e interesándose por mi carrera, con recomendaciones, opiniones, ideas locas y sobre todo, apoyo.

Finalmente, le agradezco a las instituciones: al Departamento de Física, la Ciencias Facultad de Exactas y Naturales, y en general la Universidad de Buenos Aires. No deja nunca de sorprender la calidad de la educación pública en este país, el compromiso de los docentes

–cuerpo del que ahora soy parte– y la riqueza de las enseñanzas que se imparten en los distintos espacios de esta maravillosa institución.

ÍNDICE GENERAL

PREFACIO	1
I OSCILACIONES COLECTIVAS NEURONALES EN MOSCA	5
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 El estudio de señales eléctricas	7
1.2 Moscas como modelo de oscilaciones neuronales	8
1.3 La técnica experimental: Patch Clamp	10
1.4 Estructura de la parte I	11
2 OSCILACIONES EN NEURONAS CIRCADIANAS	13
2.1 Oscilaciones de potencial de membrana en lLNvs	13
2.2 Tratamiento de los datos	13
2.2.1 Filtrado de datos	14
2.2.2 Cruces del umbral y duración del ciclo	15
2.3 Decaimiento de la frecuencia de oscilación	15
2.3.1 Validez de los ciclos	16
2.3.2 Cuantificación de la variación de CD	17
2.4 Oscilaciones de potencial de membrana en sLNvs	19
2.5 Autonomía de las oscilaciones	20
2.5.1 Curva de respuesta de fase	22
2.5.2 Escalones de corriente	24
2.5.3 Tratamiento farmacológico	25
2.6 Resumen	26
3 TEORÍA GENÉRICA DE UN OSCILADOR FORZADO	29
3.1 Oscilador forzado	29
3.2 Equilibrio	31
3.3 Estabilidad lineal	33
3.4 Respuesta a perturbaciones	34
3.5 PRC teórica	35
3.6 La teoría predice un defasaje entre células	36
4 DEFASAJE ENTRE OSCILADORES	39
4.1 Registros en pares de LNvs	39
4.2 Parametrización de la teoría	43
4.3 Oscilaciones en otras neuronas de la aMe	46
4.4 Resumen	49
5 DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	51
5.1 El origen de las oscilaciones neuronales colectivas	51
5.2 El origen del defasaje entre pares de neuronas	52
5.3 Un rol para el defasaje: ondas viajeras	54
5.4 ¿Son las oscilaciones en la aMe parte de un comportamiento colectivo extendido?	54
5.5 ¿Es la aMe el segundero del cerebro de mosca?	55

II	OSCILACIONES COLECTIVAS EN EL RELOJ DE SEGMENTACIÓN EN VERTEBRADOS	57
6	INTRODUCCIÓN	59
6.1	El desarrollo embrionario como ciencia	59
6.2	Somitogénesis y el modelo de reloj y frente de onda . .	61
6.3	Bases moleculares del oscilador en pez cebra	65
6.4	Primera hipótesis y últimos comentarios	67
7	DESCRIPCIÓN TEÓRICA DEL OSCILADOR	69
7.1	Oscilador y recepción de la señal	69
7.1.1	Función de regulación	69
7.1.2	Retardo de autoregulación	72
7.1.3	Degradación	73
7.1.4	Activación de Notch	73
7.1.5	Acomplamiento medio con vecinos	74
7.1.6	Campo medio	74
7.1.7	Actividad total de ligandos	75
7.2	Señalización activada por dímeros	75
7.2.1	Dimerización	75
7.2.2	Modelo completo	76
7.3	Adimensionalización	77
7.4	Parametrización	78
7.4.1	Parámetros del oscilador	79
7.4.2	Distribución del retardo de autoregulación . . .	81
7.4.3	Parámetros restantes	81
8	SINCRONIZACIÓN POR DÍMEROS	83
8.1	El sistema sincroniza	83
8.1.1	Sincronización	83
8.1.2	Retardo de acoplamiento	84
8.1.3	Cuantificación de la sincronización	85
8.2	Estado estacionario	87
8.2.1	Mapas de sincronización	87
8.2.2	Elección de un umbral de sincronización	89
8.2.3	Variaciones de los mapas de sincronización . .	91
8.3	Estado transitorio y desincronización	92
8.3.1	Límite anterior de defectos	93
8.3.2	Curvas de ALD y parametrización del <i>wildtype</i> . .	95
8.3.3	Origen de la diferencia de ALD	95
8.4	El rol de los dímeros	96
8.5	Resumen	98
9	SINCRONIZACIÓN POR MONÓMEROS	99
9.1	Señalización de Notch activada por monómeros	99
9.1.1	Descripción teórica	99
9.1.2	Primetrización y sincronización	100
9.1.3	Desincronización y variantes	101
9.2	Interacciones cis con señalización por DeltaD	103
9.2.1	Evidencia en otros modelos experimentales . .	103

9.2.2	Descripción teórica	104
9.2.3	Parametrización	105
9.2.4	Un nuevo rol para DeltaD	106
9.3	Unión competitiva	108
9.4	Discusión sobre otras hipótesis	109
9.5	Resumen	111
10	EL ROL DE DELTAD	113
10.1	Dos escenarios	113
10.2	Oscilaciones de DeltaD	114
10.2.1	Degradación del complejo DeltaD:NECD	114
10.2.2	Reciclado instantáneo	116
10.3	Experimentos de rescate	116
10.4	Resumen	118
11	SINCRONIZACIÓN POR UNA SEÑAL BASAL	121
11.1	Solución exacta de la dinámica de receptor y señal	121
11.2	Solución cuasiestacionaria	123
11.3	Sistema forzado 1D	126
11.4	Límite extremadamente no lineal	127
11.5	Resumen	130
12	DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	131
12.1	Dos roles para DeltaD	131
12.2	Experimentos observacionales podrían distinguir entre escenarios	132
12.3	Los dos escenarios hacen distintas predicciones ante perturbaciones	133
12.4	La vía Delta-Notch tiene interacciones en cis	134
12.5	Ligandos de Notch coexpresan en distintos contextos	135
12.6	Perspectivas	136
	COMENTARIOS FINALES	139
III	APÉNDICE	141
A	MÉTODOS	143
A.1	Métodos de la parte I	143
A.1.1	Electrofisiología	143
A.1.2	Curva de respuesta en fase	144
A.1.3	Inyección de corriente	145
A.1.4	Código	145
A.2	Métodos de la parte II	145
A.2.1	Integración numérica	145
A.2.2	No linealidades altas	146
A.2.3	Código	146
B	CÁLCULOS SUPLEMENTARIOS	147
B.1	Amplitud estacionaria del oscilador de Hopf sub umbral forzado	147
B.2	Solución exacta de la dinámica de receptor y señal	148
B.3	Aproximación cuasiestacionaria del modelo de mómoros	151

C	TABLAS SUPLEMENTARIAS	153
---	-----------------------	-----

	BIBLIOGRAFÍA	157
--	--------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustraciones de neuronas y moscas	9
Figura 2.1	Proceso de análisis	14
Figura 2.2	CD de ILNvs	16
Figura 2.3	Variación de CD en el tiempo en ILNvs	18
Figura 2.4	Valor basal de las oscilaciones	19
Figura 2.5	Amplitud de las oscilaciones	20
Figura 2.6	Oscilaciones en sLNvs	21
Figura 2.7	PRC de ejemplo	22
Figura 2.8	Curva de respuesta de fase	23
Figura 2.9	Escalones de corriente inyectada	25
Figura 2.10	Tratamientos farmacológicos de neuronas	27
Figura 3.1	Oscilaciones del modelo teórico	32
Figura 3.2	PRC numérica	36
Figura 4.1	Registros duales	40
Figura 4.2	Silencios en pares de neuronas	41
Figura 4.3	Mediciones de defasajes entre pares	42
Figura 4.4	Defasaje de pares de neuronas	43
Figura 4.5	Elección de parametrización	46
Figura 4.6	Parámetros vs. observables	47
Figura 4.7	Oscilaciones en otras neuronas de la aMe	48
Figura 6.1	Etapas del desarrollo	60
Figura 6.2	Reloj y frente de onda	63
Figura 6.3	Evidencia del reloj de segmentación	64
Figura 6.4	Proceso de segmentación	66
Figura 7.1	Esquema del modelo de dímeros	76
Figura 7.2	Oscilador central	80
Figura 7.3	Parametrización del retardo temporal	82
Figura 8.1	Oscilaciones de dímeros	84
Figura 8.2	Retardos de acoplamiento	86
Figura 8.3	Parámetro de Kuramoto	87
Figura 8.4	Fluctuaciones del parám. de Kuramoto	88
Figura 8.5	Mapas de sincronización de dímeros	90
Figura 8.6	Kuramoto en función de un parámetro	91
Figura 8.7	Elección del umbral	92
Figura 8.8	Variaciones de la región de sincronización	93
Figura 8.9	Desincronización de un sistema	94
Figura 8.10	ALD en función de parámetros	96
Figura 8.11	Roles de los dímeros	97
Figura 9.1	La hipótesis de monómeros sincroniza	100
Figura 9.2	Mapas de monómeros	102
Figura 9.3	Variaciones de mapas de monómeros	103

Figura 9.4	Diagrama del modelo de cis-inhibición	104
Figura 9.5	Oscilaciones de cis-inhibición	107
Figura 9.6	ALD de cis-inhibición	108
Figura 9.7	Unión competitiva	109
Figura 10.1	Actividad total de ligandos	114
Figura 10.2	DeltaD total	117
Figura 10.3	Ensayos de rescate	118
Figura 11.1	Correlaciones de amplitud y basal	122
Figura 11.2	Trazas del modelo forzado	124
Figura 11.3	Mapas del modelo forzado	128
Figura 11.4	Variaciones de mapas del modelo forzado	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Descripción de variables y parámetros	31
Tabla 6.1	Evidenciaia sobre componentes moleculares . .	67
Tabla 7.1	Descripción de los parámetros	79
Tabla 10.1	Amplitud de DeltaD total	116
Tabla C.1	Parámetros parte I	153
Tabla C.2	Parámetros parte II	154
Tabla C.3	Parámetros variaciones de dímeros	155

ACRÓNIMOS

LNv	neuronas latero-ventrales – <i>Lateral ventral Neuron</i>
ILNv	neuronas latero-ventrales grandes – <i>large Lateral ventral Neuron</i>
sLNv	neuronas latero-ventrales pequeñas – <i>small Lateral ventral Neuron</i>
aMe	medula accesoria – <i>accessory Medulla</i>
PDF	factor de dispersión pigmentaria – <i>Pigment Dispersion Factor</i>
CD	duración del ciclo – <i>cycle duration</i>
PRC	curva de respuesta de fase – <i>Phase Response Curve</i>
ACh	acetilcolina – <i>acetylcholine</i>
NICD	dominio intracelular de Notch – <i>Notch Intra-cellular Domain</i>
NECD	dominio extracelular de Notch – <i>Notch Extra-cellular Domain</i>
CV	coeficiente de variación – <i>coefficient of variation</i>
ALD	límite anterior de defectos – <i>anterior limit of defects</i>
PSM	mesodermo pre-somático – <i>presomitic mesoderm</i>

PREFACIO

Las oscilaciones están en todas partes. Desde el latido regular del corazón hasta el ciclo día-noche que organiza nuestra fisiología, la naturaleza está llena de ritmos que surgen y se propagan en todos los niveles de organización.

En física, las oscilaciones son comportamientos característicos de sistemas dinámicos, tanto lineales como no lineales. En su forma más simple, pueden describirse mediante ecuaciones diferenciales que modelan el intercambio periódico de energía entre dos formas —como la energía cinética y potencial en un péndulo, o la energía eléctrica y magnética en un circuito LC. Sin embargo, en sistemas no lineales, las oscilaciones adquieren una riqueza adicional: pueden estabilizarse en ciclos límite, mostrar bifurcaciones, o incluso comportamientos caóticos. Esta variedad de dinámicas oscilatorias ha sido estudiada extensamente en el marco de la teoría de sistemas dinámicos, que proporciona un lenguaje natural para describir fenómenos periódicos, cuasiperiódicos y autoorganizados. En este contexto, las oscilaciones no son simplemente movimientos repetitivos, sino manifestaciones estructurales de las leyes que gobiernan la evolución temporal del sistema.

En biología, su presencia fue inicialmente observada en fenómenos macroscópicos —el sueño, la locomoción, la floración de ciertas plantas—, pero hoy sabemos que también emergen en la regulación de genes, en el disparo rítmico de neuronas, en las contracciones de los músculos, e incluso en el crecimiento embrionario.

El estudio moderno de las oscilaciones biológicas tomó un nuevo impulso con los trabajos pioneros de Arthur Winfree, quien en los años 60 y 70 planteó preguntas fundamentales sobre la sincronización de poblaciones de osciladores biológicos en sistemas micro- y macroscópicos, como las células del marcapasos del corazón o las luciérnagas que titilan al unísono. Poco después, Yoshiki Kuramoto propuso un modelo matemático simplificado pero profundamente influyente, que permitió entender cómo un conjunto de osciladores con frecuencias naturales distintas puede llegar a sincronizarse mediante interacciones débiles. Estos marcos conceptuales demostraron ser útiles no solo en física, sino también en neurociencia, cronobiología y biología del desarrollo, donde la sincronización y la coordinación temporal son fundamentales para el funcionamiento del sistema.

Una distinción importante en el campo, y que mantendremos en esta tesis, es entre sincronización y *entrainment*. Mientras que la sincronización implica una coordinación emergente entre múltiples osciladores, donde ninguno tiene un rol privilegiado de director, el *entrain-*

entrainment

ment ocurre cuando un oscilador (o una población) ajusta su fase o frecuencia para seguir el paso de una señal externa o dominante. Esta diferencia –aunque sutil en algunos contextos– tiene implicancias importantes: no es lo mismo que un grupo de neuronas genere un ritmo por interacción mutua, o que todas estén siguiendo una señal común emitida por un marcapasos externo. En ambos casos puede observarse alineamiento de fases, pero el origen del ritmo y las propiedades del sistema frente a perturbaciones son profundamente diferentes.

Cualquiera sea el origen de la coordinación, el efecto emergente observado es un ritmo colectivo de múltiples individuos, oscilando a la par. Los ritmos colectivos, en forma de oscilaciones sincronizadas u ondas que se propagan, impregnan las funciones biológicas. La señalización molecular en las decisiones sobre el destino celular, la formación de patrones embrionarios, ritmos cardíacos, ondas cerebrales, control del movimiento animal, y fenómenos en poblaciones de individuos.

El descubrimiento del primer oscilador génico, el reloj circadiano, marcó un hito en la historia de la biología moderna. Se trataba de una red de regulación génica capaz de generar ciclos de aproximadamente 24 horas sin estímulos externos, y su identificación en organismos tan diversos como hongos, bacterias, insectos y mamíferos reveló la ubicuidad de estos sistemas en la evolución. Desde entonces, se han descubierto otros relojes celulares, como el reloj de segmentación en vertebrados, que regula la formación de los somitos durante el desarrollo embrionario. En todos estos casos, la lógica oscilatoria parece ser una solución natural –y evolutivamente conservada– para organizar procesos temporales de manera precisa, flexible y robusta.

En esta tesis, que dividimos en dos partes, estudiaremos en la primera parte la coordinación de neuronas en el cerebro de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y su *entrainment* con un forzante desconocido. Estos ritmos colectivos nos sugieren la posible existencia de ondas cerebrales en la mosca. En la segunda parte, estudiaremos una población de células en el embrión de pez cebra en desarrollo, que oscilan de forma autónoma, y se comunican para coordinarse y dar origen a vértebras, costillas y otros tejidos. Esta sincronización está mediada por comunicación local a través de vías de señalización celular. Estudiaremos estos fenómenos a partir de teorías que desarrollaremos basada estrechamente en evidencia experimental. Utilizaremos teoría de sistemas dinámicos, mecánica estadística, y la ley de acción de masas para construir sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias y con retardos. Con estas herramientas, evaluaremos distintas hipótesis para cada sistema, y realizaremos predicciones experimentales.

Este abordaje a la biología, desde un enfoque teórico, no busca reemplazar la observación ni la experimentación, sino complementarse con ellas y ofrecer nuevas formas de pensar los fenómenos que obser-

vamos. En particular, la emergencia de ritmos colectivos nos invita a mirar los sistemas vivos no solo como conjuntos de partes actuando coordinadamente, sino como procesos complejos en los que surge un orden temporal a partir de reglas simples.

Parte I

OSCILACIONES COLECTIVAS NEURONALES EN MOSCA

En la primera parte de esta tesis estudiaremos la coordinación de oscilaciones de potencial de membrana. Estudiaremos el *entrainment* de pares de neuronas en el cerebro de mosca con señales ultradianas, construiremos una descripción teórica de los osciladores y haremos predicciones respecto de la relación de fases de los osciladores, que serán experimentalmente corroboradas. Todos los experimentos de mesada fueron realizados por la mano de la Dra. Florencia Fernandez Chiappe, durante su doctorado en el grupo de la Dra. Nara I. Muraro en nuestro instituto, pero fueron diseñados, discutidos e iterados con este autor.

INTRODUCCIÓN

1.1 EL ESTUDIO DE SEÑALES ELÉCTRICAS

Durante siglos, el cerebro fue considerado un órgano enigmático, asociado al alma, la mente y los aspectos más profundos de la experiencia humana. Su funcionamiento real permanecía fuera del alcance del conocimiento empírico, dando lugar a mitos, especulaciones filosóficas y teorías de todo tipo. En la Edad Antigua, Galeno ya proponía que parte del cerebro era el órgano encargado de procesar sensaciones y gobernar el cuerpo, aunque desarrolló sus ideas dentro de la teoría de humores.

A fines del siglo XVIII, el descubrimiento de la electricidad y los avances técnicos para manipularla transformaron profundamente todos los campos del conocimiento. En la fisiología surgió la teoría del galvanismo, según la cual el cerebro genera electricidad que se transmite por los nervios para controlar el cuerpo. Estas ideas marcaron uno de los primeros intentos sistemáticos de vincular fenómenos eléctricos con funciones biológicas. Al igual que hoy en día, las teorías científicas en boga permearon en la cultura popular, dando lugar por ejemplo a Frankenstein, obra en la que se reanima un cuerpo formado de trozos de cadáveres con una descarga eléctrica, y que en el camino sentó las bases para el género de ciencia ficción moderno.

Recién hacia fines del siglo XIX las neurociencias comenzaron a establecerse como una disciplina con bases experimentales más sólidas. El desarrollo de técnicas de tinción y microscopía permitió observar por primera vez la morfología de las células nerviosas. Así, Ramón y Cajal propuso la neurona como unidad mínima del sistema nervioso (Fig. 1.1A, B). Durante el siglo XX, las neurociencias se consolidaron como un campo interdisciplinario, combinando elementos de biología, física, química y matemática para comprender el funcionamiento del sistema nervioso. La idea de que la información se codifica en patrones de actividad eléctrica se volvió central, y con ella surgieron nuevas preguntas sobre cómo las neuronas interactúan entre sí, cómo se procesan los estímulos sensoriales, y cómo emergen propiedades colectivas a partir del comportamiento de células individuales. En este contexto, el estudio de oscilaciones eléctricas en el cerebro cobró particular importancia.

Ya desde mediados de siglo se sabía que el cerebro humano exhibe ritmos eléctricos organizados, observables mediante electroencefalografía [1]. En mamíferos, estos ritmos se asociaron a funciones cognitivas y estados conductuales, y se los clasifica por sus componentes

de frecuencia –ondas Gamma de alta frecuencia, Alfa de frecuencia intermedia, y así [2]. Se observó que estas oscilaciones podrían tener roles en la coordinación temporal entre regiones cerebrales, la modulación de la excitabilidad neuronal o la sincronización de poblaciones de neuronas [2-4]. Esto impulsó no solo estudios experimentales sino también un floreciente campo teórico, que buscó entender cómo surgen, se propagan y se coordinan los ritmos neuronales dentro de redes acopladas [5-9]. Una idea central que emergió de este enfoque fue la posibilidad de que ciertas funciones cognitivas no tengan su origen en la actividad de neuronas individuales, sino en patrones colectivos de oscilación. En particular, se planteó que la sincronización de grupos neuronales podría ser clave para procesos como la integración de información o la selección de foco de atención [2, 10, 11]. Estas hipótesis dieron lugar a una intensa actividad experimental y teórica enfocada en identificar mecanismos de acoplamiento y de sincronización, y relaciones entre dinámica colectiva y función cognitiva [12-14].

En la primera parte de esta tesis nos enfocaremos en estudiar oscilaciones en neuronas individuales en cerebro de la mosca *Drosophila melanogaster*, y luego revelaremos evidencia que sugiere la existencia de oscilaciones colectivas y ondas cerebrales en estos organismos.

1.2 MOSCAS COMO MODELO DE OSCILACIONES NEURONALES

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es ampliamente utilizada como modelo de estudio animal en múltiples áreas de la biología [16, 17] (Fig. 1.1C). Su uso fue central en múltiples trabajos fundacionales, incluyendo premios Nobel por desarrollos en genética, y por descifrar mecanismos básicos del desarrollo embrionario y de la regulación del ritmo circadiano [18-20]. En neurociencia juega también un rol central, por su simplicidad anatómica, la facilidad de su manipulación genética y en general su relevancia para estudiar mecanismos conservados entre distintas especies animales [21, 22]. A pesar de su pequeño tamaño, su cerebro cuenta con varios miles de neuronas organizadas en redes bien definidas [23], que regulan desde comportamientos motores simples hasta funciones cognitivas complejas como el aprendizaje, la memoria o los ritmos circadianos.

De particular interés para nosotros es un conjunto de neuronas localizadas en el lóbulo anterior del cerebro, en una región llamada medula accesoria –*accessory Medulla* (aMe) (Fig. 1.1D, E). Esta constituye una región de procesamiento donde convergen señales visuales, circadianas y sensoriales, y es un nodo relevante en la red de control temporal en el cerebro de la mosca. Nos ocuparemos en particular de las denominadas neuronas latero-ventrales –*Lateral ventral Neurons* (LNvs) (Fig. 1.1D, E), conocidas por su rol en el control del ritmo circadiano. Son un grupo de 16-18 células del reloj circadiano caracterizadas por la expresión del neuropéptido factor de dispersión

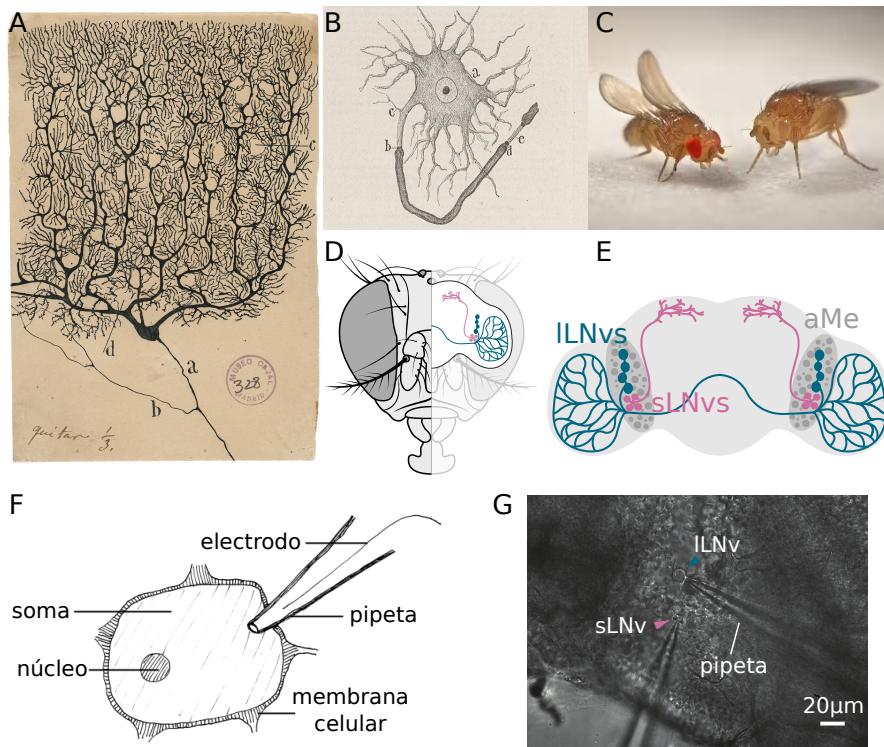


Figura 1.1: (A, B) Ilustraciones a mano alzada de neuronas, por Santiago Ramón y Cajal en 1888. (C) *Drosophila melanogaster*, fenotipos de ojos rojos (derecha) y ojos blancos (izquierda). (A-C) Son imágenes de dominio público. (D) Ilustración esquemática de la cabeza de una mosca y la ubicación del cerebro dentro de ella. (E) Ilustración esquemática del cerebro de mosca, mostrando la aMe y las ILNvs y sLNvs, incluyendo sus proyecciones axonales. (F) Esquema del armado experimental para *whole-cell patch clamp*, adaptado de Ref. [15]. (F) Una ILNv y una sLNv en *patch clamp*.

pigmentaria –*Pigment Dispersion Factor (PDF)* [24, 25]. Estas neuronas se dividen en dos subgrupos, las neuronas latero-ventrales grandes –*large Lateral ventral Neurons (ILNvs)* y las neuronas latero-ventrales pequeñas –*small Lateral ventral Neurons (sLNvs)*, que se pueden diferenciar por su tamaño y ubicación anatómica. Las primeras son un conjunto de 4 o 5 neuronas por hemisferio (Fig. 1.1E). Originalmente se pensaba que jugaban un papel en el procesamiento de información visual, dado que, si bien sus somas se encuentran en la aMe, tienen proyecciones axonales tupidas en el lóbulo óptico [26, 27]. Posteriormente se encontró también que juegan un papel central en la señalización del estado de vigila [28-31]. Las sLNvs, 4 por hemisferio (Fig. 1.1E), se cree que constituyen el marcapasos central del ritmo circadiano [32-35]. Trabajos recientes muestran que las ILNvs, y algunas otras neuronas circadianas, presentan oscilaciones de potencial de membrana robustas [36-38]. Sin embargo, aún se desconoce si estas oscilaciones neuronales forman parte de un ritmo colectivo.

ILNvs, sLNvs

1.3 LA TÉCNICA EXPERIMENTAL: PATCH CLAMP

La técnica de *whole-cell patch clamp* ha sido una herramienta fundamental en la neurociencia moderna para el estudio de las propiedades eléctricas de células excitables. Desarrollada en la década de 1980 por Erwin Neher y Bert Sakmann [39], quienes recibieron el Premio Nobel por esta contribución en 1991, esta técnica permitió, por primera vez, registrar corrientes iónicas con una resolución sin precedentes en células individuales. El método consiste en formar un sello de alta impedancia eléctrica entre una micropipeta de vidrio y la membrana plasmática de una célula, para luego romper la membrana bajo la punta y obtener acceso al interior celular [40] (Fig. 1.1F, G). Esto posibilita el registro de potenciales de membrana y las corrientes involucradas en la señalización neuronal.

Desde su introducción, el *patch clamp* ha sido empleado en una amplia variedad de modelos experimentales para investigar mecanismos de excitabilidad, sinapsis, integración neuronal y plasticidad [41]. Aunque su uso ha sido tradicionalmente más común en preparaciones de mamíferos –corteza o hipocampo de rata, o cultivos celulares–, en las últimas décadas se ha extendido con éxito al sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*, impulsado en parte por el desarrollo de herramientas genéticas sofisticadas en este modelo [36-38]. La posibilidad de combinar registros eléctricos con manipulación genética específica de tipos celulares ha abierto nuevas oportunidades para desentrañar circuitos neuronales en un cerebro relativamente simple pero funcionalmente rico.

Sin embargo, aplicar esta técnica en el cerebro de *Drosophila* representa una serie de desafíos técnicos importantes, comparado con mamíferos. El tamaño pequeño de las neuronas, la fragilidad del tejido y la necesidad de mantener la viabilidad de la preparación en condiciones *ex vivo* complican significativamente el proceso. A diferencia de las neuronas corticales de mamífero, que pueden tener diámetros de soma de más de 20 μm , muchas neuronas en la mosca tienen somas de solo 3 a 5 μm . Esto exige un nivel de precisión y destreza elevado durante la aproximación de la pipeta y la formación del sello. Además, el cerebro de la mosca carece de una arquitectura laminar clara, lo que dificulta la orientación espacial y la identificación de tipos neuronales sin ayuda de marcadores fluorescentes. En consecuencia, los registros en *Drosophila* suelen requerir el uso de líneas transgénicas con expresión específica de fluoróforos, microscopía de alta resolución y, en muchos casos, adaptaciones del equipamiento clásico de *patch clamp*. Por esta razón, en esta tesis trabajamos con la línea llamada Pdf-RFP [42], que marca las LNvs co-expresando un fluoróforo con PDF.

1.4 ESTRUCTURA DE LA PARTE I

En esta tesis realizamos registros electrofisiológicos de célula entera mediante *patch clamp* en *Drosophila melanogaster*, y desarrollamos un análisis cuantitativo para caracterizar las oscilaciones del potencial de membrana. Encontramos que las oscilaciones de las LNVs se enlentecen con el tiempo y dependen de neurotransmisores colinérgicos. Mediante pulsos breves de corriente construimos una curva de respuesta de fase, y observamos que las perturbaciones se relajan rápidamente en comparación con la escala temporal de las oscilaciones. A su vez, inyecciones de corriente más prolongadas no modifican la frecuencia de las oscilaciones. Estos resultados sugieren que las oscilaciones de las LNVs no son autónomas a nivel celular. Basado en esta evidencia, proponemos un modelo genérico de oscilador forzado que reproduce las observaciones experimentales, y predice que las oscilaciones sincronizadas deben presentar defasaje nulo entre neuronas del mismo tipo, y defasajes distintos de cero entre tipos neuronales diferentes. Validamos esta predicción mediante registros simultáneos de *patch clamp*, y mostramos que las ILNVs se adelantan consistentemente a las sLNVs. Por último, observamos que otras neuronas de la aMe también presentan oscilaciones de potencial de membrana, coherentes con las de las LNVs. En conjunto, estos hallazgos abrirán la posibilidad de la existencia ritmos colectivos en esta región aún poco explorada del cerebro de la mosca.

OSCILACIONES EN NEURONAS CIRCADIANAS

En este capítulo caracterizaremos las oscilaciones de **LLNvs** y **sLNvs**, los efectos de las condiciones experimentales en las oscilaciones, y estudiaremos la respuesta a perturbaciones eléctricas y farmacológicas para evaluar la autonomía de los osciladores.

2.1 OSCILACIONES DE POTENCIAL DE MEMBRANA EN LLNVS

Las **LNvs** disparan potenciales de acción organizados en ráfagas, una modalidad de actividad neuronal que previamente ha sido asociado con la liberación de neuropéptidos [43-46]. En este tipo de actividad, los potenciales de acción se montan sobre oscilaciones de despolarización de la membrana. Para caracterizar estas oscilaciones, realizamos registros de *patch clamp* de célula entera en **LNvs**, a partir de explantes cerebrales, siguiendo métodos previamente establecidos [47-49] (Apéndice A).

Como estas neuronas tienen roles conocidos en la regulación del ciclo circadiano y el sueño, tomamos los registros siempre dentro de la fase de luz del ciclo de 12 horas de luz, 12 de oscuridad en las que se mantiene a las moscas. Usamos moscas hembra de la línea Pdf-RFP [42], en las que el promotor del gen del factor de **PDF** regula también la expresión de una proteína fluorescente roja. De esta forma, las **LNvs** se pueden identificar en el microscopio por el marcador fluorescente, su posición anatómica y su tamaño. Inicialmente accedemos a la célula seleccionada en configuración de *whole-cell patch clamp* en modalidad *voltage clamp*. De esta forma medimos la resistencia de acceso, corrientes de fuga y en general la integridad del sello. Luego pasamos a *current clamp* con $I = 0$ para registrar el voltaje de membrana. Así obtuvimos registros que muestran ciclos claros de oscilación del potencial de membrana (Fig. 2.1A), consistentes con las observadas en trabajos previos [36].

2.2 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Para cuantificar las oscilaciones, construimos un proceso de análisis que estandariza las señales y nos permite comparar múltiples registros. En particular, observamos que el valor basal del potencial de membrana de las oscilaciones suele presentar fluctuaciones lentas (Fig. 2.1A izquierda).

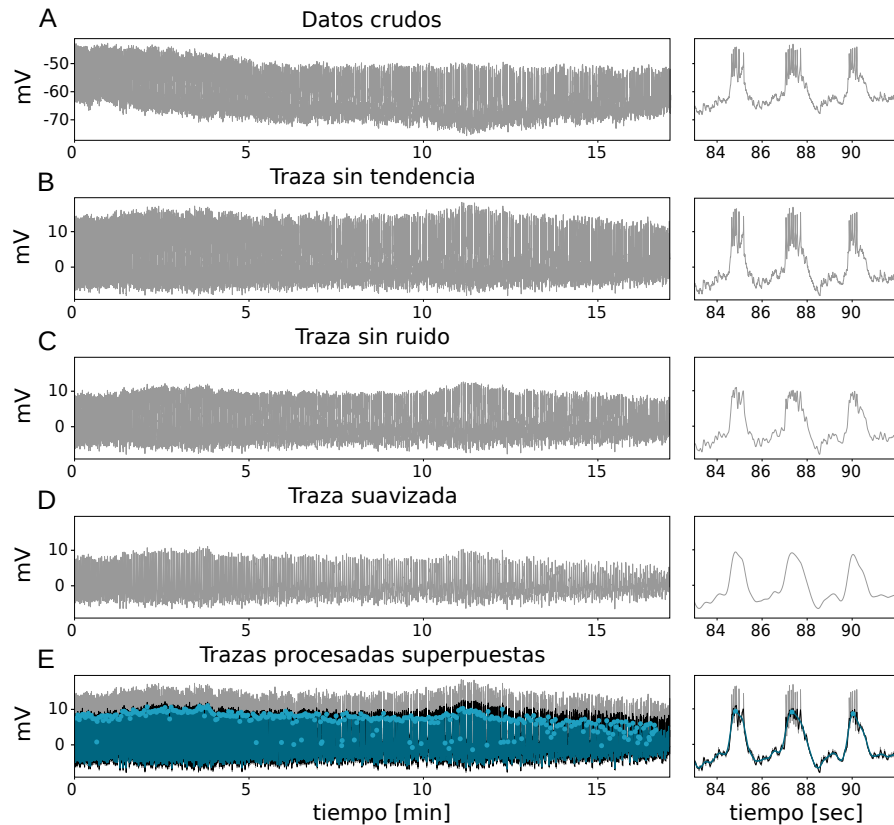


Figura 2.1: Procesamiento de registros electrofisiológicos. (A-E) Izquierda: registro completo típico. Derecha: detalle. (A) Datos crudos. (B) Datos sin tendencia de escala temporal lenta, corregido mediante un filtro pasaaltos con frecuencia de corte de 0.1 Hz. (C) Datos suavizados mediante un filtro pasabajos con frecuencia de corte de 10 Hz. Elimina ruido y potenciales de acción. (D) Datos suavizados mediante un segundo filtro pasabajos con frecuencia de corte de 2 Hz. (E) Trazas de B (gris), C (negro) y D (azul), junto con las ubicaciones de picos (puntos) obtenidas a partir de D. Todos los filtros son filtros Butterworth de segundo orden aplicados en pasadas hacia adelante y hacia atrás para evitar corrimientos de fase.

2.2.1 Filtrado de datos

Para eliminar entonces estas fluctuaciones en el valor basal y en general el ruido de la señal, aplicamos filtros de Butterworth no causales de segundo orden, tal como se implementan en `scipy.signal.filtfilt`.

Para eliminar estas dinámicas lentas en el potencial de membrana—que llamaremos de ahora en más *tendencias*— utilizamos un filtro pasaaltos con frecuencia de corte en 0.1 Hz (Fig. 2.1B), que llamaremos `filt1`. Luego, reducimos el ruido de alta frecuencia con un filtro pasabajos con frecuencia de corte en 10 Hz, que llamaremos `filt2`. En este análisis nos preocupamos por estudiar las oscilaciones de potencial

filt1, filt2 y filt3

de membrana, no los potenciales de acción montados en las oscilaciones, por lo que es importante notar que procedimiento también elimina los potenciales de acción de la señal (Fig. 2.1C). Algunos análisis posteriores requieren un suavizado adicional, que realizamos con un segundo filtro pasabajos con frecuencia de corte en 2 Hz (Fig. 2.1D), denominado `filt3`.

2.2.2 Cruces del umbral y duración del ciclo

Para cuantificar la rapidez de las oscilaciones encontramos que el método más robusto y directo resulta encontrar los instantes en que la señal cruza un umbral. Este método es sumamente directo, y resulta más resistente a fluctuaciones que otros métodos también tradicionales. De esta forma conseguimos lo que llamamos duración del ciclo –*cycle duration* (**CD**), que es esencialmente una medida instantánea del período de la oscilación. Para obtener esta cantidad hallamos los picos, los máximos locales, en la señal tratada con `filt1`, `filt2` y `filt3`, utilizando `scipy.signal.find_peaks`. Luego nos quedamos sólo con aquellos que tienen una prominencia mayor a 3 mV y que están separados entre sí una distancia mínima de 0,4 veces el intervalo promedio entre máximos (Fig. 2.1E, puntos celestes). De esta forma evitamos detectar picos espurios o múltiples picos por ciclo.

*duración del ciclo,
CD*

Debido a que la forma de la oscilación varía de ciclo a ciclo, el instante en el que la señal alcanza su máximo local también varía. Esto implica que la distancia entre picos no es una buena estimación de la **CD**. Por esta razón, detectamos los cruces por umbral en el flanco ascendente de la señal. Sobre la señal filtrada con `filt1` y `filt2`, retrocedemos desde la ubicación de cada pico hasta encontrar el cruce con un umbral. Para evitar arbitrariedad, definimos 21 valores de umbral equiespaciados entre 0 y 10 mV (Fig. 2.2A), cubriendo la mayor parte del rango de señal.

Calculamos entonces la **CD** como la diferencia de tiempo entre cruces consecutivos para cada umbral, y luego obtuvimos el promedio y desvío estándar sobre ese conjunto. De esta forma obtenemos información sobre la rapidez de la oscilación y cómo varía en el tiempo.

2.3 DECAIMIENTO DE LA FRECUENCIA DE OSCILACIÓN

Informes anteriores mostraron que la frecuencia de oscilación de la membrana en **ILN_vs** decae con el tiempo en preparaciones *ex vivo* –la **CD** aumenta– [36, 37]. Por lo tanto, registramos el tiempo transcurrido desde la disección –es decir, desde la extracción del cerebro y la preparación del explante [47]– hasta el inicio de la adquisición de los datos de voltaje para cada registro [48]. En concordancia con estos estudios, observamos que en registros individuales la **CD** tie-

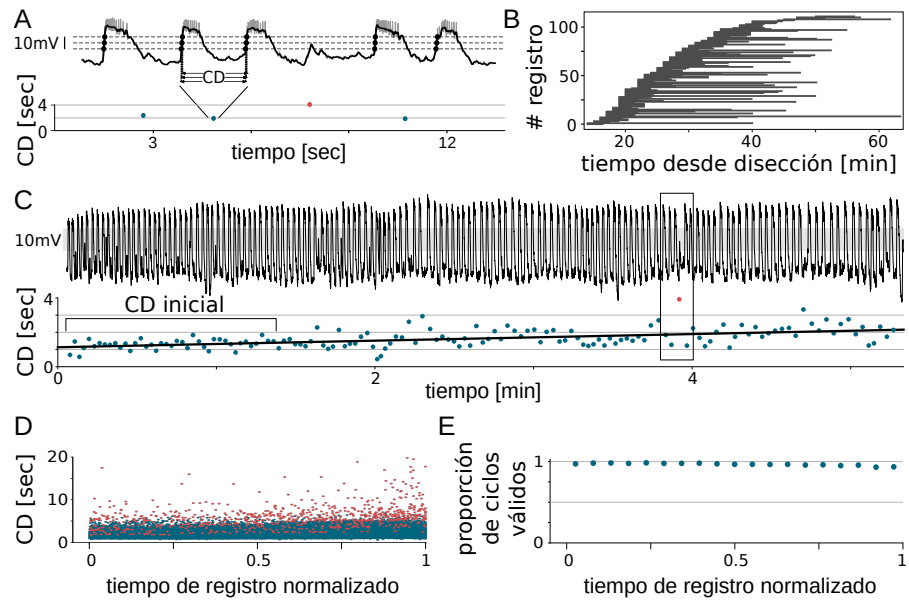


Figura 2.2: Las ILNvs tienen oscilaciones de potencial de membrana robustas. (A) Arriba: Fragmento de registro representativo luego de eliminar la tendencia global (filt1, línea gris) y traza suavizada (filt2, línea negra). Se indican tres valores de umbral a modo esquemático (líneas punteadas) y los cruces correspondientes (puntos negros). Abajo: mediciones de CD válidas (puntos azules) y no válidas (punto rojo) correspondientes. (B) Duración de $n = 112$ registros individuales representada por barras horizontales. (C) Registro completo, tratado como en el panel A. La región sombreada indica el rango de umbral. Abajo: mediciones de CD correspondientes (puntos de color) y ajuste lineal (línea). El recuadro marca el zoom en A y el corchete indica el intervalo utilizado para el cálculo de la CD inicial en la Fig. 2.3. (D) Valores válidos (puntos azules) y no válidos (puntos rojos) de CD de todos los registros de ILNvs. El tiempo de registro fue normalizado a la duración total de cada registro. (E) Fracción de puntos válidos en ventanas del 5% de la duración total del registro. La fracción total de CDs válidas es siempre superior al 93%, en promedio de 96.7% de los 25811 ciclos son válidos.

ne una deriva, aumentando sistemáticamente con el tiempo desde la disección (Fig. 2.2C).

2.3.1 Validez de los ciclos

Aunque las oscilaciones de ILNvs son en general regulares, ocasionalmente no alcanzan el umbral, lo que ocasiona que el algoritmo saltee un ciclo, y que por ende el valor calculado de CD para ese ciclo aproximadamente duplique el valor típico (puntos rojos en Fig. 2.2A, C). Para identificar y descartar estos puntos, graficamos el valor de la CD en función del tiempo para cada registro. Al inspeccionar los casos donde un ciclo es saltado y la CD tiene un valor inusualmente

alto, observamos que suelen corresponder a ciclos de baja amplitud que no fueron detectados por el algoritmo, o directamente ciclos omitidos por la neurona (Figs. 2.2A). Llamaremos a estos valores de **CD** *ciclos no válidos*, y a los valores que caen en la tendencia general, por contraste, *ciclos válidos*.

ciclos válidos y no válidos

Aunque estas interrupciones podrían reflejar eventos interesantes, no representan la tendencia general y decidimos no incluirlos al momento de estudiar el comportamiento de la **CD**. Para descartarlos, aplicamos un método en dos pasos. Primero, calculamos la moda poblacional de la **CD** y descartamos los valores que superan 1,8 veces dicha moda. Sin embargo, este criterio puede eliminar ciclos válidos en registros largos, debido a la deriva en la **CD**. Aplicar este mismo umbral de forma local, en ventanas más pequeñas, tampoco es una buena opción, ya que la estimación de la moda depende de que la mayoría de los ciclos sean válidos, y los no válidos tienden a acumularse hacia el final (Fig. 2.2D, E). Para evitar descartar ciclos válidos, en un segundo paso, ajustamos una recta a los ciclos que sobrevivieron al filtrado del primer paso. Restamos esta línea de tendencia de todos los datos (incluyendo los previamente descartados) y le sumamos el valor de la tendencia en $t = 0$. De esta forma obtenemos un conjunto de valores de **CD** que no presentan la tendencia general al aumento y cuyo valor típico se ubica cerca del valor verdadero. A partir de este conjunto corregido, recalculamos la moda y volvemos a descartar los valores que exceden 1.8 veces la nueva moda.

Analizamos la estabilidad de la **CD** en registros de entre 2 y 46 minutos (Fig. 2.2B), que contienen entre 18 y 748 ciclos cada una, en un total de 152 registros. Con este método, se conservaron en promedio el 96.7% de los ciclos al inicio de los registros, cayendo a un 93% hacia el final (Fig. 2.2E).

2.3.2 Cuantificación de la variación de **CD**

Con estas herramientas para analizar el comportamiento de la **CD** a lo largo del tiempo en todos los registros de forma robusta, estudiamos si en efecto la deriva que presenta resulta un comportamiento consistente a nivel poblacional. Efectivamente, la **CD** inicial, definida como el promedio de los primeros 40 ciclos válidos (Fig. 2.2C), aumenta con el tiempo transcurrido desde la disección en la mayoría de los registros (Fig. 2.3A).

Cuantificamos también la pendiente de las rectas ajustadas a la **CD** en registros individuales (ver por ejemplo el panel inferior de la Fig. 2.2C, línea negra). A nivel poblacional, las pendientes son en su mayoría positivas e independientes del tiempo desde la disección (Fig. 2.3B). Esta relación también se visualiza claramente en un mapa de calor que representa los valores de **CD** para todas las células registradas (Fig. 2.3C).

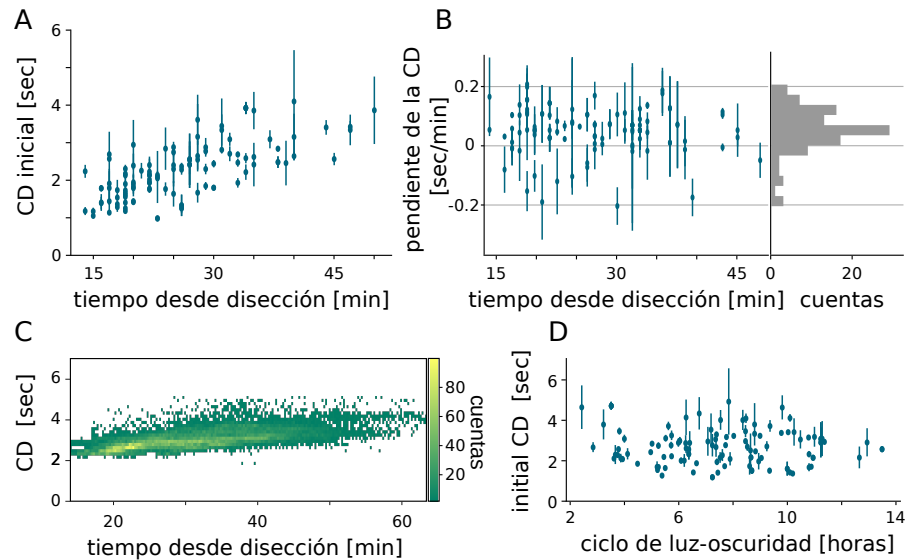


Figura 2.3: Las oscilaciones de ILNvs se degradan con el tiempo desde la disección. (A) La CD inicial en función del tiempo desde la disección (puntos) se correlaciona positivamente (Pearson $r = 0,67$). Las barras de error indican la desviación estándar (DE). (B) Izquierda: la pendiente de CD (puntos) no muestra correlación con el tiempo desde la disección (Pearson $r = 0,22$). Las barras de error indican el error del ajuste de la pendiente. Derecha: histograma de las pendientes de CD, con media de $0,09$ seg/min. La pendiente es significativamente diferente de cero ($p < 10^{-8}$, prueba de rango con signos de Wilcoxon). (C) Histograma 2D de valores de CD agrupados de todas las ILNvs registradas (24949 ciclos totales), alineados en función del tiempo desde la disección. (D) La CD inicial se correlaciona con el momento del ciclo luz-oscuridad en el que se registró la neurona (Pearson $r < 10^{-1}$). Las barras de error indican la DE.

Para entender este efecto en mayor profundidad, investigamos si otras características de la oscilación dependen del tiempo desde la disección. Por un lado, calculamos el valor basal del potencial de membrana, primero eliminamos el ruido de la señal utilizando `filt2`. Luego identificamos los mínimos locales empleando la función `scipy.signal.find_peaks`, y descartamos aquellos cuyo valor superaba la moda de la señal. Con este criterio, los mínimos restantes corresponden principalmente a fluctuaciones alrededor del valor basal, y no a los que suceden en las crestas de las oscilaciones. Aplicamos este procedimiento en ventanas de 20 segundos no solapadas para obtener un valor local del valor basal del potencial de membrana (Fig. 2.4A). Además, calculamos un valor de amplitud para cada ciclo individual. Definimos la amplitud como la distancia entre el pico del ciclo y el valor basal local (Fig. 2.5A). Dado que la forma del ciclo no afecta significativamente el valor de la amplitud, usamos la señal suavizada (`filt3`) para identificar los picos. En contraste con la CD, encontramos

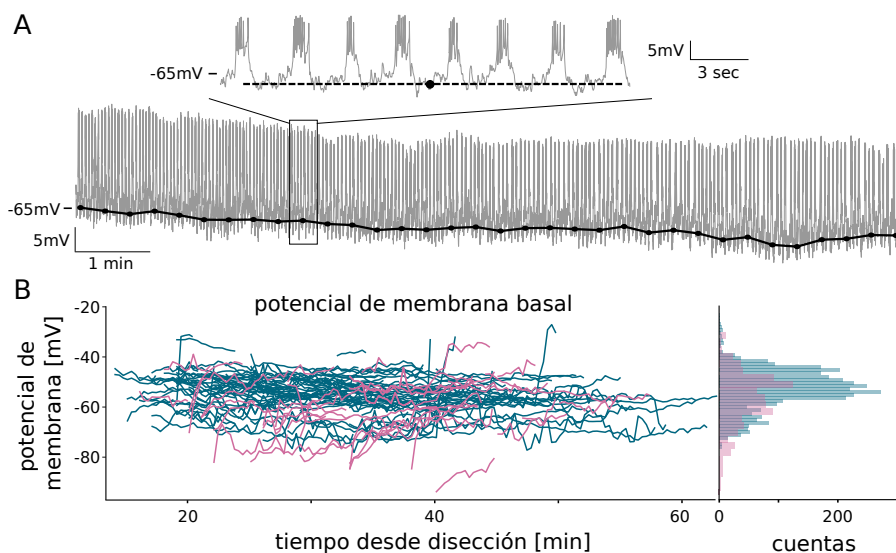


Figura 2.4: El valor basal del potencial de membrana no muestra una tendencia en función del tiempo desde la disección a nivel poblacional. (A) Ejemplo representativo del cálculo de del valor basal del potencial de membrana (puntos negros conectados por líneas) a partir de los datos crudos (línea gris). El recuadro muestra un intervalo de 20 segundos con el valor de la línea base calculado (punto negro) y una línea horizontal punteada como referencia. (B) Izquierda: Trazas de la línea base en función del tiempo desde la disección para todos los registros de ILNv (azul) y sLNv (rosa). Derecha: Distribución marginal de los valores de línea base del panel izquierdo.

que ni el valor basal del potencial de membrana ni la amplitud muestran una tendencia clara en función del tiempo desde la disección (Figs. 2.4 y 2.5).

Finalmente, como hemos mencionado, las ILNvs son neuronas reloj, con relevancia en la regulación del ritmo circadiano, y se ha reportado que su actividad varía entre el día y la noche [37, 50, 51]. Por este motivo, y para reducir la variabilidad, restringimos nuestros experimentos a la fase de luz del ciclo diario. Durante esta fase, la CD inicial no presentó una tendencia clara en función de la hora del día (Fig. 2.3D), por lo que descartamos esta variable en los análisis posteriores.

2.4 OSCILACIONES DE POTENCIAL DE MEMBRANA EN SLNVS

Al igual que las ILNvs, las sLNvs presentan oscilaciones en su potencial de membrana (Fig. 2.6A). Si bien se han reportado registros electrofisiológicos de sLNvs [36, 50, 52], en esta tesis estudiamos por primera vez las características de estas neuronas como osciladores. Examinamos la estabilidad de la CD en registros de sLNv con duraciones entre 2 y 17 min (Fig. 2.6B), y encontramos un aumento sistemá-

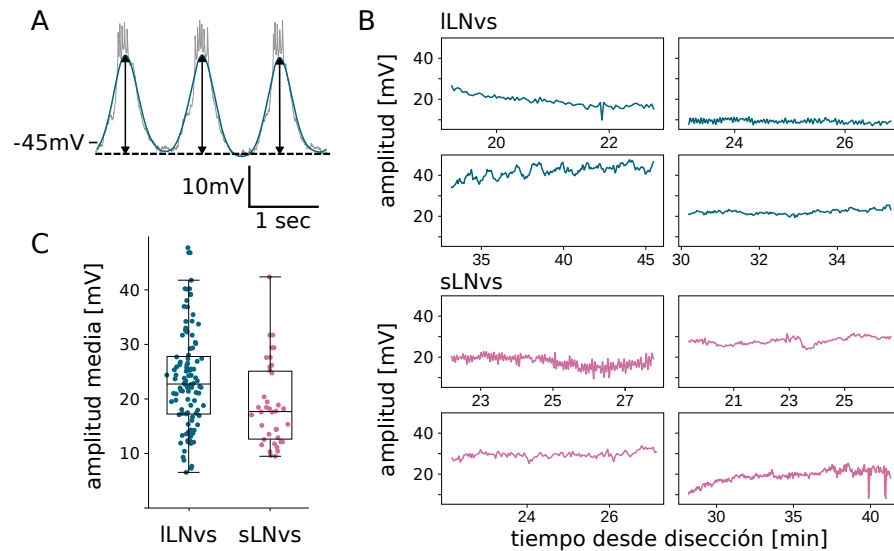


Figura 2.5: La amplitud no muestra una tendencia en función del tiempo desde la disección a nivel poblacional. (A) Ilustración del cálculo de amplitud para cada ciclo de las oscilaciones del potencial de membrana (línea gris), obtenida como la distancia (flechas negras) desde la línea base local (línea punteada) hasta el pico de la traza suavizada (línea azul). (B) Ejemplos representativos de la amplitud de oscilación en función del tiempo desde la disección para (arriba) ILNvs (líneas azules) y (abajo) sLNvs (líneas rosas). (C) Valor medio de la amplitud para todos los registros individuales de ILNvs (puntos azules) y sLNvs (puntos rosas). Las cajas indican el rango intercuartílico, la barra es la mediana y los bigotes se extienden hasta 1.5 veces el rango intercuartílico.

tico de la **CD** en función del tiempo transcurrido desde la disección también en este grupo neuronal. De forma similar a las **ILNvs**, este fenómeno puede apreciarse en registros individuales (Fig. 2.6C) y a nivel poblacional (Fig. 2.6D, E, F). En las **sLNvs** la **CD** inicial no presenta de un comportamiento bien definido en función de la hora del día (Fig. 2.6G), y no encontramos tendencia en función del tiempo desde disección en el valor basal del potencial de membrana o la amplitud de las oscilaciones (Figs. 2.4 y 2.5). Además, nuestro algoritmo de validación de ciclos identifica 96.4 % de los ciclos como válidos.

En resumen, nuestra caracterización cuantitativa del potencial de membrana de **LNvs** muestra que tanto **ILNvs** como **sLNvs** muestran oscilaciones consistentes con una duración de ciclo que aumenta gradualmente con el tiempo *ex vivo*.

2.5 AUTONOMÍA DE LAS OSCILACIONES

En principio, las oscilaciones del potencial de membrana podrían ser autónomas –originadas por procesos que ocurren exclusivamente dentro de la célula osciladora, impulsados por la acción de canales

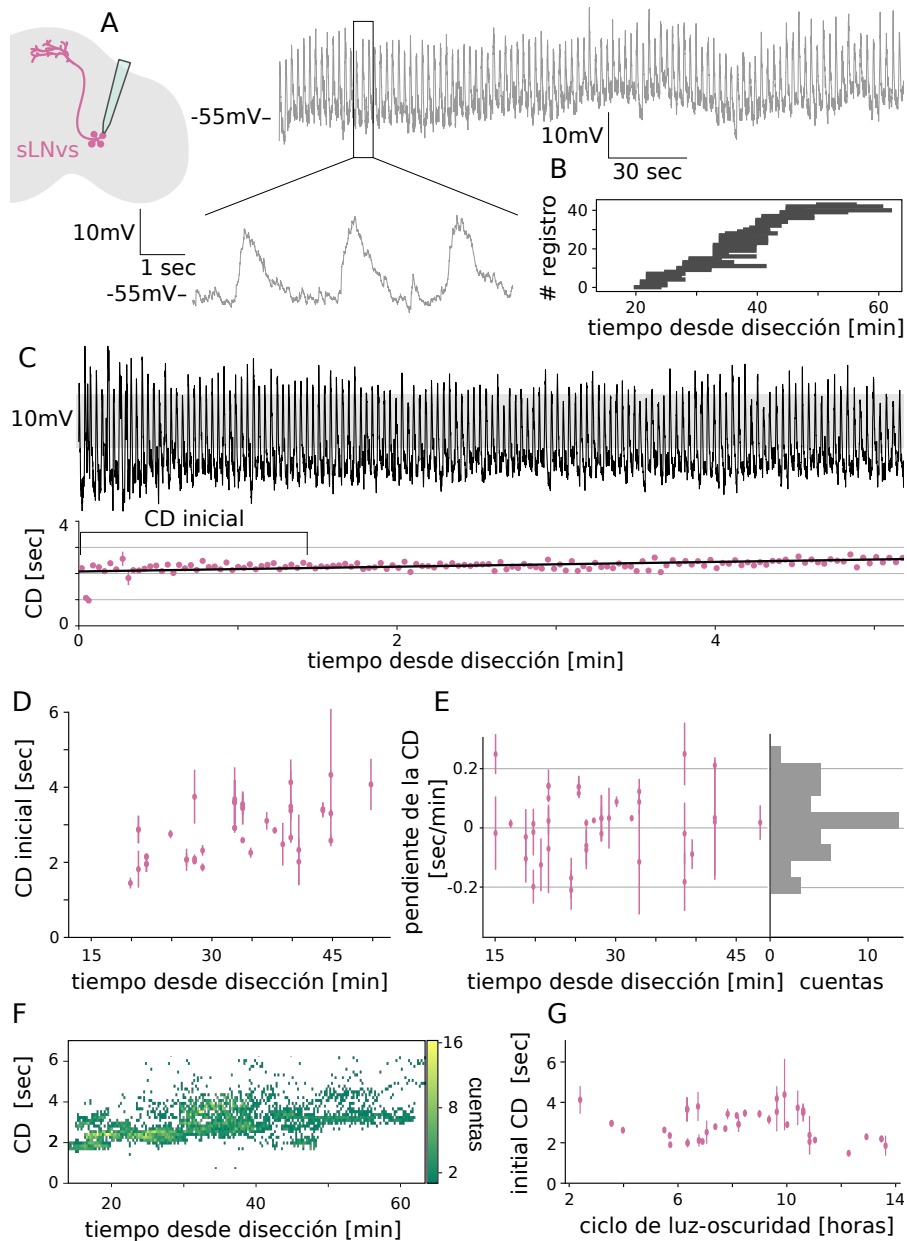


Figura 2.6: Las sLNvs exhiben oscilaciones del potencial de membrana. (A) Izquierda: esquema del explante cerebral mostrando las sLNvs y el electrodo de registro. Derecha: registro representativo de una sLNv, comenzando 35 min después de la disección. Recuadro: ampliación del recorte. (B) Duración de $n = 44$ registros individuales representados mediante barras horizontales. (C) Arriba: registro del panel A. Pasos de procesamiento, puntos, banda sombreada y corchete como en Fig. 2.2A. (D) La CD inicial vs. el tiempo desde la disección están correlacionados positivamente (Pearson $r = 0,62$). (E) Izquierda: la pendiente de CD vs. el tiempo desde la disección no muestra correlación (Pearson $r = -5 \times 10^{-3}$). Derecha: histograma de las pendientes de CD, con media 0,021 seg/min. La pendiente es significativamente distinta de cero ($p < 0,5 \times 10^{-1}$, prueba de rangos con signos de Wilcoxon). (F) Histograma 2D de los valores agrupados de CD de todas las sLNvs registradas (5001 ciclos en total), alineados en el tiempo desde la disección. (G) La CD inicial vs. el ZT no muestran correlación (Pearson $r < 10^{-1}$). (D, E, G) Barras y puntos como en la Fig. 2.3.

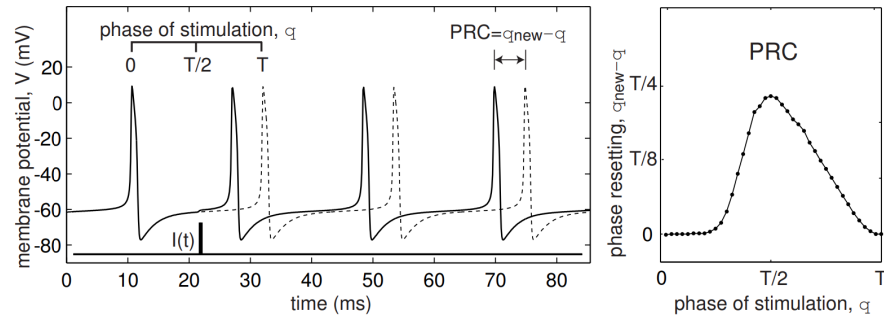


Figura 2.7: Una PRC es una forma de cuantificar la respuesta de un sistema ante perturbaciones puntuales. Izquierda: sistema oscilando libremente (líneas sólidas) y sistema luego de una perturbación $I(t)$ (líneas punteadas). En este ejemplo, la fase del oscilador se adelanta con la perturbación, indicado por $PRC = q_{new} - q$. Derecha: curva completa mostrando la respuesta de la fase ante perturbaciones, en este ejemplo el corrimiento de fase debido a perturbaciones es siempre positivo. Tomado de Ref. [54].

iónicos específicos— o podrían estar generadas por estímulos sinápticos. Un ejemplo de mecanismo celular autónomo es el que involucra la corriente activada por hiperpolarización I_h y los canales de calcio de bajo umbral tipo T [53], que en conjunto pueden generar oscilaciones autosostenidas del potencial de membrana. En lo que sigue, evaluaremos la autonomía de las oscilaciones de LNvs.

2.5.1 Curva de respuesta de fase

Si la actividad oscilatoria de las ILNvs es autónoma, cabría esperar que su fase se modifique al inyectar corriente directamente en la célula, ya que dicha inyección probablemente afecta el funcionamiento de los canales dependientes de voltaje [54]. Usualmente, este efecto se cuantifica en una curva de respuesta de fase *Phase Response Curve* (PRC), donde se perturba al sistema con pequeños impulsos —en el caso de una neurona, inyección de corriente—, y se observa el efecto sobre la fase de la oscilación, en función de la fase a la que sucedió el estímulo (Fig. 2.7).

Para poner a prueba la hipótesis de autonomía de las oscilaciones de LNvs, medimos entonces la PRC del sistema [55]. Evaluamos cómo se ven afectadas las oscilaciones en ILNvs por la inyección de pulsos cortos de 100 ms de corriente negativa, aplicados aleatoriamente en distintos momentos del ciclo de oscilación (Fig. 2.8A). Para obtener una PRC a partir de estos registros, primero los procesamos siguiendo el protocolo que utilizamos para detectar los cruces de umbral. Definimos un ciclo como el intervalo de tiempo entre dos cruces

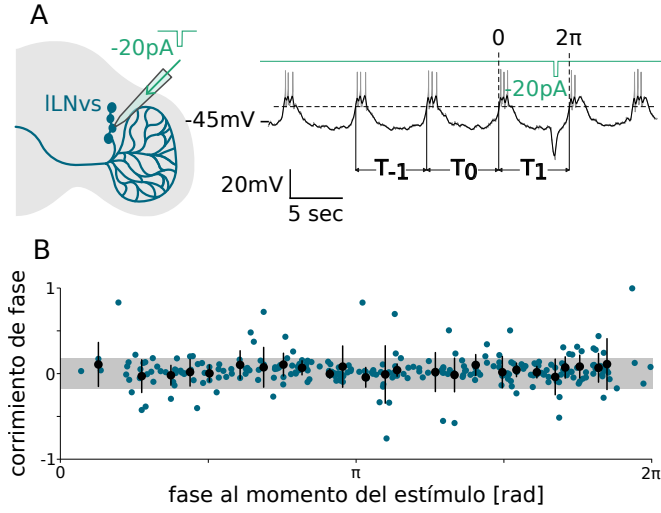


Figura 2.8: La PRC es consistente con oscilaciones no autónomas. (A) Izquierda: esquema del explante cerebral mostrando las ILNvs, el electrodo y la inyección de corriente. Derecha: fragmento de un registro de un experimento de inyección de corriente (línea gris), traza suavizada (línea negra) y corriente inyectada (línea verde). Se muestra un umbral representativo (línea de puntos horizontal) utilizado para definir el ciclo perturbado y los dos anteriores, junto con el mapeo de T_1 en el intervalo $[0, 2\pi]$. (B) Corrimiento de fase P_1 en función de la fase del estímulo, E_c (2.1). Cada punto azul corresponde a un único ciclo perturbado, agrupados de $n = 10$ neuronas diferentes, con un total de 274 ciclos. Los puntos negros son el promedio de 11 puntos azules consecutivos, y las barras de error indican la desviación estándar. El área sombreada representa la desviación estándar de los ciclos de referencia T_{-1} .

consecutivos de umbral, y seleccionamos los ciclos que presentan un pulso de inyección de corriente. Calculamos las fracciones

$$P_1 = \frac{T_1 - T_0}{T_0} \quad \text{y} \quad P_{-1} = \frac{T_{-1} - T_0}{T_0}, \quad (2.1)$$

donde T_1 es la CD del ciclo en el que se aplicó el estímulo, T_0 la del ciclo anterior, y T_{-1} la del anterior a ese (Fig. 2.8A). La fracción P_1 representa un corrimiento de fase inducido por el estímulo, que es positivo si el ciclo perturbado es más largo que el basal, y negativo si es más corto (puntos de color en Fig. 2.8B). El denominador T_0 normaliza las diferencias entre ciclos consecutivos, para compensar el aumento de la CD como función del tiempo desde la disección.

Como sabemos que la CD presenta fluctuaciones apreciables (Figs. 2.2C y 2.3C), controlamos este efecto comparando el valor de P_1 con P_{-1} , que representa la variabilidad basal en ausencia de perturbaciones, en relación con el mismo ciclo de referencia T_0 . Para determinar la fase del ciclo en la que se aplicó la perturbación, mapeamos la duración del ciclo al intervalo $[0, 2\pi]$, y asignamos el instante de inicio del

estímulo linealmente dentro de ese intervalo [55]. El área sombreada indica la desviación estándar de todos los valores de P_{-1} , lo que representa un límite de detección para estas mediciones (Fig. 2.8B).

Los cambios de fase resultantes parecen ruidosos y no siguen una función clara de la fase del estímulo (Fig. 2.8B). Observamos que aproximadamente el 80% de las mediciones cae dentro del rango de variabilidad intrínseco. Concluimos, por lo tanto, que la PRC es plana, en contraste con lo observado en otros tipos neuronales, donde inyecciones de corriente sí generan cambios de fase [38, 56-58]. Este resultado sugiere que las oscilaciones de las LNVs no tienen un fuerte componente autónomo.

2.5.2 Escalones de corriente

Una manera de testear esta hipótesis es estudiar si la inyección de pulsos de corriente negativa más largos altera la CD. Si las oscilaciones del potencial de membrana son autónomas, se espera que una hiperpolarización sostenida –como la generada por una inyección prolongada de corriente negativa– modifique la frecuencia, al alterar el estado de canales iónicos sensibles al voltaje implicados en la dinámica oscilatoria. Recalamos que este no es el mismo efecto que buscamos al construir la PRC, dado que en ese caso la frecuencia de la oscilación debería mantenerse constante, pero la fase podría cambiar con la inyección de corriente.

Realizamos registros electrofisiológicos de las oscilaciones basales tanto en ILNVs como en sLNVs durante 30 seg. Luego inyectamos un paso de corriente negativa durante 30 segundos, y continuamos registrando durante otros 30 segundos después del final del pulso (Fig. 2.9A, B). Esta inyección de corriente causó una clara hiperpolarización del potencial de membrana, mientras que las oscilaciones se mantuvieron. Cuantificamos la CD media antes, durante y después del pulso, y calculamos el cambio proporcional de la CD durante y después del pulso de corriente, en relación con la CD basal antes del pulso (Fig. 2.9C). No detectamos ningún cambio, lo que apoya aún más la hipótesis de que las oscilaciones de membrana de las LNVs no son autónomas de la célula.

Una variante de este experimento aparece de forma natural en los registros que realizamos previamente: como el potencial basal de membrana varía a lo largo de un registro de forma no correlacionada con el tiempo desde la disección, pero la CD sí lo hace, esperamos que no haya una relación entre CD y potencial basal. En efecto, no encontramos tendencias generalizadas (Fig. 2.9D, E).

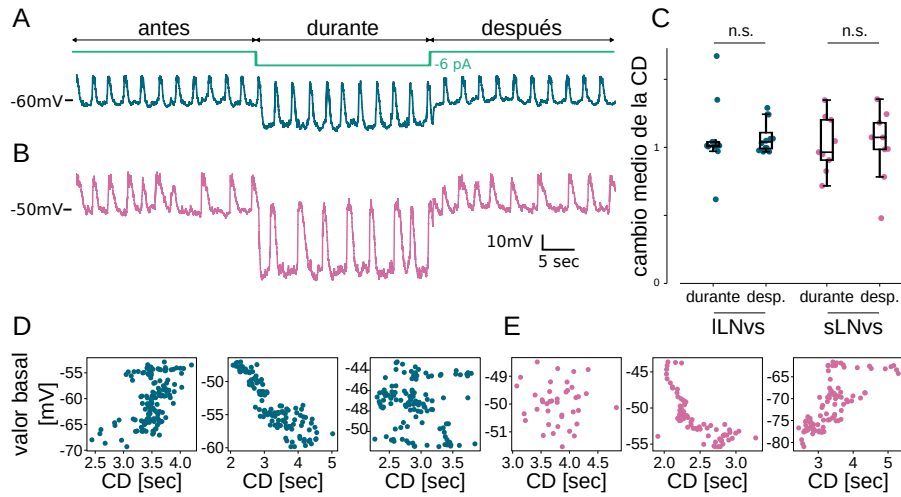


Figura 2.9: Inyectar escalones de corriente no tiene efectos apreciables sobre la CD. (A, B) Registro representativo de un experimento de inyección de corriente en una (A) ILNv o (B) sLNv, con un escalón de corriente de -6 pA de 30 segundos de duración (línea verde). Aparecen delimitado los intervalos definidos como “antes”, “durante” y “después” del pulso. (C) El cambio en la CD durante y después de la inyección de corriente, relativo a la CD previa a la inyección no es significativamente distinto de uno ($n = 9$, $\alpha = 0,9$, test de Wilcoxon). (D, E) Ejemplos representativos de correlación entre CD y el valor basal de potencial de membrana de (D) ILNvs y (E) sLNvs, incluyendo un ejemplo con correlación positiva, uno con correlación negativa y uno descorrelacionado.

2.5.3 Tratamiento farmacológico

Una hipótesis alternativa a la de oscilaciones autónomas es que las LNvs dependen de información exógena para generar las oscilaciones del potencial de membrana. Las proyecciones de las ILNvs se localizan a lo largo de los lóbulos ópticos, donde la acetilcolina *acetylcholine* (ACh) es el principal neurotransmisor [59]. Por esto, decidimos evaluar la relevancia de ACh en las oscilaciones de membrana de las LNvs. Observamos que las oscilaciones se perdieron tras el tratamiento con un antagonista de receptores nicotínicos de ACh llamado mecamilamina (mec), disuelto en el medio salino externo (Apéndice A). El fármaco se suministra disuelto en el medio externo, lo que implica que el efecto no es localizado sólo a la neurona que estamos registrando, sino que afecta a todo el cerebro.

Pocos minutos después de iniciar la exposición a mec, las oscilaciones de los ILNvs se pierden de manera consistente (Fig. 2.10A, B, $n = 12$ ILNv, $n = 14$ sLNv). Aunque los potenciales de acción persisten, dejan de organizarse en ráfagas montadas a las oscilaciones y adoptan un patrón de disparo tónico y más disperso. Esto concuerda con observaciones previas en ILNvs utilizando un bloqueador de re-

acetilcolina, ACh

mecamilamina, mec

ceptores nicotínicos de ACh alternativo, tubocurarina [37, 60], pero el resultado en sLNvs es novedoso.

Para evaluar la especificidad de este efecto, aplicamos un enfoque similar pero bloqueando los receptores de otro neurotransmisor, GABA, mediante el uso del fármaco picrotoxina (PTX). GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio tanto en vertebrados como en invertebrados, y se ha reportado que los receptores de GABA tipo A en las LNvs modulan el comportamiento del sueño [28]. Encontramos que el tratamiento con PTX no inhibe las oscilaciones de LNvs (Fig. 2.10C), lo que refuerza la conclusión de que estas oscilaciones dependen específicamente de la activación de receptores nicotínicos de ACh. Las condiciones basales, con perfusión de solución salina antes de la exposición a mec actuaron como control negativo, mostrando que el potencial de membrana de las LNvs oscila de forma continua.

Para cuantificar este efecto, calculamos la tasa de pulsado a lo largo de estos registros. Para ello, detectamos ciclos usando el protocolo de cruces de umbral. Luego contamos la cantidad de ciclos en ventanas de 60 segundos con un solapamiento del 30% entre ventanas consecutivas. Esto equivale a un promedio móvil de la inversa de la CD. Utilizamos esta cuantificación en casos donde la CD diverge, de modo que la frecuencia de oscilación tiende a cero. Observamos que en efecto, la tasa de pulsado de muestras tratadas con mec disminuye significativamente, mientras que las tratadas con PTX no se diferencian de los controles en los cuales no se aplicó ningún fármaco (Fig. 2.10D).

2.6 RESUMEN

En este capítulo corroboramos observaciones previas de que las ILNvs presentan oscilaciones de potencial de membrana con frecuencias del orden de los 0,3Hz. Observamos además que la otra población de LNvs, las sLNvs, presenta el mismo tipo de oscilaciones, una observación novedosa en el área. Cuantificamos el comportamiento temporal de estas oscilaciones y encontramos que la CD monótonamente aumenta en función del tiempo desde la disección. Esta tendencia es global, en poblaciones tanto de ILNvs como de sLNvs.

Luego, evaluamos la autonomía de las oscilaciones. Experimentos de inyección de pulsos de corriente breves y extensos sugieren que las oscilaciones no son autónomas. En particular, evidencia previa indica que el neurotransmisor ACh juega un rol importante en la recepción de señales de estas neuronas. Tratando muestras con bloqueadores de los receptores de ACh encontramos que las oscilaciones se pierden de forma sumamente consistente.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las oscilaciones de membrana de las LNvs no son autónomas, sino que dependen de circuitos colinérgicos que se ven sutilmente pertur-

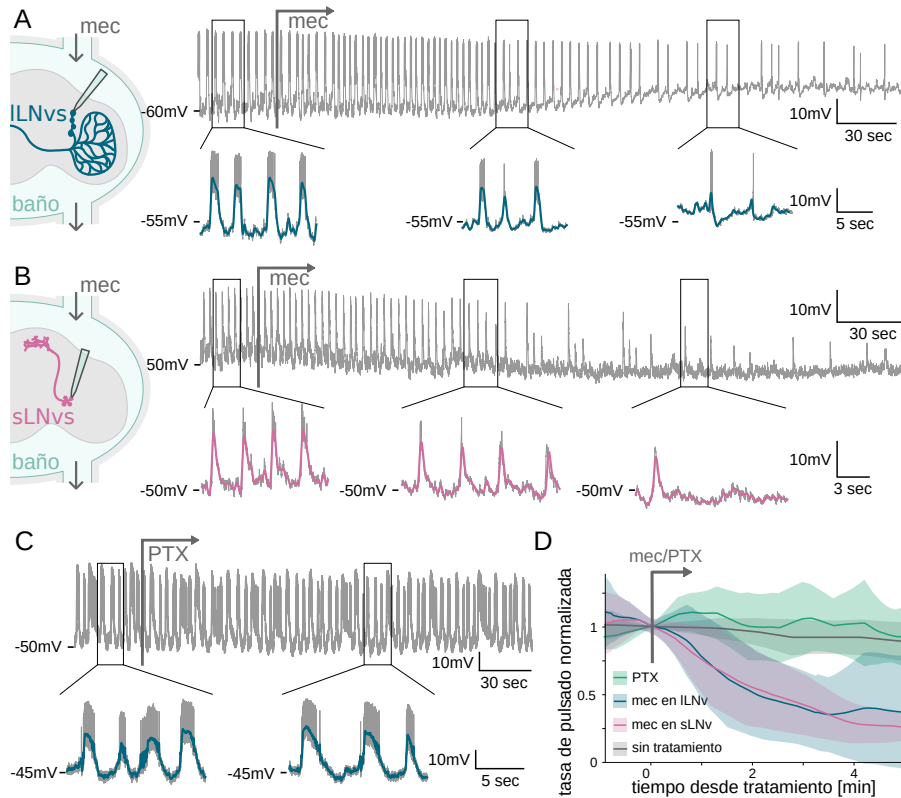


Figura 2.10: Las oscilaciones de membrana dependen de señalización por ACh. (A, B) Izquierda: esquema del explante cerebral en un baño con perfusión de mec, mostrando (A) ILNvs y (B) sLNvs, junto con el electrodo de registro. Derecha y (C): registros representativos de neuronas tratadas con (A, B) mec o (C) PTX, con una flecha gris que indica el inicio de la aplicación de la droga. Los recuadros muestran ampliaciones con fragmentos de los registros (línea gris) y las señales suavizadas de (A, C) ILNvs (línea azul) y (B) sLNvs (línea rosa) en momentos representativos del tratamiento. Los registros se realizaron (A) 56 min y (B) 37 min después de la disección. (D) Tasa de pulsos normalizada de ILNvs en función del tiempo desde la aplicación del fármaco (flecha gris), promediada sobre $n = 12$ ILNvs (azul) o $n = 14$ sLNvs (rosa) de cerebros tratados con mec, y $n = 6$ cerebros tratados con PTX (verde) y $n = 58$ ILNvs no tratados (gris) a modo de controles. La tasa de pulsos de neuronas tratadas se normalizó a su valor al inicio de la aplicación del fármaco. La tasa de neuronas no tratadas se normalizó a su valor un minuto después del inicio del registro, que se alineó con el comienzo de la aplicación para comparar con las condiciones tratadas. Las regiones sombreadas indican la desviación estándar de la tasa de pulsos en cada momento.

bados durante la preparación del cerebro, lo que da lugar a la degradación gradual de las oscilaciones neuronales.

TEORÍA GENÉRICA DE UN OSCILADOR FORZADO

Impulsados por los resultados del capítulo anterior, que indican un carácter no autónomo de las oscilaciones de las *LNvs*, en este capítulo buscamos una descripción teórica que capture aspectos clave de este comportamiento. A partir de esta teoría, pretendemos comprender mejor cómo se mantienen las oscilaciones, cómo se relacionan los parámetros del modelo que construyamos con distintas propiedades biológicas, y posiblemente revelar diferencias entre tipos neuronales.

Introduciremos una teoría genérica de oscilador forzado que describe aspectos fundamentales de la dinámica oscilatoria sin requerir un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares o fisiológicos [61]. En este contexto, nos permitirá modelar las oscilaciones no autónomas de las *LNvs* impulsadas por estímulos sinápticos que activan receptores nicotínicos de ACh. Optamos por una teoría genérica en lugar de una descripción fisiológica más detallada porque, aunque se han identificado algunos canales iónicos y receptores en las *LNvs*, aún no contamos con un panorama completo. Además, una descripción específica de los canales y neurotransmisores implicaría manejar un conjunto considerablemente grande de parámetros fisiológicos cuantitativos. En cambio, en una teoría genérica, los detalles de la fisiología neuronal se reflejan en la forma en que las variables se vinculan entre sí, y sus parámetros abarcan propiedades fisiológicas relevantes, como discutiremos a continuación. Variando estos parámetros, la misma teoría puede aplicarse para describir distintos tipos neuronales.

En particular, elegimos una formulación que describe cómo un estado estacionario estable puede volverse inestable y dar lugar a oscilaciones sostenidas, mediante una bifurcación de Hopf [62]. Favorecemos esta elección porque este mecanismo es común a muchos modelos neuronales, incluidas descripciones más detalladas de la fisiología celular [54].

3.1 OSCILADOR FORZADO

Formalizamos a continuación la teoría genérica que utilizamos para describir estas oscilaciones forzadas. La pérdida de las oscilaciones del potencial de membrana tras la aplicación de mec, que bloquea los receptores de acetilcolina, sugiere que estas oscilaciones son impulsadas por una fuente externa. En ausencia del estímulo, las oscilaciones se detienen. Además, la *PRC* plana podría explicarse por un acoplamiento fuerte con dicha fuente, de modo que, tras una perturbación,

la fase oscilatoria se reestablece rápidamente. Muchos modelos neuronales que incluyen canales iónicos pueden generar oscilaciones mediante una bifurcación de Hopf supercrítica [54]. Por lo tanto, aquí adoptamos un modelo genérico con bifurcación de Hopf con forzamiento externo,

$$\dot{z} = (\mu + i\omega)z - (a + ib)|z|^2z + F(t), \quad (3.1)$$

donde z es una variable compleja, ω es una frecuencia característica, a controla la convergencia al ciclo límite, y b es una corrección a la frecuencia dependiente de la amplitud, conocida como no isocronicidad del oscilador. El parámetro μ es el parámetro de bifurcación, ya que con $\mu > 0$ el sistema funciona como oscilador autónomo, con $\mu < 0$ el sistema tiene un único estado estable, y en $\mu = 0$ presenta una bifurcación de Hopf supercrítica [62]. El forzante es

$$F(t) = fe^{i\psi(t)}, \quad (3.2)$$

con intensidad f que controla la intensidad de entre el oscilador y el forzante, y tiene una fase dada por

$$\psi(t) = \Omega t \quad (3.3)$$

que crece linealmente a una rapidez Ω .

Los parámetros de la teoría se relacionan con propiedades fisiológicas de las neuronas. Por ejemplo, la frecuencia característica ω está influenciada por propiedades fisiológicas que determinan las escalas de tiempo de respuesta de la neurona, como la constante de tiempo de membrana. Análogamente, la intensidad del forzamiento f podría depender de la magnitud de las señales neurotransmisoras que impulsan las oscilaciones, y de cómo estas señales son detectadas y procesadas por la neurona. La frecuencia del forzante Ω describe la señal oscilatoria proveniente de fuentes externas, y estaría determinada por propiedades fisiológicas de neuronas presinápticas que también oscilan. Para formalizar la hipótesis de que las oscilaciones son inducidas externamente, fijamos $\mu < 0$, de modo que el sistema no sostiene oscilaciones autónomas. Cuando se introduce un forzamiento $f > 0$, emergen las oscilaciones (Fig. 3.1A). Además, establecemos $a, \omega, \Omega > 0$.

Para describir la amplitud y fase de las oscilaciones, para poder investigar perturbaciones a estas cantidades, la forma polar de la Ec. (3.1), que tomando $z = re^{i\theta(t)}$ resulta

$$\dot{r} = r(\mu - ar^2) + f \cos(\psi - \theta) \quad (3.4)$$

$$r\dot{\theta} = r(\omega - br^2) + f \sin(\psi - \theta). \quad (3.5)$$

Pasando a un sistema de referencia rotante, introducimos una fase relativa al forzante $\phi = \psi - \theta$, de modo que

$$\dot{r} = r(\mu - ar^2) + f \cos(\phi) \quad (3.6)$$

$$r\dot{\phi} = r(\Delta + br^2) - f \sin(\phi), \quad (3.7)$$

donde definimos la diferencia entre frecuencias, el *detuning* $\Delta \equiv \Omega - \omega$ entre forzante y oscilador. En la Tabla 3.1 podemos ver un resumen del rol de cada variable y parámetro del sistema.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN
z	variable compleja del oscilador
x, y	variables cartesianas del oscilador, interpretamos y como voltaje de membrana
r, θ	variables polares del oscilador, amplitud y fase
ψ	fase del forzante
ϕ	defasaje entre forzante y oscilador
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
μ	parámetro de bifurcación
ω	frecuencia característica
α	intensidad de convergencia al ciclo límite
b	no isocronicidad del oscilador
f	intensidad del forzante
Ω	frecuencia del forzante
Δ	detuning entre forzante y oscilador
r_0, δ	valor estacionario de amplitud y defasaje
r_p, θ_p	valor perturbado de amplitud y defasaje
τ	corrimiento temporal entre forzante y oscilador

Tabla 3.1: Descripción de las variables y los parámetros del modelo de oscilador forzado.

3.2 EQUILIBRIO

A continuación estudiamos el equilibrio dado por

$$\dot{r} = 0, \quad \dot{\phi} = 0, \quad (3.8)$$

tal que el oscilador tiene un radio de ciclo límite constante $r(t) = r_0$ y fase $\phi(t) = \delta$. Esto implica que en equilibrio, la frecuencia instantánea en el sistema de referencia original es $\dot{\theta} = \dot{\psi} = \Omega$, lo que representa el oscilador *entrained* con el forzamiento, siguiéndolo con un defasaje constante entre forzante y oscilador

$$\phi(t) = \psi(t) - \theta(t) = \delta. \quad (3.9)$$

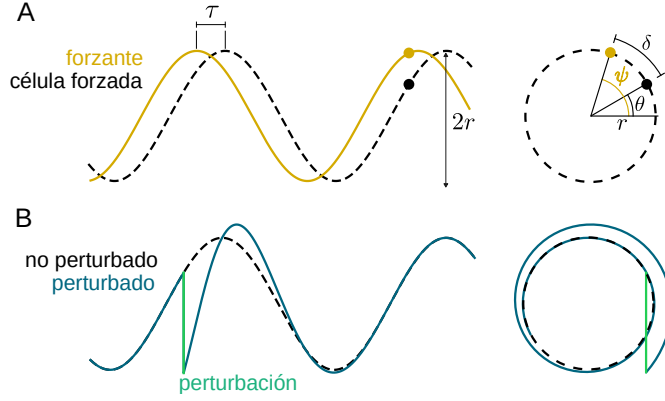


Figura 3.1: El oscilador forzado tiene un ciclo límite al que converge luego de una perturbación. (A) Izquierda: soluciones numéricas de las Ecs. (3.3) a (3.5) que muestran al forzante (línea y punto amarillos) y a la célula forzada (línea punteada y punto negro). Se indican el defasaje temporal τ y la amplitud $2r$. Derecha: representación en coordenadas polares de las oscilaciones (línea punteada), mostrando la amplitud polar r , la fase del forzante ψ (punto amarillo), la fase de la célula forzada θ (punto negro) y el corrimiento de fase δ . La amplitud del forzante no está dibujada a escala y los parámetros fueron elegidos con fines ilustrativos. (B) Solución numérica de un oscilador no perturbado (línea punteada) y un oscilador perturbado (línea azul). La perturbación instantánea se indica en verde. Izquierda: representación temporal. Derecha: representación en coordenadas polares.

Reemplazando la condición de equilibrio Ec. (3.8) en la dinámica del sistema, Ecs. (3.6) y (3.7),

$$-r_0(\mu - ar_0^2) = f \cos(\delta) \quad (3.10)$$

$$r_0(\Delta + br_0^2) = f \sin(\delta), \quad (3.11)$$

obtenemos una expresión para las variables de equilibrio

$$r_0^2 (\mu - ar_0^2)^2 + r_0^2 (\Delta + br_0^2)^2 = f^2 \quad (3.12)$$

$$\tan \delta = -\frac{\Delta + br_0^2}{\mu - ar_0^2}. \quad (3.13)$$

La Ec. (3.12) puede escribirse como ecuación cúbica en términos de r_0^2 , y resolverse analíticamente mediante la fórmula de Cardano para demostrar que para $\mu < 0$ siempre hay una raíz real positiva (Apéndice B). A partir de esta solución, se puede calcular el valor del defasaje δ en función de los parámetros.

En resumen, encontramos que con sólo pedir la condición de equilibrio en el sistema de referencia rotante, el sistema queda *entrained* con el forzante. Resulta interesante que este *entrainment* conlleva una diferencia de fase con el forzante que no necesariamente es nula: el oscilador puede estar adelantado o retrasado respecto del forzante dependiendo de los parámetros del sistema.

3.3 ESTABILIDAD LINEAL

Al comienzo de este capítulo hipotetizamos que para poder generar una PRC plana, el sistema debe estar acoplado al forzante fuertemente, de forma que ante una perturbación, este vuelva rápidamente al estado de equilibrio. Para poder estudiar la respuesta a perturbaciones analíticamente consideramos perturbaciones alrededor del equilibrio $dr(t) \equiv r(t) - r_0$ y $d\phi(t) \equiv \phi(t) - \delta$. Para perturbaciones pequeñas, descartamos los términos de orden superior y obtenemos el sistema linealizado

$$\dot{dr} = (\mu - 3ar_0^2)dr - f \sin \delta d\phi \quad (3.14)$$

$$r_0 d\dot{\phi} = (\Delta + 3br_0^2)dr - f \cos \delta d\phi \quad (3.15)$$

con matriz Jacobiana

$$\mathcal{J}|_{r_0, \delta} = \begin{pmatrix} \mu - 3ar_0^2 & -f \sin \delta \\ \Delta + 3br_0^2 & -f \cos \delta \end{pmatrix}. \quad (3.16)$$

Usando las Ecs. (3.10) y (3.11) podemos escribir la traza y determinante de la matriz Jacobiana como

$$\text{tr}(\mathcal{J}) = 2\mu - 4ar_0^2 \quad (3.17)$$

$$\det(\mathcal{J}) = 3(a^2 + b^2)r_0^4 + 4(b\Delta - \mu a)r_0^2 + \mu^2 + \Delta^2. \quad (3.18)$$

Como $\text{tr}(\mathcal{J}) < 0$ y $\det(\mathcal{J}) > 0$, el equilibrio será siempre estable [62]. Los autovalores λ_{\pm} se pueden obtener como

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \left[\text{tr}(\mathcal{J}) \pm \sqrt{\text{tr}(\mathcal{J})^2 - 4 \det(\mathcal{J})} \right], \quad (3.19)$$

lo que resulta en

$$\lambda_{\pm} = \mu - 2ar_0^2 \pm \sqrt{(a^2 + b^2)r_0^4 - (\Delta + 2br_0^2)^2}. \quad (3.20)$$

Estos autovalores describen la relajación del sistema hacia el equilibrio a lo largo de las direcciones dadas por los autovectores

$$v_{\pm} = \begin{pmatrix} 1 \\ \frac{\alpha - \lambda_{\pm}}{\beta} \end{pmatrix}, \quad (3.21)$$

con

$$\alpha = \left. \frac{\partial \dot{r}}{\partial r} \right|_{r_0, \delta} = \mu - 3ar_0^2, \quad \beta = \left. \frac{\partial \dot{r}}{\partial \phi} \right|_{r_0, \delta} = -f \sin \delta. \quad (3.22)$$

Con estos resultados podremos estudiar analíticamente la respuesta a perturbaciones como las que realizamos al medir la PRC del sistema.

3.4 RESPUESTA A PERTURBACIONES

Para obtener la PRC experimental, inyectamos corriente a la neurona. Esto perturba el valor de equilibrio del potencial de membrana, que rápidamente vuelve a su estado estacionario. Para reproducir este resultado en la teoría, es conveniente interpretar una de las coordenadas cartesianas

$$x = r \cos \theta, \quad (3.23)$$

$$y = r \sin \theta, \quad (3.24)$$

de la variable compleja $z = x + iy$ como este potencial de membrana. Sin pérdida de generalidad, aquí asumimos que el potencial de membrana se describe por la Ec. (3.24), por lo que una inyección de corriente negativa resulta en una perturbación negativa en y (Fig. 3.1B). Suponiendo que el sistema está en equilibrio antes de una perturbación a tiempo t_0 , podemos escribir el estado perturbado (r_p, θ_p) como

$$r_p \cos \theta_p = r_0 \cos (\Omega t_0 - \delta), \quad (3.25)$$

$$r_p \sin \theta_p = r_0 \sin (\Omega t_0 - \delta) + \Delta y, \quad (3.26)$$

donde $\Delta y < 0$ es la perturbación instantánea. El estado perturbado a tiempo t_0 satisface

$$r_p^2 = r_0^2 + \Delta y^2 + 2r_0 \Delta y \sin (\Omega t_0 - \delta), \quad (3.27)$$

$$\tan \theta_p = \tan (\Omega t_0 - \delta) + \frac{\Delta y}{r_0 \cos (\Omega t_0 - \delta)}. \quad (3.28)$$

La evolución temporal de esta perturbación puede escribirse en términos de los autovalores y autovectores

$$\begin{pmatrix} r(t) \\ \phi(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_0 \\ \delta \end{pmatrix} + A v_+ e^{\lambda_+(t-t_0)} + B v_- e^{\lambda_-(t-t_0)}. \quad (3.29)$$

Como $|\Re(\lambda_+)| < |\Re(\lambda_-)|$, la dinámica de perturbaciones será dominada a largo plazo por la escala temporal más lenta, dada por $|\Re(\lambda_+)|^{-1}$. Por lo tanto, aproximamos

$$\begin{pmatrix} r(t) \\ \phi(t) \end{pmatrix} \simeq \begin{pmatrix} r_0 \\ \delta \end{pmatrix} + A v_+ e^{\lambda_+(t-t_0)}, \quad (3.30)$$

y asociamos el tiempo de relajación experimental a este valor a través de la expresión

$$t_r = \frac{-1}{\Re(\lambda_+)}. \quad (3.31)$$

Con esto tenemos una descripción teórica de la respuesta a perturbaciones. Crucialmente, tenemos una expresión para el tiempo de relajación del oscilador ante perturbaciones instantáneas, lo cual podremos contrastar con el comportamiento del sistema experimental.

3.5 PRC TEÓRICA

Experimentalmente mostramos que la PRC de las ILNvs es plana (Fig. 2.8B). Por lo tanto, intentamos reproducir este resultado mediante simulaciones numéricas del modelo (Apéndice A). Para construir una PRC teórica, introducimos perturbaciones en el modelo que imitan las aplicadas experimentalmente como describimos en la sección anterior, aplicamos desplazamientos instantáneos δy en la dirección negativa del eje y (Fig. 3.1B), en distintos puntos del ciclo. Como esperamos, la fase se altera inmediatamente tras la perturbación. Luego, el forzamiento externo devuelve gradualmente la oscilación al ciclo límite estacionario. Calculamos una PRC teórica del mismo modo que con los datos experimentales: medimos el cambio en la duración del ciclo perturbado respecto de la duración del ciclo anterior. Para esto, integramos numéricamente el modelo hasta obtener un estado estacionario, y aplicamos la perturbación numérica barriendo todos los valores de la fase de la oscilación.

Para valores positivos de μ , observamos la forma típica de la PRC de un oscilador autónomo cerca de una bifurcación de Hopf (Fig. 3.2A) [54]. Para μ negativo e intensidad del forzante f no nula, la PRC se vuelve más plana al aumentar f (Fig. 3.2A), hasta quedar dentro del intervalo de incertidumbre definido experimentalmente. Estos valores altos de f corresponden a un retorno rápido al ciclo estacionario, consistente con la inspección visual de los registros experimentales (Fig. 2.8A).

Para cuantificar este efecto, estimamos un tiempo característico a partir de los datos experimentales. Calculamos los tiempos de relajación seleccionando aquellos ciclos en los que la fase de la perturbación se encuentra entre $0,6\pi$ y $1,6\pi$. Este rango garantiza que la perturbación ocurra durante la parte más plana del ciclo, donde la respuesta es más clara y no queda enmascarada por el flanco ascendente o descendente de la oscilación. Ajustamos la relajación con una función exponencial, y definimos el tiempo de relajación t_r como la constante de tiempo característica de dicha exponencial (Fig. 3.2B). Los tiempos de relajación obtenidos son consistentemente pequeños en relación con la duración del ciclo: $t_r = (0,023 \pm 0,008)$ veces la CD, con dos neuronas que muestran valores ligeramente mayores pero aún por debajo de 0,1 veces la CD (Fig. 3.2C).

En resumen, la teoría logra explicar la PRC plana observada experimentalmente a través de un acoplamiento fuerte con el forzante, y los tiempos de relajación medidos resultan consistentes con las predicciones del modelo.

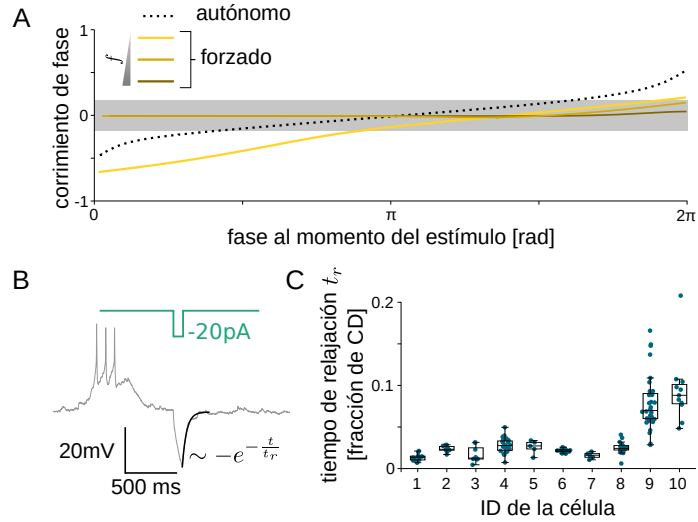


Figura 3.2: La teoría de oscilador forzado es consistente con una PRC plana. (A) PRC numérica del modelo. Los parámetros son los de la Tabla C.1, excepto por $f = 0$ y $\mu = 1$ para oscilaciones autónomas (línea punteada), y $f = 104, 10,4, 1,04$ para oscilaciones forzadas (líneas amarillas de más oscuro a más claro). (B) Fragmento de un registro de un experimento de inyección de pulso breve de corriente (línea gris), con ajuste exponencial de la respuesta a la perturbación (línea negra) y momento de la inyección de corriente (línea verde). (C) Tiempo de relajación t_r escalado por la CD en el momento de la perturbación T_1 (puntos). Las cajas representan el rango intercuartil, la línea central es la mediana, y los bigotes se extienden hasta 1,5 veces el rango intercuartil.

3.6 LA TEORÍA PREDICE UN DEFASAJE ENTRE CÉLULAS

En el estado estacionario, el oscilador se encuentra defasado en δ respecto del forzante. Este desfase implica un desfase temporal entre ambas señales, dado por

$$\tau = \delta/\Omega. \quad (3.32)$$

Este desfase se determina a partir de los valores de los parámetros del modelo mediante las Ecs. (3.13) y (3.32). Esperamos que estos parámetros sean similares entre neuronas del mismo tipo, lo que resultaría en defasajes similares con respecto al forzante, y por ende en un corrimiento cercano a cero entre ellas. Por el contrario, neuronas de diferentes tipos pueden diferir en sus propiedades biofísicas, lo que llevaría a valores distintos de τ y, en consecuencia, a un desfase relativo entre pares de neuronas no nulo.

En resumen, buscando un modelo consistente con la evidencia experimental, construimos una teoría de un oscilador de Hopf sub umbral, forzado por una señal externa armónica. Si el acoplamiento entre el forzante y el oscilador es suficientemente fuerte, este modelo presenta una PRC esencialmente plana, consistente con resultados ex-

perimentales. Además, calculamos cantidades analíticas –frecuencia, amplitud, tiempos de relajación– que se relacionan con características del sistema experimental. En lo que sigue, investigaremos la predicción sobre defasajes temporales entre neuronas de distinto tipo, midiendo pares de LNvs, y relacionaremos las mediciones con los resultados analíticos.

DEFASAJE ENTRE OSCILADORES

La teoría predice que si registramos pares de neuronas del mismo tipo deberíamos encontrar un defasaje entre las oscilaciones esencialmente nulo, mientras que si medimos pares de neuronas de distinto tipo, este podría resultar no nulo.

Para poner a prueba las predicciones de la teoría, realizamos registros simultáneos con *patch clamp* de pares de LNvs (Apéndice A). Estos registros duales presentan un desafío técnico considerable debido a la baja tasa de éxito de la técnica, incluso en configuraciones de una sola célula. En este capítulo contrastamos estas nuevas mediciones con las predicciones teóricas y parametrizamos completamente el modelo, lo que nos permitirá realizar nuevas predicciones. Además, mostramos evidencia que sugiere la existencia de oscilaciones colectivas en neuronas de la aMe.

4.1 REGISTROS EN PARES DE LNVS

Consistente con las predicciones de la teoría, encontramos que los registros duales muestran que las oscilaciones de las LNvs son coherentes: los ciclos de potencial de membrana en ambas células están siempre coordinados a lo largo del registro (Fig. 4.1). Observamos esta coherencia en todos los registros duales de pares ILNv-ILNv (Fig. 4.1A, D, $n = 9$), sLNv-sLNv (Fig. 4.1B, E, $n = 9$) y sLNv-ILNv (Fig. 4.1C, F, $n = 18$). Esta sincronía se hace particularmente evidente cuando el patrón oscilatorio, normalmente muy regular, se interrumpe de forma breve y coordinada (Fig. 4.2A-C). Además, tras la exposición a mec, los registros duales muestran un decaimiento correlacionado de la dinámica oscilatoria (Figs. 4.2D y 2.10D). En conjunto, esta evidencia apunta hacia una fuente de señal, el forzante, compartida por todas las LNvs.

Para cuantificar el grado de coordinación entre las oscilaciones de membrana de cada par neuronal, calculamos las diferencias entre los tiempos de cruce de umbral, como se introdujo anteriormente. Para ello, detectamos los cruces de umbral en ambos canales usando el protocolo que usamos previamente. Luego, para cada cruce en un canal, buscamos el cruce más cercano en el otro. Esta selección no presenta ambigüedad, ya que solo se selecciona un cruce por ciclo. Si bien en muchos casos cuando una de las neuronas omite un pulso durante la oscilación, la otra también lo hace (Fig. 4.2A-C), en ocasiones esto no sucede, o a veces el ciclo en una de las dos neuronas no es detectado por nuestro algoritmo. Para evitar medir defasajes artificialmente

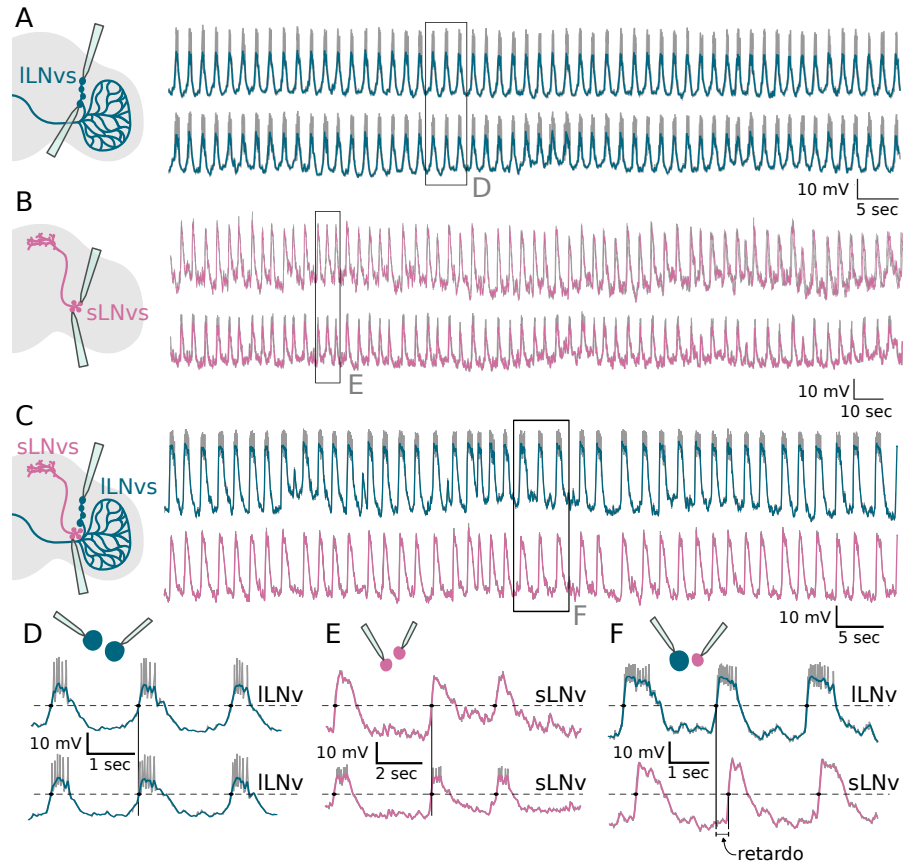


Figura 4.1: Las oscilaciones de potencial de membrana de ILNvs y sLNvs son coherentes. (A-C) Izquierda: esquema del explante cerebral que muestra (A) ILNvs, (B) sLNvs, o (C) ILNvs y sLNvs junto con los electrodos de registro. Derecha: fragmento de un registro dual representativo de pares de (A) ILNvs, (B) sLNvs, y (C) una ILNvs (azul) y una sLNvs (rosa). Los recuadros indican el zoom mostrado en los paneles D-F. (D-F) Arriba: esquema de los pares registrados de (D) ILNvs, (E) sLNvs y (F) ILNvs-sLNvs. Abajo: fragmentos representativos de los registros duales correspondientes con análisis de cruces de umbral (línea punteada y puntos). La línea punteada es sólo esquemática, dado que se usaron múltiples umbrales, como describimos en el protocolo correspondiente. Las líneas verticales sirven de guía visual para resaltar la ausencia (D, E) o presencia (F) de defasaje temporal. Las trasas están filtradas por filt1 (gris) y posteriormente también filt2 (color).

grandes, descartamos pares de ciclos con una separación mayor a 0,4 veces la duración del ciclo local. Esto corresponde a intervalos entre 0,8 y 1,4 segundos, dependiendo del tiempo desde la disección, múltiples veces el valor típico de defasaje. A partir de los pares de cruces de umbral estimamos un defasaje temporal medio de cada registro (Figs. 4.1D-F y 4.3A). Este análisis reveló que en pares del mismo tipo no hay defasaje entre los tiempos de cruce de umbral, mientras

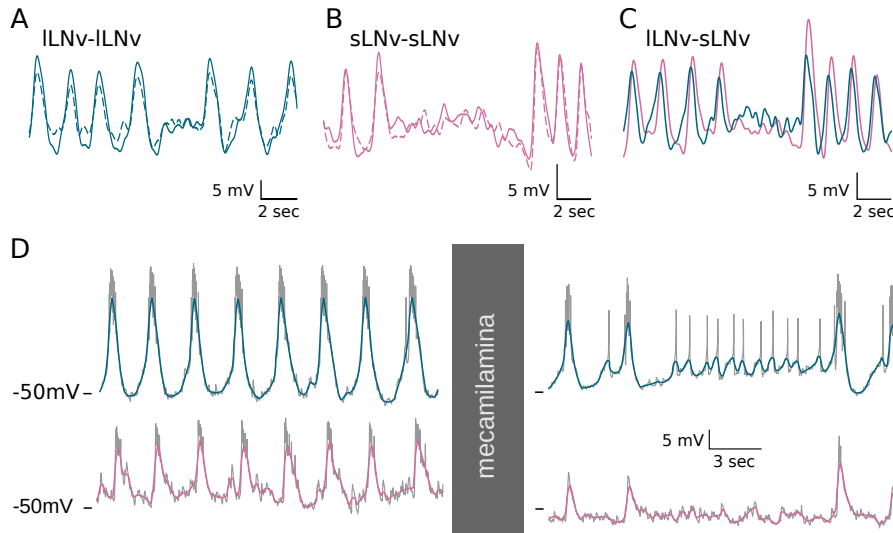


Figura 4.2: Las oscilaciones de LNvs se mantienen coordinadas incluso ante interrupciones. (A-C) Fragmentos representativos de registros duales filtrados (`filt1`, `filt2` y `filt3`) correspondientes a (A) un par de ILNVs, (B) un par de sLNVs y (C) un par ILNV-sLNV. (D) Fragmento representativo de un registro dual (líneas grises) y sus versiones filtradas por `filt2` (líneas de color) de un par formado por una (arriba) ILNV y una (abajo) sLNV, (izquierda) antes y (derecha) 120 segundos después del inicio de la aplicación de mec.

que en pares de distinto tipo las sLNVs se retrasan sistemáticamente ($0,12 \pm 0,02$) seg con respecto a las ILNVs (Fig. 4.3A).

Para validar estos resultados, implementamos otro enfoque también comúnmente usado para medir corrimientos entre señales temporales, un análisis de correlación cruzada [63]. Utilizamos señales filtradas y sin tendencia (`filt1` y `filt2`), calculamos primero la correlación cruzada C entre los dos canales $u(t)$ y $v(t)$,

$$C(\tau) = (u * v)(\tau) = \int u(t)v(t - \tau)dt, \quad (4.1)$$

donde $*$ denota convolución, y la integral se extiende sobre el tiempo total del registro. Normalizamos $C(\tau)$ dividiendo por su valor máximo, dado que no estudiamos la magnitud de la correlación. Implementamos esto utilizando las funciones `correlate` y `correlation_lags` de `scipy.signal`. Definimos el defasaje entre canales como el valor de τ correspondiente al máximo de $C(\tau)$. Con esta metodología obtuvimos resultados similares a los de cruce de umbral: un alto grado de sincronización en pares del mismo tipo (Fig. 4.3B, C, D) y un defasaje de ($0,14 \pm 0,03$) seg con las ILNVs adelantadas respecto a las sLNVs en pares de heterogéneos (Fig. 4.3B, E).

Además, calculamos valores locales de defasaje, para buscar tendencias en el defasaje en función del tiempo y construir distribuciones

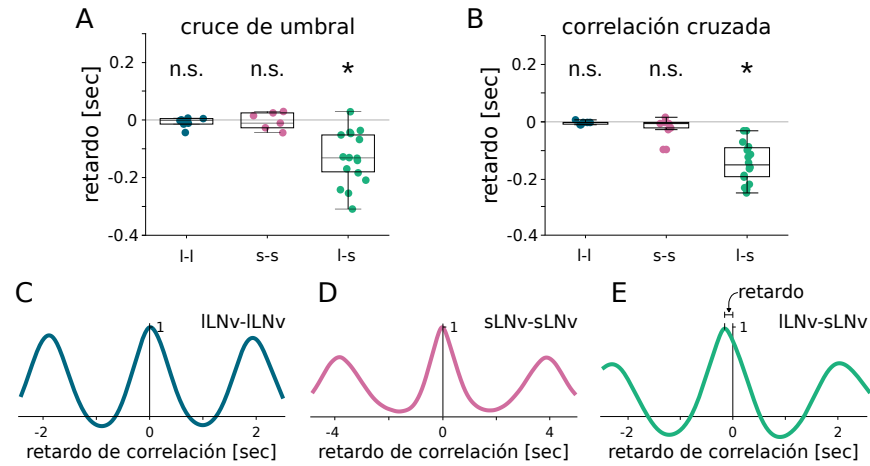


Figura 4.3: Existe un defasaje robusto entre las oscilaciones de potencial de membrana de *ILNvs* y *sLNvs*. (A, B) Cuantificación de las medianas de los defasajes obtenidos para cada registro mediante (A) cruces de umbral y (B) análisis de correlación cruzada para distintos pares de *LNv*. Las cajas representan el rango intercuartil, la barra es la mediana y los bigotes se extienden hasta 1.5 veces el rango intercuartil. Las distribuciones de defasaje no difieren significativamente de cero ($\alpha = 0,95$) para pares del mismo tipo celular, pero difieren significativamente de cero en pares *ILNv-sLNv* ($p < 10^{-4}$), según un test de Wilcoxon de una muestra, con $n = 9$ pares *ILNv-ILNv*, $n = 9$ pares *sLNv-sLNv* y $n = 18$ pares *ILNv-sLNv*. (C-E) Funciones de correlación cruzada representativas en registros individuales de pares de (C) *ILNv*, (D) *sLNv* y (E) *ILNv-sLNv*.

de defasaje para cada par registrado. Para los cruces de umbral tenemos un valor de defasaje para cada ciclo. Para la correlación cruzada, utilizamos ventanas no solapadas de 10 segundos cada una. Encontramos que las tendencias poblacionales se mantienen a nivel de pares individuales según ambos métodos (Fig. 4.4A, B), con un defasaje relativamente constante entre células a medida que avanza el tiempo desde la disección (Fig. 4.4C, D).

En resumen, nuestros resultados muestran un alto grado de sincronización en las oscilaciones de membrana de pares de *LNvs*. Mientras que las neuronas del mismo tipo oscilan en sincronía sin defasaje, los pares de tipos diferentes presentan un defasaje significativo. Esto concuerda con la teoría, que interpreta la coordinación como un *entrainment* con un forzante común para todas las *LNvs* y los defasajes como resultado de diferencias en los parámetros biofísicos que definen cada tipo neuronal.

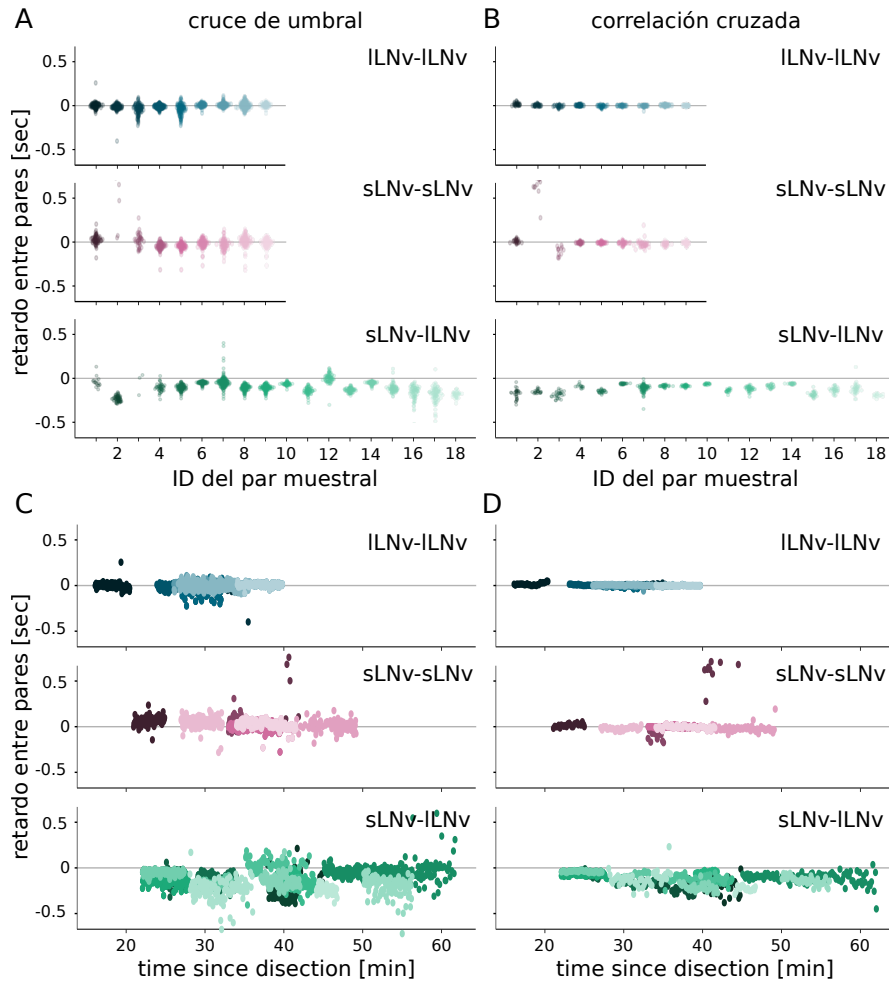


Figura 4.4: Los defasajes temporales de pares individuales son consistentes con los resultados a nivel poblacional. (A-D) Defasaje de distintos pares neuronales obtenido a partir de registros duales mediante (A, C) análisis de cruce por umbral y (B, D) correlación cruzada local, para pares de ILNv (puntos en tonos de azul), pares de sLNv (puntos en tonos de rosa) y pares ILNv-sLNv (puntos en tonos de verde). (A, B) Distribución de los defasajes temporales para cada registro. (C, D) Defasaje de cada registro en función del tiempo desde disección. Los tonos de azul, rosa o verde se corresponden entre los paneles superiores e inferiores.

4.2 PARAMETRIZACIÓN DE LA TEORÍA

En lo que sigue, parametrizaremos el modelo. Para ello, haremos un uso extensivo de la interpretabilidad de la teoría en términos de características de la oscilación. En particular, utilizaremos las relaciones entre parámetros del modelo (Tabla 3.1) y los valores de observables –frecuencia, amplitud, tiempos de relajación, defasajes relativos.

Primero, asumimos que la frecuencia del forzante Ω en la Ec. (3.3) es la misma para ambos tipos neuronales, en base a la observación de oscilaciones coherentes (Fig. 4.1). Suponiendo que los registros

se encuentran en régimen estacionario, es decir, que las oscilaciones están *entrained* con el forzante, podemos estimar la frecuencia Ω a partir de la CD utilizando la expresión

$$\Omega = \frac{2\pi}{CD}. \quad (4.2)$$

Como la CD varía a lo largo del tiempo, seleccionamos un punto de referencia 25 minutos después de la disección, donde $CD = 2,20$ s (Figs. 2.2 y 2.6).

La forma polar del oscilador forzado (Ecs. 3.4 y 3.5) incluye cinco parámetros que debemos determinar para cada tipo neuronal:

$$a_L, b_L, \omega_L, \mu_L, f_L, \quad (4.3)$$

$$a_S, b_S, \omega_S, \mu_S, f_S, \quad (4.4)$$

donde el subíndice L indica parámetros asociados a ILNvs y S a sLNvs. A diferencia de la frecuencia del forzante, la intensidad de acoplamiento al forzante f podría diferir entre tipos neuronales, ya que distintos tipos neuronales podrían responder de forma distinta a la señal. En este trabajo fijamos en un principio $b_L = b_S = 0$ por simplicidad, aunque más adelante estudiaremos su efecto sobre características del sistema.

Relacionamos los parámetros del modelo con observables teóricos: la amplitud r_0 , el defasaje temporal $\tau = \delta/\Omega$, y el tiempo de relajación $t_r = -1/\lambda_+$ para ambos tipos neuronales

$$r_L, \tau_L, t_L, \quad (4.5)$$

$$r_S, \tau_S, t_S, \quad (4.6)$$

a través de las soluciones de equilibrio (Ecs. 3.10 y 3.11) y la estabilidad lineal (Ec. 3.20). En total, entre parámetros y observables, tenemos 16 incógnitas.

Obtenemos la amplitud r_0 a partir de las amplitudes (de máximo a mínimo) de potencial de membrana medidas experimentalmente ($2r_0$): $r_L = 11,4$ mV y $r_S = 8,9$ mV (Fig. 2.5C). Si bien no medimos directamente los defasajes respecto del forzante, sí obtuvimos el defasaje relativo entre sLNvs y ILNvs: $\tau_S - \tau_L = 0,13$ s (Fig. 4.3). Además, medimos el tiempo de relajación en ILNvs: $t_L = 0,023$ CD (Fig. 6.4E), asumiremos $t_S = t_L$ por simplicidad.

Luego de estas mediciones y supuestos, quedan 9 incógnitas. Al aplicar las Ecs. (3.10), (3.11) y (3.20) a ambos tipos neuronales, se obtienen 6 ecuaciones adicionales, lo que deja 3 grados de libertad, 3 parámetros a explorar. En nuestro caso, elegimos variar el *detuning* Δ y el defasaje δ . Por un lado, Δ se relaciona con ω_S y ω_L a través $\Delta = \Omega - \omega$, por lo que estableceremos la frecuencia característica de cada tipo neuronal independientemente. Por otro, δ se relaciona con τ_L y τ_S través de la Ec. (3.32), y la condición de defasaje relativo

$\tau_S = \tau_L + 0,13$ s, por lo que la determinar uno de los valores, el otro quedará fijo. Con esto, los parámetros restantes en las Ecs (4.3) y (4.4), los valores de μ , α y f para las *sLNvs* y las *ILNvs*, quedan unívocamente determinados. La elección de parámetros libres se basa en que, si bien no conocemos los valores exactos de Δ y δ , podemos hacer conjeturas informadas sobre sus rangos posibles. Por un lado, razonamos que la frecuencia característica de las *ILNvs* y *sLNvs* podría ser similar a la de las neuronas que actúan como forzantes, es decir, $\omega/\Omega \sim 1$. Por otro lado, como hemos mencionado, conocemos el desfase relativo entre *ILNvs* y *sLNvs* a partir de los experimentos. Usamos ese valor como escala de referencia para los desfases individuales con respecto al forzante.

Invertimos las ecuaciones de equilibrio y estabilidad lineal para obtener expresiones analíticas de los parámetros restantes

$$\alpha(\delta, \Delta) = -\frac{1}{r_0^2} \frac{\left(\frac{\Delta}{\tan \delta} + \lambda_+\right)^2 + \Delta^2}{2\left(\frac{\Delta}{\tan \delta} + \lambda_+\right)}, \quad (4.7)$$

$$\mu(\delta, \Delta) = \alpha(\delta, \Delta)r_0^2 - \frac{\Delta}{\tan \delta}, \quad (4.8)$$

$$f(\delta, \Delta) = r_0 \frac{\Delta}{\sin \delta}, \quad (4.9)$$

donde estas aplican a *ILNvs* y *sLNvs*, omitimos los subíndices L y S por claridad. Estas expresiones nos permiten explorar cómo varían α , μ y f en función de δ y Δ en ambos tipos neuronales (Fig. 4.5A).

Escalamos los parámetros para que compartan unidades y podamos comparar directamente sus contribuciones a la dinámica en las Ecs. (3.6) y (3.7). Encontramos que es posible identificar un conjunto de valores, tanto para *sLNvs* como para *ILNvs*, que es consistente con todas las restricciones impuestas por los datos experimentales (Fig. 4.5A, Tabla C.1). Para parametrizar el desfase relativo entre tipos neuronales, elegimos parámetros tales que las *ILNvs* resultan más rápidas y adelantadas con respecto al forzante ($\omega_L > \Omega$, $\delta_L > 0$), y las *sLNvs* más lentas y retrasadas ($\omega_S < \Omega$, $\delta_S < 0$) (Fig. 4.5A). Con esta elección, los parámetros escalados son similares entre ambos tipos neuronales, lo que sugiere que todos los términos del modelo contribuyen de manera comparable a la dinámica, el término del forzante dominando levemente (Tabla C.1). Además, los valores de μ , α y f resultan similares para ambos tipos de *LNv*.

La teoría también nos permite explorar cómo el forzante afecta a los distintos observables (Fig. 4.6). La amplitud no se ve fuertemente afectada por el *detuning*, pero crece de manera sostenida al aumentar la intensidad del forzante. En cambio, el desfase temporal aumenta con el *detuning* y disminuye con mayor intensidad del forzante. El desfase relativo entre *ILNvs* y *sLNvs* se mantiene aproximadamente constante al variar Ω y disminuye si se incrementa la intensidad del forzante. Finalmente, el tiempo de relajación está fuertemente controlado por la intensidad de acoplamiento al forzante: tiempos de

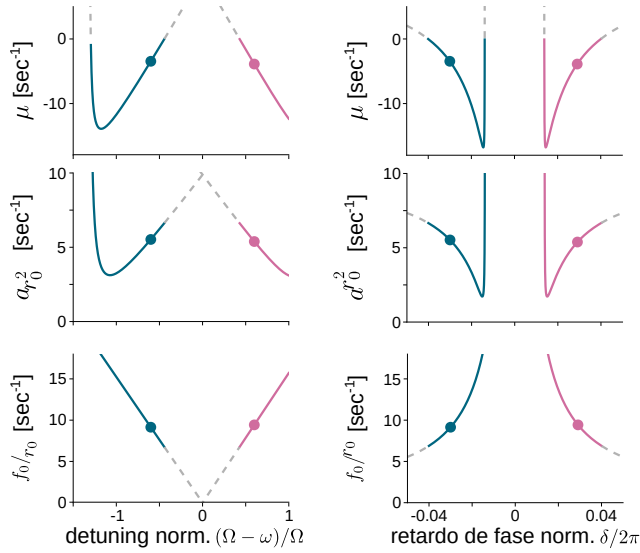


Figura 4.5: Relaciones teóricas entre parámetros y observables. (A) Relaciones dadas por las Ecs. (4.7) a (4.9) para ILNvs (línea azul) y sLNvs (línea rosa), con parámetros y observables según la Tabla C.1 (puntos). Las líneas grises punteadas indican elecciones de parámetros que resultan en $\mu > 0$. Los parámetros a y f se escalaron usando r_0 para que tengan las mismas unidades que μ , de modo que sus magnitudes puedan compararse. El defasaje δ se normalizó a 2π , y el *detuning* $\Delta = \Omega - \omega$ a la frecuencia del forzante Ω .

relajación cortos requieren valor de f alto, lo que da lugar a una PRC teórica plana (Fig. 3.2C), consistente con lo observado experimentalmente (Fig. 2.8B). Los otros parámetros del modelo también tienen efectos sobre los observables, pero nos centramos en el *detuning* y la intensidad del forzante, porque son factores clave que determinan la dinámica oscilatoria forzada. Será interesante diseñar experimentos que varíen parámetros del forzante de forma controlada para evaluar algunas de las predicciones hechas por la teoría.

En conjunto, estos resultados muestran que la teoría genérica es consistente con nuestros datos experimentales tanto para ILNvs como para sLNvs, con buen acuerdo cuantitativo respecto de la amplitud, el tiempo de relajación y el defasaje relativo entre ambos tipos neuronales.

4.3 OSCILACIONES EN OTRAS NEURONAS DE LA AME

Por último, investigamos si la sincronización de las oscilaciones de membrana se limita exclusivamente a las LNvs, o si se trata de un fenómeno más general. Para ello, realizamos registros simultáneos con *patch clamp* de pares neuronales compuestos por una LNv y una neurona vecina no marcada con fluorescencia, ubicada a una distancia de entre 15 y 30 μm dentro de la aMe. Denominamos a estas neuronas

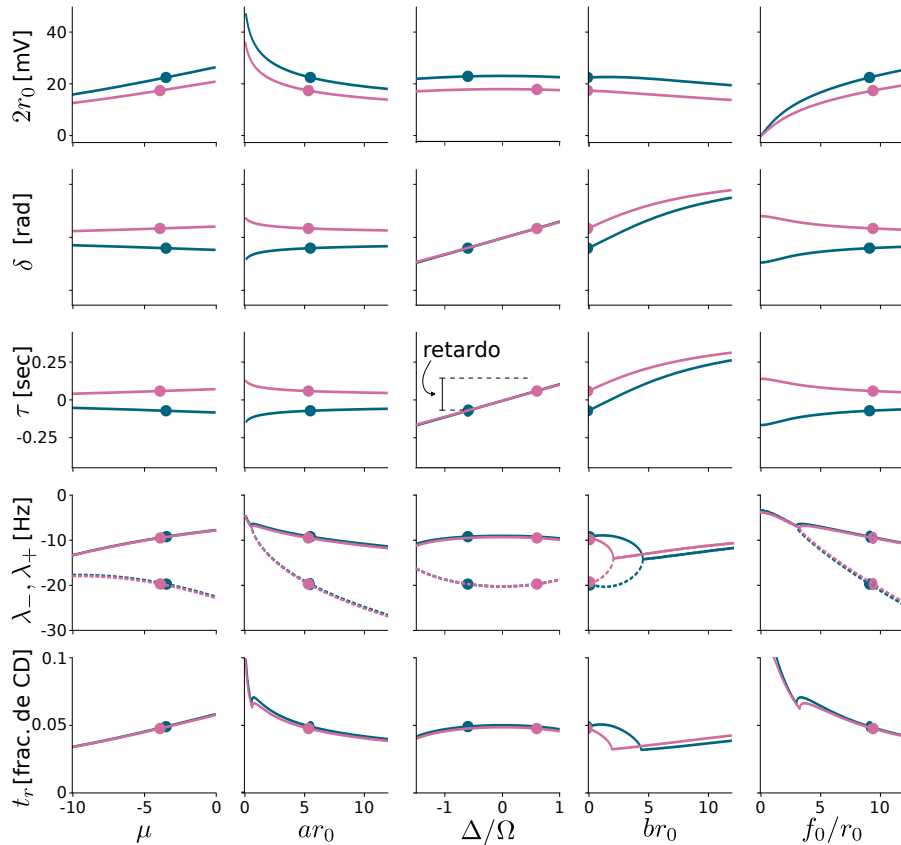


Figura 4.6: Los parámetros controlan distintos aspectos de los observables en la teoría. Mostramos la amplitud de oscilación $2r_0$, el desfase δ , el corrimiento temporal τ , los autovalores λ_+ (línea sólida) y λ_- (línea punteada), y el tiempo de relajación t_r , en función de los parámetros μ , a , Δ , b y f . Escalamos los parámetros para que tengan unidades de sec^{-1} y así poder compararlos entre sí, excepto el *detuning* Δ , que se escaló por la frecuencia de forzante Ω , de modo que $\Delta = 1$ corresponde a $\omega = 0$. Indicamos cómo se materializa el desfase relativo entre ILNvs y sLNvs a partir de la diferencia de sus defasajes respecto del forzante. Los observables se calcularon para los valores de parámetros de ILNv (puntos y líneas azules) y sLNv (puntos y líneas rosas) (Tabla C.1).

“aMe-PDF(-)” porque no contamos con información sobre su identidad específica, salvo su localización anatómica y el hecho de que no expresan PDF.

Encontramos oscilaciones de membrana coherentes entre LNvs y aMe-PDF(-), tanto en pares con ILNvs (Fig. 4.7A y C) como con sLNvs (Fig. 4.7B y D), en todos los casos en que logramos registrar ambas células. Utilizando el análisis de correlación cruzada y el método de cruce por umbral, detectamos defasajes consistentes entre las LNvs y las aMe-PDF(-). En los pares ILNv–aMe-PDF(-), los lags son pequeños y predominantemente negativos (Fig. 4.7E). En los pares sLNv–aMe-PDF(-), cuatro de cinco aMe-PDF(-) mostraron lags positivos (se

adelantan respecto a la *sLNv*), mientras que una presentó un lag negativo (se retrasa) (Fig. 4.7F).

Estos resultados implican que las oscilaciones de potencial de membrana son un comportamiento entendido en la *aMe*, lo que sugiere la existencia de oscilaciones colectivas en esta región del cerebro de mosca.

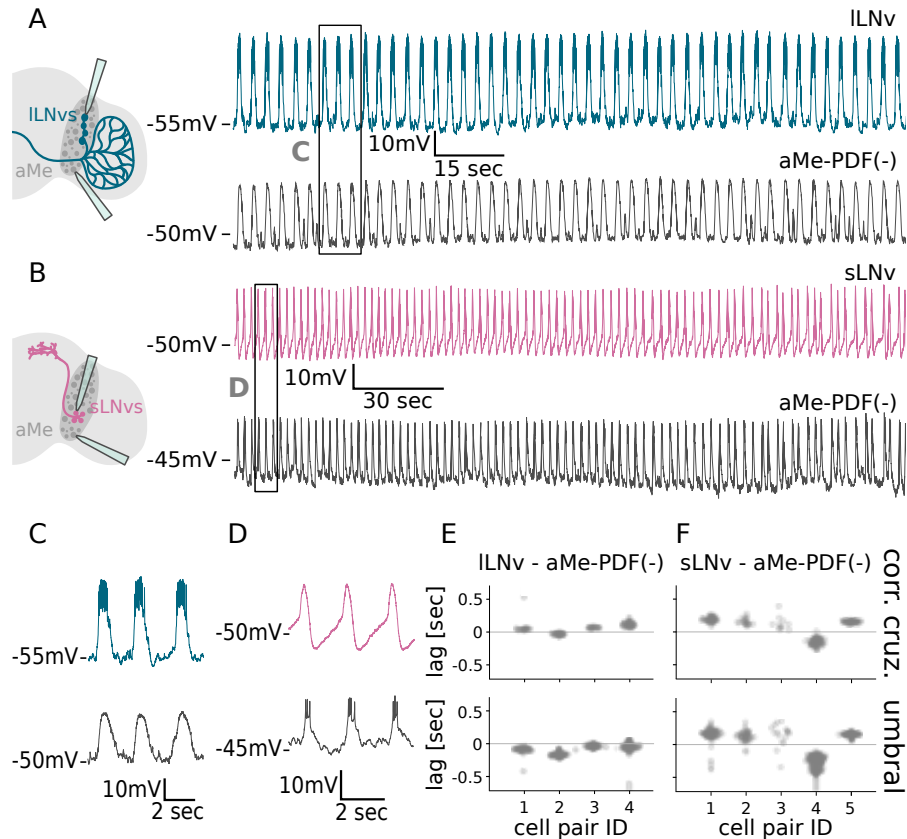


Figura 4.7: Otras neuronas de la *aMe* también oscilan de forma coherente con las *LNvs*. (A, B) Izquierda: esquema del explante cerebral que muestra neuronas de la *aMe* junto con (A) *ILNvs* y (B) *sLNvs*, con electrodos de registro. La sombra gris oscura indica la región de la *aMe*. Derecha: fragmento de un registro dual representativo, con (arriba) *LNv* y (abajo) neurona *aMe-PDF(-)*, comenzando (A) 32 min y (B) 28 min después de la disección. Los recuadros marcan las zonas ampliadas en C y D. (C, D) Fragmentos representativos correspondientes a los recuadros en A y B. (E, F) Defasajes obtenidos mediante (arriba) correlación cruzada local y (abajo) análisis de cruces de umbral para registros duales individuales entre neuronas *aMe-PDF(-)* y (E) *ILNvs* o (F) *sLNvs*. Los registros en A y B corresponden al par 4 en E y al par 5 en F.

4.4 RESUMEN

En este capítulo pusimos a prueba predicciones de la teoría. A través de registros de *patch clamp* simultáneos en pares de LNvs encontramos que, en acuerdo con la teoría, las neuronas oscilan coherentemente, con la misma frecuencia. Además, pares homogéneos, compuestos por dos neuronas del mismo tipo, oscilan sin defasaje relativo entre ellas. En cambio, en pares compuestos por una ILNv y una sLNv, la primera oscila siempre adelantada a la segunda. Con esta información, las mediciones realizadas en el Capítulo 2 y algunas asunciones parametrizamos el modelo de forma consistente con la evidencia experimental. Finalmente, encontramos que distintos pares heterogéneos de neuronas, compuestos por una LNv y una neurona no identificada en la misma región del cerebro, también tienen oscilaciones coherentes, con defasajes de orden similar a los que medimos previamente. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de ritmos colectivos en las neuronas de la aMe.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En esta primera parte de la tesis nos enfocamos en estudiar oscilaciones neuronales de potencial de membrana. En particular, estudiamos un conjunto de neuronas circadianas en una región del cerebro de *Drosophila* llamada *aMe*. Estas neuronas, las *LNvs*, tienen un rol conocido en mantener el ritmo circadiano y la regulación del ciclo de sueño y vigila, y se separan en dos grupos: las *ILNvs* y las *sLNvs*.

Mediante mediciones de *patch clamp* en preparaciones *ex vivo* registramos oscilaciones de potencial de membrana consistentes, con frecuencias sub-hertz, del orden de los 0,3 Hz. A través de cuantificaciones rigurosas mostramos que la frecuencia de las oscilaciones decae en función del tiempo desde la disección del cerebro de forma similar en ambos tipos neuronales. Realizamos experimentos para evaluar la autonomía de estas oscilaciones. Encontramos que *ILNvs* exhiben una *PRC* plana, y que la frecuencia de la oscilación no varía al inyectar pulsos de corriente negativa por períodos extensos de tiempo, lo cual sugiere que las oscilaciones son de carácter exógeno. Consistentemente, ambos tipos de *LNv* requieren la acción del neurotransmisor *ACh* para sostener su actividad oscilatoria.

Basándonos en estos hallazgos, propusimos una teoría genérica de oscilador forzado. Esta teoría predice que neuronas del mismo tipo deberían oscilar en sincronía, mientras que podrían observarse defasajes entre tipos neuronales distintos. Confirmamos ambas predicciones con registros de *patch clamp* duales: observamos que las *sLNvs* oscilan sistemáticamente retrasadas respecto a las *ILNvs*. Luego extendimos estos registros a pares compuestos por una *LNv* y una neurona vecina no identificada de la *aMe*, y encontramos que también estaban coordinadas, aunque con defasajes variados. Esta observación motiva la hipótesis de que existen ritmos colectivos en la *aMe*, resultantes de la coherencia entre las oscilaciones de membrana de neuronas locales. Será necesario continuar explorando esta posibilidad y desentrañar la función de esta posible propiedad emergente de la red neuronal en la *aMe*.

5.1 EL ORIGEN DE LAS OSCILACIONES NEURONALES COLECTIVAS

Nuestros resultados aportan evidencia sólida en favor oscilaciones sincronizadas del potencial de membrana en neuronas del reloj de *Drosophila*, en concordancia con un trabajo reciente [38]. Distintas líneas de evidencia indican además que la frecuencia de estas oscila-

ciones depende de la integridad de los circuitos visuales. En primer lugar, observamos que la frecuencia de oscilación de las LNvs disminuye progresivamente en preparaciones *ex vivo* (Figs. 2.2, 2.3 y 2.6) [37]. Las LNvs, sobre todo las ILNvs, reciben información del lóbulo óptico, y durante la preparación del cerebro para los registros electrofisiológicos se separa el cerebro de los ojos. El decaimiento de la frecuencia se debe presumiblemente a la interrupción de las señales visuales que se pierden en este proceso. En segundo lugar, esta disminución es más lenta en preparaciones *ex vivo* semi-intactas [37], donde se conservan los ojos adosados al cerebro, y dichas señales se conservan en mayor medida. Por último, las oscilaciones registradas *in vivo* presentan frecuencias más altas [38]. Todo esto sugiere que las señales visuales juegan un rol activo en mantener la oscilación.

Nuestra cuantificación de esta ralentización tiene implicancias prácticas para experimentos *ex vivo* en general. Argumentamos que es importante documentar el tiempo transcurrido desde la disección en cualquier ensayo realizado sobre explantes cerebrales. Para comparar cuantitativamente condiciones experimentales o genotipos distintos, es esencial obtener registros en intervalos temporales similares desde la disección.

En los circuitos de procesamiento visual de la mosca, el neurotransmisor más prevalente es la acetilcolina (ACh) [59]. Diversas observaciones apoyan la hipótesis de que las oscilaciones sincronizadas de las neuronas circadianas son impulsadas por señales colinérgicas comunes a todas las LNvs (Figs. 2.8 y 2.10) [37, 38]. Un posible origen de esta señal de ACh es un subconjunto de neuronas de la aMe marcadas por el controlador VT037867-Gal4, que han sido identificadas como presinápticas de las neuronas del reloj circadiano [38, 64]. No se ha estudiado si estas mismas células también proveen señales colinérgicas a otras neuronas no circadianas de la aMe, por lo que es una cuestión abierta que deberá abordarse en trabajos futuros.

5.2 EL ORIGEN DEL DEFASAJE ENTRE PARES DE NEURONAS

Encontramos una oscilación global coherente en todos los pares neuronales registrados, con ciclos de potencial de membrana coordinados a lo largo de los registros. Al registrar dos neuronas del mismo tipo de LNv, observamos una sincronización fuerte y sin defasaje. Por el contrario, en pares de distintos tipos neuronales detectamos defasajes consistentes, con las sLNvs siempre retrasadas entre 0,10 y 0,16 segundos respecto a las ILNvs (Fig. 4.3). Crucialmente, observamos defasajes entre LNvs y otras neuronas de la aMe, lo que sugiere que esta podría ser una característica generalizada de la red. Si bien en nuestros registros este defasaje es evidente en las trazas de voltaje, y lo pudimos cuantificar de forma consistente por múltiples métodos, es pertinente mencionar que un trabajo previo no reportó dichos de-

fasajes temporales en las oscilaciones de las neuronas reloj [38]. Este trabajo reporta escasamente sobre la duración y variabilidad de los registros utilizados, por lo que este autor no siente que haya información suficiente para discutir el contraste entre estos resultados.

Dado que el defasaje entre ILNvs y sLNvs es del orden de los 100 ms, esperamos que el defasaje con respecto al forzante –aún desconocido– sea de ese orden. ¿Cuál podría ser la causa de este defasaje? Recientemente se completó un atlas de la conectividad sináptica a nivel cerebral en *Drosophila*, lo que posibilita explorar qué neuronas se comunican con las neuronas de la aMe. Sin embargo, el retraso observado resulta difícil de explicar mediante sinapsis químicas individuales, que actúan a escalas temporales mucho más cortas, del orden de los pocos milisegundos.

Una alternativa es que el defasaje surja por diferencias en las vías colinérgicas de señalización. Si bien la neurotransmisión colinérgica puede ser extremadamente rápida –como en la unión neuromuscular–, también puede ser más lenta, dependiendo del tipo de receptor de ACh expresado, su localización relativa al sitio de liberación y la actividad de enzimas que limitan la actividad de este neurotransmisor en el entorno extracelular [65]. En *Drosophila* se han identificado al menos diez genes que codifican subunidades de receptores nicotínicos de ACh [66], capaces de ensamblarse en múltiples combinaciones funcionales. Diferencias en el procesamiento de las señales colinérgicas podrían entonces explicar los defasajes entre tipos neuronales. Además de las señales colinérgicas, los defasajes podrían implicar modulación peptidérgica, un proceso más lento, que involucra difusión de péptidos a través del volumen extracelular. Diversos neuropéptidos se expresan en la aMe de insectos [67, 68], y muchos de sus receptores están presentes en neuronas reloj [69]. Sin embargo, su estudio se ve limitado por la falta de herramientas genéticas versátiles, y su rol funcional dentro de circuitos intactos aún requiere mayor investigación.

Aunque estas hipótesis merecen ser exploradas, aquí propusimos una descripción teórica genérica, capaz de reproducir los defasajes observados entre neuronas independientemente de la naturaleza de las señales involucradas. En el marco de esta teoría, cada neurona muestra un defasaje determinado por parámetros que resumen propiedades fisiológicas intrínsecas. Por ejemplo, la constante de tiempo de membrana podría influir en la frecuencia característica ω , y la intensidad de acoplamiento al forzante f podría estar modulada por la sensibilidad a la señal sináptica. Dado que distintos tipos neuronales pueden diferir en estas propiedades, esperamos que exhiban defasajes diversos respecto al forzante. La teoría también predice efectos experimentalmente verificables, como una reducción del defasaje y un aumento de la amplitud oscilatoria al aumentar la fuerza del forzante. En resumen, nuestra teoría proporciona una explicación parsimonio-

sa del defasaje observado entre pares de neuronas en la aMe, basada en diferencias biofísicas entre tipos neuronales.

5.3 UN ROL PARA EL DEFASAJE: ONDAS VIAJERAS

Si no existieran defasajes entre neuronas, esperaríamos un ritmo colectivo en el que todos los tipos neuronales oscilaran en sincronía. En contraste, la presencia de defasajes sistemáticos, como los que reportamos aquí, sugiere la existencia de ondas viajeras de actividad neuronal en el cerebro de la mosca. Las ondas cerebrales podrían ser relevantes para ordenar temporalmente la activación neuronal, un proceso que se cree fundamental para la función cerebral [2, 70, 71]. Se han propuesto varios mecanismos para la propagación de ondas en redes neuronales, incluyendo: (i) osciladores autónomos acoplados localmente, (ii) propagación sináptica de pulsos desde un oscilador central, y (iii) estimulación directa con retrasos crecientes desde un oscilador único [71]. Aquí sugerimos una posibilidad adicional: (iv) que las propiedades biofísicas de cada neurona determinan su defasaje respecto a un forzante común. En este escenario, la propagación de ondas podría reflejar una topología funcional más compleja que el espacio físico tridimensional.

En trabajos recientes, registros multielectrodo de potencial de campo local –es decir valores medios de potencial eléctrico, en contraste con mediciones en células individuales– sugieren que las oscilaciones pueden viajar entre regiones cerebrales en *Drosophila*, aportando evidencia indirecta de ondas cerebrales [72]. Una evidencia más directa podría obtenerse mediante imágenes mesoscópicas de alta resolución utilizando sensores de voltaje. El mapeo de defasajes en otros elementos oscilatorios del cerebro de la mosca también contribuiría a validar la existencia de ondas viajeras.

5.4 ¿SON LAS OSCILACIONES EN LA AME PARTE DE UN COMPORTAMIENTO COLECTIVO EXTENDIDO?

La aMe es una región cerebral situada entre los lóbulos ópticos y el cerebro central. Esta ubicación le confiere un rol crucial, ya que las moscas dependen fuertemente de la visión para percibir su entorno. En *Drosophila*, más de la mitad de las neuronas del cerebro se localizan en los lóbulos ópticos [73], organizadas en neuropilas estratificadas dedicadas al procesamiento visual. La información visual debe atravesar la aMe para alcanzar el cerebro central, donde se integra con otras modalidades sensoriales y con información previamente almacenada, dando lugar finalmente a comportamientos motores [74]. Se han descrito proyecciones axonales que pasan a través de la aMe y conectan con el cerebro central, involucradas en la formación de memoria visual y la ubicación espacial [59]. Sin embargo, la aMe no

alberga únicamente proyecciones axonales, también contiene numerosos somas neuronales. Hasta donde sabemos, sólo unas pocas de estas neuronas –vinculadas a circuitos circadianos– tienen funciones caracterizadas. En este trabajo mostramos que muchas otras neuronas de la aMe, no identificadas y en principio no caracterizadas, presentan oscilaciones sincronizadas en su potencial de membrana. Será necesario explorar sus posibles funciones más allá del control circadiano, así como el significado funcional de su oscilación coherente.

Las oscilaciones en la aMe podrían extenderse a otras regiones del cerebro de *Drosophila*. Distintos trabajos apuntan en esta dirección. Se ha reportado que neuronas en la médula oscilan espontáneamente a 0,35 Hz en oscuridad [75], y que grupos de neuronas circadianas dorsales oscilan a frecuencias similares (0,3 a 0,4 Hz) [38]. Aunque no se ha evaluado la sincronía entre estas neuronas y las de la aMe, la coincidencia en frecuencia sugiere una posible relación. Neuronas involucradas en la regulación del sueño también muestran actividad sincronizada con frecuencias comparables [76]. En conjunto, la evidencia sugiere que distintas poblaciones neuronales del cerebro de *Drosophila* presentan actividad oscilatoria sincronizada del potencial de membrana.

5.5 ¿ES LA AME EL SEGUNDERO DEL CEREBRO DE MOSCA?

Las oscilaciones neuronales introducen un nivel adicional de modulación en la integración de señales [2]. La fase del ciclo oscilatorio en la que se recibe un estímulo sináptico puede afectar su procesamiento y su efecto sobre la neurona receptora [77-80]. En neuronas no oscilatorias, la respuesta a señales depende únicamente de la suma espacial y temporal de los estímulos recibidos. En cambio, en neuronas oscilatorias, un mismo estímulo puede tener efectos distintos según la fase del ciclo en que ocurre.

Las LNvs son neuronas altamente integradoras: reciben información desde circuitos visuales [37, 64], fotorreceptores extrarretinales [81], la luz ambiental [82-85], y múltiples neuronas circadianas y no circadianas [86]. Al modelar la integración de estas señales, es importante considerar su actividad oscilatoria.

La aMe de *Drosophila* alberga componentes del reloj circadiano, es decir, componentes cuya actividad está en la escala de decenas de horas. Sin embargo, también puede resultar útil para predecir eventos en escalas temporales más cortas. Los mecanismos celulares y moleculares asociados a relojes ultradianos son mucho menos conocidos [87, 88], aunque recientemente se ha demostrado que *Drosophila* puede estimar intervalos de tiempo del orden de segundos [89]. ¿Podrían las oscilaciones de membrana de las neuronas de la aMe tener un rol en el segundero de la mosca? Esta posibilidad merece ser explorada.

Parte II

OSCILACIONES COLECTIVAS EN EL RELOJ DE SEGMENTACIÓN EN VERTEBRADOS

En esta segunda parte de la tesis nos enfocaremos en el estudio de oscilaciones en el contexto del desarrollo embrionario de vertebrados. Construiremos una descripción teórica de una población de osciladores que, acoplándose a través de un campo medio, se sincronizan entre sí.

INTRODUCCIÓN

6.1 EL DESARROLLO EMBRIONARIO COMO CIENCIA

El desarrollo embrionario es el proceso mediante el cual un organismo multicelular se forma a partir de una única célula inicial (Fig. 6.1A-C). Este pasaje de la unicelularidad a la complejidad de un organismo multicelular completo ha ocurrido en cada linaje multicelular desde el origen mismo de la multicelularidad, y se repite con cada nuevo individuo, incluyendo al lector y el autor de esta tesis. En el caso particular de los cordados –un grupo muy amplio que incluye a todos los animales que tenemos médula espinal–, este proceso ha conservado características generales a lo largo de la evolución, lo que permite identificar mecanismos compartidos desde los primeros representantes del grupo hasta los organismos actuales. A través de una sucesión de divisiones, movimientos celulares, cambios morfológicos y eventos de señalización, se construyen estructuras organizadas con formas, funciones y comportamientos definidos. Este proceso no sólo da origen a los diferentes tipos celulares, sino que también establece su disposición espacial y sus interacciones funcionales, dando lugar a tejidos, órganos y sistemas coherentes.

Una de las manifestaciones fundamentales del desarrollo es la diferenciación celular, es decir, el proceso por el cual células que inicialmente son equivalentes adquieren roles, morfología y funcionalidad específica. En muchos contextos, especialmente en tejidos adultos, la división celular tiende a producir células hijas con funciones similares a la de la madre, lo que contrasta con lo que ocurre durante el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo embrionario, las divisiones celulares suelen estar acompañadas por la generación de diversidad: células hijas que adoptan destinos distintos. Esta diferenciación ocurre de manera ordenada y progresiva, y suele estar acompañada por la pérdida de plasticidad: a medida que las células avanzan en su trayectoria de diferenciación, disminuye su capacidad para generar otros tipos celulares. Sin embargo, el desarrollo no se limita a la diferenciación aislada, sino que también implica la organización jerárquica de las células en estructuras mayores, como tejidos, donde aspectos como la polaridad –anisotropía, en términos físicos–, la adhesión y la comunicación intercelular son fundamentales.

La biología del desarrollo busca comprender los principios que gobiernan estos procesos. ¿Cómo adquieren las células su identidad? ¿Cómo se generan patrones espaciales complejos a partir de señales locales? ¿De qué modo interactúan los programas genéticos con se-

diferenciación

ñales bioquímicas y mecánicas del entorno? Estas preguntas motivan una gran parte del trabajo en el área, que integra enfoques experimentales y teóricos, desde la biología molecular hasta la física del desarrollo.

El interés por el desarrollo tiene raíces antiguas. En la Grecia clásica, Aristóteles –porque siempre este caballero está en el origen de la discusión de todas las ciencias– ya observaba embriones de pollo y propuso que las estructuras se generaban progresivamente durante la embriogénesis, una postura conocida como epigénesis. Esta visión contrastaba con el preformacionismo, que si bien ya estaba presente en aquella época, fue defendido siglos más tarde. Según esta corriente, el organismo ya existía completo en miniatura desde la fecundación. Durante los siglos XVII y XVIII, con el surgimiento de la microscopía, se acumuló evidencia observacional pero no se resolvió el debate. Recién en el siglo XIX, con el desarrollo de la teoría celular y el trabajo de embriólogos como Karl Ernst von Baer, se consolidó la idea de que los embriones de diferentes especies comparten estadios iniciales similares y divergen conforme avanza su desarrollo.

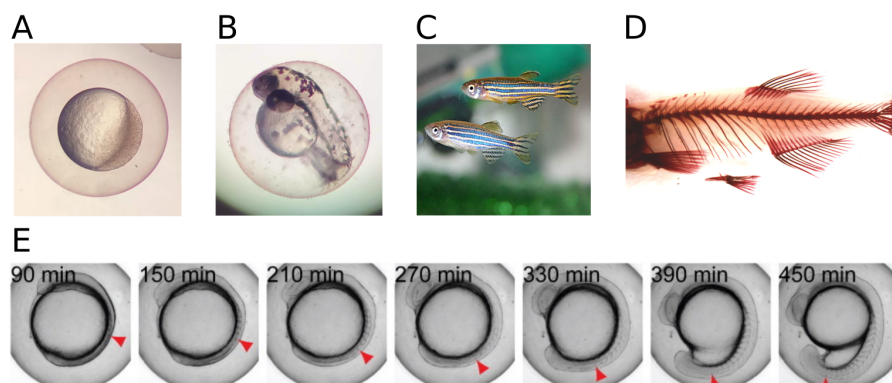


Figura 6.1: Etapas del desarrollo embrionario de un pez cebra. (A) Estadio de una célula. (B) Múltiples horas luego de la fertilización. (C) Adulto. (D) Patrón esquelético de un juvenil de dos meses de edad [90]. (E) Estadios de la segmentación. Triángulos rojos indican el segmento formado más recientemente. [91].

A comienzos del siglo XX, los avances experimentales permitieron empezar a entender los mecanismos detrás de esos cambios. Hans Driesch demostró, a través de un experimento con embriones de erizo de mar, que al separar las células tras las primeras divisiones, cada una de ellas era capaz de desarrollar un organismo completo. Este resultado desafiaba la idea de que el destino celular estuviera fijado desde el inicio, y sugería que la información necesaria para el desarrollo estaba distribuida y conservaba flexibilidad en etapas tempranas. Poco después, Spemann y Mangold demostraron la existencia de regiones del embrión capaces de organizar el destino de otras células vecinas, lo que introdujo el concepto de inducción. Estas ideas abrieron el camino para pensar el desarrollo como un proceso dinámico,

en el que las decisiones celulares dependen tanto de su historia como de las interacciones con su entorno.

Con la aparición de la genética molecular como área de estudio y caja de herramientas, la biología del desarrollo se transformó radicalmente. El descubrimiento de genes reguladores, como los genes Hox, mostró que el patrón corporal podía entenderse como la consecuencia de programas genéticos específicos, regulados en el tiempo y el espacio. En paralelo, surgieron modelos teóricos que buscaban explicar cómo emergen patrones espaciales a partir de interacciones locales, como los modelos de reacción-difusión propuestos por Alan Turing. Estos enfoques establecieron una relación entre experimentación y herramientas matemáticas y computacionales, dando lugar a una visión más integrada del desarrollo como sistema dinámico.

Actualmente, la biología del desarrollo es una disciplina consolidada que no sólo busca entender los procesos de diferenciación y formación de estructuras durante el desarrollo embrionario, sino que también tiene implicancias en áreas como la medicina regenerativa y las terapias con células madre. A medida que se profundiza en los mecanismos que regulan el destino celular, se abren nuevas posibilidades para intervenir en contextos patológicos o de reparación de tejidos. Como toda ciencia básica, ha encontrado inexorablemente su aplicación en mejorar la calidad de vida de la gente.

Además, la interacción con las matemáticas se ha vuelto cada vez más estrecha: modelos matemáticos y simulaciones computacionales permiten explorar hipótesis sobre autoorganización, estabilidad de patrones y dinámica espaciotemporal. En este sentido, la idea fundacional de Turing de que patrones complejos pueden emerger de reglas locales simples sigue siendo una referencia central para muchos enfoques actuales en el campo.

6.2 SOMITOGÉNESIS Y EL MODELO DE RELOJ Y FRENTE DE ONDA

La formación de patrones es un aspecto fundamental del desarrollo embrionario. Estructuras como los dedos, las ramas del árbol bronquial o los segmentos vertebrales no surgen de manera azarosa, sino a partir de mecanismos precisos que traducen información genética y bioquímica en organización espacial. La idea de que reglas locales pueden dar lugar a orden global tiene una larga tradición en biología teórica. El caso de la somitogénesis en vertebrados retoma y ejemplifica muchas de estas ideas: se trata de un proceso donde oscilaciones temporales se traducen en estructuras espaciales repetitivas, mediante una interacción compleja entre mecanismos genéticos, celulares y físicos que producen una secuencia ordenada de segmentos [92, 93].

La somitogénesis es el proceso por el cual se forman los somitos, estructuras transitorias que se forman con un ritmo fijo a lo largo del eje del cuerpo en el embrión de vertebrados, y que actúan co-

mo precursores de elementos repetitivos como vértebras, costillas o parte de los músculos esqueléticos (Fig. 6.1D). La formación de somitos ocurre a partir de un tejido no segmentado llamado mesodermo pre-somítico –*presomitic mesoderm* (PSM), que se encuentra en la parte posterior del embrión y se va alargando a medida que se forman nuevos segmentos en la parte anterior (Fig. 6.1E). El ritmo de formación de los somitos es sorprendentemente preciso y varía entre especies: ocurre aproximadamente cada 2 horas en el ratón, cada 90 minutos en el pollo, y puede alcanzar hasta 5 horas en humanos. En el caso del pez cebra, que será el modelo biológico de estudio de esta tesis, este ritmo es de alrededor de 25 minutos. En el corazón de esta regularidad se encuentra un mecanismo de ordenamiento temporal altamente controlado durante el desarrollo. Esto es, este ritmo constante implica la existencia de un *temporizador biológico*. Alteraciones en la somitogénesis pueden causar malformaciones congénitas, como vértebras fusionadas o escoliosis congénita, lo que subraya la importancia funcional y clínica de este proceso. Además, la somitogénesis es una característica evolutivamente conservada entre los vertebrados, lo que sugiere que los mecanismos que la regulan también están profundamente arraigados.

En 1976, Cooke y Zeeman propusieron un modelo conceptual conocido como “reloj y frente de onda” (*clock and wavefront*) para explicar la impresionante regularidad en la cantidad de segmentos en embriones de la misma especie [94]. Durante la segmentación, los somitos parecen ajustar su tamaño al del embrión al momento del comienzo de la somitogénesis, de forma que la cantidad total de segmentos (y por ende cantidad de vértebras en el adulto) es increíblemente consistente [94, 95]. Según este modelo, un reloj biológico, sobre cuya naturaleza no se preocuparon, oscila dentro de las células del PSM. Mientras tanto, una onda de diferenciación (el frente de onda) se propaga en dirección anteroposterior a una velocidad v (Fig. 6.2). Cuando esta onda alcanza una región del PSM, detiene las oscilaciones del reloj en esa posición, fijando así el estado del sistema en ese momento. Esto deja atrás un patrón espacial periódico, producto de oscilaciones temporales congeladas en el espacio. De este modo, el tamaño de los somitos formados S está determinado por la relación entre la velocidad del frente y el período del reloj T :

$$S = vT. \quad (6.1)$$

Además, si el proceso de segmentación ocurre durante un tiempo total d , el número de segmentos resultantes será $n = d/T$. Crucialmente, la cantidad de somitos es la misma, independientemente del tamaño del embrión al comienzo de la somitogénesis, si la velocidad del reloj y el tiempo total del proceso son constantes de individuo a individuo. Esto podría ser el caso si, por ejemplo, estuvieran determinados genéticamente, y no por factores mecánicos. Esta idea elegante

proporciona un marco conceptual intuitivo para visualizar cómo la estructura temporal se convierte en espacial.

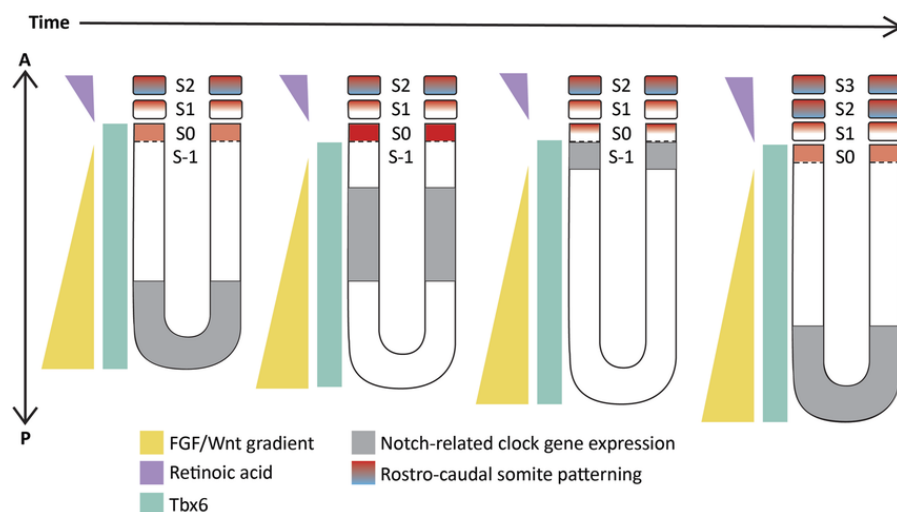


Figura 6.2: Modelo del reloj y frente de onda. Oscilaciones coordinadas de genes relacionados a la vía Notch se originan en el extremo posterior del embrión, etiquetado con la letra P, y migran anteriormente, dirección etiquetada con la letra A. Gradientes de morfógenos como FGF, Wnt y ácido retinóico controlan el arresto de las oscilaciones y la formación de los segmentos, etiquetados S₀, S₁, etc. Adaptado de la Ref. [96].

En los años posteriores, el descubrimiento de oscilaciones génicas en las células del PSM proveyeron el “reloj” del modelo de Cooke y Zeeman. Estas oscilaciones fueron originalmente encontradas en experimentos de hibridación *in-situ* [97], un procedimiento experimental en el cual se fija el tejido de un embrión y, a través de sondas de ácidos nucleicos, se tiñe la región que expresa un dado gen [98]. Fijando múltiples embriones en diferentes etapas del desarrollo, se pueden observar las variaciones temporales de los patrones de expresión [99] (Fig. 6.3). Más recientemente, reporteros fluorescentes permitieron observar las oscilaciones *in-vivo*, y cuantificar oscilaciones en células individuales en el tejido en desarrollo [100-102]. El período de estas oscilaciones coincide con el período de formación de somitos, lo que sugiere la conexión con el modelo de reloj y frente de onda. Esta red de osciladores génicos que marcan el paso de la morfogénesis llevan el nombre de “reloj de segmentación” [103-106].

reloj de
segmentación

La existencia de estos osciladores a nivel célula única, puede entenderse como un primer nivel de organización de este sistema [103]: localmente, cada célula del PSM se organiza temporalmente para formar oscilaciones. Un nivel más arriba, células vecinas se coordinan localmente para generar oscilaciones sincronizadas. La coordinación se lleva a cabo por comunicación de corto alcance, a través de la vía Delta-Notch y organiza las oscilaciones en ondas que viajan a lo largo del PSM [107-109]. En el tercer nivel, un conjunto de gradientes de

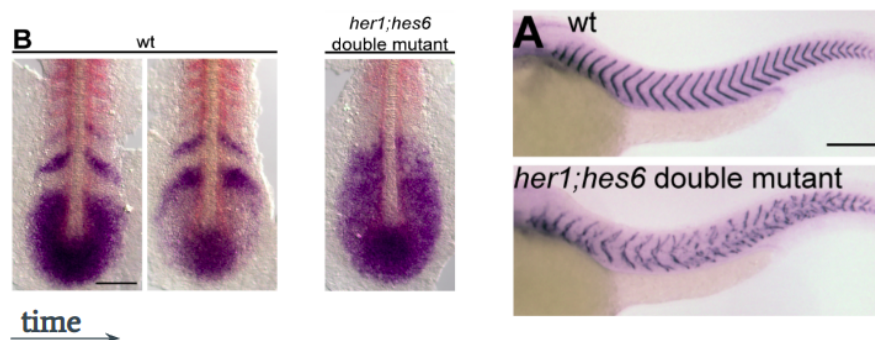


Figura 6.3: Izquierda: Revelados de hibridación *in situ* de ARNm de *her7* en embriones de pez cebra en dos momentos consecutivos durante el estadio de 10 somitos. Se observa cómo la expresión de *her7* varía su patrón espacial a con el pasar del tiempo. Centro: El doble mutante de *her1* y *hes6* no presenta el patrón espacial, lo que (derecha) resulta en una segmentación defectuosa. Adaptado de la Ref. [99].

morfógenos –FGF, Wnt, ácido retinoico, entre otros– regula el cese de las oscilaciones de las ondas viajeras a lo largo del eje anteroposterior [110, 111]. La interacción entre estos niveles permite que oscilaciones inicialmente dinámicas se conviertan en patrones espaciales.

tailbud

En esta tesis nos enfocaremos fuertemente en el segundo nivel: la sincronización a nivel local. Estudiaremos este proceso en la región más posterior del PSM, llamada *tailbud*. En esta región, las células altamente móviles [112, 113] inician sus oscilaciones de forma coordinada, completando un par de ciclos antes de migrar hacia en dirección anterior [109]. Desde aquí, a medida que el PSM se elonga se generan las ondas viajeras. La sincronización es llevada a cabo por la vía de señalización de Notch [114]. Experimentos en los que se bloquea temporalmente esta vía muestran pérdida progresiva del patrón de segmentación, que puede recuperarse si se restablece la comunicación [109]. Esto demuestra que la sincronización no solo es un fenómeno emergente, sino también un requisito funcional para el desarrollo ordenado del eje corporal en vertebrados.

El interés del estudio de la vía de Notch va más allá de la somitogénesis en vertebrados. Es una vía de señalización involucrada en procesos de desarrollo y diferenciación tan variados como se pueda pensar [115-118]. Coordina la formación de neuronas en múltiples tejidos [119-122], organiza el destino de progenitores de células pancreáticas [123] y establece los patrones de células en la retina [124, 125] entre muchos otros procesos. También cumple roles en diferenciación en organismos adultos, en la formación de nuevas neuronas en el cerebro [126], la diferenciación de células de la sangre en mosca [127] y la regeneración de tejidos [128]. A su vez, problemas en esta vía están asociados con una variedad de patologías [129-131]. Esta versatilidad para cumplir roles en una miríada de contextos se mantiene

como una pregunta abierta interesante. En esta tesis aportaremos al cuerpo de conocimiento del funcionamiento de la vía Delta-Notch, investigaremos posibles modalidades de señalización poco exploradas hasta ahora, e intentaremos hechar luz sobre los roles de algunos componentes de la vía.

6.3 BASES MOLECULARES DEL OSCILADOR EN PEZ CEBRA

En esta tesis nos enfocaremos en la sincronización del reloj de segmentación, específicamente en pez cebra (*Danio rerio*), un modelo ampliamente utilizado en estudios de desarrollo por su transparencia embrionaria, rapidez en la formación de somitos y accesibilidad experimental.

El circuito central del reloj de segmentación está constituido por una red de osciladores genéticos distribuidos en el PSM. Cada célula alberga un oscilador autónomo, generado por la expresión oscilante de genes de la familia *her* [99, 132-136] (Fig. 6.3). Estos factores forman dímeros que se autorregulan negativamente y son responsables de las oscilaciones periódicas. En particular, el sistema está compuesto por dos ciclos de autoregulación: uno mediado por homodímeros de Her1, y otro por heterodímeros entre Her7 y Hes6 [99]. Si bien todas las combinaciones de dímeros de estas tres proteínas se forman, solo estos dos dímeros tienen actividad de unión al ADN y regulan directamente la expresión de *her1* y *her7*. Los demás dímeros posibles (como Her1:Her7 o Hes6:Hes6) carecen de actividad reguladora directa, pero secuestran monómeros y afectan indirectamente la disponibilidad de los dímeros activos.

El acoplamiento entre estos osciladores individuales ocurre a través de la vía de señalización Notch (Fig. 6.4B). Cuando un receptor Notch en la membrana de una célula interactúa con un ligando de la familia DSL en una célula vecina, el receptor sufre una modificación conformacional que lleva al clivaje de la proteína, lo cual libera el dominio intracelular de Notch –*Notch Intra-cellular Domain* (NICD) en la primera célula [137, 138]. El ligando unido al restante dominio extracelular de Notch –*Notch Extra-cellular Domain* (NECD) es internalizado en la segunda célula, y presuntamente degradado. Para que este proceso pueda ser llevado a cabo, el ligando debe primero pasar por un proceso de maduración complejo que incluye modificaciones postraduccionales (glicosilación, ubiquitinación), y tráfico intracelular que son esenciales para su funcionalidad en la señalización Notch [118, 137, 138].

Los genes *her* no solo oscilan en su propia expresión, sino que regulan la transcripción de *deltaC*, un ligando de Notch de la familia DSL que también muestra un patrón de expresión oscilante [107]. DeltaC se localiza en la membrana celular y, al interactuar con receptores Notch de células adyacentes, desencadena la liberación del

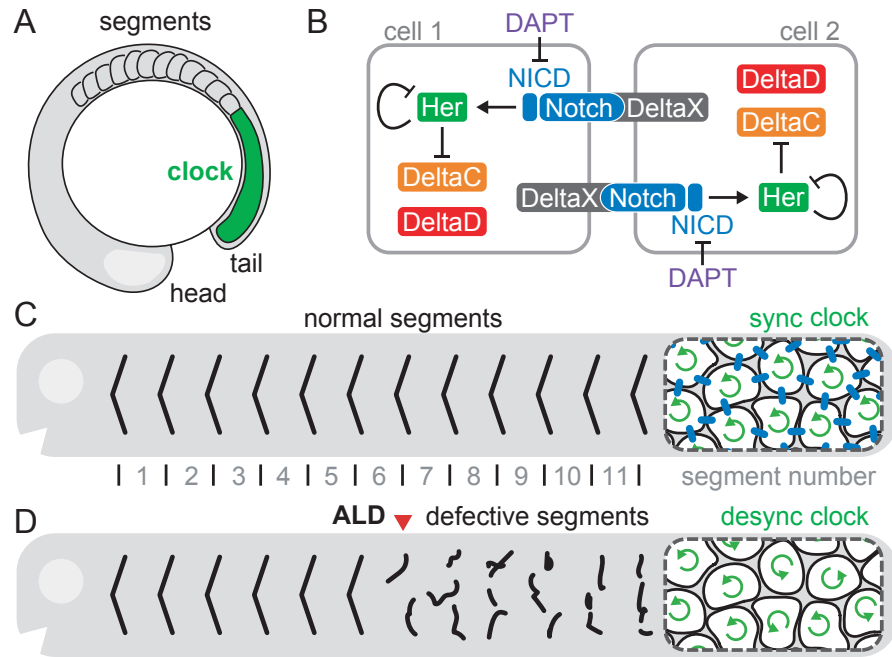


Figura 6.4: (A) Representación esquemática del embrión de pez cebra durante la segmentación, indicando la cabeza, la cola, los segmentos recientemente formados, y la región no diferenciada donde se expresa el reloj de sincronización (verde). (B) El acoplamiento inter-celular a través de la vía Notch sincroniza osciladores individuales. (C, D) Representación esquemática del embrión de pez cebra mostrando (C) fronteras entre segmentos sanos (líneas negras) y (D) segmentos defectuosos (líneas rotas). El triángulo rojo indica la aparición del primer defecto. Un zoom del extremo de la cola muestra (C) osciladores individuales sincronizados en presencia de acoplamiento (barras azules) o (D) desincronizados, en ausencia de acoplamiento.

NICD. Este migra al núcleo de la célula vecina, donde se une al factor de transcripción CSL y al co-activador Mastermind-like, formando un complejo activador que induce la expresión de *her*, cerrando así el lazo de comunicación. De este modo, el estado oscilatorio de una célula influye en la dinámica de sus vecinas, generando un acoplamiento de corto alcance que sincroniza los osciladores y genera el patrón de segmentos (Fig. 6.4C).

La importancia de esta interacción se evidencia en experimentos donde se perturba el funcionamiento de la vía Delta-Notch. Por ejemplo, embriones con mutaciones en *deltaC* o *notch1a*, o tratados con inhibidores como DAPT que bloquean la liberación del NICD, forman inicialmente algunos somitos normales, pero luego desarrollan defectos de segmentación [107, 139-141]. En promedio, los mutantes de *deltaC* y los embriones tratados con DAPT forman alrededor de 5.5 segmentos normales antes de la aparición de defectos, mientras que los mutantes de *notch1a* forman en promedio 8. Estos resultados die-

ron lugar a la llamada “hipótesis de desincronización”: si bien el sistema comienza en un estado sincronizado [109], en ausencia de acoplamiento, las oscilaciones individuales se defasan progresivamente por efecto del ruido estocástico en la expresión génica (Fig. 6.4D). Resumimos estas interacciones y sus efectos en la Tabla 6.1.

El gen *deltaD*, otro ligando de Notch presente en el pez cebra, presenta una situación particularmente interesante. Si bien su mutación también genera un fenotipo compatible con pérdida de sincronía –forma 8 segmentos sanos antes de la aparición de defectos [102]–, *deltaD* no muestra un patrón de expresión oscilante ni hay evidencia de que sea regulado por los productos de *her* [114, 142, 143] (Tabla 6.1). Esta aparente contradicción motiva la pregunta central de esta segunda parte de la tesis: cuál es el rol que cumple DeltaD, un ligando cuya dinámica de expresión no contiene información temporal sobre la oscilación, en la sincronización de las oscilaciones.

GEN	REG.	OSC.	PERTURBACIÓN
<i>her/hes</i>	sí	sí	defectos, pérdida de oscilacin
<i>notch1a</i>	no	no	8 segmentos sanos antes de los defectos
<i>deltaC</i>	sí	sí	5.5 segmentos sanos antes de los defectos
<i>deltaD</i>	no	no	8 segmentos sanos antes de los defectos
DAPT	sí	sí	5.5 segmentos sanos antes de los defectos

Tabla 6.1: Evidencia sobre los componentes moleculares del reloj de segmentación. La columna REG. define si el gen está regulado por el oscilador o no. La columna osc. define si se encontró evidencia de oscilaciones a nivel transcripcional de estos genes. La columna perturbación detalla el efecto de los mutantes del gen en la segmentación del embrión. La fila indicada por DAPT no refiere a la mutación de un gen, sino a embriones tratados con la droga DAPT.

6.4 PRIMERA HIPÓTESIS Y ÚLTIMOS COMENTARIOS

Una primera hipótesis surge a partir de estudios bioquímicos han demostrado que DeltaC y DeltaD colocalizan *in vivo* y pueden formar tanto heterodímeros como homodímeros en condiciones *in vitro* [144]. Además, los heterodímeros se forman en mayor proporción, lo que sugiere una asimetría en la afinidad de los ligandos. Esto podría sugerir que la funcionalidad del sistema requiere la formación de heterodímeros DeltaC:DeltaD para activar efectivamente receptores Notch en células vecinas. En esta hipótesis, *deltaD* no aportaría una señal rítmica propia, sino que operaría como compañero necesario que habilita la propagación de la información de fase mediada por DeltaC.

Diversos trabajos teóricos han abordado distintos aspectos de la señalización Notch en el reloj de segmentación. Modelos de fases, que abstraen los detalles moleculares del acoplamiento, se han usado para estudiar la dinámica de sincronización en modelos de campo medio [109], los efectos del retardo en el acoplamiento [145-147], la movilidad de los osciladores [112, 113], perturbaciones [148], el acoplamiento pulsado asimétrico [149, 150] y distintos modos de señalización de Notch [151, 152]. Otros modelos genéricos han considerado osciladores excitables impulsados por Notch como origen del ritmo colectivo [153-155]. Modelos más detallados han incorporado información molecular para estudiar, por ejemplo, oscilaciones bioquímicas sincronizadas [133, 156-158], modulación del receptor Notch [159], efectos del ruido y la división celular [108], ondas cinemáticas de expresión génica [160, 161], y transmisión de señales a través de canales ruidosos [152].

A pesar del detallado conocimiento acumulado sobre los componentes moleculares del reloj de segmentación, persisten interrogantes fundamentales acerca de cómo se coordina la dinámica colectiva de las células en el PSM. En particular, la aparente contradicción que representa el hecho de que DeltaD sea crucial para la segmentación correcta ha sido una pregunta abierta desde el descubrimiento de los fenotipos de desincronización en mutantes de *deltaD* hace más de una década. Pocos trabajos han intentado responder esta pregunta, en esta segunda parte de esta tesis nos proponemos avanzar en esa dirección.

En lo que sigue de esta tesis desarrollamos una teoría del acoplamiento Delta-Notch en el reloj de segmentación del pez cebra basada en evidencia experimental. Usamos un enfoque de campo medio para estudiar la sincronización bajo distintos escenarios, con el objetivo de investigar el rol del ligando DeltaD. Primero, exploramos la hipótesis de que la unión de dímeros de Delta a los receptores Notch es la que media la sincronización, y analizamos qué roles cumplen los distintos dímeros para reproducir los distintos aspectos observados en los datos experimentales. Luego formulamos una teoría alternativa basada en la unión independiente de monómeros, y evaluamos si también puede dar cuenta del rol de DeltaD. Finalmente, discutimos las predicciones de cada hipótesis y proponemos experimentos que podrían permitir distinguir entre ellas.

DESCRIPCIÓN TEÓRICA DEL OSCILADOR

En este capítulo construimos una descripción teórica de los procesos biológicos de interés. Escribiremos ecuaciones diferenciales que describan la evolución de variables relevantes del sistema. Cada variable representará la concentración de moléculas involucradas en los procesos que estudiamos.

Construiremos una descripción de los componentes descritos en el capítulo 6 en cada célula utilizando un conjunto de ecuaciones diferenciales con retardo. Para esto haremos un uso extenso de la ley de acción de masa, herramientas de la mecánica estadística y teoría de sistemas dinámicos [62, 162, 163].

7.1 OSCILADOR Y RECEPCIÓN DE LA SEÑAL

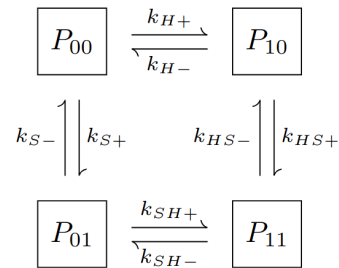
Este trabajo se enfoca en desentrañar los roles de los componentes de la red de señalización de Notch, por lo que para describir el oscilador tomaremos un acercamiento más simple y parsimonioso. Consideramos una sola proteína Her que inhibe su propia síntesis con un retraso temporal que tiene en cuenta el tiempo de síntesis. La variable $H(t)$ representa la concentración de esta proteína a tiempo t . Además de la auto inhibición, la tasa de síntesis de la proteína Her es regulada positivamente por los componentes de señalización de Notch. El NICD se libera dentro de la célula tras la unión de ligandos de células vecinas con el receptor de Notch. Denotamos la concentración de este componente de señalización por $S(t)$.

7.1.1 Función de regulación

Primero, derivaremos una función para describir los efectos reguladores de H y S en la tasa de síntesis de H . Consideraremos la dinámica y el estado estacionario del promotor y los factores de unión. La arquitectura de los promotores de genes *her* es compleja, incluyendo alrededor de 12 sitios de unión, donde se cree que las proteínas Her se unen como dímeros a sus propios promotores [99]. Se ha demostrado que múltiples sitios de unión aumentan la no linealidad efectiva de las funciones reguladoras [164-166]. Asimismo, la dimerización puede ser descrita efectivamente en una aproximación adiabática por un exponente de Hill de 2 [99]. Por lo tanto, aquí asumimos que sólo hay un sitio de unión para las proteínas Her por simplicidad, y luego incluimos los efectos de la multiplicidad en un exponente de Hill efectivo mayor a dos [164]. Además, si bien el NICD forma un complejo

antes de unirse los sitios de regulación de *her*[167, 168], asumiremos de la misma forma un único sitio de unión directamente para el *NICD*, y describiremos esta complejidad con una no linealidad efectiva.

Con estos supuestos, el promotor puede estar uno de cuatro estados, dependiendo de si ninguno, uno o ambos de los sitios de unión están ocupados. Representamos el estado del promotor como $P_{\mu\nu}$, donde μ es el estado del sitio de unión a *Her* y ν es el estado del sitio de unión a *NICD*, con $\mu, \nu = 0$ indicando un sitio vacío y $\mu, \nu = 1$ un sitio ocupado. Así, P_{10} indica el promotor al cual se unió *H*, pero no *S*. Los distintos estados del promotor están conectados en el esquema de las reacciones de unión

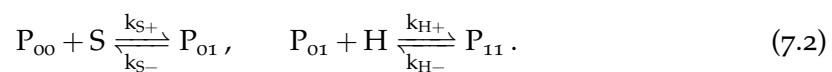
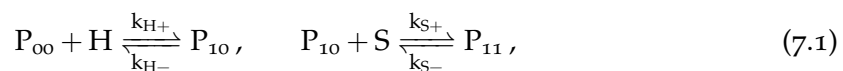


donde $k_{H\pm}$ y $k_{S\pm}$ son las tasas de unión (+) y desunión (−) de *H* y *S* a los promotores libres, $k_{SH\pm}$ es la tasa de unión y desunión de *H* al promotor con *S* unido y $k_{HS\pm}$ la tasa de *S* al promotor con *S* unido. Los valores de $k_{HS\pm}$ y $k_{SH\pm}$ dependen de cómo interactúan los dos componentes reguladores. Por ejemplo, fijar ambos a cero, $k_{HS+} = k_{SH+} = 0$, describe lo que llamamos unión competitiva excluyente, donde el estado de promotor debilmente unido es inalcanzable [169]. Esto asume que si *H* o *S* se unieron al promotor, el otro no puede unirse también. Alternativamente, suponer que las tasas de unión son independientes del estado del promotor para ambos componentes, $k_{SH\pm} = k_{H\pm}$ y $k_{HS\pm} = k_{S\pm}$, describe una situación donde no hay interacción en los sitios de unión de los componentes reguladores. Esto es, la tasa de unión de *H* al promotor es independiente e si *S* está unido o no, y viceversa. A este caso lo llamamos modelo de unión dual. Otras elecciones de los valores de $k_{HS\pm}$ y $k_{SH\pm}$ describen diferentes modelos para las interacciones de los ligandos. Motivados por los múltiples sitios de unión accesibles a los factores de transcripción de *Her*, aquí nos centramos en el modelo de unión dual.

*unión competitiva
excluyente*

unión dual

Las reacciones implicadas en este escenario de unión dual son



De estas cuatro reacciones podemos escribir las ecuaciones diferenciales para los cuatro estados del promotor, siguiendo la ley de acción de masas

$$\dot{P}_{00} = k_{H-}P_{10} + k_{S-}P_{01} - k_{H+}HP_{00} - k_{S+}SP_{00}, \quad (7.3)$$

$$\dot{P}_{10} = k_{H+}HP_{00} + k_{S-}P_{11} - k_{H-}P_{10} - k_{S+}SP_{10}, \quad (7.4)$$

$$\dot{P}_{01} = k_{S+}SP_{00} + k_{H-}P_{11} - k_{S-}P_{01} - k_{H+}HP_{01}, \quad (7.5)$$

$$\dot{P}_{11} = k_{H+}HP_{01} + k_{S+}SP_{10} - k_{H-}P_{11} - k_{S-}P_{11}, \quad (7.6)$$

junto con la ley de conservación

$$P_{00} + P_{10} + P_{01} + P_{11} = P_T. \quad (7.7)$$

Suponemos que las reacciones de unión y desunión del promotor son mucho más rápidas que la dinámica de H y S. Así, el estado promotor está en equilibrio para una dada concentración H y S, y fijamos $\dot{P}_{\mu\nu} = 0 \forall \mu, \nu$. Podemos resolver las ecuaciones algebraicas resultantes para obtener la ocupación del promotor en estado cuasi estacionario $P_{\mu\nu}(H, S)$,

$$P_{00}(H, S) = \frac{k_{H-}k_{S-}P_T}{(k_{H-} + k_{H+}H)(k_{S-} + k_{S+}S)}, \quad (7.8)$$

$$P_{10}(H, S) = \frac{k_{S-}k_{H+}P_TH}{(k_{H-} + k_{H+}H)(k_{S-} + k_{S+}S)}, \quad (7.9)$$

$$P_{01}(H, S) = \frac{k_{H-}k_{S+}P_TS}{(k_{H-} + k_{H+}H)(k_{S-} + k_{S+}S)}, \quad (7.10)$$

$$P_{11}(H, S) = \frac{k_{H+}k_{S+}P_THS}{(k_{H-} + k_{H+}H)(k_{S-} + k_{S+}S)}. \quad (7.11)$$

Luego, consideramos cómo la ocupación del promotor determina la tasa de transcripción. Introducimos la función de regulación $f(H, S)$, que modula la tasa de síntesis de H

$$f(H, S) = \sum_{\mu, \nu=0,1} \alpha_{\mu\nu} P_{\mu\nu}(H, S), \quad (7.12)$$

donde cada estado de promotor $P_{\mu\nu}$ tiene una tasa de transcripción asociada $\alpha_{\mu\nu}$. Aquí asumiremos que al unirse Her al promotor, la transcripción se ve completamente inhibida, independientemente del estado de unión del NICD, $\alpha_{10} = \alpha_{11} = 0$. Fijamos la tasa de transcripción basal $\alpha_{00} = b$ y la tasa de transcripción en el estado activado a un valor más alto $\alpha_{01} = a > b$, resultando en

$$f(H, S) = P_T \frac{k_{H-}(bk_{S-} + ak_{S+}S)}{(k_{H-} + k_{H+}H)(k_{S-} + k_{S+}S)}. \quad (7.13)$$

Si introducimos escalas de concentración

$$H_0 \equiv \frac{k_{H-}}{k_{H+}} \quad \text{and} \quad S_0 \equiv \frac{k_{S-}}{k_{S+}}, \quad (7.14)$$

obtenemos

$$f(H, S) = \frac{b_H}{1 + \frac{H}{H_0}} \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \frac{S}{S_0}}{1 + \frac{S}{S_0}}, \quad (7.15)$$

donde definimos $a_H \equiv P_T a$ y $b_H \equiv P_T b$.

Esta expresión proporciona la estructura de la función reguladora. Como mencionamos arriba, las proteínas Her forman dímeros y estos dímeros se unen a múltiples sitios de unión en el promotor. Del mismo modo, el NICD se une al ADN a través de un complejo que también puede introducir no linealidades adicionales. Estos efectos pueden englobarse en exponentes efectivos de Hill h_H y h_S ,

$$f(H, S) = b_H \frac{1}{1 + \left(\frac{H}{H_0}\right)^{h_H}} \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \left(\frac{S}{S_0}\right)^{h_S}}{1 + \left(\frac{S}{S_0}\right)^{h_S}}. \quad (7.16)$$

La función de regulación se separa en dos factores

$$f_-(H) = \frac{1}{1 + \left(\frac{H}{H_0}\right)^{h_H}} \quad \text{and} \quad f_+(S) = \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \left(\frac{S}{S_0}\right)^{h_S}}{1 + \left(\frac{S}{S_0}\right)^{h_S}}, \quad (7.17)$$

de modo que

$$f(H, S) = b_H f_-(H) f_+(S), \quad (7.18)$$

reflejando la asunción de independencia de las tasas de unión de los ligandos al promotor, el modelo de unión dual.

7.1.2 Retardo de autoregulación

En la célula $i = 1, \dots, N_c$, la concentración de Her H_i crecerá a una tasa constante b_H , modulada por la función de regulación Ec. (7.16). El proceso de regulación involucra múltiples pasos –la transcripción del ADN y *splicing* del ARN, el transporte del mARN desde el núcleo hasta los ribosomas, la subsiguiente traducción, el transporte de las proteínas resultantes al núcleo. Siguiendo la elección de parsimonia en la descripción del oscilador, escribimos

$$\dot{H}_i(t) = b_H \frac{1}{1 + \left(\frac{H_i(t-\tau_i)}{H_0}\right)^{h_H}} \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \left(\frac{S_i(t-\tau_i)}{S_0}\right)^{h_S}}{1 + \left(\frac{S_i(t-\tau_i)}{S_0}\right)^{h_S}} + \dots, \quad (7.19)$$

donde describimos todos estos pasos por un retardo efectivo τ_i , que resume el efecto de H regulándose a sí mismo [163, 170]. Como una molécula de Her tarda un tiempo τ_i en sintetizarse en la célula i , la tasa de síntesis en el tiempo t depende de las concentraciones de Her y NICD en un tiempo anterior $t - \tau_i$, cuando se iniciaba la síntesis.

El período de las oscilaciones de un sistema con retardos como el de Ec. (7.19) queda determinado, a primer orden, por el retardo en la síntesis y la tasa de degradación [133, 171, 172]. Como vamos a investigar la sincronización de múltiples osciladores como este, necesitamos que cada oscilador sea levemente distinto, de forma que la sincronización no sea trivial. Una elección sumamente parsimoniosa para esta variabilidad entre osciladores consiste en asignar distintos valores del retardo en la síntesis para cada célula, introduciendo una variabilidad en el período. Esta variabilidad tiene su correlato biológico: las fluctuaciones en la expresión génica pueden generar ruido en los tiempos de transcripción, la cantidad de ribosomas de célula a célula varía, lo que puede afectar los tiempos de traducción, y en general la maquinaria de síntesis de proteínas es intrínsecamente ruidosa. Por simplicidad, esta será la única fuente de variabilidad entre células en esta descripción del sistema, y la estudiaremos en profundidad más adelante.

7.1.3 Degradación

Por simplicidad, en este trabajo asumiremos que todas las especies químicas X_i decaen según la reacción



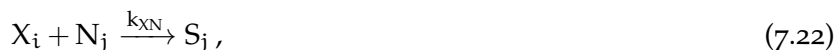
lo que resulta en un término lineal de decaimiento en la dinámica de X_i

$$\dot{X}_i(t) = -d_X X_i(t) + \dots, \quad (7.21)$$

donde d_X es la tasa de decaimiento de la especie X_i .

7.1.4 Activación de Notch

La comunicación entre células se efectúa a través de la unión de ligandos en una célula al receptor Notch en células vecinas. Una vez que Notch se une a un ligando, su dominio intracelular se libera en la célula y el complejo formado por el dominio extracelular restante y el ligando unido se internaliza en la otra célula. En este punto supondremos que el ligando se degrada tras la interacción con un receptor, más adelante revisaremos esta asunción en el capítulo 8. Dado que el receptor es clivado en este proceso, lo describimos como una reacción irreversible,



donde k_{XN} es la tasa de asociación entre el ligando X en la célula i y el receptor N en la célula j vecina, liberando la señal S en esa célula.

7.1.5 *Acomplamiento medio con vecinos*

Estas reacciones de unión dan lugar a términos de acomplamiento entre las concentraciones de los ligandos y de Notch, que en la célula receptora de la señal es

$$\dot{N}_i(t) = - \sum_{j \in \mathcal{V}_i} k_{XN} X_j N_i r_{ij} + \dots, \quad (7.23)$$

donde la suma es sobre los vecinos \mathcal{V}_i de la célula i . La contribución de cada vecino j es pesada por la fracción r_{ij} de la superficie de la célula i que está en contacto con la célula j ,

$$r_{ij} = \frac{A_{ij}}{A_T}, \quad (7.24)$$

donde A_{ij} es la superficie de contacto en cuestión y A_T es el área total de una célula, que asumimos igual para todas las células. Asumiendo que la superficie total de la célula i se comparte de forma equitativa entre todos los $|\mathcal{V}_i|$ vecinos, esto es $A_{ij} = A_T/|\mathcal{V}_i|$, tenemos que

$$r_{ij} = \frac{1}{|\mathcal{V}_i|}. \quad (7.25)$$

Con esta asunción, la célula i está acoplada al promedio de los ligandos en las células vecinas

$$\dot{N}_i(t) = -k_{XN} N_i \frac{1}{|\mathcal{V}_i|} \sum_{j \in \mathcal{V}_i} X_j + \dots, \quad (7.26)$$

donde la dinámica completa de N tendrá un término como estos por cada ligando X en el sistema. Por la reacción Ec. (7.22) tenemos que en la dinámica de la señal S en la célula receptora hay un término similar

$$\dot{S}_i(t) = +k_{XN} N_i \frac{1}{|\mathcal{V}_i|} \sum_{j \in \mathcal{V}_i} X_j + \dots. \quad (7.27)$$

7.1.6 *Campo medio*

En este trabajo nos centramos en el *tailbud*, una región posterior del reloj de segmentación caracterizada por oscilaciones sincronizadas en una población de células con alta movilidad [173]. Esta movilidad celular provoca un intercambio continuo de vecinos, que trabajos previos han demostrado que es efectivamente equivalente a un acomplamiento de todos con todos, es decir de campo medio [113]. Así, la cantidad total de vecinos es $|\mathcal{V}_i| = N_c$ en las Ecs. (7.26) y (7.27), y tenemos que los ligandos X y el receptor Notch N tienen valores de campo medio

$$\bar{X} = \frac{1}{N_c} \sum_{i=1}^{N_c} X_i, \quad \bar{N} = \frac{1}{N_c} \sum_{i=1}^{N_c} N_i. \quad (7.28)$$

7.1.7 Actividad total de ligandos

Con las Ecs. (7.21), (7.26) y (7.27), y la definición de campo medio (7.28) podemos escribir la dinámica del receptor y la señal

$$\dot{N}_i = -d_N N_i + b_N - K N_i \quad (7.29)$$

$$\dot{S}_i = -d_S S_i + K N_i \quad (7.30)$$

donde incluimos un término de síntesis constante del receptor b_N , dado que no hay evidencia de que Notch esté regulado transcripcionalmente por el oscilador u otro componente durante la somitogénesis. Además, definimos la actividad total de ligandos

$$K = \sum_{\{X\}} k_{XN} \bar{X} \quad (7.31)$$

como la suma de toda la actividad de los ligandos, pesados por su afinidad a Notch.

actividad total de
ligandos

7.2 SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR DÍMEROS

A continuación, construiremos una descripción de la dinámica de los ligandos de Notch y su rol en la señalización. Basándonos en la propuesta de que los ligandos de Notch DeltaC y DeltaD dimerizan [144, 174], y que son los dímeros los que en realidad se unen a Notch y lo activan (Fig. 7.1), escribiremos ecuaciones para la dinámica de las concentraciones de los monómeros y de los dímeros.

7.2.1 Dimerización

La evidencia *in vitro* sugiere que tanto el heterodímero DeltaC:DeltaD como los homodímeros DeltaC:DeltaC y DeltaD:DeltaD se forman [144]



donde k_{CD}^\pm es la tasa de asociación (+) o disociación (−) del heterodímero, y k_{CC}^\pm y k_{DD}^\pm , de los homodímeros. Para alivianar la notación, introducimos variables para describir las concentraciones de los dímeros [DeltaC:DeltaD] \equiv E, [DeltaC:DeltaC] \equiv F, [DeltaD:DeltaD] \equiv G, y re-etiquetamos las tasas de asociación y disociación correspondientes $k_E^\pm \equiv k_{CD}^\pm$, $k_F^\pm \equiv k_{CC}^\pm$, and $k_G^\pm \equiv k_{DD}^\pm$. Así, usando la ley de acción de masas, tenemos que por ejemplo que por la reacción Ec. (7.33) el

homodímero de DeltaC F aporta términos en su propia dinámica y en la del monómero C

$$\dot{C}_i(t) = -2k_F^+ C_i^2 + 2k_F^- F_i + \dots, \quad (7.35)$$

$$\dot{F}_i(t) = +k_F^+ C_i^2 - k_F^- F_i + \dots. \quad (7.36)$$

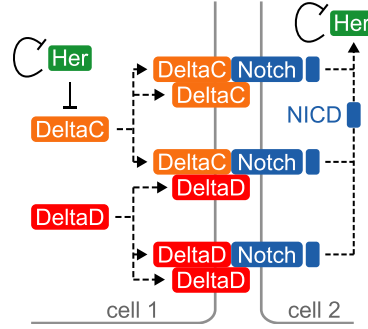


Figura 7.1: Esquema de la red de dimerización de DeltaC y DeltaD, y de la activación de Notch. La síntesis de DeltaC está regulada por el oscilador. Los monómeros DeltaC y DeltaD se asocian homodímicamente y heterodímicamente y forman dímeros. Los dímeros se unen a Notch en células vecinas y lo activan, liberando el NICD y transmitiendo una señal al oscilador de la receptora.

7.2.2 Modelo completo

Con lo desarrollado hasta aquí estamos en condiciones de construir el modelo completo que describe acoplamiento mediado por dímeros. Para cada célula i tenemos

$$\dot{H}_i = -d_H H_i + b_H \frac{1}{1 + \left(\frac{H_i(t-\tau_i)}{H_0}\right)^{h_H}} \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \left(\frac{S_i(t-\tau_i)}{S_0}\right)^{h_S}}{1 + \left(\frac{S_i(t-\tau_i)}{S_0}\right)^{h_S}} \quad (7.37)$$

$$\begin{aligned} \dot{C}_i = & -d_C C_i + b_C \frac{1}{1 + \left(\frac{H_i(t-\tau_C)}{H_{0C}}\right)^{h_C}} - \dots \\ & \dots - k_E^+ C_i D_i + k_E^- E_i - 2k_F^+ C_i^2 + 2k_F^- F_i \end{aligned} \quad (7.38)$$

$$\dot{D}_i = -d_D D_i + b_D + k_E^- E_i - k_E^+ C_i D_i - 2k_G^+ D_i^2 + 2k_G^- G_i \quad (7.39)$$

$$\dot{E}_i = -d_E E_i - k_E^- E_i + k_E^+ C_i D_i - k_{EN} E_i \bar{N} \quad (7.40)$$

$$\dot{F}_i = -d_F F_i - k_F^- F_i + k_F^+ C_i^2 - k_{FN} F_i \bar{N} \quad (7.41)$$

$$\dot{G}_i = -d_G G_i - k_G^- G_i + k_G^+ D_i^2 - k_{GN} G_i \bar{N} \quad (7.42)$$

$$\dot{N}_i = -d_N N_i + b_N - KN_i \quad (7.43)$$

$$\dot{S}_i = -d_S S_i + KN_i \quad (7.44)$$

donde incluimos términos de decaimiento con tasa d_X en cada una de las ecuaciones siguiendo la Ec. (7.21), y k_{EN} , k_{FN} y k_{GN} son las afini-

dades de los dímeros a Notch, siguiendo la definición en la Ec. (7.22), de forma que la actividad total de ligandos es

$$K = k_{EN}\bar{E} + k_{FN}\bar{F} + k_{GN}\bar{G}. \quad (7.45)$$

La concentración de DeltaD D incluye un término de síntesis constante, dado que no hay evidencia de que esté transcripcionalmente regulado por el oscilador en el tejido de interés, y que no se observan patrones en la expresión del ARNm[142]. En cambio, DeltaC sí presenta patrones consistentes con signos de oscilación[142], y el promotor de DeltaC tiene sitios de unión para productos de *her*. Por esa razón, la dinámica de C incluye un término de regulación negativa como en Ec. (7.17), evaluada en un tiempo pasado $t - \tau_C$ que tiene en cuenta el intervalo de tiempo entre la represión del gen de *deltaC* y la producción de la proteína. Este parámetro, si bien describe retardos en la síntesis de DeltaC, actúa para fijar de forma efectiva también el retardo de acoplamiento entre células. La escala de concentración H_{0C} indica la concentración de H que reduce a la mitad la tasa de síntesis basal b_C , y el exponente de Hill h_C da cuenta de los pasos intermedios involucrados en la regulación de DeltaC.

7.3 ADIMENSIONALIZACIÓN

En esta tesis trabajaremos con una versión adimensional del modelo dado por las Ecs. (7.37)- (7.44), lo que nos provee una descripción independiente de las escalas de tiempo y de concentración del sistema. Elegimos una escala temporal dada por el inverso de la tasa de decaimiento de Her d_H^{-1} , y una escala de concentración dada por la escala de autoregulación de Her H_0 . Las ecuaciones tienen unidades de concentración sobre tiempo, por lo que multiplicando todas por un factor $(H_0 d_H)^{-1}$ obtenemos una expresión adimensional. Introducimos la concentración adimensional

$$x_i \equiv \frac{X_i}{H_0}, \quad X = H, C, D, E, F, G, N, S, \quad (7.46)$$

y tiempo adimensional

$$\tilde{t} \equiv t d_H, \quad (7.47)$$

las derivadas temporales se transforman como

$$\frac{\dot{X}}{d_H H_0} = \frac{dx}{d\tilde{t}} \equiv x', \quad (7.48)$$

donde utilizamos la prima como derivada respecto de la variable temporal adimensional \tilde{t} . La formulación completa es entonces

$$h'_i = -h_i + \beta_h \frac{1}{[1 + h_i^{\eta_H}(\tilde{t} - \tilde{\tau}_i)]} \frac{1 + \alpha(\sigma s_i(\tilde{t} - \tilde{\tau}_i))^{\eta_S}}{[1 + (\sigma s_i(\tilde{t} - \tilde{\tau}_i))^{\eta_S}]} \quad (7.49)$$

$$c'_i = -\delta_c c_i + \beta_c \frac{1}{1 + (\gamma h_i(\tilde{t} - \tilde{\tau}_C))^{\eta_C}} + \dots \\ \dots + \lambda_E^- e_i - \lambda_E^+ c_i d_i + \lambda_F^- f_i - \lambda_F^+ c_i^2 \quad (7.50)$$

$$d'_i = -\delta_d d_i + \beta_d + \lambda_E^- e_i - \lambda_E^+ c_i d_i + \lambda_G^- g_i - \lambda_G^+ d_i^2 \quad (7.51)$$

$$e'_i = -\delta_e e_i - \lambda_E^- e_i + \lambda_E^+ c_i d_i - \kappa_E e_i \bar{n} \quad (7.52)$$

$$f'_i = -\delta_f f_i - \lambda_F^- f_i + \lambda_F^+ c_i^2 - \kappa_F f_i \bar{n} \quad (7.53)$$

$$g'_i = -\delta_G g_i - \lambda_G^- g_i + \lambda_G^+ d_i^2 - \kappa_G g_i \bar{n} \quad (7.54)$$

$$n'_i = -\delta_n n_i + \beta_n - n_i \sum_{x=e,f,g} \kappa_X \bar{x} \quad (7.55)$$

$$s'_i = -\delta_s s_i + n_i \sum_{x=e,f,g} \kappa_X \bar{x} \quad (7.56)$$

con parámetros adimensionales

$$\delta_X \equiv \frac{d_X}{d_H}, \quad \beta_X = \frac{b_X}{d_H H_0}, \quad \kappa_X = \frac{k_{XN} H_0}{d_H}, \\ \sigma = \frac{H_0}{S_0}, \quad \gamma \equiv \frac{H_0}{H_{0C}}, \quad \alpha = \frac{a_H}{b_H},$$

$$\lambda_E^+ \equiv \frac{H_0 k_E^+}{d_H}, \quad \lambda_E^- \equiv \frac{k_E^-}{d_H}, \\ \lambda_F^+ \equiv \frac{2H_0 k_F^+}{d_H}, \quad \lambda_F^- \equiv \frac{2k_F^-}{d_H}, \\ \lambda_G^+ \equiv \frac{2H_0 k_G^+}{d_H}, \quad \lambda_G^- \equiv \frac{2k_G^-}{d_H}.$$

y renombrando $h_X \rightarrow \eta_X$ para $X = H, S, C$. La Tabla 7.1 resume el rol de cada uno de los parámetros adimensionales. En lo que sigue haremos abuso de la notación e indicaremos la derivada respecto del tiempo adimensional con un punto \dot{x} , y omitiremos las tildes de las variables temporales y los retardos, de modo que t , τ_i y τ_C refieren a los valores adimensionales. Cuando resulte necesario, mencionaremos explícitamente si nos referimos al valor dimensional del parámetro.

7.4 PARAMETRIZACIÓN

A continuación, estableceremos valores para la mayoría de los parámetros del modelo. Las observaciones experimentales del reloj de segmentación del pez cebra, junto con algunas consideraciones teóricas, establecen restricciones en los valores de los parámetros.

PARÁM.	APLICA A X =	DESCRIPCIÓN
δ_X	H, C, D, E, F, G, N, S	tasa de decaimiento
β_X	H, C, D, N	tasa de síntesis
κ_X	E, F, G	afinidad del dímero a Notch
λ_X^\pm	E, F, G	tasa de dimerización y disociación
η_X	H, S, C	no linealidad efectiva
σ, γ		escala de concentración
τ_i, τ_C		retardo en la regulación

Tabla 7.1: Descripción de los parámetros del modelo adimensional dado por las Ecs. (7.49)- (7.56).

7.4.1 Parámetros del oscilador

Para parametrizar el oscilador de autoregulación seguimos [133], comparando el modelo de ARNm y proteína

$$\dot{p}(t) = am(t - \tau_p) - bp(t), \quad (7.57)$$

$$\dot{m}(t) = \frac{k}{1 + \left(\frac{p(t - \tau_m)}{p_0}\right)^n} - cm(t), \quad (7.58)$$

con la forma del oscilador descrita sólo por una proteína en la Ec. (7.49)

$$\dot{H}(t) = -d_H H(t) + \frac{b_H}{1 + \left(\frac{H(t - \tau_H)}{H_0}\right)^{n_H}}, \quad (7.59)$$

donde τ_H , que describe el retardo en la autoregulación de *her* en promedio. Los valores de los parámetros estimados para el oscilador de ARNm y proteínas son $a = 4,5$ proteínas por molécula de ARNm, $c = 0,23$ moléculas por minuto, $b = 0,286$ moléculas por minuto estimadas a partir de experimentos [161], $k = 33$ moléculas de ARNm por célula diploide por minuto, y $p_0 = 40$ moléculas. Los retrasos de síntesis en el modelo se estimaron posteriormente a partir de experimentos [175], mostrando que *her1* y *her7* tienen tiempos de transcripción muy similares $\tau_{m1} \approx ,10$ min y $\tau_{m7} \approx 9$ min, dominando sobre los tiempos de traducción de proteínas $\tau_{p1} \approx 2,8$ min y $\tau_{p7} \approx 1,7$ min. Introduciendo una aproximación de estado cuasi estacionario para el ARNm, $\dot{m} \approx 0$, obtenemos

$$m(t) \approx \frac{k}{c} \frac{1}{1 + \left(\frac{p(t - \tau_m)}{p_0}\right)^n}, \quad (7.60)$$

reemplazamos $m(t - \tau_p)$ en la Ec. (7.57),

$$\dot{p}(t) = -bp(t) + \frac{ak}{c} \frac{1}{1 + \left(\frac{p(t - \tau_m - \tau_p)}{p_0}\right)^n}. \quad (7.61)$$

Comparando las Ecs. (7.59) y (7.61) vemos que para obtener dinámicas similares deberíamos fijar $d_H \approx b$, $b_H \approx ak/c$, $\tau_H \approx \tau_m + \tau_p$, $\eta_H \approx n$ y $H_0 \approx p_0$. Dado que esta comparación se basa en la aproximación cuasi estacionaria, una asignación estricta de estos valores puede producir diferencias en la amplitud y el período. Además, el retardo de síntesis τ_H podría estimarse de forma diferente al comparar el periodo estimado para ambos modelos,

$$T_{\text{Lewis}} \approx 2(\tau_p + \tau_m + 1/b + 1/c), \quad (7.62)$$

$$T_H \approx 2(\tau_H + 1/d_H). \quad (7.63)$$

para que los períodos coincidan se requiere que $\tau_H \approx \tau_m + \tau_p + 1/c$.

Para el modelo de sólo proteína, los valores de los parámetros de [133] implican una tasa de degradación de la proteína Her $d_H = 0,286 \text{ min}^{-1}$, lo que fija la escala temporal, y $H_0 = p_0 = 40$ moléculas, lo que corresponde a una escala de concentración $[H_0] \approx 0,3 \text{ nM}$ para células del *tailbud* de $7,6 \mu\text{m}$ de diámetro [173].

Con estos valores iniciales, podemos integrar numéricamente el sistema (Apéndice A) y obtenemos oscilaciones autónomas sostenidas (Fig. 7.2). Utilizando estas simulaciones notamos que para obtener oscilaciones de amplitud similar a la Ref. [133], fijamos $\beta_H = 28$ en el modelo adimensional, lo que corresponde a $b_H \approx 320$ proteínas por minuto.

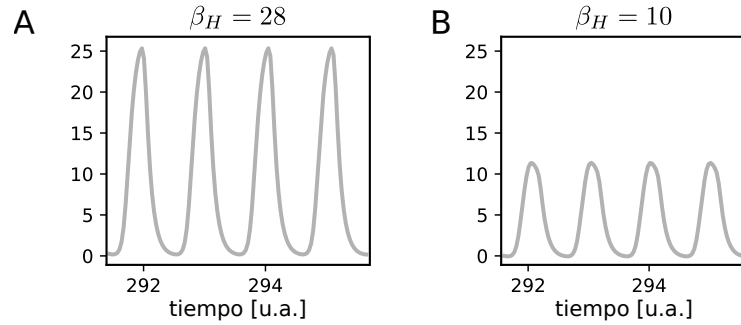


Figura 7.2: El sistema descrito por la Ec. (7.59) es capaz de oscilar con los parámetros estimados, resumidos en la Tabla C.2, excepto por $\beta_H = 10$ en el panel B. La amplitud de las oscilaciones varía fuertemente con la tasa de síntesis de Her β_H .

Fijamos el retardo adimensional en $\tau_h = 4,2$, lo que corresponde a un retardo de síntesis dentro de un rango de valores obtenidos al promediar los datos de Her1 y Her7, $\tau_H = 14,7$. Los exponentes de Hill tienen un valor efectivo que abarca el efecto de múltiples interacciones macromoleculares en la regulación, como la dimerización [99], la unión de complejos y múltiples sitios de unión en el promotor [164, 165]. Esperamos que los valores del exponente sean mayores a 2, por lo que elegimos una estimación conservadora $\eta = 2,5$. Utilizaremos estos valores para el oscilador y determinaremos el resto de parámetros a partir de estimaciones y exploraciones posteriores.

7.4.2 Distribución del retardo de autoregulación

Como mencionamos arriba, la única fuente de variabilidad entre células en el modelo está dado por la variabilidad en el retardo de autoregulación τ_H , que en cada célula i tiene un valor distinto τ_i .

El periodo autónomo del oscilador i depende principalmente del valor del retardo de síntesis τ_i y de la vida media de la proteína d_H^{-1} , con correcciones de segundo orden que dependen sobre todo de la tasa de síntesis b_H [133]. En particular, el medio período $T/2$ es aproximadamente la suma de estas dos cantidades, por lo que en la expresión adimensional tenemos $T \approx 2(\tau_i + 1)$. Integrando el modelo numéricamente observamos que el acuerdo con esta aproximación es bueno (Fig. 7.3A).

Para introducir variabilidad en los periodos autónomos, muestreamos los retardos τ_i de osciladores individuales a partir de una distribución normal, con media τ_H y ancho dado por el coeficiente de variación –*coefficient of variation* (CV)

$$C_\tau = \frac{\sigma_\tau}{\tau_H} \quad (7.64)$$

donde σ_τ es la desviación estándar de la distribución. El CV de la distribución del periodo resultante C_T es lineal con C_τ en un amplio rango (Fig. 7.3B). Fijamos entonces el valor del CV de la distribución de retardos $C_\tau = 0,03$. De esta forma, solo pocos osciladores en la población tendrán un período autónomo que varíe en más de 5%, lo que se traduce en que, en ausencia de acoplamiento, tardarán algunos ciclos en defasarse completamente del resto.

7.4.3 Parámetros restantes

Por simplicidad, haremos algunas suposiciones más. Fijaremos las tasas de decaimiento iguales para todas las variables, de modo que $\delta_X = 1 \forall X$. La escala de concentración de regulación de DeltaC la fijamos igual a la de autoregulación de Her, $\gamma = 1$. La escala de regulación positiva de Her por la señal será más chica que la de autoregulación, dado que asumimos que la señal debe aportar sólo una corrección al oscilador, pero la autoregulación debe gobernar el proceso, por lo que $\sigma = 0,1$.

Todos los parámetros restantes están relacionados al acoplamiento de los osciladores, y no disponemos de evidencia experimental para proponer valores para ellos, aunque sí disponemos de algunas restricciones. Fijaremos los valores de estos parámetros y estudiaremos su efecto sobre la sincronización del sistema en el capítulo siguiente.

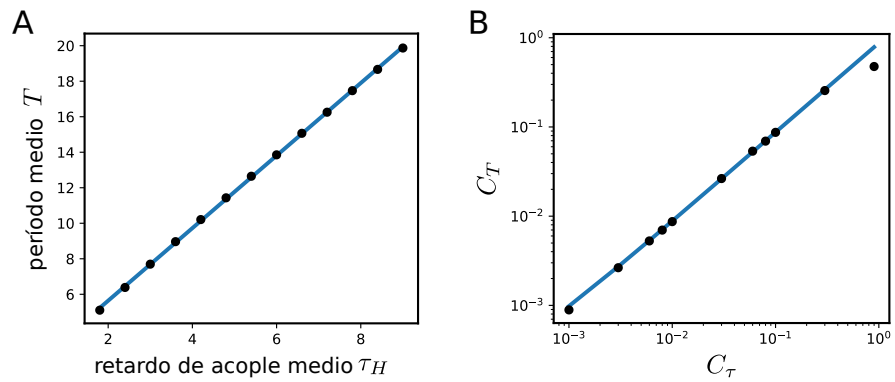


Figura 7.3: (A) El período medio de la población T depende del centro de la distribución de retardos τ_H siguiendo aproximadamente la relación $T = 2,04\tau_H + 1,55$. (B) La relación entre el CV de la distribución de retardos C_τ y el CV de la distribución de períodos C_T es esencialmente lineal, con una pendiente de 0.84. Cada punto representa el CV calculado a partir de la desviación estándar y la media de la muestra, de una población de 5000 osciladores integrados numéricamente. (A-B) Cada punto azul es el promedio de 5000 integraciones con los parámetros en la Tabla C.2, salvo por τ_H y C_τ como se indica en los ejes. Las líneas azules son ajustes lineales.

SINCRONIZACIÓN POR DÍMEROS

En este capítulo estudiaremos las condiciones necesarias para que el sistema sincronice. Exploraremos los valores de los parámetros que aún no han sido fijados y su efecto sobre la sincronización. Exploraremos la validez de la hipótesis de dimerización y propondremos hipótesis alternativas con el objetivo de responder *cuál es el rol del ligando DeltaD* en la sincronización de las oscilaciones del reloj de segmentación.

8.1 EL SISTEMA SINCRONIZA

Para completar la parametrización del sistema resta establecer valores para las tasas de dimerización λ_X^\pm , tasas de síntesis β_X y afinidad de acoplamiento entre los dímeros y Notch κ_X , y para el retardo y la intensidad de acoplamiento τ_c y α . Si bien estas cantidades no han sido medidas, podemos estimar el orden de magnitud de ellas a partir de descripciones teóricas de otros sistemas que cuentan con los mismos componentes. Para las tasas de síntesis β_C , β_D y β_N , exploramos valores del orden de β_H . Las tasas de dimerización y afinidad a Notch serán exploradas en un rango entre 10^{-3} y 10^0 , siguiendo trabajos como [99, 161, 176, 177]. Los valores restantes los fijaremos a partir de consideraciones experimentales que requieren haber fijado el resto de los parámetros.

8.1.1 Sincronización

Simulamos el sistema para $N_c = 100$ células y obtuvimos sincronización con los parámetros en la Tabla C.2 (Fig. 8.1A). Nos interesa describir la pérdida de sincronización como observamos en los fenotipos de las condiciones mutantes [107]. Las condiciones mutantes de los componentes de señalización, así como otras perturbaciones, pueden describirse en el modelo alterando las correspondientes tasas de síntesis β_C , β_D y β_N . Por ejemplo, el mutante DeltaD podría describirse estableciendo $\beta_D = 0$. Encontramos que la sincronización se pierde en esta condición, coincidiendo con la evidencia experimental de desincronización [102], a pesar de que DeltaD no está regulada por el oscilador, Fig. 8.1B.

*parametrización de
condiciones
mutantes*

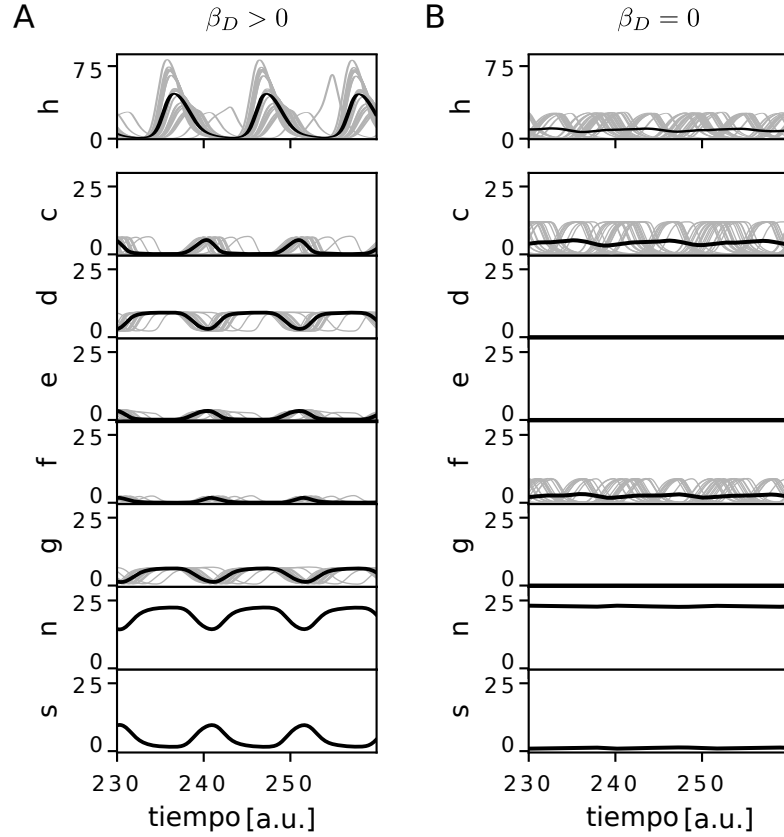


Figura 8.1: Oscilaciones individuales en estado estacionario $x_i(t)$ (líneas grises, se muestran 25 de 100) y campo medio $\bar{x}(t)$ (línea negra), para todas las variables $x = h, c, d, e, f, g, n, s$ con el sistema (A) sincronizado y (B) no sincronizado. Las escalas verticales son las mismas excepto para $h(t)$. Parámetros como en la Tabla C.2, salvo por $\beta_D = 0$ en el panel B.

8.1.2 Retardo de acoplamiento

Habiendo sincronizado el sistema, utilizaremos consideraciones experimentales para fijar los últimos parámetros restantes: la intensidad y el retardo de acoplamiento α y τ_C . Trabajos previos mostraron en sistemas de osciladores de fases que el acoplamiento retardado puede dar lugar a que los osciladores se sincronicen a una frecuencia colectiva mayor o menor que la autónoma, dependiendo del valor del retardo de acoplamiento [146]. En particular la intensidad de este efecto depende de la intensidad del acoplamiento (Fig 8.2A).

Para utilizar estos resultados en nuestro sistema, comparamos la distribución de periodos sin acoplar con la distribución de periodos en sistemas completamente sincronizados y sólo parcialmente sincronizados, con retardos de acoplamiento que resultan en periodos colectivos superiores o inferiores al autónomo. Para variar entre los sistemas desacoplado, acoplado debilmente (que resulta en sincronización

parcial) y acoplado fuertemente (resultando en sincronización total) variamos el valor de la intensidad de acoplamiento α entre 1 (desacoplado) y 6 (fuertemente acoplado). En el sistema completamente sincronizado (histogramas de color sólido en Fig. 8.2B) podemos ver que la distribución no sólo se desplaza hacia la derecha o hacia la izquierda respecto de la distribución desacoplada (histograma gris), dependiendo del retardo de acoplamiento, sino que también se estrecha significativamente. Esto es, el período colectivo es mayor o menor que el autónomo, y al sincronizarse el sistema disminuye el CV. En los casos parcialmente sincronizados (histogramas de líneas) podemos distinguir dos poblaciones: una que oscila con el ritmo colectivo, el pico angosto y bien definido, y otra que sigue oscilando a su ritmo autónomo.

Exploramos los valores del retardo de acoplamiento y tomamos $\tau_C = 1,7\tau_H$, de forma que el período colectivo sea 92 % del período autónomo cuando el sistema está sincronizado, siguiendo los resultados de [146] (Fig 8.2). Asimismo, fijamos $\alpha = 10$ de forma que el sistema esté fuertemente acoplado y el sistema se sincronice completamente.

8.1.3 Cuantificación de la sincronización

En lo que sigue, nos interesará explorar el efecto de los parámetros del sistema sobre la sincronización, con el objetivo de encontrar un conjunto de parámetros sea que capaz de reproducir todas las observaciones experimentales. Para este fin, introducimos un índice de sincronización, el parámetro de orden Kuramoto [62, 178, 179]. Coloquialmente, el parámetro de orden de Kuramoto cuantifica la dispersión de fases de una población de osciladores, y en principio es una cantidad que depende del tiempo. Si las fases de todos los osciladores avanzan juntas, es decir la población está sincronizada, el valor será cercano a uno. En cambio, si las fases están dispersas, es decir el sistema desincronizado, el valor será cercano a cero (Fig. 8.3A, B).

*parámetro de orden
de Kuramoto*

Más formalmente, el parámetro de orden de Kuramoto se calcula como el módulo del valor medio de los fasores complejos de las oscilaciones individuales

$$R(t)e^{i\varphi(t)} = \frac{1}{N_c} \sum_{i=1}^{N_c} e^{i\theta_i(t)}, \quad (8.1)$$

donde $\theta_i(t)$ es la fase de cada oscilador de la población y $R(t)$ y $\varphi(t)$ son el módulo y la fase de la oscilación colectiva. Así, para un dado tiempo t , $R(t) \approx 1$ cuando todas las fases $\theta_i(t)$ son similares, y $R(t) \approx 0$ cuando los valores están dispersos en el círculo unidad. Cuando la sincronización es parcial, y sólo una parte de los osciladores avanzan al ritmo de colectivo (Fig. 8.2B), el valor de $R(t)$ será intermedio.

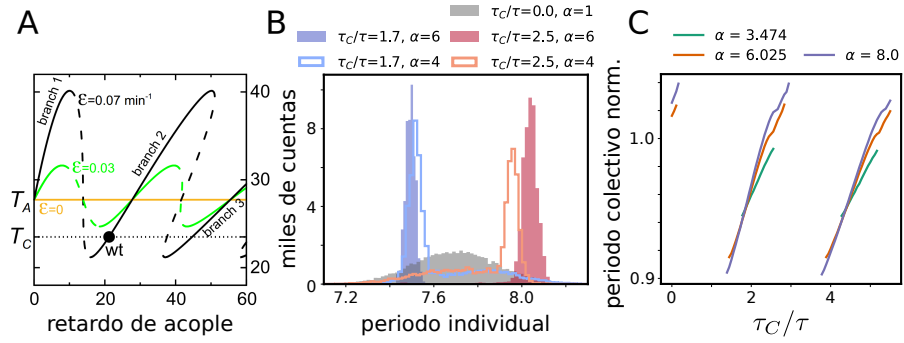


Figura 8.2: El retardo de acoplamiento afecta al período colectivo. (A) Período colectivo de un sistema de osciladores de fase en función del retardo de acoplamiento. En sistemas de osciladores de fase, el período colectivo puede ser mayor o menor que el período autónomo $T_A = 28$, dependiendo del valor del retardo de acoplamiento y de la intensidad de acoplamiento ϵ . Resultados analíticos adaptados de [146]. (B) Distribución de periodos de las células en un escenario desacoplado (desincronizado) y cómo cambia esa misma distribución al acoplar las células. Los histogramas completos coloreados representan sistemas totalmente sincronizados, los histogramas contorneados, parcialmente sincronizados. El histograma completo en gris es la distribución de periodos de células desacopladas. Los histogramas rojos representan sistemas que oscilan a un ritmo más lento que de forma autónoma, los azules más rápido. Cada distribución de color se construyó a partir de un total de 100 sistemas de 50 células acopladas cada uno. (C) Período colectivo normalizado a al período individual, aproximado por $2\tau_H + 1$, en función del retardo de acoplamiento τ_i para distintos valores de la intensidad de acoplamiento α . Sólo se muestran valores donde el sistema se encuentra sincronizado con $\bar{R} > R_T = 0,6$ (Fig. 8.7). El valor $\tau_c/\tau = 2$ es aproximadamente equivalente a un retardo de acople de 28 en el panel A. (B-C) Resultados de integración numérica del sistema dado por las Ecs. (7.49) a (7.56). Parámetros como en la Tabla C.2, salvo por los valores indicados en las leyendas.

Esta cantidad fue diseñada originalmente por Yoshiki Kuramoto para estudiar la aparición de la sincronización de un sistema de osciladores de fase en función de la intensidad del acople [178, 179]. Para utilizarlo para cuantificar la sincronización en otros sistemas, se debe definir la fase de los osciladores del sistema. En nuestro caso, utilizamos una transformada de Hilbert numérica [180], implementada en el paquete Python `scipy` [181], para obtener una fase $\theta_i(t)$ a partir de la serie temporal de los $h_i(t)$ (Fig. 8.3C).

Es importante notar que el valor de $R(t)$ será estacionario sólo si el sistema se encuentra en un estado estacionario, es decir, si la distancia entre las fases se mantiene fija. Si los osciladores se adelantan unos a otros, o si las fases se acercan y se alejan, el valor de $R(t)$ tendrá fluc-

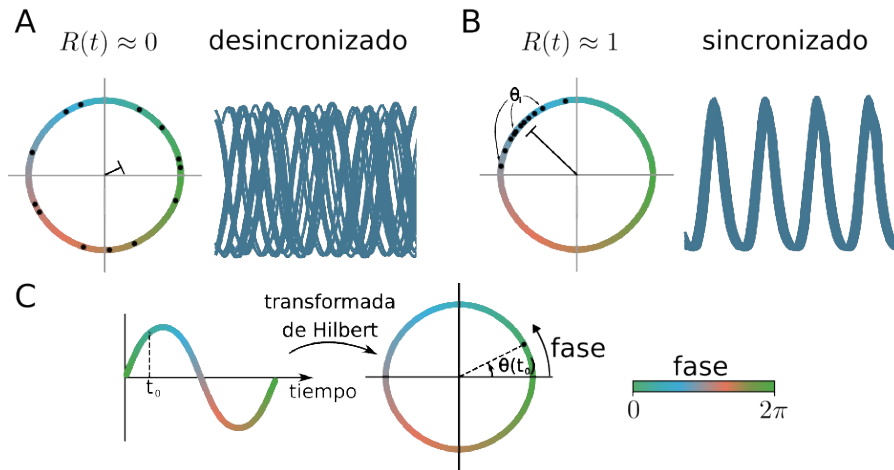


Figura 8.3: El parámetro de orden de Kuramoto cuantifica el grado de dispersión de las fases de osciladores en el círculo unidad, y así cuantifica el grado de sincronización. (A-B) Esquemmatización de la fase (puntos negros) de osciladores individuales, repartidos en torno al círculo unidad para un sistema (A) desincronizado y (B) sincronizado. La escala de colores indica el valor de la fase. (C) Esquemmatización de la extracción de la fase del sistema a partir de la serie temporal utilizando la transformada de Hilbert.

tuaciones (Fig. 8.4). Por esta razón, estimamos el valor estacionario del parámetro de orden de Kuramoto a partir del promedio temporal $\bar{R} = \langle R(t) \rangle_t$ en simulaciones de aproximadamente 200 períodos de duración.

8.2 ESTADO ESTACIONARIO

En lo que sigue, exploraremos valores de los parámetros que nos permiten describir los fenotipos mutantes. Así definiremos los valores de los parámetros que describen adecuadamente las oscilaciones en el *tailbud* del pez cebra, en la condición donde no se ha hecho ningún tipo de perturbación. A esta condición la llamamos condición salvaje, o *wildtype*. La presencia de defectos de segmentación en fenotipos mutantes para los ligandos Delta y el receptor Notch se interpretan como estados desincronizados del sistema [107]. A partir de los parámetros del *wildtype* describiremos las perturbaciones que corresponden a los fenotipos mutantes variando las tasas de síntesis de las componentes mutadas.

wildtype

8.2.1 Mapas de sincronización

Construimos mapas del valor estacionario del parámetro de sincronización \bar{R} en función de las tasas de síntesis de DeltaC, DeltaD y Notch (Fig. 8.5). Cada píxel en un mapa corresponde al promedio

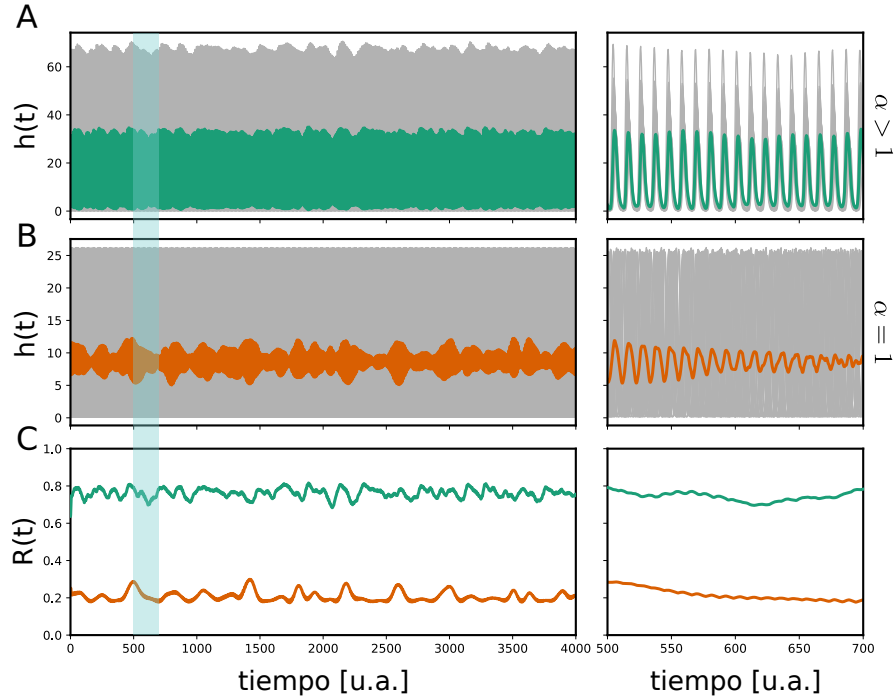


Figura 8.4: El parámetro de Kuramoto varía en efunción del tiempo, dado que el estado estacionario del sistema tiene fluctuaciones. (A-B) Oscilaciones individuales (gris) y campo medio (color) de un sistema (A) sincronizado y (B) sin sincronizar. La banda celeste indica la región en la que se hace zoom en los paneles de la derecha. (C) Parámetro de orden de Kuramoto en función del tiempo $R(t)$ para los sistemas sincronizado (verde) y desincronizado (naranja). (A-B) Parámetros como en la Tabla C.2, salvo por $\alpha = 0$ en el panel B.

de \bar{R} de diez integraciones numéricas de sistemas de $N_c = 100$ células, cada iteración con un conjunto distinto de retardos τ_i . De píxel a píxel, el valor de uno de los parámetros de control varía. Podemos ver que es posible elegir un conjunto de parámetros para el *wildtype* dentro de la región con alto índice de sincronización, de tal manera que la reducción de las tasas de síntesis de los componentes de acoplamiento dará lugar a la pérdida de la sincronización estacionaria (puntos en la Fig. 8.5).

Con esta elección de parámetros del *wildtype* (Tabla C.2), todos los componentes de acoplamiento resultan necesarios para la sincronización de estado estacionario, lo que está de acuerdo con los fenotipos mutantes para los ligandos y el receptor [102]. En particular, este resultado es consistente con un papel para DeltaD en la sincronización del reloj de segmentación. Además, observamos que partiendo de la condición $\beta_D = 0$ (punto rojo en la Fig. 8.5C, D) y aumentando β_C o β_N podemos volver a la región sincronizada. Esto predice que los defectos de segmentación en el mutante de DeltaD pueden ser rescatados con una sobre-expresión adecuada de DeltaC o Notch.

Estos mapas también predicen un comportamiento no monotónico del parámetro de orden con la tasa de síntesis de DeltaD β_D . Los mapas de sincronización extendidos (Fig. 8.5C, D) muestran que para valores grandes de β_D se pierde la sincronización, lo que sugiere que los términos no oscilatorios dominan en la dinámica, y eliminan la señal oscilatoria DeltaC. Esto es consistente con los experimentos en los que la sobreexpresión de DeltaD mediante la inyección de altos niveles de ARNm causa segmentos defectuosos [182], probablemente debido a la pérdida de sincronía. Por el contrario, peces transgénicos que expresan 50 veces más DeltaD que el *wildtype* no presentan fenotipo de desincronización [114]. Las copias extra de *deltaD* que dan esta sobreexpresión contienen las regiones de regulación endógenas del gen, por lo que los patrones de expresión del gen son los mismos que los del *wildtype*, lo cual no sucede con los experimentos de inyección de ARNm [114]. En conjunto, estos datos sugieren que el *wildtype* se sitúa en una región del mapa de sincronización con algún lugar para mayores concentraciones de DeltaD antes de que se pierda la sincronía. En la teoría, la sobreexpresión de DeltaD puede ser representada por grandes valores de β_D . Sin embargo, se debe tener en cuenta que en nuestro modelo no incluimos el detalle de la maduración y transporte de los ligandos DeltaD. Esto implica que un aumento de 50 veces en la expresión en peces transgénicos no se traduce necesariamente a un aumento 50 veces en el valor de β_D . De hecho, se observó que el aumento en la actividad de la vía de señalización de Notch no es lineal con el aumento de producción de DeltaD [114]. Esto implica que, si bien el *wildtype* debe encontrarse en una región del espacio de parámetros que admita sobreexpresión sin pérdida de sincronización, no es necesario que la región de sincronización admita un aumento en 50 veces del valor *wildtype* de β_D .

8.2.2 Elección de un umbral de sincronización

Para evaluar los efectos de los otros parámetros para los cuales fijamos rangos al comienzo de este capítulo, observaremos cómo la región de sincronización cambia de forma al modificar los parámetros. Notamos que al transicionar de una región de baja sincronización a una de alta sincronización, el crecimiento en el valor de \bar{R} es abrupto, consistente con lo que se observa en sistemas de tamaño finito de osciladores de Kuramoto [178, 179] (Fig. 8.6). Entonces, definimos un umbral de sincronización R_T , de forma que diremos que el sistema no está sincronizado si $\bar{R} < R_T$, y que el sistema está sincronizado si $\bar{R} > R_T$. Este cambio abrupto en el valor de \bar{R} nos permite definir de forma flexible el umbral de sincronización, dado que el sistema debería tener un conjunto de parámetros muy específico para encontrarse en la transición, lo cual sería poco robusto en un contexto biológico.

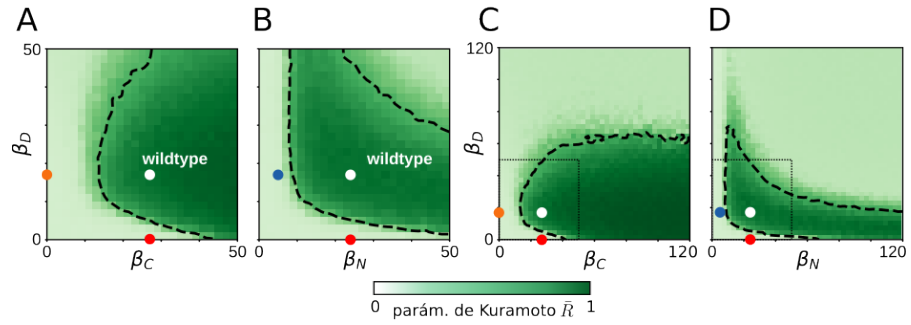


Figura 8.5: La hipótesis de dímeros uniendo a Notch es compatible con los fenotipos de desincronización en el estado estacionario. (A, B) Parámetro de orden de Kuramoto estacionario \bar{R} en función de las tasas de sintetización de (A) DeltaC y DeltaD, y (B) Notch y DeltaD. (C, D) Región más extensa del espacio de parámetros. Cajas de línea punteada indican el rango en los paneles A, B. (A-D) Cada mapa es el promedio de diez corridas con parámetros idénticos pero distinta elección de retardos τ_i . Líneas de rayas indican la frontera de la región de sincronización definida por $\bar{R} = R_T = 0,6$. Puntos de colores indican los parámetros del *wildtype* (blanco), mutante de DeltaC (naranja), DeltaD (rojo) y Notch (azul). El valor del umbral R_T y de los parámetros de mutantes se define más abajo en las Figs. 8.7 y 8.10, respectivamente.

De hecho, podemos calcular la fracción de píxeles de mapas como los de la Fig. 8.5 que están por encima de un valor de umbral arbitrario (Fig. 8.7A superior). Las curvas corresponden a mapas que generamos durante la exploración de parámetros y que no incluimos en esta tesis. Observamos que, partiendo de $R_T = 0$, todos los píxeles están por encima del umbral. A medida que aumentamos paulatinamente, llegamos a una primera caída de la curva al rededor de $R_T = 0,2$. Este valor corresponde al valor de \bar{R} que tiene el sistema en el estado desincronizado, las regiones claras de los mapas de la Fig. 8.5. Lugo, a medida que R_T sigue aumentando, observamos que la proporción de píxeles por encima del umbral se mantiene esencialmente constante. En esta región podemos fijar el umbral para separar entre estado sincronizado y desincronizado, y la elección exacta no afectará significativamente el tamaño de la región de sincronización en los mapas. Finalmente, a medida que R_T continúa aumentando observamos otra caída fuerte en la proporción de píxeles por encima del umbral cerca de $R_T = 0,95$, las regiones más oscuras de los mapas de la Fig. 8.5. Esto corresponde al valor estacionario de la región sincronizada. Podemos cuantificar las regiones de cambio abrupto de la proporción de píxeles por arriba del umbral calculando la derivada (Fig. 8.7A inferior). Una buena elección de umbral será alguna en la región más plana de la curva, donde la derivada es aproximadamente nula. Confeccionando un histograma de los dos picos más prominentes de la

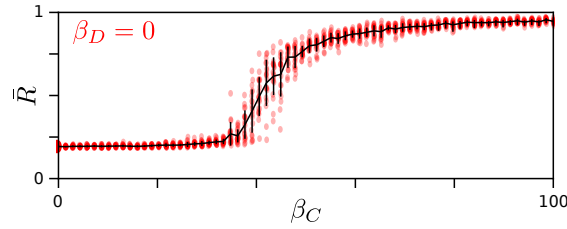


Figura 8.6: El valor del parámetro de Kuramoto presenta un salto relativamente abrupto a medida que el sistema hace la transición al estado sincronizado. Puntos rojos son realizaciones individuales, línea negra y barras son promedio y desviación estándar para cada valor de la tasa de síntesis β_C . Parámetros como en la Tabla C.2, excepto por $\beta_D = 0$, lo que equivale a desplazarse por el eje horizontal de la Fig. 8.5C.

derivada para cada mapa (Fig. 8.7B) vemos que la región aproximadamente entre $R_T = 0,3$ y $R_T = 0,7$ contiene buenos candidatos para el valor del umbral. En esta tesis utilizaremos $R_T = 0,6$.

Este umbral establece una curva de nivel en los mapas de sincronización, lo que define un límite para la región de sincronización (línea punteada Fig. 8.5).

8.2.3 Variaciones de los mapas de sincronización

Con esta herramienta en mano podemos probar si el modelo puede dar cuenta de los datos de sobreexpresión DeltaD, buscamos parámetros que controlan la forma de la región de sincronización para grandes valores de β_D . En efecto, los valores de los parámetros que controlan las tasas de dimerización y las afinidades de los dímeros a Notch varían límites de las regiones de sincronización (Fig. 8.8). Por ejemplo, aumentar el valor de la afinidad del homodímero de DeltaC a Notch κ_F cambia el punto en el eje $\beta_D = 0$ donde aumentar el valor de β_C o β_N lleva a una transición de sincronización (Fig. 8.8B, H). De hecho, valores altos de este parámetro y de la tasa de dimerización correspondiente λ_F^+ (Fig. 8.8E, K) eliminan la región del mapa donde se puede ubicar el *wildtype* de forma que DeltaD sigan siendo necesario para sincronizar. Es decir, no existe una región del mapa donde se pueda ubicar el conjunto de parámetros que describe al mutante de DeltaD.

Por el contrario, el límite para valores grandes de β_D puede ser moldeado por el valor de la afinidad del homodímero de DeltaD a Notch κ_G , o la tasa de dimerización correspondiente λ_G^+ . Esto no afecta significativamente la transición de sincronización en $\beta_D = 0$ (Fig. 8.8C, I). Por lo tanto, la sobreexpresión DeltaD puede ser capturada en el modelo, preservando al mismo tiempo el comportamiento de la condición mutante DeltaD. El trabajo que originalmente mostró

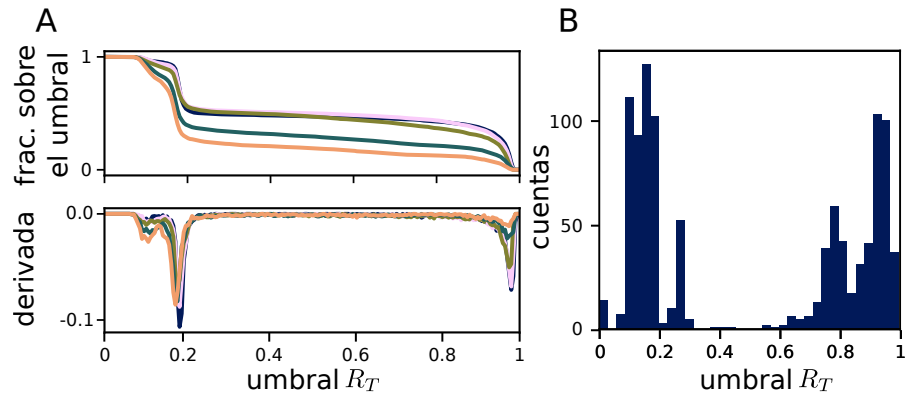


Figura 8.7: Elección del umbral R_T para el parámetro de Kuramoto. (A) Superior: Fracción de mapas de sincronización por encima del valor del umbral R_T para todos los valores posibles del umbral. Cada curva muestra los valores correspondientes a un mapa. Se muestran cinco mapas que difieren entre sí en el valor de un único parámetro, a modo de ejemplo. Inferior: Derivada de la fracción. (B) Histograma de los dos picos más prominentes de la derivada de la fracción de píxeles que se encuentran por encima del umbral para 529 mapas de sincronización distintos.

la dimerización *in vitro* de los ligandos de Notch hipotetiza que el homodímero de DeltaD no se une ni activa a Notch [114]. Esta hipótesis se puede parametrizar fijando $\kappa_G = 0$. Trabajos más recientes, sin embargo muestran que el homodímero, de existir, probablemente tenga actividad uniéndose a Notch [174], por lo que en esta tesis fijamos $\kappa_G > 0$.

Finalmente, notamos que para que el sistema tenga una región de sincronización amplia y robusta, y que pueda describir correctamente los fenotipos mutantes, es necesario que las tasas de dimerización y afinidades a Notch de los homodímeros sean un orden de magnitud menor que las del heterodímero (Fig. 8.8D-E, J-L). Esto es consistente con observaciones experimentales cualitativas [114].

8.3 ESTADO TRANSITORIO Y DESINCRONIZACIÓN

En el embrión, las oscilaciones del reloj de segmentación inician en un estado sincronizado [109, 183]. Se cree que en los mutantes de señalización de Notch, el acoplamiento deficiente conduce a la desincronización paulatina del ritmo colectivo y, finalmente, causa los segmentos defectuosos observados [102, 107-109]. Aunque todos los mutantes de los componentes de acoplamiento se desincronizan eventualmente, algunos empiezan a producir defectos antes que otros [184] (Tabla. 6.1).

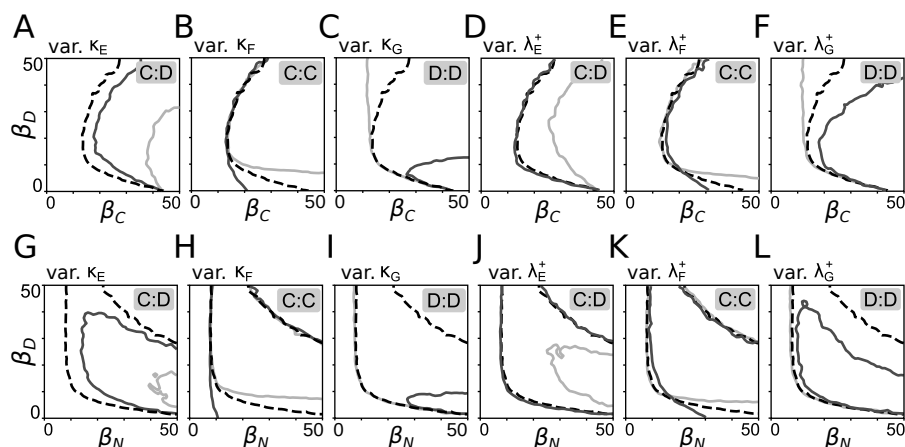


Figura 8.8: La frontera de la región de sincronización depende de los valores de los parámetros de (A-C, G-I) afinidad entre ligandos y Notch κ_X , y de (D-F, J-L) dimerización λ_X^+ . Mapas en función de la tasa de síntesis de (A-F) DeltaC y DeltaD, o (G-L) Notch y DeltaD. La línea de rayas corresponde en todos los casos a la frontera de la región de sincronización de los mapas en la Fig. 8.5A o B, según corresponda. Los valores de los parámetros de las líneas completas clara y oscura son un valor por encima y uno por debajo del valor del *wildtype* en todos los casos, salvo κ_E (Tabla C.3). Parámetros del *wildtype* en la Tabla C.2. Las etiquetas funcionan como ayuda memoria. Por ejemplo, C : C indica que en ese mapa se varía un parámetro que afecta la dinámica del homodímero de DeltaC.

8.3.1 Límite anterior de defectos

En el embrión, estas diferencias en el inicio de los defectos suelen cuantificarse midiendo cuántos segmentos sanos se generan antes de la aparición del primero defectuoso, cantidad que se denomina límite anterior de defectos –*anterior limit of defects (ALD)* [142]. Mientras que el mutante *deltaC* y embriones tratados con DAPT tienen un ALD medio de unos 5,5 segmentos [139, 141], los mutantes de *deltaD* y *notch1a* tienen un ALD medio de 8 segmentos [109, 114, 139] (Tabla. 6.1). Existen múltiples genes *notch* que se expresan en el reloj de segmentación [185], pero sólo se han reportado fenotipos de desincronización en el mutante de *notch1a*. Por esta razón, es posible que este mutante no tenga una pérdida total de señalización. En cambio, en el mutante de *deltaC* la señal que se comunica entre células carece de componentes oscilatorios. Es entonces entendible que el fenotipo de este mutante tenga el mismo ALD que embriones tratados con DAPT, que si la concentración es suficientemente alta, bloquea la liberación del NICD, y por ende elimina completamente la señalización [146].

Para medir numéricamente el ALD, realizamos ensayos donde utilizamos los parámetros correspondientes a condiciones mutantes, ini-

límite anterior de defectos, ALD

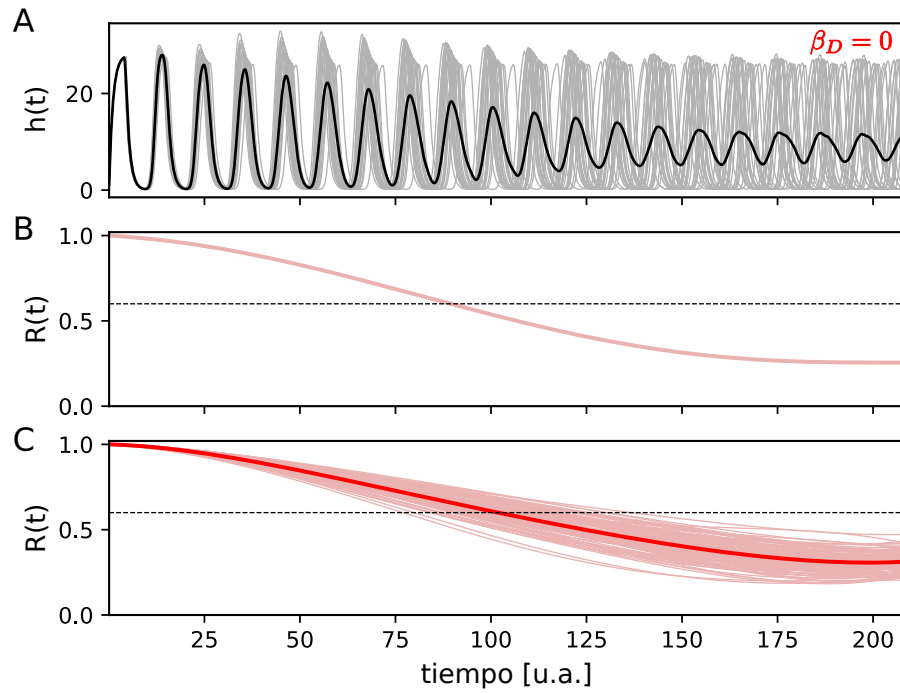


Figura 8.9: En condiciones mutantes, a medida que el sistema se desincroniza, el parámetro de Kuramoto disminuye. (A) Trazas de células individuales (gris) y del campo medio (negro) en la condición de mutante de *deltaD* ($\beta_D = 0$) se desincronizan a medida que avanza el tiempo. Se muestran 20 de las 100 trazas para mejorar la claridad. (B) Parámetro de orden de Kuramoto del sistema en el panel A. (C) Parámetro de orden de Kuramoto de 100 iteraciones de sistemas como el del panel A, variando la elección de retardos τ_i (rojo claro) y promedio de todas las iteraciones (rojo oscuro). (B-C) Línea punteada representa el umbral $R_T = 0,6$.

cializamos el sistema en un estado sincronizado [109] y observamos el período transitorio hasta llegar a la desincronización (Fig. 8.9A). Luego, calculamos el parámetro de orden de Kuramoto en cada instante $R(t)$ desde el comienzo de la integración (Fig. 8.9B). Esta curva presenta una fuerte variabilidad, dependiendo de la muestra aleatoria de retardos τ_i (Fig. 8.9B), por lo que corremos 100 réplicas independientes del sistema. En cada una de ellas calculamos la fase del campo medio utilizando la transformada de Hilbert. De allí extraemos el valor de la fase en el momento en que la curva de $R(t)$ cruza el umbral R_T . De esta forma, calculamos la cantidad de ciclos que realiza el sistema antes de desincronizarse, lo que interpretamos como la formación de segmentos defectuosos. Dado que las células en el embrión completan un par de ciclos antes del comienzo de la somitogénesis [109, 183], el valor del ALD medido es dos menos que la cantidad de ciclos que realizó el sistema al cruzar le umbral.

8.3.2 Curvas de ALD y parametrización del *wildtype*

Con esta herramienta podemos explorar el valor del ALD en función de los parámetros del sistema. De hecho, es esta herramienta la que utilizamos para fijar los parámetros del *wildtype* y los mutantes del sistema más arriba (puntos en la Fig. 8.5).

Para ello, primero calculamos el ALD del sistema tratado con DAPT, que recordamos, es una droga que inhibe la liberación del NICD y por ende la transmisión de la señal. Podemos simular un ensayo en el que una dosis variable de DAPT se administra al embrión si incluimos en la Ec. (7.30) un factor

$$\dot{s}_i = -\delta_S s_i + n_i K \left(1 - \frac{[\text{DAPT}]}{[\text{DAPT}]_{\text{sat}}} \right), \quad (8.2)$$

donde $[\text{DAPT}]$ es la concentración aplicada de DAPT y $[\text{DAPT}]_{\text{sat}}$ es la concentración de saturación, a partir de la cual la pérdida de transmisión de información es completa. Para el cálculo del ALD fijamos $[\text{DAPT}] = [\text{DAPT}]_{\text{sat}}$, lo que equivale a fijar $K = 0$ en la Ec. (7.30). Una vez obtenido este valor, corroboramos el que fenotipo mutante de *deltaC*, parametrizado por $\beta_C = 0$, tenga el mismo ALD. Luego, estudiamos el valor del ALD del mutante de *deltaD*, parametrizado por $\beta_D = 0$, en función de la tasa de síntesis de DeltaC β_C (Fig. 8.10A). Esto equivale a recorrer el eje horizontal del mapa de sincronización en la Fig. 8.5A, como hicimos en la Fig. 8.6. La variabilidad del valor del ALD aumenta a medida que la tasa de síntesis se acerca a valores que sincronizan al sistema, y eventualmente, el sistema queda sincronizado en el estado estacionario, por lo que a partir de cierto valor de β_C no se puede definir un ALD. Fijamos el valor *wildtype* de β_C en aquel que resulta en un mutante de *deltaD* que tiene un ALD 2,5 ciclos mayor que el tratado con DAPT (línea horizontal en la Fig. 8.10A). Finalmente, establecemos el valor de la tasa de síntesis de Notch β_N que describe al mutante haciendo un barrido similar del ALD en función de este parámetro (Fig. 8.10B).

De esta forma, nos aseguramos de que la parametrización elegida en la Tabla C.2 tiene valores de ALD consistentes con las observaciones experimentales (Fig. 8.10C).

8.3.3 Origen de la diferencia de ALD

Comparando las curvas en las Figs. 8.6 y 8.10, observamos que tienen formas parecidas, y que presentan una transición en torno a valores similares de la tasa de síntesis. Esto sugiere una potencial explicación para los distintos valores de ALD que el sistema presenta con distintas parametrizaciones. Observamos que el valor estacionario del índice de sincronización \bar{R} en el mutante de *deltaC* es menor que en el mutante de *deltaD* (ver por ejemplo el valor en el cual la curva corta el

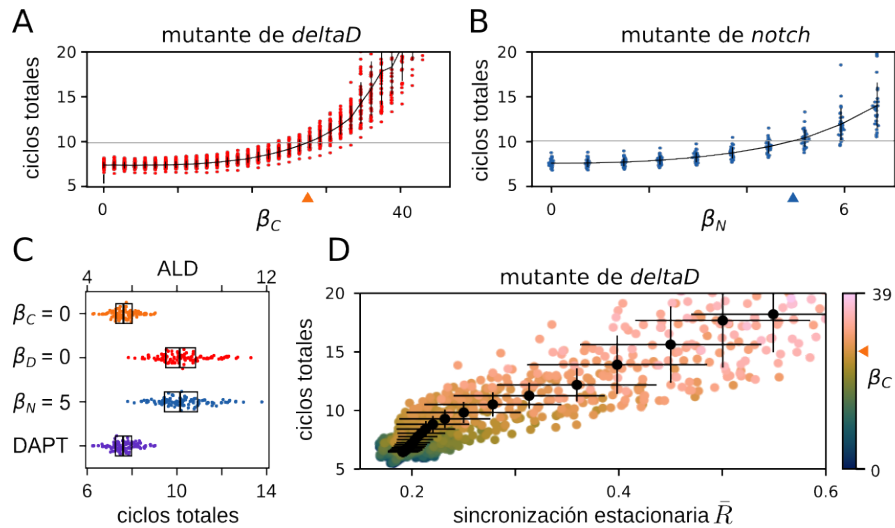


Figura 8.10: El **ALD** de las condiciones mutantes varía con las tasas de síntesis de los ligandos. (A-B) Cantidad de ciclos del campo medio antes de cruzar el umbral de sincronización (esto es, **ALD**+2) para (A) el mutante de *deltaD* en función de la tasa de síntesis de DeltaC β_C y (B) la tasa de síntesis de Notch β_N . Puntos de colores son los resultados de 50 realizaciones individuales, puntos negros y barra son promedio y desviación estándar de las realizaciones, unidos con líneas negras para guiar el ojo. Línea gris indica el valor del umbral de sincronización R_T . Triángulo azul indica la tasa de síntesis del mutante de Notch. (C) Cantidad de ciclos totales antes del cruce del umbral y **ALD** para las condiciones mutantes es consistente con la evidencia experimental. El eje superior está corrido en dos ciclos respecto del inferior. Puntos son 100 realizaciones individuales, caja y barra son rango intercuartil y mediana. (D) Cantidad de ciclos totales se correlaciona positivamente con el valor estacionario del parámetro de Kuramoto \bar{R} para los datos en el panel A. Escala de colores indica el valor de la tasa de síntesis de DeltaC. (A, D) Triángulo de naranja indica la tasa de síntesis de DeltaC del *wildtype*.

sincronización
estacionaria
remanente

umbral vs. el valor inicial en la Fig. 8.10). Por ende, proponemos que la diferencia en **ALD** se debe a una sincronización estacionaria remanente, generada por una señalización oscilatoria que no se ha perdido completamente. De hecho, podemos estudiar el valor del **ALD** y de \bar{R} a medida que variamos por ejemplo la tasa de síntesis de DeltaC en la condición mutante de *deltaD*. Vemos que estas cantidades en efecto se correlacionan positivamente (Fig. 8.10D).

8.4 EL ROL DE LOS DÍMEROS

A continuación, nos preguntamos cómo los distintos dímeros contribuyen a definir la región de sincronización. Para ello, alternamos

finjando a cero sus tasas de asociación, disociación y de unión al receptor Notch.

El heterodímero DeltaC:DeltaD resulta clave para generar una región de sincronización amplia, con un rango extenso de valores de β_C en los que el mutante DeltaD conduce a la pérdida de sincronización (Fig. 8.11A). El homodímero DeltaC:DeltaC favorece la sincronización en la región de baja concentración de DeltaD, permitiendo que valores altos de β_C puedan rescatar el fenotipo del mutante DeltaD (Fig. 8.11B). En contraste, el homodímero DeltaD:DeltaD parece inhibir la sincronización cuando DeltaD se encuentra en concentraciones elevadas (Fig. 8.11C). La exclusión de ambos homodímeros produce un mapa de sincronización simétrico, en el que la pérdida de cualquiera de los dos monómeros tiene efectos equivalentes (Fig. 8.11D).

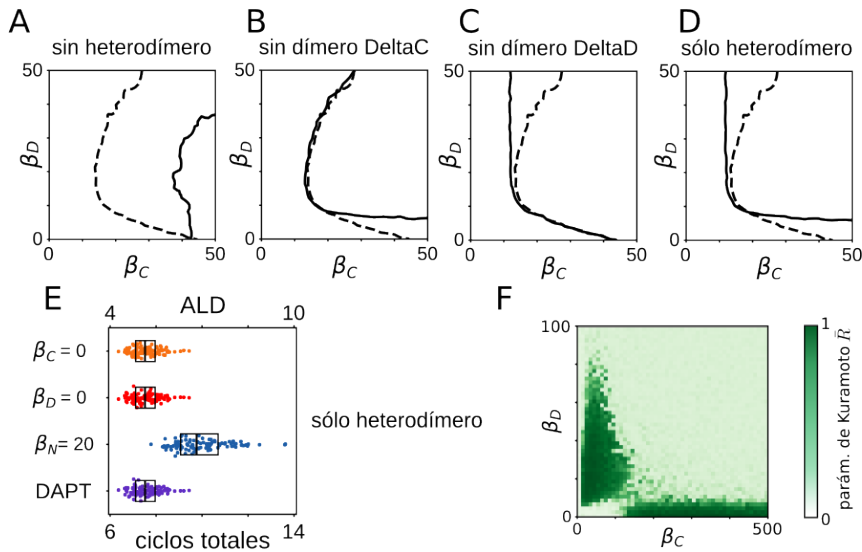


Figura 8.11: Los cada dímero individualmente controla distintos aspectos del mapa de sincronización. (A–D) Variación en los límites de la región de sincronización en la Fig. 8.5A (línea de rayas) para (A) $\lambda_{Epm} = 0$ y $\kappa_E = 0$, (B) $\lambda_{Fpm} = 0$ y $\kappa_F = 0$, (C) $\lambda_{Gpm} = 0$ y $\kappa_G = 0$, (D) $\lambda_{Fpm} = \lambda_{Gpm} = 0$ y $\kappa_F = \kappa_G = 0$, en todos los casos la línea sólida. Línea de rayas, número de realizaciones y otros parámetros como en la Fig. 8.5A. (E) Cantidad de ciclos totales antes del cruce del umbral y ALD para condiciones mutantes según se indica, en el escenario del pabel D. Ejes, parámetros, puntos y cajas como en la Fig. 8.10C. (F) Mapa de sincronización como en la Fig. 8.5A, C, con tasa de dimerización del homodímero de DeltaC $\lambda_{F+} = 0,003$. Mapa es una única iteración del sistema, en vez de el promedio de diez iteraciones. Las escalas vertical y horizontal son distintas, para que se aprecie la separación de las dos regiones.

Este mapa de sincronización, considerando únicamente el heterodímero, es coherente con las propiedades en estado estacionario observadas en los mutantes, es decir, la pérdida de sincronización. Sin embargo, los ensayos numéricos de desincronización muestran que

los mutantes de DeltaC y DeltaD tienen el mismo **ALD**, con lo que no reproducen los fenotipos embrionarios diferentes que se observan experimentalmente (Fig. 8.11E). Esto se debe a que los roles de DeltaC y DeltaD son completamente simétricos en la síntesis del heterodímero, y la pérdida de cualquiera de ellos lleva a la pérdida del heterodímero. Esto genera que no exista una sincronización estacionaria remanente en la región del mapa de sincronización que describe el mutante de DeltaD, que es la que generaría un **ALD** distintos para los distintos mutantes.

Un acercamiento complementario para desglosar los roles de los dímeros es intentar entender la estructura de la región de sincronización. Observamos que al disminuir significativamente la tasa de dimerización del homodímero de DeltaC λ_F^+ , la región de sincronización se separa en dos partes, que sólo son visibles si extendemos los ejes de tasas de síntesis β_C y β_D considerablemente (Fig. 8.11F). Vemos que hay una región superior, consistente con la sincronización debido exclusivamente al heterodímero, como en Fig. 8.11D, y que hay otra región baja a la derecha, consistente con lo que observamos al variar los niveles del homodímero de DeltaC o su afinidad a Notch, consistente con la Fig. 8.8B, H. Entonces, el heterodímero sincroniza al sistema cuando los niveles de DeltaD son más altos, mientras que el homodímero de DeltaC provee la sincronización estacionaria remanente en el mutante de DeltaD.

8.5 RESUMEN

En resumen, la hipótesis de que los dímeros DeltaC y DeltaD se asocian para activar el receptor Notch resulta consistente con las principales observaciones experimentales sobre los fenotipos mutantes. En este escenario, el rol de DeltaD sería funcionar como compañero de unión para DeltaC. Así, a pesar de no estar regulado transcripcionalmente, DeltaD coopera con DeltaC en la generación de una señal oscilatoria mediante su interacción. De esta forma, el heterodímero DeltaC:DeltaD parece ser el actor principal en este mecanismo (Fig. 8.11A). Los homodímeros, por su parte, introducen una asimetría que permite explicar las diferencias observadas en los experimentos de desincronización entre los mutantes DeltaC y DeltaD (Figs. 8.10C y 8.11E).

SINCRONIZACIÓN POR MONÓMEROS

La visión más extendida sobre la señalización de Notch propone que los ligandos se unen a los receptores como monómeros [138, 186]. La activación del receptor Notch por dímeros de Delta representaría un cambio de paradigma respecto a esta concepción [144, 176]. El trabajo que originalmente mostró que la dimerización de ligandos sucede *in vitro* [144] se motivó en intentar desentrañar por qué el mutante de *deltaD* tiene un fenotipo de desincronización, y encontró una respuesta en la dimerización. La evidencia que utilizan, sin embargo, hasta donde sabemos no ha sido replicada por otros equipos de trabajo en el pez cebra, ni ha sido corroborada en ensayos *in vivo*. Nos preguntamos entonces si el paradigma usual, los monómeros de ligandos uniéndose al receptor Notch, también permitiría reproducir las observaciones experimentales. De forma *naïv* se podría pensar que un componente no oscilatorio no debería tener efecto en la sincronización del sistema. ¿Qué rol podría tener DeltaD en este contexto?

9.1 SEÑALIZACIÓN DE NOTCH ACTIVADA POR MONÓMEROS

A continuación, adaptamos la teoría que construimos en los Capítulos 7 y 8 para evaluaremos la hipótesis de que los ligandos de Notch en forma de monómeros se unen a Notch y lo activan.

9.1.1 Descripción teórica

Para evaluar esta hipótesis alternativa, formulamos una teoría en la cual las proteínas DeltaC y DeltaD individuales pueden unirse al receptor Notch como monómeros y activar la señal en la célula receptora (Fig. 9.1A). Para esto, eliminamos de las dinámicas de las concentraciones de los monómeros los términos que impliquen dimerización como en la Ec. (7.35), y agregamos términos de asociación a Notch con la forma $\kappa_X \chi_i \bar{n}$. El modelo completo de monómeros uniendo a Notch, en su forma adimensional, es

$$\dot{h}_i = -h_i + \beta_h \frac{1}{[1 + h_i^{\eta_H} (\tilde{t} - \tilde{\tau}_i)]} \frac{1 + \alpha (\sigma s_i (\tilde{t} - \tilde{\tau}_i))^{\eta_S}}{[1 + (\sigma s_i (\tilde{t} - \tilde{\tau}_i))^{\eta_S}]} \quad (9.1)$$

$$\dot{c}_i = -\delta_C c_i + \beta_C \frac{1}{1 + [\gamma h_i (t - \tau_C)]^\eta} - \kappa_C c_i \bar{n}, \quad (9.2)$$

$$\dot{d}_i = -\delta_D d_i + \beta_D - \kappa_D d_i \bar{n} \quad (9.3)$$

$$\dot{n}_i = -\delta_n n_i + \beta_n - n_i K(t) \quad (9.4)$$

$$\dot{s}_i = -\delta_s s_i + n_i K(t), \quad (9.5)$$

donde κ_C y κ_D son las tasas de afinidad de los monómeros al campo medio de Notch. La actividad total de ligandos se expresa como:

$$K(t) = \kappa_C \bar{c} + \kappa_D \bar{d}, \quad (9.6)$$

donde \bar{c} y \bar{d} son los campos medios de DeltaC y DeltaD, respectivamente (ver Ec. 7.28).

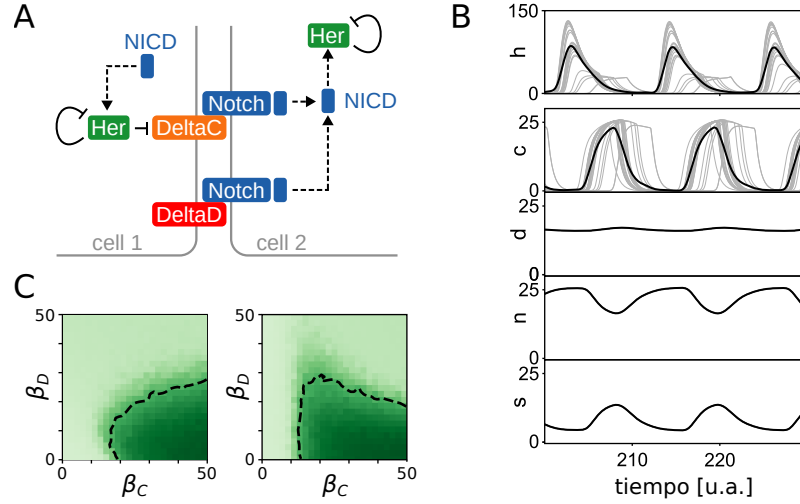


Figura 9.1: La hipótesis de monómeros uniendo a Notch y activándolo produce oscilaciones sincronizadas. (A) La síntesis de DeltaC está regulada por el oscilador, la de DeltaD no. Los monómeros DeltaC y DeltaD se unen a Notch en células vecinas y lo activan, liberando el NICD y transmitiendo una señal al oscilador de la receptora. (B) Oscilaciones individuales en estado estacionario $x_i(t)$ (líneas grises, se muestran 25 de 100) y campo medio $\bar{x}(t)$ (línea negra), para todas las variables $x = h, c, d, n, s$. Las escalas verticales son las mismas excepto para $h(t)$. Parámetros como en la Tabla C.2. (C) Mapas de sincronización del sistema bajo la hipótesis de monómeros uniendo a Notch no tienen una región compatible con el fenotipo de desincronización del mutante de *deltaD*. Parámetros de los valores no variados en la Tabla C.2, salvo por $\eta = 2,5$, que tiene el valor de dímeros. Escala de colores, cantidad de repeticiones y línea de rayas como en la Fig. 8.5.

9.1.2 Parametrización y sincronización

Esta hipótesis alternativa de monómeros uniéndose a Notch es capaz de generar oscilaciones sincronizadas (Fig. 9.1B). Realizamos una exploración en el espacio de parámetros (β_C, β_D) y (β_N, β_D) para evaluar si este escenario podría ser consistente con los datos experimentales. Encontramos que, con una parametrización similar a la que usamos en el caso de dímeros, los mapas de sincronización no muestran regiones prominentes de pérdida de sincronía al eliminar DeltaD (Fig. 9.1C). Esto es en principio consistente con la idea *naïv* de que la señal constante no juega un rol en la sincronización.

Sin embargo, al aumentar la no linealidad efectiva η en la función regulatoria, la región de sincronización cambia de forma: una región del espacio de parámetros con β_C y β_D intermedios es capaz de sincronizar, y disminuir β_D elimina la sincronización. De hecho, si bien nuestra parametrización establece $\eta_C = \eta_H = \eta_S \equiv \eta$, podemos relajar esta condición. Estos exponentes representan distintos procesos—las múltiples interacciones involucradas en la regulación de Her sobre DeltaC y sí mismo, y la regulación de la señal sobre Her—, y los habíamos supuesto todos iguales por simplicidad. Variamos uno a la vez los exponentes de Hill efectivos, manteniendo los valores de los otros dos en su valor de la parametrización de dímeros. El exponente de la de la regulación de DeltaC por Her η_C no parece tener un efecto en frontera de la región de sincronización (Fig. 9.2B). El de autoregulación de Her η_H achica levemente la región de sincronización, sin modificar la forma, de modo que no se genera una zona compatible con el fenotipo mutante *deltaD* (Fig. 9.2C). Sólo el exponente de la regulación positiva por la señal η_S agranda y, crucialmente, cambia la forma de la región de sincronización de forma que DeltaD resulta necesario para sincronizar el sistema en una región significativa del espacio de parámetros (Fig. 9.2D). Si recordamos que estos exponentes de Hill están describiendo de forma efectiva múltiples interacciones involucradas en los pasos que cada uno describe, los resultados de la Fig. 9.2A-D sugieren que el modelo de monómeros para funcionar requiere incluir en la descripción interacciones más complejas que el modelo de dímeros.

Si bien este desglose de exponentes efectivos es interesante, para mantener simple la parametrización, en lo que sigue mantendremos $\eta_H = \eta_C = \eta_S \equiv \eta$, sabiendo que el efecto de variar η o sólo η_S es similar. Con esto en mente, tomamos $\eta = 7$ y construimos los mapas de sincronización estacionaria, que reproducen los fenotipos de los mutantes de *deltaC*, *deltaD* y *notch* [102, 107] (Figs. 9.2E-H). En particular, observamos una región extensa donde la ausencia de DeltaD lleva a la desincronización (Fig. 9.2E, F).

9.1.3 Desincronización y variantes

Al igual que en el modelo de dímeros, en el de monómeros observamos que para valores bajos de β_D donde se pierde la sincronización, un aumento en β_C y β_N puede llevar al sistema a una transición de sincronización y la recuperación del estado sincronizado (Fig. 9.2). Estos mapas también muestran que para valores altos de β_D se pierde la sincronización. No obstante, el límite de las regiones sincronizadas está controlado por las tasas de afinidad a Notch, κ_C y κ_D (Fig. 9.3A-D). Reducir κ_D extiende la región sincronizada hacia valores más altos de β_D , lo que permite mantener la sincronización bajo sobreexpresión de DeltaD [114, 182]. Por otro lado, un incremen-

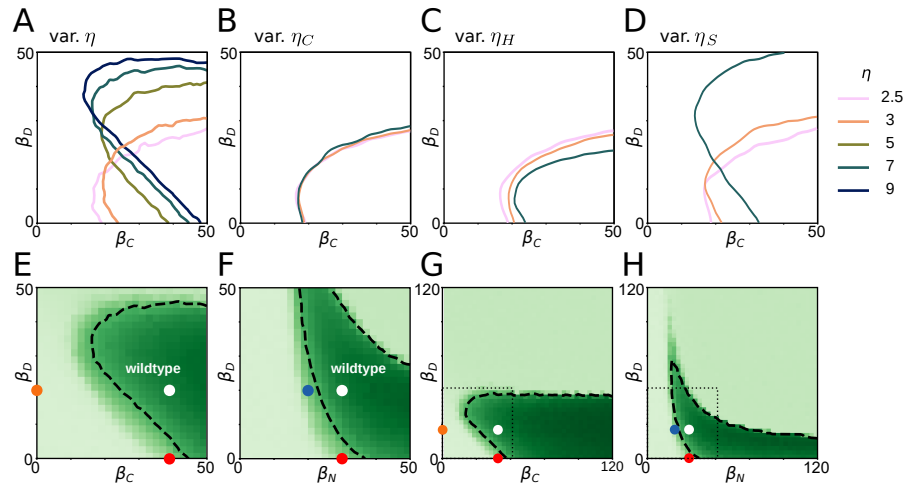


Figura 9.2: Variar la no linealidad efectiva en la regulación positiva agranda la región de los mapas compatible con el mutante de *deltaD*. (A-D) Cambios en la frontera de la región de sincronización en el mapa de Fig. 9.1C (izquierda) al variar los valores de la no linealidad efectiva (A) η , (B) η_S , (C) η_C o (D) η_H . En B-D se mantiene los exponentes que no varían $\eta_X = 2,5$. (E-H) Mapas de el valor estacionario del parámetro de Kuramoto en función de la tasa de síntesis de (E, G) DeltaC y DeltaD, y (F, H) Notch y DeltaD. En G, H las cajas de línea punteada indican el rango en los paneles E, F. Escala de colores, cantidad de iteraciones, puntos y líneas de rayas como en la Fig. 8.5. Parámetros en la Tabla C.2.

to en κ_C desplaza la región sincronizada hacia valores más bajos de las tasas de síntesis, lo que reduce el costo –en términos de recambio molecular– de mantener la sincronía.

Siendo que el modelo es capaz de reproducir los fenotipos estacionarios, nos preguntamos a continuación por los ensayos de desincronización. En efecto, estos también muestran que la hipótesis de monómeros reproduce las diferencias observadas en las tasas de pérdida de sincronía entre los mutantes (Fig. 9.3E).

En resumen, la hipótesis que establece que los monómeros no dimerizan, sino que se unen de forma directa a Notch y lo activan es compatible con la evidencia experimental disponible. Para ello, requiere una parametrización levemente distinta a la de la hipótesis de dímeros, pero los parámetros no dejan de tomar valores biológicamente plausibles. El rol que esta hipótesis le asigna a DeltaD no es evidente en esta instancia –lo discutiremos más adelante. Podría ser que la señal constante debido a DeltaD eleve los niveles totales de señalización, de forma que las oscilaciones en la señal debido a DeltaC sincronizan el sistema. En ausencia de DeltaD, la señalización no sería suficientemente intensa como para sincronizar el sistema.

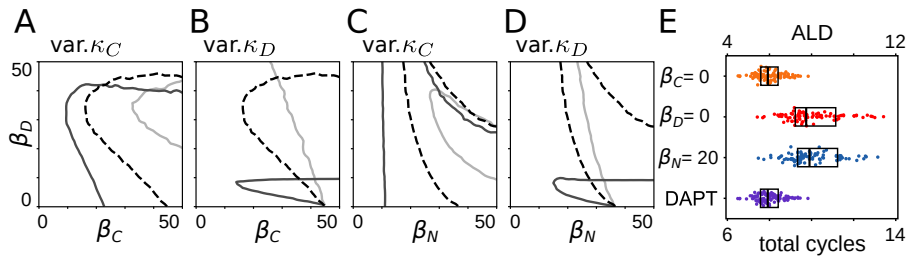


Figura 9.3: La hipótesis de unión de monómeros a Notch es compatible con los fenotipos de desincronización. (A-D) Cambios en la frontera de la región de sincronización de los mapas en la Fig. 9.1B, C al variar (A, C) la afinidad de DeltaC por Notch $\kappa_C = 0,01$ (línea clara) y $0,3$ (línea oscura), o (B, D) la afinidad de DeltaD por Notch $\kappa_D = 0,002$ (línea clara), $0,3$ (línea oscura). La línea de rayas es la misma que en la Fig. 9.1B, C. (E) Cantidad de ciclos totales antes del cruce del umbral y ALD para condiciones mutantes según se indica, bajo la hipótesis de monómeros. Ejes, puntos y cajas como en la Fig. 8.10C.

9.2 INTERACCIONES CIS CON SEÑALIZACIÓN POR DELTAD

En esta sección evaluaremos una hipótesis que extiende la de monómeros, incluyendo otro tipo de interacciones entre los ligandos y con el receptor. En particular, distintos trabajos proponen que en múltiples contextos y especies, los ligandos de Notch pueden interactuar con el receptor en cis [137]. Esto es, además de unirse a receptores en células vecinas, los ligandos también pueden unirse a los receptores en la misma célula. En particular, estudiaremos el caso donde esta interacción en cis no activa Notch, por lo que el efecto neto es la inhibición de la vía por captura mutua del receptor y el ligando.

9.2.1 Evidencia en otros modelos experimentales

Aunque no hay evidencia directa de interacciones cis en el reloj de segmentación del pez cebra, datos de mamíferos nos llevaron a considerar esta posibilidad. En ratón, el ligando divergente Delta-like 3 (DLL3) se une exclusivamente en cis a Notch, secuestrando el receptor y bloqueando así su activación [187, 188]. Aunque DLL3 se expresa de forma constante, se ha propuesto que regula cíclicamente la disponibilidad de Notch, contribuyendo a las oscilaciones del reloj de segmentación [188]. Estas interacciones suceden exclusivamente en el interior de la célula, en vez de la membrana celular. En particular, la evidencia indica que DLL3 nunca es exportada a la membrana. A su vez, se ha sugerido que DeltaC del pez cebra es ortólogo de DLL3 [189-191]. En esta línea, podemos reinterpretar la evidencia de la Ref. [144] donde observamos agregados intracelulares de DeltaC en tinciones con anticuerpos en el PSM como evidencia indirecta de interacciones cis.

En el reloj de segmentación del ratón, DLL1 –un ligando de Notch que sí oscila– se coexpresa con DLL3 [192, 193]. A diferencia de DLL3, DLL1 puede unirse a receptores Notch tanto en trans como en cis, activando o inhibiendo la vía, respectivamente [188]. Un estudio *in vitro* con DLL1 de rata en líneas celulares mamíferas, combinado con modelado teórico, mostró cómo este doble rol permite establecer estados de señalización mutuamente excluyentes, donde las células se diferencian hacia señalizadoras o receptoras de señal [177, 194]. Análogamente, en tejido neural embrionario del pez cebra, se ha demostrado que DeltaD cumple un rol dual, funcionando tanto como transactivador como cisinhibidor de Notch [121].

Basándonos en esta evidencia, proponemos un modelo en el que tanto DeltaC como DeltaD inhiben Notch en cis, y solo DeltaD puede activar Notch en trans (Fig. 9.4). Recalcamos la diferencia entre los modelos de reloj de segmentación en ratón y en pez cebra. En el primero, el ligando que activa Notch en trans es el que está transcripcionalmente regulado y oscila [188]. En el segundo, el ligando que activa en trans es el que no presenta un patrón de expresión temporal coordinado con el oscilador de la célula. En principio, no es obvio ver cómo este modelo es capaz de generar oscilaciones sincronizadas, dado que la única interacción entre el ligando oscilante y el reloj de células vecinas es a través primero de Notch en la misma célula, luego DeltaD también en la misma célula, y recién después con Notch en células vecinas. ¿Será esta interacción indirecta entre DeltaC en una célula y Notch de otras células suficiente para sincronizar?

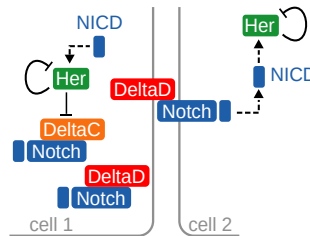
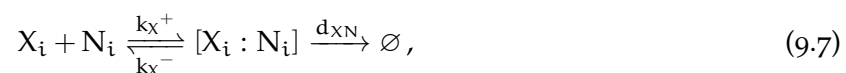


Figura 9.4: DeltaC y DeltaD inhiben Notch en cis, DeltaD también lo activa en trans.

9.2.2 Descripción teórica

Para describir formalmente esta hipótesis, consideramos interacciones cis entre monómeros de ligando y Notch mediante la reacción



para $X = C, D$, donde el complejo cis $[X_i : N_i]$ se forma y se disocia con tasas k_X^+ y k_X^- . Suponemos que la concentración del complejo

decae linealmente con una tasa d_{XN} , eliminando de forma efectiva al ligando y al receptor Notch del sistema. Esta es la suposición que explicita la cis-inhibición por captura mutua del ligando y el receptor. La dinámica del complejo está dada entonces por

$$\frac{d[X_i : N_i]}{dt} = -d_{XN}[X_i : N_i] + k_X^+ X_i N_i - k_X^- [X_i : N_i], \quad (9.8)$$

y se agregan los términos correspondientes en las ecuaciones para el ligando X_i y el receptor N_i de la forma

$$\dot{X}_i = \dots - k_X^+ X_i N_i + k_X^- [X_i : N_i], \quad (9.9)$$

$$\dot{N}_i = \dots - k_X^+ X_i N_i + k_X^- [X_i : N_i]. \quad (9.10)$$

Asumiendo que la dinámica de la Ec. (9.8) es más rápida que el reloj, utilizamos una aproximación cuasiestacionaria $d[X_i : N_i]/dt \approx 0$. Así, podemos reemplazar el valor en estado estacionario

$$[X_i : N_i] = \frac{k_X^+}{k_X^- + d_{XN}} X_i N_i \quad (9.11)$$

en la Ec. (9.9) y reagrupar para obtener

$$\dot{X}_i = \dots - k_{XN}^{\text{cis}} X_i N_i, \quad (9.12)$$

$$\dot{N}_i = \dots - k_{XN}^{\text{cis}} X_i N_i, \quad (9.13)$$

donde definimos $k_{XN}^{\text{cis}} \equiv d_{XN} \frac{k_X^+}{k_X^- + d_{XN}}$. La forma adimensional de este término lo obtenemos con las Ecs. (7.46-7.48)

$$\dot{x}_i = \dots - \kappa_X^{\text{cis}} x_i n_i, \quad (9.14)$$

$$\dot{n}_i = \dots - \kappa_X^{\text{cis}} x_i n_i, \quad (9.15)$$

donde redefinimos $\kappa_X^{\text{cis}} \equiv \frac{k_{XN}^{\text{cis}} H_0}{d_h}$ para $X = C, D$.

9.2.3 Parametrización

Para describir la nueva hipótesis, donde la señalización sucede exclusivamente a través de DeltaD en trans, mientras que ambos ligandos unen a Notch en cis, fijamos $\kappa_C = 0$. Además, fijamos los valores de las afinidades a Notch en cis en un orden de magnitud por encima de lo que valen las afinidades en trans en el modelo de monómeros ($\kappa_C^{\text{cis}} = 0,3$, $\kappa_D^{\text{cis}} = 0,1$), siguiendo mediciones y ajustes numéricos de las Refs. [177, 194].

Con estos cambios, notamos que el sistema no logra oscilaciones sincronizadas (Fig. 9.5A), si utilizamos los parámetros del modelo de monómeros (Tabla C.2). Sin embargo, al inspeccionar las trazas encontramos una pequeña modulación en la amplitud de la señal s , lo cual no era necesariamente esperable, en principio. Esta modulación

es significativamente menor que la que observamos en el modelo de monómeros (Fig. 9.1), por lo que tal vez si reparametrizamos el sistema para escalar la señal, quizás consigamos sincronizarlo. A su vez, es posible que dada la nueva arquitectura de señalización, los retardos intrínsecos de acoplamiento hayan cambiado. Si este fuera el caso, para que el retardo de acoplamiento efectivo τ_C mantenga al sistema en la segunda rama de sincronización (Fig. 8.2B), es posible que debamos ajustar el valor de τ_C .

Por estas razones, realizando un barrido de parámetros en la escala de concentración de la señal σ y el retardo de acople τ_C . Encontramos que, aún sin variar el segundo respecto de los modelos anteriores, existe una estrecha región sincronizada (Fig. 9.5C). Fijando entonces $\sigma = 0,5$, valor que aún se encuentra dentro de los rangos biológicos que estimamos más arriba, obtenemos oscilaciones sincronizadas (Fig. 9.5B).

Es interesante notar que, a diferencia del modelo de dímeros, las oscilaciones pronunciadas que aparecen en la concentración del monómero de DeltaD están en fase con las de DeltaC (comparar Figs 8.1 y 9.5).

9.2.4 Un nuevo rol para DeltaD

En este modelo, el ligando que transmite la señal a las células vecinas no está directamente regulado por el oscilador. Sin embargo, observamos que los mapas de sincronización en estado estacionario presentan una región sincronizada robusta y son compatibles con los fenotipos mutantes estacionarios (Fig. 9.5D, E). Este modelo le asigna a DeltaD un tercer rol en la sincronización, distinto de los del modelo de dímeros o monómeros. El oscilador inhibe cíclicamente a DeltaC, que secuestra a Notch mediante unión en cis, compitiendo directamente con DeltaD. Como consecuencia, los niveles de DeltaD libre también oscilan, produciendo una activación cíclica de receptores Notch en células vecinas. Así, DeltaD transporta la señal oscilatoria de una célula a otra a través de una interacción indirecta con el DeltaC oscilante.

Si bien este modelo reproduce los fenotipos estacionarios de mutantes, no logra capturar las diferencias observadas en los ensayos de desincronización (Fig. 9.6A, B). Esto se debe probablemente a que no existe un nivel de sincronización estacionaria remanente en la región del mapa de sincronización que describe al mutante de *deltaD* ($\beta_D = 0$) que permita generar distintos ALD para ambos mutantes.

En particular, la pérdida de DeltaD genera efectos equivalentes a la pérdida de DeltaC o a la inhibición farmacológica con DAPT, lo cual no concuerda con lo observado en embriones, donde la desincronización tras la pérdida de DeltaD es más lenta que los otros dos casos. Esto se debe a que, en ausencia de DeltaD, no hay ligando disponible

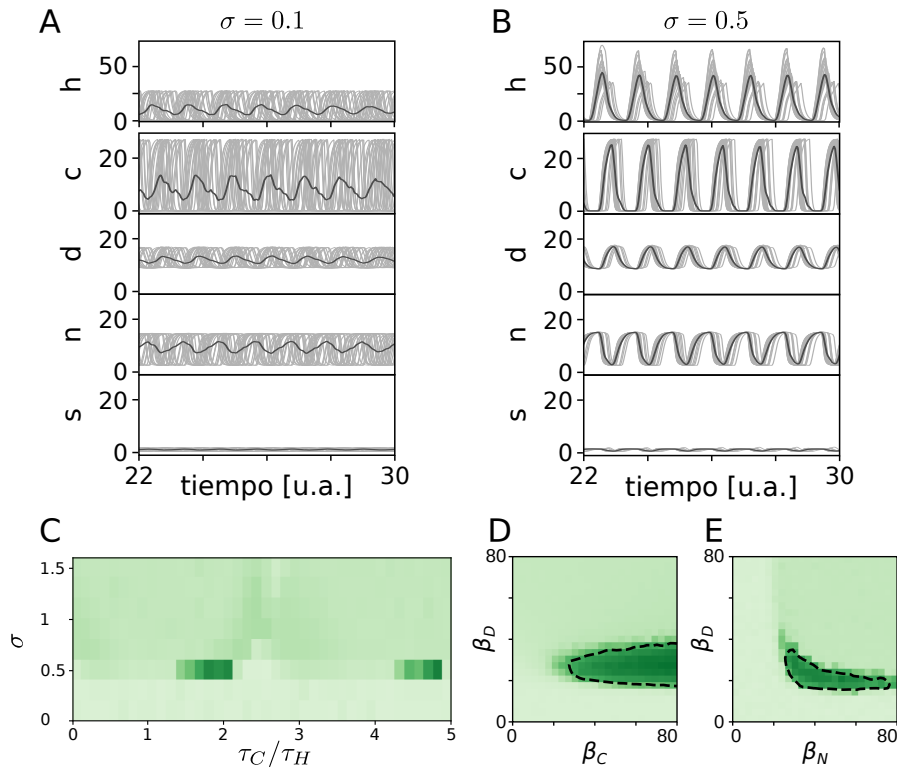


Figura 9.5: El modelo con cis-inhibición es capaz de sincronizar. (A-B) Oscilaciones individuales en estado estacionario $x_i(t)$ (líneas grises, se muestran 25 de 100) y campo medio $\bar{x}(t)$ (línea negra), para todas las variables $x = h, c, d, n, s$ con el sistema (A) no sincronizado y (B) sincronizado. Las escalas verticales son las mismas excepto para $h(t)$. $\kappa_C^{\text{cis}} = 0,3$, $\kappa_D^{\text{cis}} = 0,1$, el resto de los parámetros como en el modelo de monómeros en la Tabla C.2, salvo por $\sigma = 0,5$ en el panel B y $\kappa_C = 0$ en A y B. (C) Mapa de sincronización en función de el retarde de acople τ_C , medido en unidades del retardo medio del reloj τ_H , y de la escala de concentración de la regulación positiva σ para una única realización del sistema. (D, E) Mapa de sincronización en función de las tasas de síntesis de (D) DeltaC y DeltaD, y (E) Notch y DeltaD. Promedio sobre diez iteraciones. (C-E) Parámetros como en el panel B, escala de colores y línea de rayas como en la Fig. 8.5.

para activar Notch en células vecinas (Fig. 9.6C). Es un efecto similar al tratamiento con DAPT, donde el ligando se une al receptor, pero la señal no puede transmitirse (Fig. 9.6D). Finalmente, la pérdida de DeltaC desacopla el oscilador de su influencia sobre la señalización. Aunque DeltaD sigue presente y puede activar Notch, lo hace de forma constante, sin ser modulado por el estado del oscilador (Fig. 9.6E).

Así, aunque este modelo representa una alternativa interesante para el rol de DeltaD en la sincronización, no logra reproducir las dinámicas de desincronización observadas experimentalmente. Por esta razón, no lo consideraremos en lo que sigue.

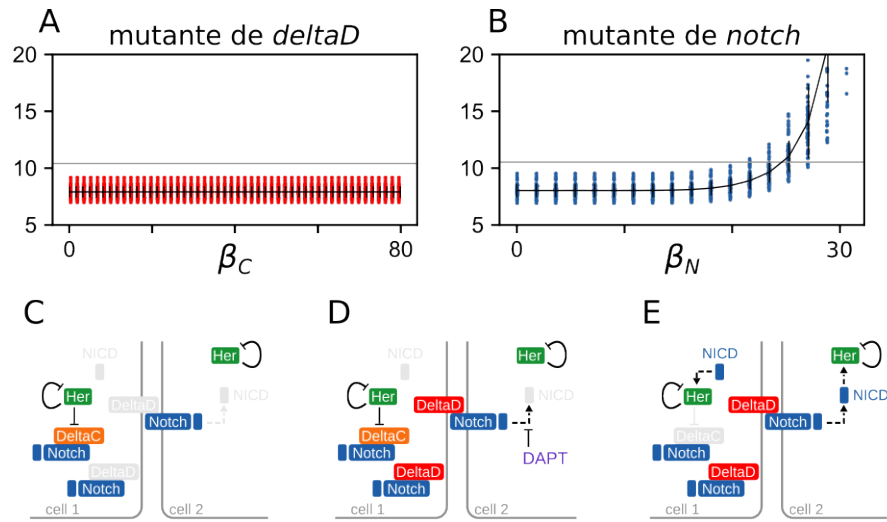


Figura 9.6: La hipótesis de cis-inhibición no es compatible con los ensayos de desincronización. (A-B) Cantidad de ciclos del campo medio antes de cruzar el umbral de sincronización para (A) el mutante de *deltaD* en función de la tasa de síntesis de DeltaC β_C y (B) la tasa de síntesis de Notch β_N . Puntos de colores, puntos negros y líneas como en la Fig. 8.10. (C-E) Esquemas de la red de señalización no es capaz de transmitir información al ser perturbada por (C) mutante de *deltaD*, (D) tratamiento con DAPT, o (E) mutante de *deltaC*.

9.3 UNIÓN COMPETITIVA

En el capítulo 7 hicimos explícitamente una asunción respecto de la interacción de la señal *S* y de dímeros de Her al unirse a los sitios de regulación en el promotor de Her. Asumimos que la afinidad del promotor por Her y por la señal son independientes del estado del promotor, lo cual denominamos unión doble. Otra hipótesis razonable que también esbozamos es que *S* y *H* compitan por los sitios de unión en el promotor. Esto es menos plausible debido a que el promotor tiene múltiples sitios de unión en su región regulatoria, pero no conocemos de evidencia directa a favor o en contra de ninguna de las dos hipótesis. Por esta razón aquí evaluamos brevemente la hipótesis de unión competitiva y sus efectos sobre los resultados hasta aquí obtenidos.

Formalmente, la hipótesis de unión competitiva resulta en reemplazar la regulación de *H* en la ecuación Ec. (7.16) por

$$f(H, S) = b_H \frac{1 + \frac{a_H}{b_H} \left(\frac{S}{S_0}\right)^{\eta_S}}{1 + \left(\frac{H}{H_0}\right)^{\eta_H} + \left(\frac{S}{S_0}\right)^{\eta_S}} \quad (9.16)$$

El efecto de esto es que hay una región del espacio (*H*, *S*) donde la función de regulación es no nula, donde antes era nula (Fig. 9.7A, B). Introduciendo esta función de regulación en el modelo completo

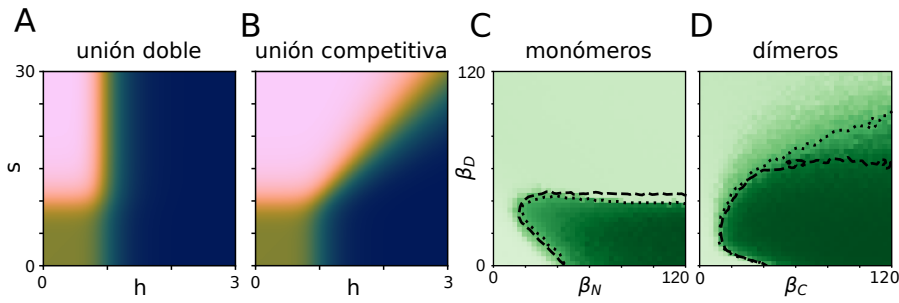


Figura 9.7: Cambiar la hipótesis de función de regulación no afecta significativamente los resultados. (A, B) Valor de la función de regulación en función de las variables h y s en el caso de (A) unión doble, dado por la Ec. (7.16), y (B) unión competitiva, dado por la Ec. (9.16). Parámetros como en el modelo de monómeros, salvo $\alpha = 2$, para acentuar el efecto visual. Escala de colores es arbitraria, claro indica valores altos y oscuro, valores bajos. (C, D) Mapas de sincronización en función de las tasas de síntesis de DeltaC y DeltaD bajo la hipótesis de unión competitiva en los casos del modelo de (C) monómeros y (D) dímeros. Línea punteada indica el borde de la región de sincronización de estos mapas dado por $\bar{R} = R_T$. Línea de rayas corresponde a la hipótesis de unión doble, como en las Figs. 8.5 y 9.2, para facilitar la comparación.

observamos que, si bien algunos detalles de la región de sincronización difieren, cualitativamente los resultados son consistentes con los que obtuvimos hasta ahora bajo la hipótesis de monómeros (comparar línea punteada y línea de rayas en la Fig. 9.7C). Crucialmente, lo mismo es cierto para la hipótesis de dímeros, donde los aspectos más importantes de la región de sincronización se mantienen al reemplazar la Ec. 9.16 en la regulación del reloj (Fig. 9.7D).

Con este breve análisis exploratorio concluimos que las conclusiones hasta aquí son robustas respecto del tipo de función de regulación que elijamos, y no son una característica intrínseca de la relación entre el promotor de Her con H y S.

9.4 DISCUSIÓN SOBRE OTRAS HIPÓTESIS

Hacemos aquí un breve interludio para discutir el raciocinio detrás de las hipótesis que hemos evaluado. Esta tesis no pretende hacer un recuento exhaustivo de todos los posibles roles de DeltaD en la sincronización del reloj de segmentación. En cambio, nos limitamos a evaluar hipótesis basadas en evidencia experimental, a veces más directa, a veces más circunstancial. En el caso de la hipótesis de monómeros, ensayos *in vitro* mostraron que todos los dímeros de ligandos Delta se pueden formar, y que el heterodímero es el que predomina. Luego, experimentos *in vivo* mostraron que los ligandos colocalizan, fortaleciendo esta hipótesis. En el caso de monómeros, utilizamos el

paradigma usual de la vía Delta-Notch, que se basa en el cuerpo de evidencia construido a lo largo de los años investigando esta vía. Similamente, el caso de interacciones cis que evaluamos se basa en evidencia en otros modelos animales, en información de ortología y en información recopilada en otros procesos del desarrollo en pez cebra.

En contraste, no evaluamos la posibilidad de que el heterodímero se forme *in vivo*, pero no se una a Notch, y que sean los monómeros, o en su defecto los homodímeros los que se unen y activan a Notch. En este escenario, el rol del heterodímero sería el de capturar DeltaC y DeltaD, haciendo que se inhiban mutuamente. De esta forma, DeltaD tendría oscilaciones pronunciadas, como las tiene en el modelo de dímeros considerado más arriba, y activaría a Notch en células vecinas en contrafase con DeltaC. Así, la sincronización se llevaría a cabo en medio de una cinchada entre las oscilaciones de DeltaC y de DeltaD. De todas formas, el comportamiento general del sistema sería similar al de monómeros, donde DeltaD provee una señal basal, que en este caso sería oscilatoria, pero nunca se anularía, como la de DeltaC.

Similarmente, no investigamos a fondo la posibilidad de que sólo los homodímeros se formen, y activen y unan a Notch. Esto correspondería a asumir que el heterodímero no se forma *in vivo*. En este escenario los dímeros jugarían papeles similares a los de los monómeros. Esta hipótesis tiene un paso extra en la señalización, comparado con el modelo de monómeros, por lo que tal vez eliminaría el requerimiento de un exponente efectivo alto.

Otra opción es que el heterodímero sí se forme, se una a Notch y lo active, en conjunto con los monómeros, en vez de los dímeros. En este caso, el sistema se comportaría casi igual que el modelo de dímeros, donde ahora serán los monómeros los que aporten la asimetría que permita describir correctamente los fenotipos de desincronización.

También podríamos considerar configuraciones alternativas de la red de interacciones en cis. Por ejemplo, agregar al sistema evaluado más arriba una interacción en trans de DeltaC (es decir, un modelo donde ambos Delta interactúan en cis y en trans con Notch). Esto proveería al sistema de la sincronización estacionaria remanente en la región que describe al mutante de DeltaD, y le permitiría plausiblemente obtener valores de [ALD](#) consistentes con los experimentales. En este punto, sin embargo, el comportamiento del sistema sería equivalente al de monómeros, donde las interacciones en cis sólo se encargan de disminuir los niveles efectivos de señalización, que deberán ser suplidos aumentando la escala de concentración de la señal, como vimos más arriba. En este caso, el rol de DeltaD sería nuevamente el mismo que en el modelo de monómeros.

Similarmente, podríamos considerar toda la combinatoria posible de interacciones en cis y en trans en el caso donde los ligandos dimerizan, donde ahora es posible que coexistan monómeros y dímeros, cada uno con un rol en la señalización, siguiendo tal vez la Ref [176].

Todos estos casos, no fueron evaluados debido a la ausencia de evidencia que los respalde o, más aún, a la evidencia que los contradice.

9.5 RESUMEN

En resumen la hipótesis de que los monómeros de los ligandos de Notch unen a Notch y lo activan es compatible con los fenotipos experimentales estacionarios y de desincronización. Bajo esta hipótesis, el rol del DeltaD parecería ser el de proveer una señal basal constante, sobre la cual las oscilaciones de la señal debido a la actividad con DeltaC sincronizan al sistema. En contraste, otras hipótesis alternativas que evaluamos no son capaces de reproducir toda la evidencia experimental. Por lo tanto, en lo que sigue contrastaremos predicciones que podemos hacer bajo las hipótesis de dímeros o monómeros uniéndose a Notch.

En este capítulo nos centramos en la motivación original de esta segunda parte de la tesis: nos preguntamos cuál es el rol de DeltaD, un componente de la red de señalización de Notch que no presenta oscilaciones por regulación transcripcional, en la sincronización del reloj de segmentación del pez cebra.

10.1 DOS ESCENARIOS

Para atender esta pregunta, estudiamos las contribuciones de cada ligando a la actividad total de ligandos $K(t)$ (Fig. 10.1A). Hemos presentado dos escenarios que podrían explicar los datos: uno en el que se forman dímeros que se unen a receptores Notch, con los heterodímeros dominando la señalización –al que llamamos escenario de dímeros–, y otro en el que los monómeros se unen y activan directamente los receptores Notch –al que llamamos escenario de monómeros. La actividad de acoplamiento total está dada en cada escenario por las Ecs. (7.45) y (9.6).

En el escenario de dímeros, las oscilaciones de gran amplitud de $K(t)$ son impulsadas principalmente por las oscilaciones del heterodímero $\kappa_E e(t)$. Las contribuciones de los homodímeros, $\kappa_F f(t)$ y $\kappa_G g(t)$, presentan oscilaciones de amplitud mucho menor, ya que κ_F y κ_G son un orden de magnitud menores que κ_E (Tabla C.2). Esto confirma el rol de DeltaD como pareja de DeltaC en el heterodímero, que actúa como principal activador de los receptores Notch. En el escenario de monómeros, $\kappa_D d(t)$ se mantiene relativamente constante y es $\kappa_C c(t)$ el que contribuye con el componente oscilatorio de $K(t)$. Esto sugiere que en este caso el rol de DeltaD es proporcionar un nivel basal de señalización que eleva $K(t)$ a valores absolutos más altos. En esta interpretación, los niveles de $\kappa_C c(t)$ por sí solos no son suficientes para sincronizar el sistema, lo que da lugar al fenotipo observado en el mutante DeltaD.

De estas maneras distintas, ambos escenarios satisfacen un requerimiento en común: generar oscilaciones de suficiente amplitud en la actividad total de ligandos $K(t)$, que transporta la señal. Estas oscilaciones impulsan a la señal $s(t)$ en la Ec. (7.49) a cruzar periódicamente el umbral definido por la escala adimensional σ , y así logran sincronizar los osciladores.

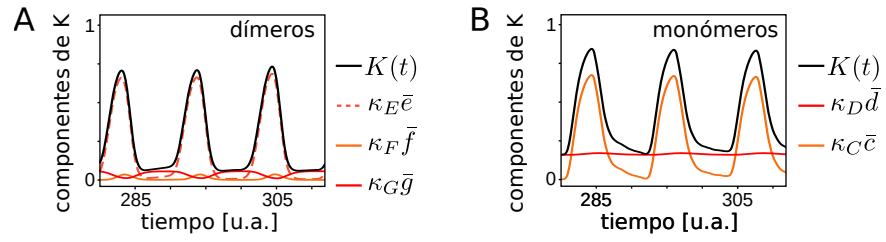


Figura 10.1: Los roles de los componentes de señalización difieren entre el escenario de dímeros y el escenario de monómeros. (A, B) Descomposición de las contribuciones a la actividad total de unión de ligandos $K(t)$ (línea negra sólida). (A) Actividad de acoplamiento de dímeros $\kappa_F \bar{f}$ (línea naranja), $\kappa_G \bar{g}$ (línea roja sólida), $\kappa_E \bar{e}$ (línea roja punteada). (B) Actividad de acoplamiento de monómeros $\kappa_C \bar{c}$ (línea naranja), $\kappa_D d$ (línea roja).

10.2 OSCILACIONES DE DELTAD

Estos roles de DeltaD, distintos en cada escenario, nos motivan a buscar posibles diferencias en su dinámica. En el escenario de dímeros, DeltaD se encuentra tanto como monómero como formando parte de dímeros. Encontramos que la concentración total adimensional de DeltaD, $d_T(t) = d(t) + e(t) + 2g(t)$, muestra oscilaciones pronunciadas, Fig. 10.2B. En contraste, en el escenario de monómeros, $d_T(t) = d(t)$ presenta oscilaciones de baja amplitud. Cuantificamos la amplitud relativa como la diferencia entre el máximo y el mínimo, dividida por el valor promedio de la oscilación. Esto arroja una amplitud relativa del 71% en el escenario de dímeros, y del 7% en el escenario de monómeros.

Es interesante evaluar numéricamente la amplitud de las oscilaciones de DeltaD total, dado que es una cantidad que se puede asociar a mediciones experimentales. Se han desarrollado reporteros de expresión de DeltaD [114], esto es, peces transgénicos que expresan una variante de DeltaD que tiene adosada una molécula fluorescente. Midiendo la variación de intensidad del fluoróforo a lo largo del tiempo se puede inferir la variación de la concentración de DeltaD. En principio, este ensayo cuantificaría la cantidad de DeltaD presente en todas sus formas –maduro o sin madurez, libre o unido a otras proteínas en dímeros y complejos.

10.2.1 Degradación del complejo DeltaD:NECD

La cuantificación numérica de esta cantidad tiene una asunción detrás que puede ser importante revisar. Cuando un ligando se une a un receptor Notch, este se cliva, de modo que se libera NICD en la célula que recibe la señal. El NECD restante, unido al ligando Delta, es internalizado en la célula emisora de señal y eliminado del sistema [194-196]. El modelo, hasta aquí, no contempla la dinámica de es-

te complejo ya que no participa directamente en la señalización [137, 197]. Sin embargo, para contabilizar la cantidad total de DeltaD presente en una célula, puede ser relevante considerar al ligando que forma parte del complejo internalizado.

Modificamos entonces la Ec. (7.22) para incluir la formación del complejo:

$$X_i + N_j \xrightarrow{k_{NX}} W_{X_i} + S_j, \quad X = C, D, E, F, G, \quad (10.1)$$

donde W_{X_i} representa el complejo formado por el ligando X y Notch en la célula i . Suponemos que este complejo es internalizado y degradado con una tasa d_W [121, 137, 194], común para todos los ligandos X , por lo que la dinámica del complejo está dada por

$$\dot{W}_{X_i} = -d_W W_{X_i} + k_{XN} X_i \bar{N}. \quad (10.2)$$

La formulación adimensional de la Ec. (10.2) se obtiene a partir de las Ecs. (7.46-7.48), definiendo

$$\delta_W \equiv \frac{d_W}{d_H},$$

de forma tal que

$$\dot{w}_{X_i} = -\delta_W w_{X_i} + \kappa_X x_i \bar{n}, \quad (10.3)$$

donde existe una ecuación de este tipo para cada $X = C, D, E, F, G$. Estas ecuaciones actúan como lecturas de salida, *readouts*, del modelo principal, ya que no afectan la dinámica de las otras variables. Por lo tanto, la evolución de w_{X_i} puede obtenerse mediante integración exacta de la Ec. (10.3), a partir de la dinámica de Ecs. (7.49-7.56) que obtenemos numéricamente. Usando un factor de integración [198],

$$e^{\int \delta_W dt} = e^{\delta_W t} \quad (10.4)$$

obtenemos la solución

$$w_{X_i}(t) = e^{-\delta_W t} \int_0^t \kappa_X x_i(t') \bar{n}(t') e^{\delta_W t'} dt. \quad (10.5)$$

La cantidad total de DeltaD en una célula queda entonces dada por

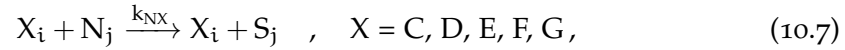
$$d_T(t) = d(t) + e(t) + 2g(t) + w_D(t) + w_E(t) + 2w_G(t), \quad (10.6)$$

donde las concentraciones de dímeros y complejos de los dímeros e y g son cero en el escenario de monómeros.

No incluir ecuaciones para W_{X_i} en el modelo, como teníamos hasta ahora, equivale a asumir un decaimiento instantáneo del complejo, lo cual se parametriza como $\delta_W \rightarrow \infty$. Para considerar una vida media finita del complejo, fijamos su tasa de decaimiento al mismo valor [194] o mayor [121] que la del ligando libre, y evaluamos su efecto sobre la dinámica del DeltaD total. Observamos que, observamos que el valor basal de las amplitudes aumenta levemente, y que la amplitud disminuye (Fig. 10.2B–D y Tabla 10.1). De todas formas, la diferencia entre los dos escenarios sigue siendo marcada.

10.2.2 *Reciclado instantáneo*

Una hipótesis alternativa a la degradación del complejo es suponer que el ligando es reciclado tras activar Notch y ser internalizado. En el límite en que todo el ligando se recicla instantáneamente [197], la reacción de la Ec. (7.22) se transforma en:



lo que equivale a eliminar los términos de pérdida del tipo $-\kappa_X x_i \bar{n}$ en las Ecs. (7.50-7.54). A diferencia de la hipótesis anterior, esto tiene un efecto neto sobre la dinámica, ya que hay más cantidad de ligando disponible en todo momento. Lo más destacable es que las pequeñas oscilaciones en los niveles de DeltaD en el escenario de monómeros desaparecen por completo, ya que eran impulsadas por la interacción con los niveles oscilatorios de Notch a través del término que ahora ha sido eliminado (Fig. 10.2A).

Vemos entonces que, independientemente de la dinámica del complejo de NECD, las conclusiones iniciales –que el escenario de dímeros tiene oscilaciones de DeltaD total, mientras que el de monómeros esencialmente no– se mantienen al menos cualitativamente. Sin embargo, los valores cuantitativos dependerán de esta dinámica, que deberá ser investigada experimentalmente si se desea calibrar más adecuadamente este experimento.

Tasa de decaimiento	Escenario dímeros	Escenario monómeros
∞	71 %	7 %
10	64 %	6 %
1	26 %	0 %
Reciclado	27 %	0 %

Tabla 10.1: Amplitud relativa de las oscilaciones del DeltaD total en los escenarios dímero y monómero, bajo diferentes tasas de decaimiento del complejo formado por un ligando y el dominio extracelular de Notch. El caso con tasa de decaimiento ∞ corresponde al modelo en el que se elimina instantáneamente el ligando del sistema tras unirse a Notch.

10.3 EXPERIMENTOS DE RESCATE

Dados los distintos roles de DeltaD –y presumiblemente, mecanismos de sincronización también distintos– en cada escenario, buscamos perturbaciones cuyos efectos nos permitan diferenciar entre los dos escenarios. Nos preguntamos entonces qué sucedería si, eliminando DeltaD del sistema –el mutante de *deltaD* en el pez, $\beta_D = 0$

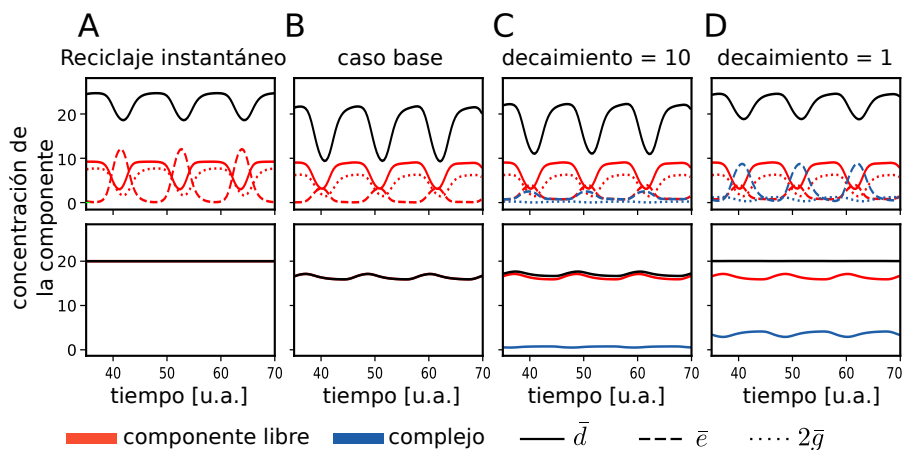


Figura 10.2: Descomposición de las contribuciones a la concentración adimensional total de DeltaD $d_T(t)$ (línea negra sólida) en el escenario de dímeros (arriba) y en el escenario de monómeros (abajo). La cantidad total de DeltaD se obtiene como la suma de DeltaD libre (línea sólida roja), heterodímero (línea punteada roja) y dos veces homodímero de DeltaD (línea punteada de puntos roja), más los complejos ligando:NECD (naranja), según la Ec. (10.6), en diferentes escenarios: (A) asume reciclaje instantáneo del ligando tras unirse a Notch, sin formación de complejo; (B) asume degradación instantánea del complejo, equivalente a una tasa infinita de decaimiento; (C,D) asumen tasas de decaimiento decrecientes como se indica.

en la teoría—, introducimos nuevos jugadores que puedan reemplazar a DeltaD en uno de sus roles pero no en el otro. Será crucial que estos nuevos jugadores puedan ser implementadas experimentalmente. Una posibilidad, en términos del modelo, es suministrar una señal basal exógena, que en ausencia de DeltaD reemplace su efecto sobre la señal total, pero que no cumpla el papel de pareja de unión necesaria para DeltaC en el escenario de dímeros. Experimentalmente, esto podría llevarse a cabo por ejemplo expresando constitutivamente el NICD en todas las células.

Para poner a prueba esta idea, incluimos en el modelo un término adicional de síntesis para $s(t)$:

$$\dot{s}_i = -\delta_S s_i + K n_i + \beta_S, \quad (10.8)$$

donde β_S representa una expresión exógena y no regulada de NICD. Los mapas de sincronización muestran que existe un rango de valores de β_S que permiten rescatar el fenotipo mutante DeltaD en el escenario de monómeros (punto rojo y línea punteada en la Fig. 10.3A). En contraste, este mismo ensayo de sobreexpresión de NICD no logra rescatar el fenotipo en el escenario de dímeros (Fig. 10.3). El parámetro de orden a lo largo de la dirección β_S muestra un rango de valores consistentemente altos por encima del umbral R_T en el caso de monómeros, mientras que en el escenario de dímeros se observan grandes

fluctuaciones que permanecen por debajo del umbral (paneles inferiores en la Fig. 10.3A).

Otra perturbación posible consiste en expresar DeltaC de manera exógena y no regulada, en el murante de *deltaD*, lo que describimos formalmente agregando un término como

$$c'_i = \dots + \beta_C^{\text{ex}} \quad (10.9)$$

a la Ec. 7.50, donde β_C^{ex} es una tasa de síntesis exógena de DeltaC. Numéricamente, este experimento también predice diferentes comportamientos en cada uno de los escenarios (Fig. 10.3B).

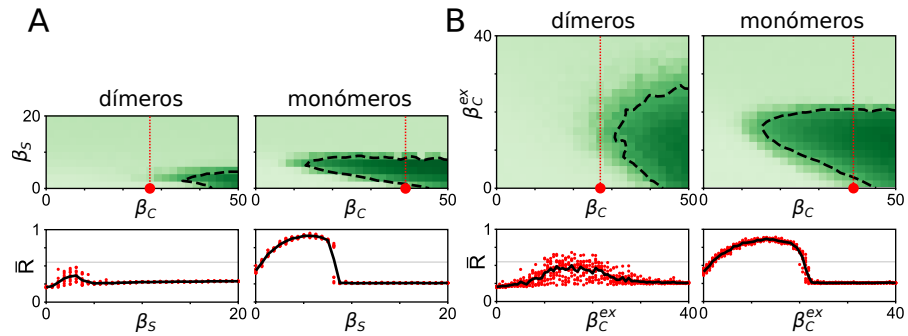


Figura 10.3: Ensayos de rescate en mutante DeltaD predice resultados distintos para los escenarios de monómeros y de dímeros. (A-B) Mapas de sincronización de ensayos de rescate por sobreexpresión de (A) NICD y (B) DeltaC en el escenario de (izquierda) dímeros y (derecha) monómeros. Arriba: parámetro de orden en estado estacionario \bar{R} en función de las tasas de síntesis de DeltaC endógeno y (A) NICD o (B) DeltaC exógeno. El punto rojo indica la condición mutante DeltaD para $\beta_S = 0$ o $\beta_C^{\text{ex}} = 0$ y la línea punteada roja indica el corte mostrado en los paneles inferiores. Línea punteada, escala de color y número de realizaciones como en Fig. 8.5. Abajo: parámetro de orden en estado estacionario \bar{R} como función de (A) β_S y (B) β_C^{ex} a lo largo de la línea punteada en los paneles superiores. Los puntos rojos indican 10 realizaciones independientes y la línea negra representa el promedio. La línea gris horizontal indica el umbral R_T . Parámetros como en el escenario correspondiente en la Tabla C.2, salvo por $\beta_D = 0$.

10.4 RESUMEN

En este capítulo definimos dos escenarios compatibles con la evidencia experimental y que asignan roles distintos a DeltaD. En el escenario de dímeros, DeltaD cumple el rol de compañero necesario de unión a DeltaC. En el escenario de monómeros en cambio, DeltaD provee una señal basal constante que eleva los niveles de señalización total, de forma que las oscilaciones en la señal debido a la actividad de DeltaC son capaces de sincronizar al sistema. Además, propusimos dos

conjuntos de experimentos, cuyos resultados permitirían diferenciar entre estos dos escenarios.

SINCRONIZACIÓN POR UNA SEÑAL BASAL

El escenario de monómeros plantea la hipótesis interesante de la existencia de un “umbral” de sincronización que la señal oscilatoria debe cruzar periódicamente para sincronizar al sistema, y que una señal constante es capaz de elevar los niveles de señalización de forma que este umbral sea en efecto cruzado. En este capítulo estudiaremos en más profundidad esta idea, haciendo uso de modelos simplificados y resultados analíticos.

11.1 SOLUCIÓN EXACTA DE LA DINÁMICA DE RECEPTOR Y SEÑAL

A continuación, buscamos entender cómo surge la región de sincronización y cómo depende de las tasas de síntesis β_C y β_D . De hecho, estos dos parámetros funcionan como proxies para la amplitud y el nivel basal de la actividad total de unión K , respectivamente (Fig. 11.1A, B). La amplitud está positivamente correlacionada con β_C , mientras que el nivel basal permanece relativamente constante al variar este parámetro, mientras el sistema esté bien sincronizado (líneas sólidas). A su vez, el nivel basal está correlacionado positivamente con β_D , mientras que la amplitud se mantiene constante cuando el sistema se mantiene sincronizado al variar este parámetro.

Con esto en mente, notamos que podemos usar las Ecs. (9.4–9.5) junto con la Ec. (7.28) para escribir ecuaciones para los valores de campo medio de la señal y del receptor Notch:

$$\dot{\bar{s}}(t) = -\delta_S \bar{s}(t) + K(t) \bar{n}(t) \quad (11.1)$$

$$\dot{\bar{n}}(t) = -\delta_N \bar{n}(t) + \beta_N - K(t) \bar{n}(t), \quad (11.2)$$

donde escribimos explícitamente la dependencia temporal para resaltar que se trata de un conjunto de ODEs acopladas no autónomas. Podemos entonces proponer una forma explícita, conocida de $K(t)$ e integrar el sistema. Basándonos en los resultados de las Figs. 10.1 y 11.1 proponemos aproximar $K(t)$ por su expansión de Fourier hasta primer orden

$$K(t) = \frac{C}{2} \left[\sin\left(\frac{2\pi}{T}t\right) + 1 \right] + D, \quad (11.3)$$

donde T es el período; la amplitud de pico a valle C es proporcional a β_C , y el nivel basal D es proporcional a β_D . En este caso, podemos

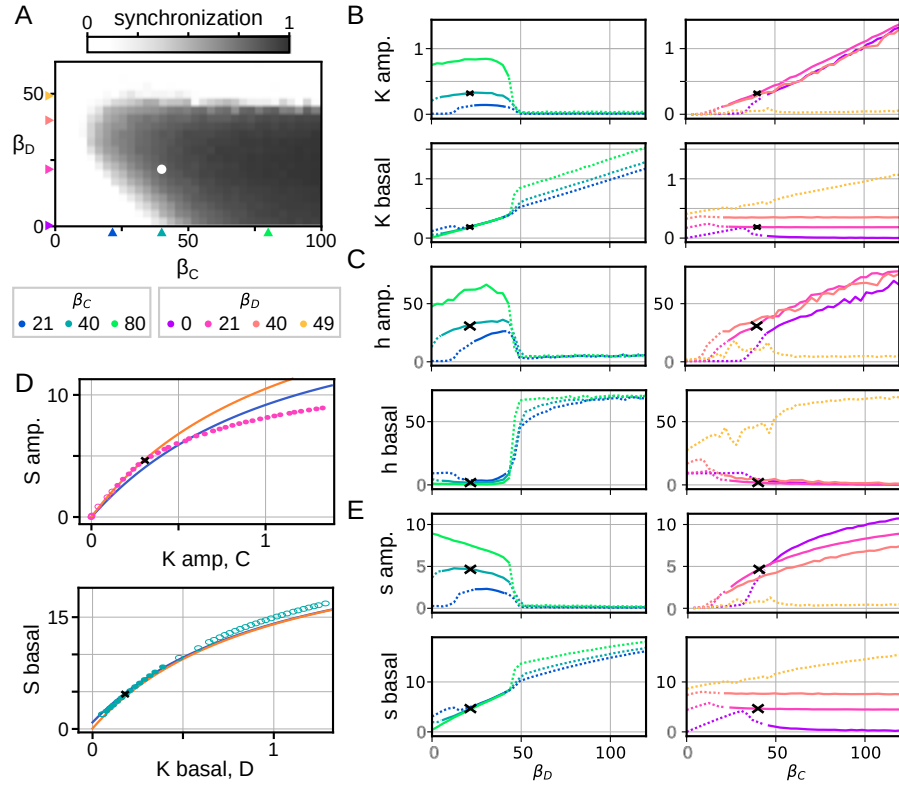


Figura 11.1: La amplitud y el valor basal de la señal y la actividad total de acoplamiento se correlacionan con las tasas de síntesis de los monómeros. (A) Mapa de sincronización del escenario de monómeros como en la Fig. 9.2. Punto blanco indica los parámetros del *wildtype*, triángulos de colores indican valores de las tasas de síntesis utilizados en B-E, según se indica en la leyenda. (B, C, E) (Arriba) amplitud y (abajo) nivel basal de (B) la actividad total de ligandos $K(t)$, (C) concentración de her h y (E) señal s en función de (izquierda) la tasa de síntesis de DeltaC, manteniendo fija la de DeltaD, o (derecha) viceversa, según se indica en la leyenda. Regiones sincronizadas y no sincronizadas ($\bar{R} > R_T$) se indican con líneas continuas y punteadas, respectivamente. La amplitud se define como el promedio del pico a valle por ciclo, el nivel basal como el valor promedio del mínimo de cada ciclo. (D) Correlación entre (arriba) la amplitud y (abajo) el nivel basal de $K(t)$ y $\bar{s}(t)$ al variar las tasas de síntesis de (arriba) DeltaC y (abajo) DeltaD. Los círculos llenos y vacíos corresponden a datos de la simulación del modelo completo por encima y por debajo del umbral de sincronización, respectivamente para (arriba) $\beta_D = 21$ y (abajo) $\beta_C = 40$, los valores *wildtype* de estos parámetros. Las líneas continuas muestran resultados de la integración de la solución cuasi-estacionaria (naranja, Ecs. (11.11) y (11.12)) y la exacta (azul, Ecs. (11.1) y (11.2)) usando un $K(t)$ sinusoidal dado por la Ec. (11.3), donde los parámetros C y D controlan la amplitud y el nivel basal de la oscilación. (B-E) Parámetros según la Tabla C.2, salvo donde se indica lo contrario. La cruz negra corresponde al valor del *wildtype*.

encontrar soluciones exactas para las Ecs. (11.1) y (11.2) (Apéndice B). Usando un factor de integración [198] obtenemos

$$\begin{aligned} \bar{n}(t) = n_T(t) + \beta_N \left[I_0 + 2 \sum_{j=0}^{\infty} I_j \cos(j\omega t) \right] \times \\ \times \left\{ \frac{I_0}{\delta_N + b} + 2 \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(-1)^j I_j}{(\delta_N + B)^2 + (j\omega)^2} \cdots \right. \\ \left. \cdots \left[(\delta_N + b) \cos(j\omega t) + j\omega \sin(j\omega t) \right] \right\} + C_0, \quad (11.4) \end{aligned}$$

donde definimos la frecuencia de oscilación $\omega \equiv \frac{2\pi}{T}$, $I_j \equiv I_j(\frac{C}{2}\omega)$ son funciones de Bessel modificadas, tomamos $b = \frac{C}{2} + D$, C_0 es una constante de integración y $n_T(t) \rightarrow 0$ es el comportamiento transitorio de $\bar{n}(t)$. Podemos entonces insertar esta solución en la Ec. (11.1) para obtener una solución cerrada y exacta que es demasiado extensa para incluir aquí (Apéndice B).

Parametrizamos la Ec. 11.3 a partir de los resultados de la Fig. 10.1, de forma que el período, la amplitud y el valor basal coincidan con los del modelo completo. Con estos valores, observamos que la solución exacta del modelo forzado por una señal sinusoidal resulta en oscilaciones de frecuencia, amplitud, y valor basal compatibles con los del modelo completo (Fig. 11.2A, B, línea naranja). Además, estas oscilaciones escalan consistentemente con las que se observa en el modelo completo: la amplitud de \bar{s} escala con la amplitud de la señal sinusoidal C , y su nivel basal también es consistente con el de la señal D (Fig. 11.1D, línea naranja).

Si bien estos resultados aportan validez a la aproximación sinusoidal de $K(t)$, no esclarecen el efecto de su amplitud y su valor basal en la sincronización, dado que la expresión para $s(t)$ resulta sumamente opaca de analizar. Por esta razón, dejaremos de lado la solución exacta y haremos una aproximación para intentar esclarecer la relación entre las cantidades que estamos estudiando.

11.2 SOLUCIÓN CUAESIESTACIONARIA

Si asumimos que la escala de tiempo de las oscilaciones generadas por el reloj es mucho más lenta que la escala de tiempo de la unión y degradación de los ligandos, podemos hacer una aproximación de estado cuasi-estacionario para la dinámica de c_i , d_i , n_i y s_i . De este modo, podemos obtener una forma cerrada para la dependencia temporal de h_i consigo mismo. Primero, obtendremos expresiones para los ligandos, a partir de las cuales podemos calcular el valor de $K(t)$ como función de $h_i(t)$. Luego, obtendremos expresiones para el receptor y la señal, que finalmente insertaremos en la Ec. (9.1).

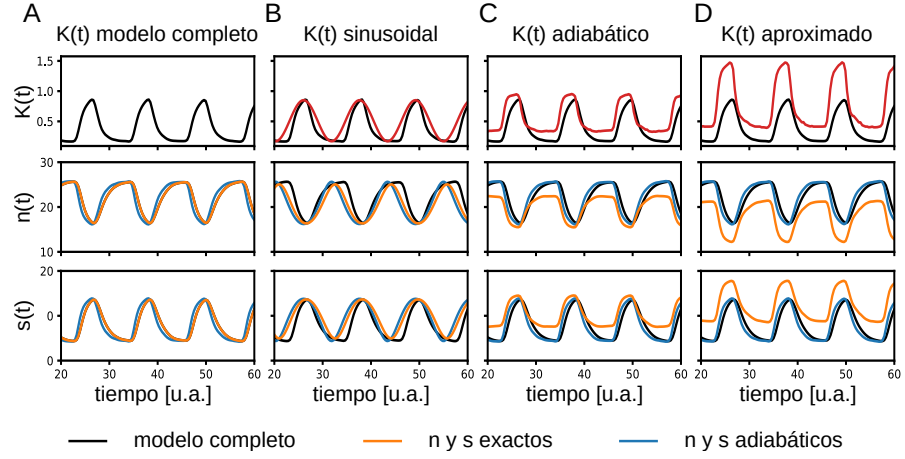


Figura 11.2: Una actividad total de ligandos sinusoidal aproxima los resultados del modelo completo. (A-D) Trazas de (arriba) actividad total de ligandos, (medio) concentración de Notch y (abajo) señal en función del tiempo cuando utilizamos $K(t)$ dado por (A) el modelo completo, (B) una aproximación sinusoidal Ec. (11.3), (C) una aproximación adiabática Ec. (11.10) o (D) una aproximación de la misma Eq. (11.13) para integrar el sistema exacto Ecs. (11.1) y (11.2) (línea naranja) o una aproximación adiabática del sistema Ecs. (11.11) y (11.12) (línea azul). En todos los casos aparece el valor de las cantidades en línea negra. En los paneles superiores, línea roja es el valor de $K(t)$ para esa columna. En A la línea naranja coincide exactamente con la línea negra. En B usamos $C = 0,68$, $B = 0,17$ y $T = 11,58$, a partir de mediciones del $K(t)$ en el modelo completo. Otros parámetros, como en la Tabla C.2.

Suponiendo que la dinámica de las concentraciones de monómeros en el lado izquierdo de las Ecs. (9.2) y (9.3) es muy rápida, obtenemos

$$c_i = \frac{\beta_C f_-(\gamma h_i(t - \tau_C))}{\delta_C + \kappa_C \bar{n}} \quad (11.5)$$

$$d_i = \frac{\beta_D}{\delta_D + \kappa_D \bar{n}}. \quad (11.6)$$

Las expresiones de campo medio de estas cantidades se calculan mediante la Ec. (7.28)

$$\bar{c} = \frac{\beta_C \bar{f}_C}{\delta_C + \kappa_C \bar{n}} \quad (11.7)$$

$$\bar{d} = \frac{\beta_D}{\delta_D + \kappa_D \bar{n}}, \quad (11.8)$$

donde definimos la regulación promedio de DeltaC por el reloj como

$$\bar{f}_C = \frac{1}{N} \sum_i^N f_-(\gamma h_i(t - \tau_C)). \quad (11.9)$$

Esta es una cantidad que oscila entre 0 y 1, y solo alcanza esos extremos cuando el sistema está bien sincronizado. Insertando las Ecs. (11.7) y (11.8) en la Ec. (9.6), obtenemos una expresión para K que depende únicamente de \bar{n} y h_i :

$$K = \frac{\kappa_C \beta_C \bar{f}_C}{\delta_C + \kappa_C \bar{n}} + \frac{\kappa_D \beta_D}{\delta_D + \kappa_D \bar{n}}. \quad (11.10)$$

A continuación, calculamos los niveles en estado cuasi-estacionario del receptor y la señal:

$$n_i = \frac{\beta_N}{\delta_N + K} \quad (11.11)$$

$$s_i = \frac{K n_i}{\delta_S} = \frac{\beta_N}{\delta_S} \frac{K}{\delta_N + K}. \quad (11.12)$$

Aplicando la Ec. (7.28) observamos que, bajo esta aproximación, los niveles individuales del receptor y la señal están siempre alineados con sus campos medios: $n_i = \bar{n}$ y $s_i = \bar{s}$. De hecho, esto es verdad también para el modelo completo (Fig. 9.1). Lo mismo sucede además con $d_i = \bar{d}$. Podemos entonces resolver la Ec. (11.11) usando la Ec. (11.10) para obtener una expresión de \bar{n} en términos de h_i . Esto resulta en una expresión cúbica que depende de todos los parámetros de las Ecs. (9.2–9.5). Nuevamente, la solución analítica resulta opaca para el análisis de los efectos de las tasas de síntesis en la sincronización. De todas formas, podemos validar la aproximación comparando el efecto de utilizar la expresión para $K(t)$ dada por la Ec. 11.10 en la dinámica de n y s en el sistema exacto (Ecs.(11.1) y (11.2)) y en el cuasiestacionario (Ecs. (11.11) y (11.12)). Encontramos que la aproximación de K sobreestima el valor basal de la oscilación (Fig. 11.2C arriba). Esto se debe probablemente a que las oscilaciones de la regulación promedio de ΔC por el reloj \bar{f} no alcanzan el cero, debido a que la sincronización del sistema no es completa (Figs. 9.1 y 9.2). Esto resulta en oscilaciones de la señal cuyo valor basal es mayor al del modelo completo, cuando se integra de forma exacta las ecuaciones (Fig. 11.2C abajo, línea naranja). En la aproximación cuasiestacionaria, sin embargo, la oscilación de la señal está razonablemente de acuerdo con la del modelo completo (Fig. 11.2C abajo, línea azul). Esta solución cuasiestacionaria utilizando $K(t)$ cuasiestacionario de hecho se comporta de forma sumamente similar al resultado de utilizar el $K(t)$ del modelo completo en la expresión cuasiestacionaria de Notch y la señal (Fig. 11.2A, línea naranja).

Para simplificar la expresión dada por la solución del sistema Ecs. (11.10)–(11.12), notamos que $\kappa_C \bar{n} \ll \delta_C$ y $\kappa_D \bar{n} \ll \delta_D$ (Tabla C.2 y Fig. 9.1), por lo que podemos aproximar la Ec. (11.10) como

$$K(t) \approx \frac{\kappa_C \beta_C \bar{f}_C(t)}{\delta_C} + \frac{\kappa_D \beta_D}{\delta_D}, \quad (11.13)$$

donde incluimos la dependencia temporal para enfatizar que, bajo esta aproximación, la tasa de síntesis de DeltaC β_C controla la amplitud de las oscilaciones de $K(t)$, y la tasa de síntesis de DeltaD β_D controla su nivel basal (Fig. 11.1A). Nuevamente, la aproximación sobreestima el valor basal y ahora también la amplitud de $K(t)$, lo cual se refleja en la dinámica de Notch y de la señal al ser integrados de forma exacta (Fig. 11.2D).

Esta línea de pensamiento, si bien parece una aproximación un tanto burda, nos ofrece cierta información: muestra explícitamente que, en el escenario de monómeros, la tasa de síntesis de DeltaD se encarga de controlar el valor basal de la actividad total de acoplamiento, mientras que la tasa de síntesis de DeltaC escala la amplitud de la oscilación. Sin embargo, este mismo acercamiento revela un problema en esta línea de pensamiento en general: la amplitud de esta oscilación está íntimamente ligada con el estado de sincronización del sistema (Fig. 11.1C, E). Este acoplamiento, si bien no presenta un obstáculo insalvable, dificultará la interpretación de los resultados. Por esta razón, en lo que sigue tomaremos un acercamiento levemente distinto al problema que nos permitirá analizar por separado el efecto del nivel basal y de la amplitud sobre la sincronización.

11.3 SISTEMA FORZADO 1D

Esta vez realizaremos una aproximación que no se deriva de un tratamiento analítico del modelo, sino de la exploración de la dinámica que hemos hecho hasta ahora. Hemos notado que la amplitud y el valor basal de la señal s se correlaciona fuertemente con los de la actividad total de ligandos K (Fig. 11.1D). Además, encontramos que al introducir un $K(t)$ sinusoidal en las ecuaciones dinámicas para $s(t)$ obtenemos un comportamiento que es aproximadamente sinusoidal, cuya amplitud y valor basal es consistente con el del modelo completo (Fig. 11.2B). Esto sugiere que puede ser razonable aproximar la señal misma por su expansión de Fourier hasta primer orden

$$s(t) = \frac{A}{2} \left[\sin\left(\frac{2\pi}{T}t\right) + 1 \right] + B, \quad (11.14)$$

donde A es la amplitud de pico a valle de la oscilación, B el valor basal y T el período. Por los resultados de la Fig. 11.1E asociaremos la tasa de síntesis de DeltaD β_D con B , y la de DeltaC β_C con A .

Con esta expresión para la señal, no es necesario estudiar una población de osciladores, dado que alcanza con estudiar uno y entender cómo se sincroniza –o no– con la señal a medida que se varían los parámetros de esta. Utilizaremos entonces la expresión en la Ec. (11.14) para forzar el oscilador central de nuestro sistema, Ec. (7.49). Dado el nuevo rol de $s(t)$, lo llamaremos de acá en más forzante, en vez de señal. Nos interesará medir si el oscilador tiene un período igual al

del forzante, en cuyo caso diremos que el sistema está sincronizado, o distinto, en cuyo caso el sistema no está sincronizado. No nos preocuparemos en principio por la relación relativa de fases, dado que en el sistema completo no hemos medido la relación de fases entre s y h . Para esto definimos un índice de sincronización dado por la diferencia de períodos de las dos variables

$$\zeta = T_h - T \quad (11.15)$$

donde T_h es el período del oscilador. Así, $\zeta = 0$ representa un sistema sincronizado, cuando $\zeta > 0$ el oscilador avanza más lento que el forzante y si $\zeta < 0$, el oscilador avanza más rápido.

Para evaluar sincronización del sistema debemos fijar un valor del período del forzante T que sea distinto del período autónomo del oscilador. Así, en ausencia de sincronización el valor de ζ será no nulo, y sólo cuando los valores de A y B permitan la sincronización obtendremos $\zeta \approx 0$. En particular, utilizamos un oscilador cuyo período autónomo en presencia de señalización es $T_h = 8,4$, por lo que usamos $T = 7,3$. Construimos así un mapa de ζ en el espacio de parámetros (A, B) , y observamos que aparece una región de sincronización cualitativamente muy similar a la del escenario de monómeros (comparar Fig. 11.3A con Fig. 9.2). Esto valida a este modelo simplificado 1D como herramienta para estudiar cómo la señal basal constante de DeltaD es capaz de sincronizar al sistema.

11.4 LÍMITE EXTREMADAMENTE NO LINEAL

A continuación exploramos un límite del sistema forzado. En el modelo completo, la regulación positiva f_+ del oscilador h_i por la señal s_i , Ec. (7.17), tiene forma sigmoideal (Fig. 11.3B-D). A bajos niveles de señalización, su valor es 1, y aumenta hasta α para niveles altos de señalización. Su región de rango dinámico más alto está en torno al umbral σ^{-1} , donde pequeños cambios en la señal producen grandes respuestas. Así, para niveles intermedios de señal, una señal oscilante se traduce en una modulación grande de la función regulatoria, impulsando una activación cíclica de la síntesis de Her (Fig. 11.3C líneas naranjas). En cambio, para niveles bajos o altos de señalización, una señal oscilante s produce una variación mucho más acotada en la función regulatoria, fallando en transmitir una modulación oscilatoria (Fig. 11.3B, D, líneas naranjas). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que en el escenario de monómeros los niveles de señalización debidos únicamente a DeltaC no alcanzan la región de alto rango dinámico alrededor de σ^{-1} . La señal constante debida a DeltaD aumenta los niveles de señal y permite la sincronización.

Un caso límite de este comportamiento ocurre cuando la no linealidad en la función regulatoria tiende a infinito, $\eta_S \rightarrow \infty$, en cuyo caso $f_+(x)$ se convierte en una función escalón de Heaviside (Fig. 11.3E).

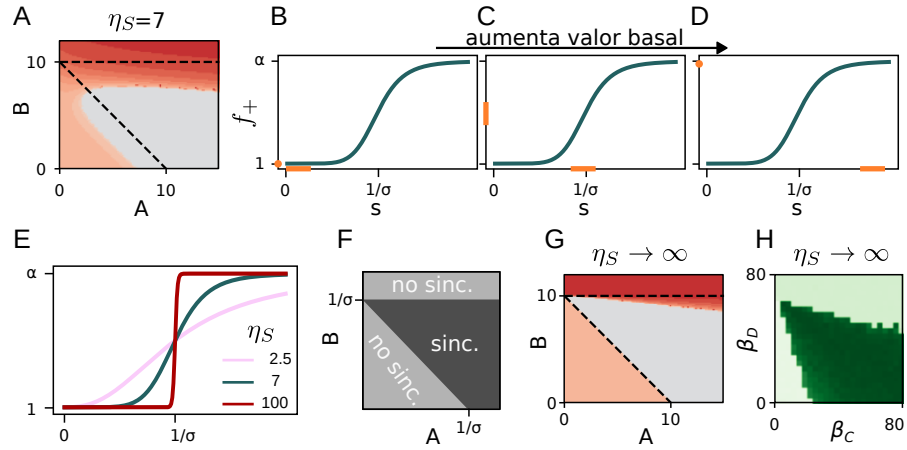


Figura 11.3: Al aumentar la no linealidad, la región de sincronización tiende hacia una forma de cuña, con un vértice marcado. (A) Diferencia de período entre oscilador y forzante ζ en función de la amplitud y el nivel basal del forzante. (B-D) Valor de la función de regulación (línea oscura) y representación esquemática de los valores recorridos por la señal para un valor (B) bajo, (C) intermedio y (D) alto del nivel basal de la señal (línea naranja). En el eje horizontal se representa los valores que puede tomar s , en el eje vertical, los valores de $f_+(s)$ correspondientes. En B y D un punto representa un rango de valores de $f_+(s)$ demasiado pequeño para ser visualizado con una barra como en C. (E) Valor de la función de regulación a medida que varía la no linealidad efectiva. (F) Representación esquemática de la condición necesaria para obtener sincronización en el límite extremadamente no lineal, etiquetando las regiones del espacio de parámetros donde el sistema puede (oscuro) o no (claro) sincronizar. (G) Diferencia de período entre oscilador y forzante en función de la amplitud y el nivel basal del forzante en el límite extremadamente no lineal. (H) Mapa del parámetro de orden de Kuramoto en función de las tasas de síntesis de DeltaC y DeltaD en el escenario de monómeros en el límite extremadamente no lineal. Parámetros y escala de colores como en la Fig. 9.2, salvo por η_S . (A, G) Parámetros del oscilador como en la Tabla C.2, $T = 7,3$. Líneas punteadas corresponden a los bordes de la región diagramada en F. Escala de colores como en la Fig. 11.4.

En este caso límite el valor de la función de regulación f_+ no varía con la señal mientras el valor máximo de esta sea menor que el umbral

$$A + B < \sigma^{-1}, \tag{11.16}$$

y tenemos $f_+ = 1$ constantemente. A su vez si el valor mínimo de la señal es demasiado grande

$$B > \sigma^{-1}, \tag{11.17}$$

tenemos $f_+ = \alpha$ constantemente, y tampoco hay transmisión de señal oscilatoria. Sólo cuando la señal cruza el umbral σ^{-1} el oscilador

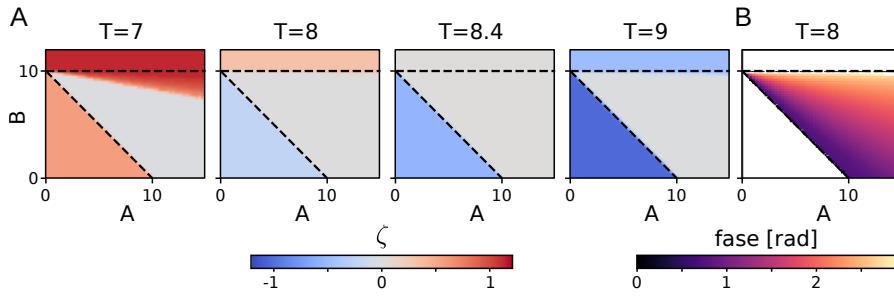


Figura 11.4: La región en la que la sincronización en principio es posible pero no se obtiene varía con el período del forzante. (A) Mapa de la diferencia de período entre oscilador y forzante en función de la amplitud y el valor basal del forzante para distintos valores del período del forzante. En todos los casos el período del oscilador es $T_h = 7,7$ en la región por debajo de la región delimitada por la Ec. 11.16 y $T_h = 8,4$ por arriba de la región delimitada por Ec. 11.17. (B) Diferencia de fase entre el oscilador y el forzante. Se muestra la cantidad sólo en la región donde $\zeta = 0$, donde el oscilador y forzante mantienen una diferencia de fase fija. Por fuera de esa región, la diferencia de fase no está definida.

recibe información temporal de la señal y es capaz de sincronizarse con este. Así, las Ecs. (11.16) y (11.17) definen las condiciones necesarias –pero no suficientes– para obtener sincronización en el límite de extrema no linealidad (Fig. 11.3F), y reinterpretemos el valor de la escala de concentración de la señal σ como la inversa de un umbral de señalización σ^{-1} .

Construyendo un mapa de sincronización del oscilador forzado en función de los parámetros del oscilador en este caso extremadamente no lineal encontramos en general un muy buen acuerdo entre la región que cumple la condición necesaria para la sincronización y la región con $\zeta = 0$ del mapa (Fig. 11.3G). Existe sólo una pequeña región cerca del límite superior de la región de sincronización donde la condición necesaria parece no ser suficiente. En esta región la pérdida de sincronización parece no deberse a la saturación de la función de regulación, sino a otro efecto. No exploraremos en profundidad la causa de la pérdida de sincronización en esta región en esta tesis, pero podemos ver que al variar el período del forzante, la región se achica a medida que T se acerca al período autónomo del oscilador en la región superior (Fig. 11.4A). A su vez, observamos que la diferencia de fase entre el oscilador y el forzante es nula en la parte de la región de sincronización cercana a la condición dada por la Ec. (11.16) y tiende a π , es decir sincronización en antifase, al acercarse al límite superior de la región de sincronización (Fig. 11.4B). Los resultados de la Fig. 11.4 no explican la flata de sincronización en la región superior, pero ilustra algunos aspectos interesantes del comportamiento.

Finalmente, construimos un mapa de sincronización en el escenario de monómeros, donde tomamos el límite extremadamente no lineal, y encontramos que la región de sincronización adquiere una forma consistente con los resultados para el modelo de oscilador forzado (Fig. 11.3H, Apéndice A).

11.5 RESUMEN

En este capítulo evaluamos la hipótesis de que una señal basal es capaz de decidir el estado de sincronización del sistema. Primero integramos de forma exacta las ecuaciones para la señal, lo cual nos permitió evaluar la validez de aproximaciones subsiguientes. Luego, utilizando una aproximación cuasiestacionaria, encontramos de forma explícita que la tasa de síntesis de DeltaC controla la amplitud de la oscilación, mientras que la de DeltaD controla el nivel basal de señal. Con estas observaciones, redujimos el sistema de múltiples osciladores acoplados a un único oscilador forzado, donde encontramos que, en el límite extremadamente no lineal, la señal basal es capaz de decidir el estado de sincronización según si el forzante cruza o no un umbral de señalización.

En resumen, la sincronización por efecto de una señal basal parece estar mediada por un umbral de sincronización, como hipotetizamos en el Capítulo 10. De hecho, en el escenario de monómeros el valor de la escala de concentración es $\sigma = 0,1$. Las oscilaciones de la señal en ese modelo son tales que cruzan periódicamente $\sigma^{-1} = 10$ en presencia de la señal basal debido a DeltaD (Figs. 9.1 y 11.1)E. Al eliminarla, el máximo valor que s alcanza periódicamente se aleja del umbral. De la misma forma, en el modelo de cis-inhibición encontramos que la amplitud y el valor basal de s es consistentemente menor que en el escenario de monómeros (Fig. 9.5). Consecuentemente debimos aumentar el valor de σ –disminuir el umbral– para lograr sincronización.

En la segunda parte de esta tesis nos hemos enfocado en el reloj de segmentación de vertebrados, en particular en el del pez cebra. Durante el desarrollo embrionario, la formación de segmentos que darán origen a vértebras, costillas y otros elementos repetitivos del cuerpo ocurre de manera secuencial, en un proceso conocido como somitogénesis. La formación de este patrón espacial es gobernada por oscilaciones génicas que actúan como temporizador, transformando así ordenamiento temporal en espacial. La señalización mediada por la vía Delta-Notch permite la sincronización de estas oscilaciones entre células vecinas, dando lugar a un ritmo colectivo que define la posición y el momento de formación de cada somito.

En este contexto, exploramos el rol específico de DeltaD, un ligando de Notch cuya participación en la somitogénesis es un enigma desde hace más de una década. El ritmo de segmentación está controlado por la expresión oscilante de genes de la familia *her*, que regulan la producción del ligando DeltaC, responsable de activar receptores Notch en células vecinas. Este circuito de retroalimentación permite acoplar los osciladores individuales y generar un ritmo colectivo coherente. Sin embargo, *deltaD* no muestra oscilaciones evidentes en sus patrones de expresión, aunque su ausencia produce defectos en la segmentación. Esto plantea la pregunta de cuál es su rol en la sincronización.

12.1 DOS ROLES PARA DELTAD

En esta tesis abordamos esta pregunta mediante un enfoque teórico. Motivados por datos experimentales disponibles, en los Capítulos 7 y 8 consideramos en primer lugar un modelo en el que los ligandos deben dimerizarse para unirse al receptor y transmitir una señal a una célula vecina. Esta hipótesis asigna a DeltaD un rol claro como pareja de DeltaC, haciéndolo necesario para la sincronización. Mostramos que este modelo es compatible con datos experimentales en mutantes, tanto en estado estacionario como en los fenotipos de desincronización. Si bien el componente clave en esta hipótesis es el heterodímero –que transmite la mayor parte de la señal–, encontramos que los homodímeros también son necesarios para explicar las diferencias observadas en los fenotipos de los mutantes de la vía Delta-Notch. Dado que la evidencia sobre la existencia de dímeros de ligandos es limitada y mayormente restringida a ensayos extraembrionarios, en el Capítulo 9 exploramos una hipótesis alternativa donde los monó-

meros se unen directamente y activan el receptor Notch. Mostramos que este modelo también es consistente con los datos experimentales, asignando a DeltaD el rol de proporcionar una señal basal. Estas dos hipótesis de acoplamiento confieren a DeltaD roles funcionales distintos. Por lo tanto, discutimos posibles experimentos que podrían distinguir entre ambas hipótesis.

Además, en el Capítulo 11 pusimos a prueba la validez de la hipótesis de que, en presencia de una señal oscilatoria, la existencia o ausencia de una señal basal constante puede definir si un sistema de osciladores se sincroniza o no. Con un abordaje analítico y un modelo de un oscilador forzado unidimensional, encontramos que el sistema tiene un umbral de sincronización dado por la escala de concentración de la regulación positiva del reloj por la señal. Así, validamos la hipótesis para el rol de DeltaD en el escenario de monómeros.

12.2 EXPERIMENTOS OBSERVACIONALES PODRÍAN DISTINGUIR ENTRE ESCENARIOS

Una diferencia clave entre los mecanismos propuestos de señalización radica en el modo en que los ligandos Delta interactúan con el receptor Notch. En particular, la hipótesis de dímeros propone que la formación de complejos de ligando juega un rol predominante en la unión a los receptores Notch. La dimerización de ligandos ha sido corroborada *in vitro* mediante anticuerpos contra DeltaC y DeltaD [144]. Más recientemente, se reportó también la dimerización de otros ligandos de la vía Notch en cultivos celulares de mamíferos [176, 199]. Estos estudios identificaron regiones específicas de la proteína responsables de la interacción homofílica, y caracterizaron experimentalmente la formación de dímeros mediante co-inmunoprecipitación. En embriones de pez cebra se ha reportado la colocalización de ligandos Delta en la región del PSM mediante inmunohistoquímica fluorescente convencional [144]. Sin embargo, sería importante confirmar si estos dímeros también se forman como especies moleculares funcionales en este contexto. Para ello podrían emplearse ensayos FRET para evaluar la proximidad entre ligandos [200], o el ensayo N&B para determinar el estado de oligomerización [201]. La observación directa de dimerización molecular *in vivo* sería un fuerte indicio a favor del rol funcional de los dímeros, apoyando el escenario de dímeros.

Más allá de su estado de oligomerización, la dinámica temporal de DeltaD también puede ofrecer pistas sobre su modo de acción. En el Capítulo 10 encontramos que los dos escenarios predicen dinámicas distintas para la concentración total de DeltaD. En el escenario de dímeros, se espera que DeltaD exhiba oscilaciones marcadas. En cambio, en el escenario de monómeros sólo se espera una leve variación en el tiempo. Por lo tanto, una forma de contrastar entre ambos

escenarios sería mediante la visualización *in vivo* de una proteína reportera de DeltaD, o el uso de anticuerpos, para cuantificar la amplitud relativa de sus fluctuaciones. Un trabajo previo utilizando DeltaD fusionado a *venus*-YFP no reportó oscilaciones evidentes [114]. Estos resultados apoyan el escenario de monómeros, aunque será necesario complementarlos con otros ensayos experimentales.

12.3 LOS DOS ESCENARIOS HACEN DISTINTAS PREDICCIONES ANTE PERTURBACIONES

Además de evaluar las predicciones del modelo a través de observaciones directas, podemos también explorar perturbaciones que nos permitan poner a prueba los roles distintos para DeltaD en la sincronización celular. Propusimos entonces que sería posible rescatar el fenotipo del mutante DeltaD utilizando componentes que suplan el rol de DeltaD faltante en un caso, pero no en el otro. Una posibilidad consiste en expresar NICD de forma independiente a las interacciones regulatorias, lo que permitiría evaluar si la activación constitutiva de la vía es suficiente para restaurar la sincronía en ausencia de señalización a través de DeltaD. Esto podría lograrse mediante enfoques de biología sintética que introduzcan versiones modificadas del receptor Notch [202-204]. Un nivel constante de señalización de NICD aportarían una señal basal en el escenario de monómeros, pero no suplirían el rol de pareja de unión de DeltaC necesario en el caso de unión mediante dímeros.

Una estrategia similar sería expresar, en el mutante de DeltaD, DeltaC de forma exógena y constante, sin regulación por parte del oscilador vía inhibición por Her, manteniendo a su vez el DeltaC endógeno que proveería una señal oscilatoria. Así, en el escenario de monómeros, el DeltaC exógeno funcionaría como una señal basal. Sin embargo, en el escenario dímeros, no cumpliría el papel de DeltaD faltante, ya que se cree que la formación de homodímeros de DeltaC es mucho más débil que la de heterodímeros [144]. En el embrión, esto podría implementarse mediante la inyección de ARNm de *deltaC*, actuando como fuente constante de ligando no regulado.

Experimentos previos utilizando esta estrategia mostraron que inyectar ARNm de *deltaC* en embriones heterocigotas para mutantes de *deltaC* o *deltaD* no mejora la recuperación en un ensayo de pulso con DAPT, mientras que inyectar ARNm de *deltaD* en el heterocigoto del mutante de *deltaD* sí lo hace [205]. Si bien estos experimentos revelan funciones distintas de DeltaC y DeltaD, la falla del rescate con ARNm de *deltaC* no es concluyente, ya que el modelo predice una respuesta no monótona al nivel de ARNm, que podría enmascarar un rescate exitoso ante ciertas concentraciones. Para realizar una prueba más exhaustiva sería necesario realizar múltiples ensayos, variando la dosis de ARNm inyectada para explorar la región de rescate posible en

el escenario de monómeros. Una limitación de este enfoque puede ser la estabilidad del ARNm, que implicaría una tasa de síntesis de la proteína que decrece con el tiempo. Una alternativa para sortear esta limitación sería generar una línea transgénica con DeltaC expresado constitutivamente, o introducir copias de *deltaC* bajo el promotor de *deltaD*. El experimento recíproco, en el que un mutante para DeltaC es suplementado con un transgén de DeltaD, no debería rescatar el fenotipo de desincronización en ninguno de los dos escenarios. Este resultado fortalecería aún más la hipótesis del rol diferencial de los ligandos.

12.4 LA VÍA DELTA-NOTCH TIENE INTERACCIONES EN CIS

Los ligandos de Notch también tienen funciones diferenciadas en otros contextos [195, 196, 206, 207]. Un estudio reciente generó una librería de líneas celulares modificadas para caracterizar los modos de interacción ligando-receptor de cuatro ligandos distintos y dos receptores presentes en células de mamíferos [208]. Este estudio reveló una variedad de perfiles de inhibición y activación, tanto en cis como en trans, dependiendo de las concentraciones de cada componente. También se ha demostrado que la inhibición o activación en cis de la vía Notch puede desempeñar un papel clave en la toma de decisiones del destino celular y en la generación de patrones [121, 158, 188, 194, 209]. En particular, durante la somitogénesis de ratón, la interacción en cis del ligando DLL3 con Notch es crucial para la segmentación correcta del embrión [188]. Además, DeltaD interactúa en cis durante algunos procesos de neurogénesis en embriones de pez cebra [121]. Esto sugiere que mecanismos similares podrían estar presentes también en otros contextos del desarrollo, incluyendo la somitogénesis en pez cebra.

A pesar de que no existe evidencia directa de estos mecanismos en el reloj de segmentación, en el Capítulo 9 utilizamos argumentos de ortología entre ligandos de mamíferos y de pez cebra, y reinterpretamos evidencia en somitogénesis de pez cebra para construir un modelo donde la actividad en cis resulte central a la somitogénesis. Propusimos que el ligando oscilante DeltaC se une a Notch exclusivamente en cis, lo que genera una inhibición mutua mediante la captura competitiva de moléculas. El ligando con expresión constante DeltaD se une al receptor Notch tanto en cis –inhibiéndose mutuamente– como en trans –activándolo. Con una parametrización adecuada, este modelo es capaz de reproducir los fenotipos estacionarios de sincronización, pero no es consistente con la evidencia de ensayos de desincronización de los fenotipos mutantes. Si bien este modelo representa potencialmente un tercer rol para DeltaD –como único transmisor de la señal entre células–, al menos bajo esta formulación, la inhibición

en cis no representa un mecanismo funcional dominante en este contexto.

Recientemente, trabajos que muestran dimerización *in vitro* de ligandos Delta en líneas celulares de mamíferos asignaron –en un contexto donde sólo se expresa un ligando– al dímero un rol cis-inhibitorio, y proponen que el monómero se encarga exclusivamente de la trans-activación durante la formación de patrones [176, 199]. De esta forma, los autores pueden asignar múltiples roles a un único ligando dependiendo de su estado de oligomerización. En el contexto de nuestro trabajo, podemos considerar una aproximación donde reemplazamos las concentraciones de dímeros por las de los monómeros correspondientes a través de una aproximación cuasiestacionaria. De esta forma, nuestro análisis sobre la hipótesis de cis-inhibición puede reinterpretarse en el contexto de la evidencia de dímeros cis-inhibiendo. Basado en esto, en principio es esperable que los resultados que obtuvimos se mantengan en el contexto de dímeros, y que la cis-inhibición no juegue un rol central en la somitogénesis. Sin embargo, sería interesante extender estos modelos, desarrollados para sistemas con un único ligando, al contexto del reloj de segmentación del pez cebra, donde dos ligandos se coexpresan. Esto permitiría explorar cómo se combinan los efectos de la dimerización y la cis-inhibición, y qué consecuencias podrían tener sobre la dinámica del acoplamiento y de sincronización.

12.5 LIGANDOS DE NOTCH COEXPRESAN EN DISTINTOS CONTEXTOS

Una pregunta que resulta pertinente hacerle a este sistema es por qué el reloj de segmentación evolucionó de forma de requerir dos ligandos para funcionar correctamente. Es siempre peligroso preguntarle “por qué” a la evolución, siendo que no es un proceso direccionado o inteligente. Aun así, plantearse la pregunta puede dar lugar a reflexiones útiles que inspiren nuevos experimentos o modelos.

En el marco teórico, un solo ligando oscilatorio como DeltaC puede sincronizar los osciladores, incluso en ausencia de DeltaD, si su tasa de síntesis es lo suficientemente alta. Sin embargo, en el embrión de pez cebra, el ligando DeltaC por sí solo presenta un fenotipo de desincronización [107]. La restricción impuesta por el período del reloj, del orden de 30 minutos [91], podría entrar en conflicto con una cinética bioquímica más lenta de este ligando, lo que podría explicar la necesidad de un sistema con dos ligandos. Un sistema con dos ligandos podría también conferir propiedades adicionales, como flexibilidad [210] para ajustar el perfil de acoplamiento a lo largo del tejido no segmentado [174], de manera análoga a los perfiles de frecuencia [211] o movilidad [173]. Finalmente, estos ligandos cumplen funciones adicionales en otros contextos del desarrollo y en el indi-

viduo adulto. Estas funciones probablemente imponen restricciones sobre la bioquímica y cinética de los ligandos, más allá de las necesarias para la sincronización. Por ejemplo, DeltaC y DeltaD se coexpresan en células de la retina en desarrollo [144]; DeltaA y DeltaD se coexpresan en la placa neural [121]; y DeltaA, DeltaC y DeltaD se encuentran simultáneamente en progenitores neuronales durante el desarrollo de la médula espinal [212]. De hecho, la coexpresión combinatoria de múltiples componentes de la vía de Notch es un fenómeno generalizado [213].

La señalización de Notch cumple funciones diversas en una amplia gama de procesos del desarrollo y también en enfermedades [104, 116, 214]. Por ejemplo, coordina oscilaciones en antifase durante la neurogénesis [119, 120], participa en oscilaciones asociadas a decisiones de destino en progenitores pancreáticos [123], en la formación de patrones en la retina [124, 125], en el frente neurogénico de la retina del pollo [122], en procesos de regeneración tisular [128] y en la neurogénesis adulta [126]. Esta notable versatilidad de la señalización Notch en distintos contextos sigue siendo una cuestión abierta e interesante. Comprender cómo las células utilizan múltiples ligandos para comunicarse según el contexto será relevante tanto para aplicaciones médicas —como el diagnóstico y el desarrollo de terapias—, y también será clave para aprovechar esta versatilidad en biología de gastruloides y organoides, así como en la ingeniería de tejidos [129-131, 215, 216].

12.6 PERSPECTIVAS

A lo largo de esta tesis, analizamos cómo diferentes mecanismos de señalización Delta-Notch pueden generar dinámicas de sincronización diferenciadas en el reloj de segmentación del pez cebra. Combinamos modelado teórico con análisis de datos experimentales para comparar escenarios moleculares plausibles y proponer formas de contrastarlos funcionalmente.

Estos resultados permiten interpretar observaciones experimentales previas bajo una nueva luz, y proponen predicciones concretas que podrían ponerse a prueba mediante ensayos de rescate, visualización de proteínas endógenas o manipulación genética de los distintos ligandos. Además, establecen una base conceptual sobre la cual extender el análisis a variantes del sistema —como embriones mutantes o condiciones perturbadas, tanto genéticas como ambientales— que ayuden a entender la robustez y adaptabilidad del acoplamiento intercelular.

En conjunto, este trabajo contribuye a entender cómo una red molecular altamente reutilizada como la vía Delta-Notch puede modular su modo de acción en distintos contextos, incluso dentro de un mismo tejido. Esta flexibilidad funcional plantea desafíos y oportunidades para futuros estudios experimentales y teóricos, tanto en el marco

del desarrollo como en otros procesos dinámicos mediados por esta vía. En particular, el enfoque comparativo entre hipótesis moleculares que desarrollamos aquí puede servir como marco para analizar otros sistemas oscilatorios mediados por Notch.

COMENTARIOS FINALES

En esta tesis investigamos dos sistemas muy distintos: neuronas circadianas en cerebro de mosca, oscilando en frecuencias ultradianas, y el reloj de segmentación del pez cebra, compuesto por osciladores génicos sincronizados. Revelamos a lo largo de las dos partes de la tesis diferentes mecanismos para generar oscilaciones colectivas. por u lado, el *entrainment* con una señal externa, desconocida, generando oscilaciones coherentes neuronas de una región del cerebro de mosca. Por otro, sincronización por acción de una vía de señalización de efecto local, comunicando el estado de los osciladores individuales por los valores oscilatorios de un complejo que surge de la interacción de dos ligandos de membrana. Finalmente, la sincronización mediada por los niveles oscilatorios de un ligando, pero reforzada por una señal constante debido a otro ligando.

A través de formulaciones teóricas que conversan con resultados experimentales, estudiamos estos sistemas, enriqueciendo los conocimientos existentes en cada área, y sugiriendo nuevas direcciones de investigación para continuar explorando.

Parte III

APÉNDICE

MÉTODOS

En este apéndice detallamos los métodos experimentales y numéricos utilizados en esta tesis.

A.1 MÉTODOS DE LA PARTE I

A.1.1 *Electrofisiología*

Los protocolos para los experimentos de *patch clamp* están descritos de forma detallada en las Refs. [36, 47-49]. Brevemente, las moscas hembras de entre 3 y 9 días de edad fueron anestesiadas colocando el vial sobre hielo durante un breve período, y el cerebro fue disecado en solución externa de registro, compuesta por (en mM): 101 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 4 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 5 glucosa y 20.7 NaHCO₃, pH 7.2, con una osmolaridad de 250 mmol/kg. Tras retirar la probóscide, los sacos aéreos y la cutícula cefálica, el cerebro se fijó con la cara ventral hacia arriba sobre un cubreobjetos recubierto con Sylgard, utilizando unas pocas microlitros de adhesivo tisular Vetbond (3M).

La preparación consistió únicamente en tejido cerebral, ya que preservar el tejido visual genera una mayor variabilidad experimental, debido a la desconexión inconsistente entre la retina y el cerebro central durante la disección [37].

El tiempo desde la anestesia hasta el establecimiento del registro, que denominamos tiempo desde la disección, se utilizó de la siguiente manera: las LNvs fueron visualizadas mediante fluorescencia roja en moscas Pdf-RFP, que expresan un fluoróforo rojo bajo el promotor de Pdf [42], utilizando un microscopio Olympus BX51WI con lente de inmersión en agua de 60× y sistemas de iluminación LEDD1B y TK-LED (TOLKET S.R.L., ThorLabs). Una vez identificadas las células fluorescentes, se las visualizó con IR-DIC utilizando una cámara DMK23UP1300 (Imaging Source) y el software IC Capture 2.4. Las lLNvs se distinguieron de las sLNvs por su tamaño y posición anatómica.

Para acceder a la neurona objetivo con el electrodo de registro, se dirigió localmente la glía superficial adyacente a los somas de las LNvs utilizando una solución de proteasa XIV (10 mg/ml; P5147, Sigma-Aldrich) disuelta en la solución externa de registro. Esto se logró usando una pipeta de vidrio de punta ancha (~20 μm, tipo FG-GBF150-110-7.5; Sutter Instrument) y masajeando suavemente con succión bucal, permitiendo el acceso a los somas subyacentes con mí-

nima alteración de los circuitos neuronales. Tras esta digestión, la solución de proteasa se lavó rápidamente mediante perfusión con solución externa utilizando una bomba peristáltica (catálogo #ISM831, ISMATEC).

Los registros se realizaron con pipetas de vidrio borosilicato de pared gruesa (FG-GBF150-86-7.5, Sutter Instrument) traccionadas a una resistencia de 7–8 M Ω con un extractor horizontal P-97 (Sutter Instrument) y pulidas al fuego para alcanzar 9–12 M Ω . Las señales se amplificaron con un Multiclamp 700B y se adquirieron con el software pClamp 10.4 mediante un conversor Axon Digidata 1515 (Molecular Devices), y se guardaron en archivos .abf.

Las pipetas se llenaron con solución interna compuesta por (en mM): 102 gluconato de potasio, 17 NaCl, 0.085 CaCl₂, 0.94 EGTA y 8.5 HEPES, pH 7.2, con una osmolaridad de 235 mmol/kg. Los sellos de gigaohm se lograron con succión mínima y posterior ruptura controlada de la membrana mediante succión suave en modo voltage-clamp, con un potencial de retención de –60 mV. La actividad espontánea se registró en modo current-clamp ($I = 0$).

En los experimentos de doble registro, la secuencia se repitió dos veces consecutivas, obteniendo la configuración *whole-cell* primero en una neurona y luego en la otra (en el caso de registros sLNv-ILNv, se *pacheó* siempre primero la ILNv). Una vez establecida la configuración en ambas neuronas, se registró su actividad simultáneamente. Todos los registros simultáneos se realizaron en pares de neuronas ubicadas del mismo lado del cerebro.

Los registros se realizaron a temperatura ambiente.

En los experimentos con mecamilamina (M9020, Sigma-Aldrich) y picrotoxina (P1675, Sigma-Aldrich), tras registrar entre 1 y 3 minutos en condiciones basales como control, se perfundieron 10 ml de solución de mecamilamina (10 μ M) o 10 ml de solución de picrotoxina (100 μ M), ambas preparadas en solución salina externa, durante aproximadamente 3 minutos. Luego, los fármacos se eliminaron mediante lavado con solución salina externa. La perfusión se mantuvo continua durante todo el experimento.

A.1.2 *Curva de respuesta en fase*

Para los experimentos de curva de respuesta en fase, se registró la actividad de las neuronas durante 1 a 3 minutos inicialmente, con el fin de determinar la frecuencia basal aproximada de oscilación, contando la cantidad de ciclos completados en 60 segundos. Luego se calculó la frecuencia de estimulación dividiendo la frecuencia basal por 5. Para evitar que esta frecuencia coincidiera con la frecuencia de disparo espontáneo de la neurona, se redondeó el valor, generando un desplazamiento de ± 0.01 a 0.02 Hz. Este ajuste evitó que los estímulos caigan consistentemente con la misma fase del ciclo.

Una vez determinada la frecuencia de estimulación, se aplicaron estímulos consistentes en pulsos de -20 pA de amplitud y 100 ms de duración. Cada ensayo consistió en 5 barridos consecutivos, cada uno de 90 segundos. Luego del último barrido se verificó que la neurona continuaba disparando ráfagas espontáneas con una frecuencia similar a la registrada al inicio.

A.1.3 *Inyección de corriente*

Para los experimentos de inyección de corriente, se registró la actividad de las neuronas durante 1 a 3 minutos iniciales. Luego se aplicó un protocolo de estimulación compuesto por tres barridos. Cada barrido consistió en 30 segundos de registro basal, seguidos por 30 segundos de inyección de corriente negativa, y otros 30 segundos de registro basal para evaluar el efecto de la estimulación y el estado de la neurona y del sello luego de la misma.

Durante el primer barrido no se inyectó corriente, como control. Durante el segundo se inyectaron -3 pA, y durante el tercero y último se inyectaron -6 pA.

A.1.4 *Código*

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó utilizando código en Python desarrollado por esta autor, con las bibliotecas científicas estándar (*scipy*, *numpy*, *pandas*, *matplotlib*). Además, se empleó la biblioteca *pyABF* [217] para la lectura de archivos *.abf*, y la biblioteca *jitcode* para integración numérica [218]. El código está disponible públicamente en <https://github.com/mwappner/FlyClock>.

A.2 MÉTODOS DE LA PARTE II

A.2.1 *Integración numérica*

Integramos las ecuaciones diferenciales con retardo (DDEs) del modelo de forma numérica utilizando un código propio basado en la biblioteca de Python *jitcdde* [218]. Esta biblioteca implementa el algoritmo de Shampine-Thompson con pasos de tiempo adaptativos [219], y convierte el código Python de las DDEs en código C compilado para acelerar su ejecución.

Para integrar un sistema de DDEs se debe especificar el valor de todas las variables del sistema en un intervalo de tiempo previo al comienzo de la integración tan grande como el mayor retardo considerado. Fijamos todas las variables de cada célula a un valor constante en el intervalo de tiempo $[-\tau, 0]$. Para construir mapas de estado estacionario, asignamos a cada célula un valor aleatorio extraído de una distribución uniforme en el rango $[2, 6]$, lo que inicializa el siste-

ma en un estado desincronizado. En los ensayos de desincronización, elegimos valores en el rango $[0, 0,01]$ para inicializar el sistema en un estado sincronizado. Luego, evolucionamos el modelo durante un tiempo equivalente a aproximadamente 100 ciclos completos en los ensayos de estado estacionario, y durante 30 ciclos en los ensayos de desincronización. Para un oscilador genético con autoregulación negativa y retardo, una estimación de primer orden para la duración del ciclo es $2(\tau + 1/d)$, donde τ es el retardo de la autoregulación y d la tasa de decaimiento, que en nuestro sistema usamos como escala temporal para adimensionalizar las ecuaciones del modelo [133, 171, 172]. Todos los ensayos numéricos se realizaron con $N_c = 100$ células.

A.2.2 *No linealidades altas*

Para integrar el sistema en el límite extremadamente no lineal, no podemos reemplazar explícitamente la función de regulación por una función escalón de Heaviside, porque el algoritmo de integración con paso adaptativo falla. A su vez, si ingenuamente utilizamos un exponente alto en las expresiones del modelo completo, el tiempo de cómputo que tome la integración será muy elevado, debido al alto costo computacional de los exponentes altos y a los pequeños pasos de integración que debe realizar el sistema.

Por esta razón, para integrar el sistema en este límite, utilizamos una aproximación numérica, donde reemplazamos la función escalón por una función sigmoidea numéricamente eficiente. La biblioteca `jitcdde` cuenta con una función para esto, llamada `jump`. Esta reemplaza discontinuidades en las ecuaciones por una función arco-tangente escalada apropiadamente, y utiliza una derivada analítica para mejorar el cálculo del paso de integración.

A.2.3 *Código*

El análisis de los resultados, las integraciones numéricas y las visualizaciones fueron realizadas utilizando código en Python desarrollado por esta autor, con las biblioteca científica estándar (`scipy`, `numpy`, `pandas`, `matplotlib`). Además, se empleó la biblioteca `jitcode` para integración numérica [218], como detallamos arriba, y `cmcrmeri` para visualizaciones [220]. El código está disponible públicamente en <https://github.com/mwappner/DeltaDimer>, pendiente publicación del manuscrito.

CÁLCULOS SUPLEMENTARIOS

Este apéndice incluye cuentas detalladas cuyo desarrollo no resulta enriquecedor para el desarrollo del trabajo principal, pero cuyo resultado es relevante para el análisis que realizamos.

B.1 AMPLITUD ESTACIONARIA DEL OSCILADOR DE HOPF SUB UMBRAL FORZADO

La Ec. (3.12) del texto principal describe lo que debe cumplir la amplitud del oscilador forzado en el estado estacionario r_0 . Esta puede reescribirse en términos de $R \equiv r_0^2$ como una ecuación cúbica

$$R^3(a^2 + b^2) + R^2 2(\Delta b - \mu a) + R(\mu^2 + \Delta^2) - f^2 = 0, \quad (\text{B.1})$$

la cual siempre tendrá una raíz real positiva si $\mu < 0$. Para obtenerla, utilizamos la fórmula de Cardano para resolver cúbicas reducidas [221, 222]. Esto requiere transformar primero la Ec. (B.1) mediante un cambio de variable [223] $R = t - \frac{a_2}{3a_3}$, lo que da lugar a

$$t^3 + pt + q = 0, \quad (\text{B.2})$$

donde

$$p = \frac{3a_3 a_1 - a_2^2}{3a_3^2} \quad (\text{B.3})$$

$$q = \frac{2a_2^3 - 9a_3 a_2 a_1 + 27a_3^3 a_0}{27a_3^3}, \quad (\text{B.4})$$

y definimos a_i como los coeficientes del término de orden i en la Ec. (B.1). La fórmula de Cardano establece que, si existe una solución real para la Ec. (B.2), se puede obtener como t_0 tal que

$$t_0 = \sqrt[3]{u_+} + \sqrt[3]{u_-}, \quad (\text{B.5})$$

donde

$$u_{\pm} = -\frac{q}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{q}{2}\right)^2 + \left(\frac{p}{3}\right)^3}. \quad (\text{B.6})$$

Las Ecs. (B.1) a (B.6) nos una solución para la Ec. (3.12), que no escribimos explícitamente aquí dado que sólo la utilizaremos para ajustes numéricos, como detallamos en el texto principal.

B.2 SOLUCIÓN EXACTA DE LA DINÁMICA DE RECEPTOR Y SEÑAL

Asumiendo que la forma de la actividad total de ligandos $K(t)$ es conocida, las ecuaciones para los campos medios de receptor y de señal Ecs. (11.2) y (11.1) son un sistema de ODEs no autónomas, y pueden integrarse de forma exacta. En lo que sigue, omitiremos la barra de campo medio para simplificar la notación. Esto dejará en evidencia que, como mencionamos en el texto principal, la dinámica de los receptores y la señal en las células individuales es idéntica a la del campo medio de estas cantidades.

Reescribimos estas ecuaciones en la forma estándar

$$\dot{n}(t) + (\delta_n + K(t))n(t) = \beta_n, \quad (\text{B.7})$$

$$\dot{s}(t) + \delta_s s(t) = K(t)n(t). \quad (\text{B.8})$$

Este es un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias lineales y no autónomas con coeficientes variables, que resolvemos mediante un factor de integración [198],

$$n(t) = e^{-\int(\delta_n + K(t))dt} \left[c_n + \int dt \beta_n e^{\int(\delta_n + K(t))dt} \right] \quad (\text{B.9})$$

y

$$s(t) = e^{-\delta_s t} \left[c_s + \int dt K(t)n(t)e^{\delta_s t} \right] \quad (\text{B.10})$$

donde c_n y c_s son constantes de integración determinadas por las condiciones iniciales. La Ec. (B.10) depende de la solución $n(t)$, que puede obtenerse de forma autónoma a partir de la Ec. (B.9). Estas expresiones ya constituyen soluciones semi-analíticas, que pueden ser verificadas resolviendo numéricamente las integrales y comparando con la solución numérica de las Ecs. (9.4) y (9.5) del modelo completo. Para obtener una solución completamente analítica, debemos resolver las integrales en las Ecs. (B.9) y (B.10). Para ello, asumimos una forma explícita para $K(t)$. En el texto principal argumentamos que una elección razonable consiste en forma que tenga una componente constante y una modulación sinusoidal montada,

$$K(t) = b + a \sin(2\pi/T) \quad (\text{B.11})$$

donde b es la componente constante, a la amplitud y T el período de la modulación. Esta formulación es levemente distinta de la que utilizamos en el modelo analítico en la Ec. 11.3, pero nos será útil para la integración. Podemos mapear de una expresión a la otra tomando $b = C/2 + D$ y $a = C/2$, donde C y D están definidas en la Ec. 11.3.

Calculamos primero el prefactor en la Ec. (B.9), que también aparece dentro de la integral entre corchetes,

$$\int dt(\delta_n + K(t)) = (\delta_n + b)t - \frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right). \quad (\text{B.12})$$

La expresión para $n(t)$ queda entonces

$$n(t) = e^{-(\delta_n+b)t + \frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} \left[c_n + \beta_n \int dt e^{(\delta_n+b)t - \frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} \right]. \quad (\text{B.13})$$

El primer término describe un comportamiento transitorio que decae exponencialmente para $t \gg (\delta_n + b)^{-1}$:

$$\begin{aligned} c_n e^{-(\delta_n+b)t + \frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} &= \\ &= c_n e^{-(\delta_n+b)t} e^{\frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} \sim e^{-(\delta_n+b)t} \xrightarrow[t \rightarrow \infty]{} 0. \end{aligned} \quad (\text{B.14})$$

El segundo término incluye una integral más difícil de resolver. Aquí la resolveremos en cierto detalle para el factor de la Ec.(B.13)

$$\psi(t) = \int dt e^{(\delta_n+b)t - \frac{aT}{2\pi} \cos(2\pi t/T)}. \quad (\text{B.15})$$

La exponencial del coseno se parece a la distribución de von Mises, que tiene una expansión en términos de funciones de Bessel modificadas,

$$\psi(t) = \int dt e^{(\delta_n+b)t} \left\{ I_0\left(\frac{aT}{2\pi}\right) + 2 \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^j I_j\left(\frac{aT}{2\pi}\right) \cos\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) \right\}. \quad (\text{B.16})$$

El primer término es la integral de una exponencial,

$$I_0\left(\frac{aT}{2\pi}\right) \int dt e^{(\delta_n+b)t} = \frac{I_0(aT/2\pi)}{\delta_n + b} e^{(\delta_n+b)t} + C_1, \quad (\text{B.17})$$

y los demás son integrales de productos entre exponenciales y cosenos, de la forma

$$\int e^{At} \cos(Bt) dt = \frac{e^{At}}{A^2 + B^2} [A \cos(Bt) + B \sin(Bt)] + C, \quad (\text{B.18})$$

por lo que tenemos

$$\begin{aligned} \int dt e^{(\delta_n+b)t} \cos\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) &= \frac{e^{(\delta_n+b)t}}{(\delta_n + b)^2 + (j2\pi/T)^2} \times \\ &\left[(\delta_n + b) \cos\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) + \frac{j2\pi}{T} \sin\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) \right] + C_2. \end{aligned} \quad (\text{B.19})$$

Usando estos resultados en la Ec. (B.16) obtenemos

$$\begin{aligned} \psi(t) &= \frac{I_0(aT/2\pi)}{\delta_n + b} e^{(\delta_n+b)t} + \\ &+ 2 \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(-1)^j I_j(aT/2\pi)}{(\delta_n + b)^2 + (j2\pi/T)^2} e^{(\delta_n+b)t} \times \\ &\times \left[(\delta_n + b) \cos\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) + \frac{j2\pi}{T} \sin\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) \right] + C \end{aligned} \quad (\text{B.20})$$

Podemos volver ahora a la Ec. (B.13) y escribir la solución analítica completa $n(t)$ para el $K(t)$ dado

$$\begin{aligned} n(t) = & c_n e^{\frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} e^{-(\delta_n+b)t} + \beta_n e^{\frac{aT}{2\pi} \cos\left(\frac{2\pi t}{T}\right)} \times \\ & \times \left\{ \frac{I_0(aT/2\pi)}{\delta_n + b} + 2 \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(-1)^j I_j(aT/2\pi)}{(\delta_n + b)^2 + (j2\pi/T)^2} \cdots \right. \\ & \left. \cdots \left[(\delta_n + b) \cos\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) + \frac{j2\pi}{T} \sin\left(\frac{j2\pi t}{T}\right) \right] \right\} + C. \quad (\text{B.21}) \end{aligned}$$

Ahora que conocemos $n(t)$, retomamos la Ec. (B.10) y buscamos una solución analítica $s(t)$, recordando que nuestro objetivo es entender cómo depende $s(t)$ de $K(t)$. El primer término en la Ec. (B.10) describe un decaimiento transitorio exponencial. El segundo término requiere resolver una integral de $K(t)n(t)e^{\delta_s t}$. La expresión de $n(t)$ todavía contiene una exponencial de un coseno, que no sabemos integrar directamente. Por lo tanto, expandiremos este factor en funciones de Bessel como antes. Esto generará términos que son productos de una exponencial y dos funciones trigonométricas. Además, al estar multiplicado por $K(t)$, que también tiene un término cosenoidal, surgen productos triples de funciones trigonométricas y exponenciales. Por lo tanto, para resolver la integral en la Ec. (B.10), debemos integrar productos de una exponencial y múltiples funciones trigonométricas.

Primero expandimos la exponencial usando la misma expansión utilizada en las Ecs. (B.15) y (B.16),

$$e^{\frac{aT}{2\pi} \cos(2\pi t/T)} = I_0\left(\frac{aT}{2\pi}\right) + 2 \sum_{i=1}^{\infty} I_i\left(\frac{aT}{2\pi}\right) \cos\left(\frac{i2\pi t}{T}\right) \quad (\text{B.22})$$

notando que, por la diferencia de signos, no aparece el factor $(-1)^i$ aquí. Usando esta expresión en la Ec. (B.21), tenemos

$$\begin{aligned} n(t) = & c_n e^{-(\delta_n+b)t} \left\{ I_0 + 2 \sum_{i=0}^{\infty} I_i \cos(i\omega t) \right\} + \\ & + \beta_n \left\{ I_0 + 2 \sum_{i=0}^{\infty} I_i \cos(i\omega t) \right\} \left\{ \frac{I_0}{\delta_n + b} + \right. \\ & \left. + 2 \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(-1)^j I_j}{(\delta_n + b)^2 + (j\omega)^2} \left[(\delta_n + b) \cos(j\omega t) + j\omega \sin(j\omega t) \right] \right\} + C \end{aligned} \quad (\text{B.23})$$

donde, para simplificar la notación, omitimos el argumento de las funciones de Bessel,

$$I_\ell = I_\ell\left(\frac{aT}{2\pi}\right), \quad (\text{B.24})$$

y definimos

$$\omega = \frac{2\pi}{T}. \quad (\text{B.25})$$

A continuación expandimos el producto entre corchetes, lo multiplicamos por $e^{\delta_s t}$ y por $K(t)$ dado por la Ec. (B.11) y realizamos la integración.

El resultado es extenso, y escribirlo explícitamente aquí resultaría poco productivo, dado que no analizaremos su expresión analítica en esta tesis. De todas formas, su expresión es útil para validar aproximaciones del modelo completo, como detallamos en el texto principal.

B.3 APROXIMACIÓN CUASIESTACIONARIA DEL MODELO DE MÓMEROS

En el texto principal realizamos una aproximación cuasiestacionaria del modelo de monómeros, de donde obtenemos expresiones para las concentraciones de los ligandos, el receptor y la señal, Ecs. (11.5), (11.6), (11.11) y (11.12). De las de ligandos obtuvimos una expresión para el valor cuasiestacionario de la actividad total de ligandos, Ec. (11.10). Esta depende de parámetros del sistema, de una cantidad $\bar{f}_C(t)$ que representa la regulación promedio de DeltaC por el reloj, y del campo medio del receptor \bar{n} .

Nuestro objetivo es entender cómo $s_i(t)$ depende del oscilador $h_i(t)$, para poder luego reemplazar este resultado en la dinámica del oscilador y obtener una expresión para el acoplamiento del oscilador consigo mismo. Para ello, debemos primero obtener ecuaciones para el campo medio de receptor y señal. Aplicando la Ec. 7.28 a las Ecs. (11.11) y (11.12) obtenemos

$$\bar{n} = \frac{\beta_N}{\delta_N + K} \quad (\text{B.26})$$

$$\bar{s} = \frac{K\bar{n}}{\delta_S} = \frac{\beta_N}{\delta_S} \frac{K}{\delta_N + K}. \quad (\text{B.27})$$

Como señalamos en el texto principal, comparando las Ecs. (11.11) y (11.12) con las Ecs. (B.26) y (B.27) notamos que el valor de la concentración de receptor y señal en cada célula es igual al campo medio de estos valores, $n_i = \bar{n}$, $s_i = \bar{s}$. De esta forma, si bien estamos buscando una expresión para \bar{s} , podremos reemplazar esta misma expresión en s_i en la ecuación para el oscilador Ec. 9.1.

Para esto debemos primero desacoplar las expresiones de $K(t)$ y de $n(t)$, de forma que queden escritas en términos de los parámetros. Podemos expandir la Ec. (11.10) para obtener

$$K(t) = \frac{\bar{n}\kappa_C\kappa_D(\beta_C\bar{f}_C + \beta_D) + \kappa_C\beta_C\bar{f}_C\delta_D + \kappa_D\beta_D\delta_C}{(\delta_C + \kappa_C\bar{n})(\delta_D + \kappa_D\bar{n})} \quad (\text{B.28})$$

que está expresada completamente en términos de \bar{n} . Reordenando la Ec. (B.26) tenemos

$$K(t)\bar{n} = \beta_N - \delta_N \bar{n}. \quad (\text{B.29})$$

Reemplazando la Ec. (B.28) en la Ec. (B.29) obtenemos una expresión enteramente en términos de \bar{n} , los parámetros y \bar{f}_C . Esta expresión es la que dicta la dinámica cuasiestacionaria del receptor en términos de la dinámica del reosciladorloj, a través de la regulación media de DeltaC por el oscilador \bar{f}_C . Podemos expandirla para obtener explícitamente una ecuación cúbica en \bar{n}

$$\begin{aligned} & \bar{n}^3 \delta_N \kappa_C \kappa_D + \\ & + \bar{n}^2 [\kappa_C \kappa_D (\beta_C \bar{f}_C + \beta_D - \beta_N) + \delta_N (\kappa_C \delta_D + \kappa_D \delta_C)] + \\ & + \bar{n} [\kappa_C \delta_D (\beta_C \bar{f}_C - \beta_N) + \kappa_D \delta_C (\beta_D - \beta_N) + \delta_C \delta_D \delta_N] - \\ & - \beta_N \delta_C \delta_D = 0 \quad (\text{B.30}) \end{aligned}$$

que tiene solución exacta que podemos calcular por la fórmula de Cardano [221, 222].

Sin embargo, ya la expresión de la cúbica es oscura a la interpretación. Las raíces del polinomio lo serán más, y luego deberemos utilizar esas raíces para reemplazar \bar{n} en la Ec. (11.10) y obtener una expresión de \bar{s} en términos de parámetros y \bar{f}_C . De este proceso no buscamos sólo una expresión analítica, sino interpretabilidad del resultado, lo cual este autor opina que resultará sumamente opaco. Por esta razón, decidimos no continuar esta línea de pensamiento, y en el texto principal elegimos un acercamiento distinto, simplificando el modelo.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

PARÁMETRO	LLNV	SLNV	DESCRIPCIÓN
μ	-3,46	-3,88	parámetro de bifurcación
a	$5,53/r_0^2$	$5,37/r_0^2$	intensidad del atractor
Δ	$-0,6 \Omega$	$0,6 \Omega$	<i>detuning</i>
b	0	0	no isocronicidad
f	$9,14 r_0$	$9,43 r_0$	intensidad del forzante

OBSERVABLE	LLNV	SLNV	DESCRIPCIÓN
δ	$-0,03 2\pi$	$0,03 2\pi$	retardo de fase
r_0	11,4	8,85	hemiamplitud
t_r	0,023	0,023	tiempo de relajación

Tabla C.1: Parámetros, observables y sus descripciones utilizados en el modelo de la Parte I.

PARÁM.	DÍMEROS	MONÓM.	DESCRIPCIÓN
δ_C	1	1	degradación de DC
δ_D	1	1	degradación de DD
δ_E	1	1	degradación de DC:DD
δ_F	1	1	degradación de DC:DC
δ_G	1	1	degradación de DD:DD
δ_N	1	1	degradación de Notch
δ_S	1	1	degradación de NICD
β_H	28	28	síntesis de Her
β_C	26	39	síntesis de DC
β_D	17	20	síntesis de DD
β_N	24	30	síntesis de Notch
λ_{E+}	1	–	dimerización de DC:DD
λ_{E-}	0.1	–	disociación de DC:DD
λ_{F+}	0.1	–	dimerización de DC:DC
λ_{F-}	0.1	–	disociación de DC:DC
λ_{G+}	0.1	–	dimerización de DD:DD
λ_{G-}	0.1	–	disociación de DD:DD
κ_C	–	0.02	unión de DC a Notch
κ_D	–	0.01	unión de DD a Notch
κ_E	0.2	–	unión de DC:DD a Notch
κ_F	0.02	–	unión de DC:DC a Notch
κ_G	0.009	–	unión de DD:DD a Notch
σ	0.1	0.1	umbral de activación de S
γ	1	1	umbral de inhibición de DC
η_H	2.5	7	EH de auto-inhibición de Her
η_S	2.5	7	EH de activación de Her por S
η_C	2.5	7	EH de inhibición de DC por Her
α	10	10	Intensidad de acoplamiento
τ_H	4.2	4.2	Retardo medio en la síntesis de Her
σ_τ/τ_H	0.03	0.03	CV del retardo de síntesis de Her
τ_C/τ_H	1.7	1.7	Retardo relativo en la síntesis de DC

Tabla C.2: Tabla de parámetros utilizados en los sistemas de la parte II. Parámetros del *wildtype* para los escenarios de monómeros y dímeros. δ_X , β_X , λ_X y κ_X indican tasas. DC y DD indican DeltaC y DeltaD. Los dímeros se indican como DX:DX, por ejemplo DC:DC es el homodímero de DeltaC. S indica la señal. EH es exponente de Hill, CV es coeficiente de variación.

PANEL	PARÁM.	CLARO	PUNTEADO	OSCURO
A, G	κ_E	0.02	0.2	0.066
B, H	κ_F	0.002	0.02	0.2
C, I	κ_G	0.002	0.09	0.2
D, J	λ_E^+	0.05	1	3.33
E, K	λ_F^+	0.006	0.1	2
F, L	λ_G^+	0.006	0.1	2

Tabla C.3: Parámetros utilizados para las curvas de variación de a frontera de la región de sincronización en la Fig. 8.8. Claro indica el valor del parámetro en la curva gris claro, punteado el valor en la curva punteada, que en todos los casos coincide con el valor del *wildtype* en la Tabla C.1 y lo incluimos aquí a modo de referencia, y oscuro, el valor en la línea oscura.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Claudio Babiloni et al. «Alpha rhythm and Alzheimer's disease: Has Hans Berger's dream come true?» En: *Clinical Neurophysiology* 172 (2025), págs. 33-50. ISSN: 1388-2457. DOI: [10.1016/j.clinph.2025.02.256](https://doi.org/10.1016/j.clinph.2025.02.256). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388245725002913>.
- [2] György Buzsáki y Mihály Vöröslakos. «Brain rhythms have come of age». En: *Neuron* 111.7 (2023), págs. 922-926. ISSN: 0896-6273. DOI: [10.1016/j.neuron.2023.03.018](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.018). URL: [https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273\(23\)00214-3](https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273(23)00214-3).
- [3] Laura M. J. Fernandez y Anita Lüthi. «Sleep Spindles: Mechanisms and Functions». En: *Physiol. Rev.* 100.2 (2020), págs. 805-868. ISSN: 1522-1210. DOI: [10.1152/physrev.00042.2018](https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2018).
- [4] Gabrielle Girardeau y Vítor Lopes-dos Santos. «Brain neural patterns and the memory function of sleep». En: *Science* 374.6567 (2021), págs. 560-564. DOI: [10.1126/science.abi8370](https://doi.org/10.1126/science.abi8370). URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abi8370>.
- [5] Xue Fan y Henry Markram. «A Brief History of Simulation Neuroscience». En: *Frontiers in Neuroinformatics* 13 (2019). Publisher: Frontiers. ISSN: 1662-5196. DOI: [10.3389/fninf.2019.00032](https://doi.org/10.3389/fninf.2019.00032). URL: [https://www.frontiersin.orghttps://www.frontiersin.org/journals/neuroinformatics/articles/10.3389/fninf.2019.00032/full](https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/neuroinformatics/articles/10.3389/fninf.2019.00032/full).
- [6] A. T. Winfree. *The geometry of biological time*. New York: Springer-Verlag, 1980.
- [7] J. Christoph et al. «Electromechanical vortex filaments during cardiac fibrillation». En: *Nature* 555 (2018), págs. 667-675.
- [8] Eve Marder y Dirk Bucher. «Central pattern generators and the control of rhythmic movements». En: *Curr Biol* 11.23 (2001), R986-R996.
- [9] Terufumi Fujiwara, Margarida Brotas y M. Eugenia Chiappe. «Walking strides direct rapid and flexible recruitment of visual circuits for course control in *Drosophila*». En: *Neuron* 110 (2022), págs. 2124-2138.
- [10] Kai S. Gansel. «Neural synchrony in cortical networks: mechanisms and implications for neural information processing and coding». En: *Frontiers in Integrative Neuroscience* 16 (2022). Publisher: Frontiers. ISSN: 1662-5145. DOI: [10.3389/fnint.2022.900715](https://doi.org/10.3389/fnint.2022.900715). URL: <https://www.frontiersin.orghttps://www.frontiersin.org/journals/integrative-neuroscience/articles/10.3389/fnint.2022.900715/full>.

- frontiersin.org/journals/integrative-neuroscience/articles/10.3389/fnint.2022.900715/full.
- [11] Thilo Womelsdorf y Pascal Fries. «The role of neuronal synchronization in selective attention». En: *Current Opinion in Neurobiology*. Cognitive neuroscience 17.2 (2007), págs. 154-160. ISSN: 0959-4388. DOI: [10.1016/j.conb.2007.02.002](https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.02.002). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438807000268>.
- [12] Rufin VanRullen, Thomas Carlson y Patrick Cavanagh. «The blinking spotlight of attention». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.49 (2007). Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences, págs. 19204-19209. DOI: [10.1073/pnas.0707316104](https://doi.org/10.1073/pnas.0707316104). URL: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0707316104>.
- [13] Rufin VanRullen. «Perceptual Cycles». En: *Trends in Cognitive Sciences* 20.10 (2016). Publisher: Elsevier, págs. 723-735. ISSN: 1364-6613, 1879-307X. DOI: [10.1016/j.tics.2016.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tics.2016.07.006). URL: [https://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/abstract/S1364-6613\(16\)30104-8](https://www.cell.com/trends/cognitive-sciences/abstract/S1364-6613(16)30104-8).
- [14] Charles E. Schroeder y Peter Lakatos. «Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection». En: *Trends in Neurosciences* 32.1 (2009). Publisher: Elsevier, págs. 9-18. ISSN: 0166-2236, 1878-108X. DOI: [10.1016/j.tins.2008.09.012](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.012). URL: [https://www.cell.com/trends/neurosciences/abstract/S0166-2236\(08\)00250-6](https://www.cell.com/trends/neurosciences/abstract/S0166-2236(08)00250-6).
- [15] Matthijs Constantijn Dorst. (PDF) *Electrophysiological characterization of striatal neurons through dynamic I-V curves*. 2013. URL: https://www.researchgate.net/publication/257239930_Electrophysiological_characterization_of_striatal_neurons_through_dynamic_I-V_curves.
- [16] Robert E Kohler. *Lords of the fly: Drosophila genetics and the experimental life*. University of Chicago Press, 1994.
- [17] Barbara H. Jennings. «Drosophila – a versatile model in biology & medicine». En: *Materials Today* 14.5 (2011), págs. 190-195. ISSN: 1369-7021. DOI: [10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702111701134>.
- [18] The Nobel Prize. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933*. Accessed: 2025-05-06. 1933. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/summary/>.
- [19] The Nobel Prize. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1995*. Accessed: 2025-05-06. 1995. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1995/summary/>.

- [20] The Nobel Prize. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017*. Accessed: 2025-05-06. 2017. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2017/summary/>.
- [21] H. Kazama. «Systems neuroscience in *Drosophila*: Conceptual and technical advantages». En: *Neuroscience*. Contributions from different model organisms to brain research 296 (2015), págs. 3-14. ISSN: 0306-4522. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2014.06.035](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.035). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030645221400520X>.
- [22] Hugo J. Bellen, Chao Tong e Hiroshi Tsuda. «100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future». En: *Nature Reviews Neuroscience* 11.7 (2010). Publisher: Nature Publishing Group, págs. 514-522. ISSN: 1471-0048. DOI: [10.1038/nrn2839](https://doi.org/10.1038/nrn2839). URL: <https://www.nature.com/articles/nrn2839>.
- [23] Sven Dorkenwald et al. «Neuronal wiring diagram of an adult brain». En: *bioRxiv* (2023). DOI: [10.1101/2023.06.27.546656](https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546656). URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.06.27.546656v2>.
- [24] Y. Peng, D. Stoleru, J. D. Levine, J. C. Hall y M. Rosbash. «*Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication». En: *PLoS Biol.* 1.1 (2003), E13. ISSN: 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). DOI: [10.1371/journal.pbio.0000013](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000013). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12975658.
- [25] S. C. Renn, J. H. Park, M. Rosbash, J. C. Hall y P. H. Taghert. «A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*». En: *Cell* 99.7 (1999), págs. 791-802. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10619432.
- [26] C. Helfrich-Forster. «The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*». En: *PNAS* 92.2 (1995), págs. 612-6. ISSN: 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7831339.
- [27] C. Helfrich-Forster y U. Homberg. «Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity». En: *J. Comp. Neurol.* 337.2 (1993),

- págs. 177-90. ISSN: 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). DOI: [10.1002/cne.903370202](https://doi.org/10.1002/cne.903370202). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276996>.
- [28] K. M. Parisky et al. «PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit». En: *Neuron* 60.4 (2008), págs. 672-82. ISSN: 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). DOI: [10.1016/j.neuron.2008.10.042](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.042). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19038223.
- [29] Y. Shang, L. C. Griffith y M. Rosbash. «Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain». En: *PNAS* 105.50 (2008), págs. 19587-94. ISSN: 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19060186.
- [30] V. Sheeba, K. J. Fogle, M. Kaneko, S. Rashid, Y. T. Chou, V. K. Sharma y T. C. Holmes. «Large ventral lateral neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*». En: *Curr. Biol.* 18.20 (2008), págs. 1537-45. ISSN: 0960-9822 (Print). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18771923.
- [31] Naoto Shimada, Show Inami, Shoma Sato, Toshihiro Kitamoto y Takaomi Sakai. «Modulation of light-driven arousal by LIM-homeodomain transcription factor *Apterous* in large PDF-positive lateral neurons of the *Drosophila* brain». En: *Sci. Rep.* 6.1 (2016), pág. 37255. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep37255](https://doi.org/10.1038/srep37255). URL: <https://www.nature.com/articles/srep37255>.
- [32] B. Grima, E. Chelot, R. Xia y F. Rouyer. «Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain». En: *Nature* 431.7010 (2004), págs. 869-73. ISSN: 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). DOI: [10.1038/nature02935](https://doi.org/10.1038/nature02935). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15483616.
- [33] C. Helfrich-Forster. «Neurobiology of the fruit fly's circadian clock». En: *Genes Brain Behav.* 4.2 (2005), págs. 65-76. ISSN: 1601-1848 (Print) 1601-183X (Linking). DOI: [10.1111/j.1601-183X.2004.00092.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00092.x). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720403>.
- [34] D. Rieger, O. T. Shafer, K. Tomioka y C. Helfrich-Forster. «Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*». En: *J. Neurosci.* 26.9 (2006), págs. 2531-43. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16510731.

- [35] D. Stoleru, P. Nawathean, M. P. Fernandez, J. S. Menet, M. F. Ceriani y M. Rosbash. «The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer». En: *Cell* 129.1 (2007), págs. 207-19. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). DOI: [10.1016/j.cell.2007.02.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.038). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17418796.
- [36] F. Fernandez-Chiappe, L. Frenkel, C. C. Colque, A. Ricciuti, B. Hahn, K. Cerredo, N. I. Muraro y M. F. Ceriani. «High-Frequency Neuronal Bursting is Essential for Circadian and Sleep Behaviors in *Drosophila*». En: *J. Neurosci.* 41.4 (2021), págs. 689-710. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). DOI: [10.1523/JNEUROSCI.2322-20.2020](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2322-20.2020). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33262246>.
- [37] N. I. Muraro y M. F. Ceriani. «Acetylcholine from Visual Circuits Modulates the Activity of Arousal Neurons in *Drosophila*». En: *J. Neurosci.* 35.50 (2015), págs. 16315-27. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1571-15.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1571-15.2015). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674859>.
- [38] Min Tang et al. «An extra-clock ultradian brain oscillator sustains circadian timekeeping». En: *Sci. Adv.* 8.35 (2022), eabo5506. ISSN: 2375-2548. DOI: [10.1126/sciadv.abo5506](https://doi.org/10.1126/sciadv.abo5506).
- [39] B. Sakmann y E. Neher. «Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes». en. En: *Annual Review of Physiology* 46. Volume 46, (mar. de 1984). Publisher: Annual Reviews, págs. 455-472. ISSN: 0066-4278, 1545-1585. DOI: [10.1146/annurev.ph.46.030184.002323](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.002323). URL: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.ph.46.030184.002323> (visitado 09-04-2025).
- [40] Charlotte L. Hill y Gary J. Stephens. «An Introduction to Patch Clamp Recording». En: *Patch Clamp Electrophysiology: Methods and Protocols*. Ed. por Mark Dallas y Damian Bell. New York, NY: Springer US, 2021, págs. 1-19. ISBN: 978-1-0716-0818-0. DOI: [10.1007/978-1-0716-0818-0_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0_1). URL: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0_1.
- [41] Davide Lovisolò. «Patch Clamp: The First Four Decades of a Technique That Revolutionized Electrophysiology and Beyond». En: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Ed. por Stine Helene Falsig Pedersen. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023, págs. 1-28. ISBN: 978-3-031-25628-8. DOI: [10.1007/112_2022_71](https://doi.org/10.1007/112_2022_71). URL: https://doi.org/10.1007/112_2022_71.

- [42] M. Ruben, M. D. Drapeau, D. Mizrak y J. Blau. «A mechanism for circadian control of pacemaker neuron excitability». En: *J. Biol. Rhythms* 27.5 (2012), págs. 353-64. ISSN: 1552-4531 (Electronic) 0748-7304 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23010658.
- [43] P-O. Andersson, S. R. Bloom, A. V. Edwards y J. Jarhult. «Effects of stimulation of the chorda tympani in bursts on submaxillary responses in the cat». En: *J. Physiol.* 322 (1982), págs. 469-483. ISSN: 0022-3751. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1249683/>.
- [44] Zhiguo Chu, Maurizio Tomaiuolo, Richard Bertram y Suzanne M. Moenter. «Two types of burst firing in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurones». En: *J. Neuroendocrinol.* 24.7 (2012), págs. 1065-1077. ISSN: 0953-8194. DOI: [10.1111/j.1365-2826.2012.02313.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02313.x). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380170/>.
- [45] Tomas Hökfelt et al. «Neuropeptide and Small Transmitter Coexistence: Fundamental Studies and Relevance to Mental Illness». En: *Front. Neural Circuits* 12 (2018). ISSN: 1662-5110. DOI: [10.3389/fncir.2018.00106](https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00106). URL: <https://www.frontiersin.org/journals/neural-circuits/articles/10.3389/fncir.2018.00106/full>.
- [46] Matthijs Verhage, Harvey T. McMahon, Wim E. J. M. Ghijsen, Frans. Boomsma, Greet Scholten, Victor M. Wiegant y David G. Nicholls. «Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals». En: *Neuron* 6.4 (1991), págs. 517-524. ISSN: 0896-6273. DOI: [10.1016/0896-6273\(91\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90054-4). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0896627391900544>.
- [47] F. Fernandez-Chiappe y N. I. Muraro. «Dissection of Drosophila Adult Brains for Patch-Clamping Neurons». En: *Cold Spring Harb. Protoc.* 2022.8 (2022), pdb-prot107935. ISSN: 1559-6095 (Electronic) 1559-6095 (Linking). DOI: [10.1101/pdb.prot107935](https://doi.org/10.1101/pdb.prot107935). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35798465>.
- [48] F. Fernandez-Chiappe y N. I. Muraro. «Patch-Clamping Drosophila Brain Neurons». En: *Cold Spring Harb. Protoc.* 2022.8 (2022), pdb-prot107936. ISSN: 1559-6095 (Electronic) 1559-6095 (Linking). DOI: [10.1101/pdb.prot107936](https://doi.org/10.1101/pdb.prot107936). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35798464>.
- [49] F. Fernandez-Chiappe y N. I. Muraro. «Patch-Clamping Fly Brain Neurons». En: *Cold Spring Harb. Protoc.* 2022.8 (2022), pdb-top107796. ISSN: 1559-6095 (Electronic) 1559-6095 (Linking). DOI: [10.1101/pdb.top107796](https://doi.org/10.1101/pdb.top107796). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35798467>.

- [50] G. Cao y M. N. Nitabach. «Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons». En: *J. Neurosci.* 28.25 (2008), págs. 6493-501. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). DOI: [10.1523/JNEUROSCI.1503-08.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1503-08.2008). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18562620.
- [51] V. Sheeba, H. Gu, V. K. Sharma, D. K. O'Dowd y T. C. Holmes. «Circadian- and light-dependent regulation of resting membrane potential and spontaneous action potential firing of *Drosophila* circadian pacemaker neurons». En: *J. Neurophysiol.* 99.2 (2008), págs. 976-88. ISSN: 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). DOI: [10.1152/jn.00930.2007](https://doi.org/10.1152/jn.00930.2007). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18077664.
- [52] M. T. Li, L. H. Cao, N. Xiao, M. Tang, B. Deng, T. Yang, T. Yoshii y D. G. Luo. «Hub-organized parallel circuits of central circadian pacemaker neurons for visual photoentrainment in *Drosophila*». En: *Nat. Commun.* 9.1 (2018), pág. 4247. ISSN: 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). DOI: [10.1038/s41467-018-06506-5](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06506-5). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30315165>.
- [53] A. Luthi y D. A. McCormick. «H-current: properties of a neuronal and network pacemaker». En: *Neuron* 21.1 (1998), págs. 9-12. ISSN: 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697847>.
- [54] Eugene M. Izhikevich. *Dynamical systems in neuroscience: the geometry of excitability and bursting*. Computational neuroscience. Cambridge, Mass: MIT Press, 2007. ISBN: 978-0-262-09043-8.
- [55] A. Granada, R. M. Hennig, B. Ronacher, A. Kramer y H. Herzog. «Chapter 1 Phase Response Curves: Elucidating the Dynamics of Coupled Oscillators». En: *Methods in Enzymology*. Vol. 454. Computer Methods, Part A. Academic Press, ene. de 2009, págs. 1-27. DOI: [10.1016/S0076-6879\(08\)03801-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03801-9). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687908038019> (visitado 02-09-2024).
- [56] T. I. et al. Netoff. «Synchronization in Hybrid Neuronal Networks of the Hippocampal Formation». En: *J. Neurophysiol.* 93 (2005), págs. 1197-1208.
- [57] R. Stoop, L. A. Bunimovich y W.-H. Steeb. «Generic origins of irregular spiking in neocortical networks.» En: *Biol. Cybern.* 83 (2000), págs. 481-489.

- [58] K. M. Stiefel, B. S. Gutkin y T. J. Sejnowski. «Cholinergic Neuromodulation Changes Phase Response Curve Shape and Type in Cortical Pyramidal Neurons». En: *PLoS ONE* 3 (2008), e3947.
- [59] Timothy A. Currier, Michelle M. Pang y Thomas R. Clandinin. «Visual processing in the fly, from photoreceptors to behavior». En: *Genetics* 224.2 (2023), iyad064. ISSN: 1943-2631. DOI: [10.1093/genetics/iyad064](https://doi.org/10.1093/genetics/iyad064).
- [60] E. V. McCarthy, Y. Wu, T. Decarvalho, C. Brandt, G. Cao y M. N. Nitabach. «Synchronized bilateral synaptic inputs to *Drosophila melanogaster* neuropeptidergic rest/arousal neurons». En: *J. Neurosci.* 31.22 (2011), págs. 8181-93. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21632940.
- [61] Sten Rüdiger, Ernesto M. Nicola, Jaume Casademunt y Lorenz Kramer. «Theory of pattern forming systems under traveling-wave forcing». En: *Phys. Rep.* 447.3 (2007), págs. 73-111. ISSN: 0370-1573. DOI: [10.1016/j.physrep.2007.02.017](https://doi.org/10.1016/j.physrep.2007.02.017). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0370157307001329>.
- [62] Steven Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. Boca Raton London New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2019. ISBN: 978-0-8133-4910-7 978-0-367-09206-1.
- [63] R. Quiñan Quiroga, A. Kraskov, T. Kreuz y P. Grassberger. «Performance of different synchronization measures in real data: A case study on electroencephalographic signals». En: *Physical Review E* 65.4 (2002). Publisher: American Physical Society, pág. 041903. DOI: [10.1103/PhysRevE.65.041903](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.041903). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.65.041903>.
- [64] Na Xiao et al. «A single photoreceptor splits perception and entrainment by cotransmission». En: *Nature* 623.7987 (2023), págs. 562-570. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/s41586-023-06681-6](https://doi.org/10.1038/s41586-023-06681-6). URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06681-6>.
- [65] Yves Dunant y Victor Gisiger. «Ultrafast and Slow Cholinergic Transmission. Different Involvement of Acetylcholinesterase Molecular Forms». En: *Molecules* 22.8 (2017), pág. 1300. ISSN: 1420-3049. DOI: [10.3390/molecules22081300](https://doi.org/10.3390/molecules22081300). URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/8/1300>.
- [66] Justin S. Rosenthal, Jun Yin, Jingce Lei, Anupama Sathyamurthy, Jacob Short, Caixia Long, Emma Spillman, Chengyu Sheng y Quan Yuan. «Temporal regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunits supports central cholinergic synapse deve-

- lopment in *Drosophila*». En: *PNAS* 118.23 (2021), e2004685118. DOI: [10.1073/pnas.2004685118](https://doi.org/10.1073/pnas.2004685118). URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2004685118>.
- [67] Agata Kolodziejczyk y Dick R. Nässel. «A novel wide-field neuron with branches in the lamina of the *Drosophila* visual system expresses myoinhibitory peptide and may be associated with the clock». En: *Cell Tissue Res.* 343.2 (2011), págs. 357-369. ISSN: 1432-0878. DOI: [10.1007/s00441-010-1100-7](https://doi.org/10.1007/s00441-010-1100-7).
- [68] Bernhard Petri, Monika Stengl, Stefan Würden y Uwe Homberg. «Immunocytochemical characterization of the accessory medulla in the cockroach *Leucophaea maderae*». En: *Cell Tissue Res.* 282.1 (1995), págs. 3-19. ISSN: 1432-0878. DOI: [10.1007/BF00319128](https://doi.org/10.1007/BF00319128). URL: <https://doi.org/10.1007/BF00319128>.
- [69] Katharine C. Abruzzi, Abigail Zadina, Weifei Luo, Evelyn Wiyanto, Reazur Rahman, Fang Guo, Ori Shafer y Michael Rosbash. «RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides». En: *PLoS Genet.* 13.2 (2017), e1006613. ISSN: 1553-7404. DOI: [10.1371/journal.pgen.1006613](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006613). URL: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006613>.
- [70] György Buzsáki y Edvard I. Moser. «Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system». En: *Nat. Neurosci.* 16.2 (2013), págs. 130-138. ISSN: 1546-1726. DOI: [10.1038/nn.3304](https://doi.org/10.1038/nn.3304). URL: <https://www.nature.com/articles/nn.3304>.
- [71] G. Bard Ermentrout y David Kleinfeld. «Traveling Electrical Waves in Cortex: Insights from Phase Dynamics and Speculation on a Computational Role». En: *Neuron* 29 (2001), págs. 33-44.
- [72] Melvyn H. W. Yap, Martyna J. Grabowska, Chelsie Rohrscheib, Rhiannon Jeans, Michael Troup, Angelique C. Paulk, Bart van Alphen, Paul J. Shaw y Bruno van Swinderen. «Oscillatory brain activity in spontaneous and induced sleep stages in flies». En: *Nat. Commun.* 8.1 (2017), pág. 1815. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-017-02024-y](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02024-y).
- [73] Joshua I. Raji y Christopher J. Potter. «The number of neurons in *Drosophila* and mosquito brains». En: *PLoS ONE.* 16.5 (2021), e0250381. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0250381](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250381). URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0250381>.
- [74] Tomás L. Cruz y M. Eugenia Chiappe. «Multilevel visuomotor control of locomotion in *Drosophila*». En: *Curr Opin Neurobiol* 82 (2023), pág. 102774.

- [75] John C. Tuthill, Aljoscha Nern, Gerald M. Rubin y Michael B. Reiser. «Wide-Field Feedback Neurons Dynamically Tune Early Visual Processing». En: *Neuron* 82 (2014), págs. 887-895.
- [76] Davide Raccuglia, Sheng Huang, Anatoli Ender, M.-Marcel Heim, Desiree Laber, Raquel Suárez-Grimalt, Agustin Liotta, Stephan J. Sigrist, Jörg R. P. Geiger y David Oswald. «Network-Specific Synchronization of Electrical Slow-Wave Oscillations Regulates Sleep Drive in *Drosophila*». En: *Curr. Biol.* 29.21 (2019), 3611-3621.e3. ISSN: 1879-0445. DOI: [10.1016/j.cub.2019.08.070](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.070).
- [77] M. L. Mayer, G. L. Westbrook y P. B. Guthrie. «Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones». En: *Nature* 309.5965 (1984), págs. 261-263. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/309261a0](https://doi.org/10.1038/309261a0).
- [78] I. M. Raman y L. O. Trussell. «Concentration-jump analysis of voltage-dependent conductances activated by glutamate and kainate in neurons of the avian cochlear nucleus». En: *Biophys. J.* 69.5 (1995), págs. 1868-1879. ISSN: 0006-3495. DOI: [10.1016/S0006-3495\(95\)80057-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80057-3). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349595800573>.
- [79] Eyal Rozenfeld, Merav Tauber, Yair Ben-Chaim y Moshe Parnas. «GPCR voltage dependence controls neuronal plasticity and behavior». En: *Nat. Commun.* 12.1 (2021), pág. 7252. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-021-27593-x](https://doi.org/10.1038/s41467-021-27593-x). URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27593-x>.
- [80] Dekel David, Ziv Bentulila, Merav Tauber y Yair Ben-Chaim. «G Protein-Coupled Receptors Regulated by Membrane Potential». En: *Int. J. Mol. Sci.* 23.22 (2022), pág. 13988. ISSN: 1422-0067. DOI: [10.3390/ijms232213988](https://doi.org/10.3390/ijms232213988). URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/13988>.
- [81] M. Schlichting et al. «A Neural Network Underlying Circadian Entrainment and Photoperiodic Adjustment of Sleep and Activity in *Drosophila*». En: *J. Neurosci.* 36.35 (2016), págs. 9084-96. ISSN: 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). DOI: [10.1523/JNEUROSCI.0992-16.2016](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0992-16.2016). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581451>.
- [82] P. Emery, W. V. So, M. Kaneko, J. C. Hall y M. Rosbash. «CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity». En: *Cell* 95.5 (1998), págs. 669-79. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9845369.

- [83] P. Emery, R. Stanewsky, J. C. Hall y M. Rosbash. «A unique circadian-rhythm photoreceptor». En: *Nature* 404.6777 (2000), págs. 456-7. ISSN: 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). DOI: [10.1038/35006558](https://doi.org/10.1038/35006558). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761904>.
- [84] P. Emery, R. Stanewsky, C. Helfrich-Forster, M. Emery-Le, J. C. Hall y M. Rosbash. «Drosophila CRY is a deep brain circadian photoreceptor». En: *Neuron* 26.2 (2000), págs. 493-504. ISSN: 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839367>.
- [85] R. Stanewsky, M. Kaneko, P. Emery, B. Beretta, K. Wager-Smith, S. A. Kay, M. Rosbash y J. C. Hall. «The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila». En: *Cell* 95.5 (1998), págs. 681-92. ISSN: 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9845370.
- [86] Orië T Shafer, Gabrielle J Gutierrez, Kimberly Li, Amber Mil-denhall, Daphna Spira, Jonathan Marty, Aurel A Lazar y Maria de la Paz Fernandez. «Connectomic analysis of the Drosophila lateral neuron clock cells reveals the synaptic basis of functional pacemaker classes». En: *eLife* 11 (2022). Ed. por Claude Desplan y Charlotte Helfrich-Förster, e79139. ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.79139](https://doi.org/10.7554/eLife.79139). URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.79139>.
- [87] Catalin V. Buhusi y Warren H. Meck. «What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing». En: *Nat. Rev. Neurosci.* 6.10 (2005), págs. 755-765. ISSN: 1471-0048. DOI: [10.1038/nrn1764](https://doi.org/10.1038/nrn1764). URL: <https://www.nature.com/articles/nrn1764>.
- [88] Lucille Tallot y Valérie Doyère. «Neural encoding of time in the animal brain». En: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 115 (2020), págs. 146-163. ISSN: 0149-7634. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2019.12.033](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.033). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014976342030395X>.
- [89] Masayoshi Ikarashi e Hiromu Tanimoto. «Drosophila acquires seconds-scale rhythmic behavior». En: *J. Exp. Biol.* 224.10 (2021), jeb242443. ISSN: 1477-9145. DOI: [10.1242/jeb.242443](https://doi.org/10.1242/jeb.242443).
- [90] Christian Schröter y Andrew C. Oates. «Segment Number and Axial Identity in a Segmentation Clock Period Mutant». En: *Current Biology* 20.14 (2010). Publisher: Elsevier, págs. 1254-1258. ISSN: 0960-9822. DOI: [10.1016/j.cub.2010.05.071](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.071). URL: [https://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822\(10\)00795-5](https://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822(10)00795-5).

- [91] Christian Schröter, Leah Herrgen, Albert Cardona, Gary J. Brouhard, Benjamin Feldman y Andrew C. Oates. «Dynamics of zebra-fish somitogenesis». En: *Developmental Dynamics* 237.3 (2008), págs. 545-553. ISSN: 1097-0177. DOI: [10.1002/dvdy.21458](https://doi.org/10.1002/dvdy.21458). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dvdy.21458>.
- [92] Lewis Wolpert, Cheryll Tickle y Alfonso Martinez Arias. *Principles of Development*. Oxford University Press, 2015. 721 págs. ISBN: 978-0-19-870988-6.
- [93] Bruce Alberts. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2017. ISBN: 978-1-317-56375-4.
- [94] J. Cooke y E. C. Zeeman. «A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis». En: *Journal of Theoretical Biology* 58.2 (1976), págs. 455-476. ISSN: 0022-5193. DOI: [10.1016/s0022-5193\(76\)80131-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(76)80131-2).
- [95] Céline Gomez, Ertuğrul M. Özbudak, Joshua Wunderlich, Diana Baumann, Julian Lewis y Olivier Pourquié. «Control of segment number in vertebrate embryos». En: *Nature* 454.7202 (2008). Publisher: Nature Publishing Group, págs. 335-339. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature07020](https://doi.org/10.1038/nature07020). URL: <https://www.nature.com/articles/nature07020>.
- [96] Pranav S. Ramesh y Li-Fang Chu. «Species-specific roles of the Notch ligands, receptors, and targets orchestrating the signaling landscape of the segmentation clock». En: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (2024). Publisher: Frontiers. ISSN: 2296-634X. DOI: [10.3389/fcell.2023.1327227](https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1327227). URL: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2023.1327227/full>.
- [97] I. Palmeirim, D. Henrique, D. Ish-Horowicz y O. Pourquié. «Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis». En: *Cell* 91.5 (1997), págs. 639-648. ISSN: 0092-8674. DOI: [10.1016/s0092-8674\(00\)80451-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80451-1).
- [98] David G Wilkinson. «The theory and practice of in situ hybridization». En: *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. Ed. por D G Wilkinson. Oxford University Press, 1998, pág. 0. ISBN: 978-0-19-963659-4. DOI: [10.1093/oso/9780199636594.003.0001](https://doi.org/10.1093/oso/9780199636594.003.0001). URL: <https://doi.org/10.1093/oso/9780199636594.003.0001>.
- [99] Christian Schröter et al. «Topology and Dynamics of the Zebra-fish Segmentation Clock Core Circuit». En: *PLoS Biology* 10.7 (2012). Ed. por Kate G. Storey, e1001364. ISSN: 1545-7885. DOI:

- 10.1371/journal.pbio.1001364. URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001364>.
- [100] Daniele Soroldoni, David J. Jörg, Luis G. Morelli, David L. Richmond, Johannes Schindelin, Frank Jülicher y Andrew C. Oates. «A Doppler effect in embryonic pattern formation». En: *Science* 345.6193 (2014), págs. 222-225. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1253089. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1253089>.
- [101] Daniele Soroldoni y Andrew C Oates. «Live transgenic reporters of the vertebrate embryo's Segmentation Clock». En: *Current Opinion in Genetics & Development*. Developmental mechanisms, patterning and evolution 21.5 (2011), págs. 600-605. ISSN: 0959-437X. DOI: 10.1016/j.gde.2011.09.006. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X11001419>.
- [102] Emilie A. Delaune, Paul François, Nathan P. Shih y Sharon L. Amacher. «Single-Cell-Resolution Imaging of the Impact of Notch Signaling and Mitosis on Segmentation Clock Dynamics». En: *Developmental Cell* 23.5 (2012), págs. 995-1005. ISSN: 15345807. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.09.009. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580712004200>.
- [103] Andrew C. Oates, Luis G. Morelli y Saúl Ares. «Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock». En: *Development* 139.4 (2012), págs. 625-639. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.063735. URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/139/4/625/45506/Patterning-embryos-with-oscillations-structure>.
- [104] Hiromi Shimojo y Ryoichiro Kageyama. «Oscillatory control of Delta-like1 in somitogenesis and neurogenesis: A unified model for different oscillatory dynamics». En: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Bone development and disease 49 (2016), págs. 76-82. ISSN: 1084-9521. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.01.017. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116300179>.
- [105] Olivier Pourquié. «A brief history of the segmentation clock». En: *Developmental Biology* 485 (2022), págs. 24-36. ISSN: 0012-1606. DOI: 10.1016/j.ydbio.2022.02.011. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160622000331>.
- [106] Olivier F. Venzin y Andrew C. Oates. «What are you synching about? Emerging complexity of Notch signaling in the segmentation clock». En: *Developmental Biology* 460.1 (2020), págs. 40-54. ISSN: 00121606. DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.06.024. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160618304445>.

- [107] Yun-Jin Jiang, Birgit L. Aerne, Lucy Smithers, Catherine Haddon, David Ish-Horowicz y Julian Lewis. «Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock». En: *Nature* 408.6811 (2000), págs. 475-479. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. DOI: [10.1038/35044091](https://doi.org/10.1038/35044091). URL: <http://www.nature.com/articles/35044091>.
- [108] Kazuki Horikawa, Kana Ishimatsu, Eiichi Yoshimoto, Shigeru Kondo e Hiroyuki Takeda. «Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock». En: *Nature* 441.7094 (2006), págs. 719-723. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/nature04861](https://doi.org/10.1038/nature04861). URL: <https://www.nature.com/articles/nature04861>.
- [109] Ingmar H. Riedel-Kruse, Claudia Müller y Andrew C. Oates. «Synchrony Dynamics During Initiation, Failure, and Rescue of the Segmentation Clock». En: *Science* 317.5846 (2007), págs. 1911-1915. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1142538](https://doi.org/10.1126/science.1142538). URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1142538>.
- [110] Lola Bajard, Luis G. Morelli, Saúl Ares, Jacques Pécrciaux, Frank Jülicher y Andrew C. Oates. «Wnt-regulated dynamics of positional information in zebrafish somitogenesis». En: *Development (Cambridge, England)* 141.6 (2014), págs. 1381-1391. ISSN: 1477-9129. DOI: [10.1242/dev.093435](https://doi.org/10.1242/dev.093435).
- [111] J. Dubrulle, M. J. McGrew y O. Pourquié. «FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation». En: *Cell* 106.2 (2001), págs. 219-232. ISSN: 0092-8674. DOI: [10.1016/S0092-8674\(01\)00437-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00437-8).
- [112] Koichiro Uriu, Yoshihiro Morishita y Yoh Iwasa. «Random cell movement promotes synchronization of the segmentation clock». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.11 (2010), págs. 4979-4984. DOI: [10.1073/pnas.0907122107](https://doi.org/10.1073/pnas.0907122107). URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0907122107>.
- [113] Koichiro Uriu, Saúl Ares, Andrew C. Oates y Luis G. Morelli. «Dynamics of mobile coupled phase oscillators». En: *Physical Review E* 87.3 (2013), pág. 032911. DOI: [10.1103/PhysRevE.87.032911](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.87.032911). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.87.032911>.
- [114] Bo-Kai Liao, David J. Jörg y Andrew C. Oates. «Faster embryonic segmentation through elevated Delta-Notch signalling». En: *Nature Communications* 7.1 (2016), pág. 11861. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms11861](https://doi.org/10.1038/ncomms11861). URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms11861>.

- [115] Emma R. Andersson, Rickard Sandberg y Urban Lendahl. «Notch signaling: simplicity in design, versatility in function». En: *Development* 138.17 (2011), págs. 3593-3612. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.063610](https://doi.org/10.1242/dev.063610). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.063610>.
- [116] K. G. Guruharsha, Mark W. Kankel y Spyros Artavanis-Tsakonas. «The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway». En: *Nature Reviews Genetics* 13.9 (2012), págs. 654-666. ISSN: 1471-0064. DOI: [10.1038/nrg3272](https://doi.org/10.1038/nrg3272). URL: <https://www.nature.com/articles/nrg3272>.
- [117] Domingos Henrique y François Schweisguth. «Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space». En: *Development* 146.3 (2019), dev172148. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.172148](https://doi.org/10.1242/dev.172148). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.172148>.
- [118] Nalani Sachan, Vartika Sharma, Mousumi Mutsuddi y Ashim Mukherjee. «Notch signalling: multifaceted role in development and disease». En: *The FEBS Journal* n/a.n/a (2023). ISSN: 1742-4658. DOI: [10.1111/febs.16815](https://doi.org/10.1111/febs.16815). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.16815>.
- [119] Hiromi Shimojo, Toshiyuki Ohtsuka y Ryoichiro Kageyama. «Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors». En: *Neuron* 58.1 (2008), págs. 52-64. ISSN: 0896-6273. DOI: [10.1016/j.neuron.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.014). URL: [https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273\(08\)00166-9](https://www.cell.com/neuron/abstract/S0896-6273(08)00166-9).
- [120] Runrui Zhang, Anna Engler y Verdon Taylor. «Notch: an interactive player in neurogenesis and disease». En: *Cell and Tissue Research* 371.1 (2018), págs. 73-89. ISSN: 1432-0878. DOI: [10.1007/s00441-017-2641-9](https://doi.org/10.1007/s00441-017-2641-9). URL: <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2641-9>.
- [121] Miho Matsuda y Ajay B. Chitnis. «Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue». En: *Development* 136.2 (ene. de 2009), págs. 197-206. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.027938](https://doi.org/10.1242/dev.027938). URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/136/2/197/65398/Interaction-with-Notch-determines-endocytosis-of> (visitado 25-11-2024).
- [122] Pau Formosa-Jordan, Marta Ibañes, Saúl Ares y José María Frade. «Regulation of neuronal differentiation at the neurogenic wavefront». En: *Development* 139.13 (2012), págs. 2321-2329. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.076406](https://doi.org/10.1242/dev.076406). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.076406>.

- [123] Philip Allan Seymour, Caitlin Alexis Collin, Anuska la Rosa Egeskov-Madsen, Mette Christine Jørgensen, Hiromi Shimojo, Itaru Imayoshi, Kristian Honnens de Lichtenberg, Raphael Kopan, Ryoichiro Kageyama y Palle Serup. «Jag1 Modulates an Oscillatory Dll1-Notch-Hes1 Signaling Module to Coordinate Growth and Fate of Pancreatic Progenitors». En: *Developmental Cell* 52.6 (2020), 731-747.e8. ISSN: 1534-5807. DOI: [10.1016/j.devcel.2020.01.015](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.015). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580720300162>.
- [124] Ashutosh P. Jadhav, Seo-Hee Cho y Constance L. Cepko. «Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.50 (2006), págs. 18998-19003. DOI: [10.1073/pnas.0608155103](https://doi.org/10.1073/pnas.0608155103). URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0608155103>.
- [125] Elizabeth A. Mills y Daniel Goldman. «The Regulation of Notch Signaling in Retinal Development and Regeneration». En: *Current pathobiology reports* 5.4 (2017), págs. 323-331. ISSN: 2167-485X. DOI: [10.1007/s40139-017-0153-7](https://doi.org/10.1007/s40139-017-0153-7). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5772988/>.
- [126] Laure Mancini et al. «Apical size and deltaA expression predict adult neural stem cell decisions along lineage progression». En: *Science Advances* 9.35 (2023), eadg7519. DOI: [10.1126/sciadv.adg7519](https://doi.org/10.1126/sciadv.adg7519). URL: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.adg7519>.
- [127] D. Blanco-Obregon, M. J. Katz, L. Durrieu, L. Gándara y P. Wappner. «Context-specific functions of Notch in *Drosophila* blood cell progenitors». En: *Developmental Biology* 462.1 (2020), págs. 101-115. ISSN: 0012-1606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2020.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.03.018). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160620301068>.
- [128] Junying Gao, Lixia Fan, Long Zhao y Ying Su. «The interaction of Notch and Wnt signaling pathways in vertebrate regeneration». En: *Cell Regeneration* 10 (2021). DOI: [10.1186/s13619-020-00072-2](https://doi.org/10.1186/s13619-020-00072-2). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8012441/>.
- [129] Susanne C. van den Brink et al. «Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids». En: *Nature* 582.7812 (2020), págs. 405-409. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/s41586-020-2024-3](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2024-3). URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2024-3>.
- [130] Naomi Moris, Kerim Anlas, Susanne C. van den Brink, Anna Alemany, Julia Schröder, Sabitri Ghimire, Tina Balayo, Alexander van Oudenaarden y Alfonso Martinez Arias. «An in vitro

- model of early anteroposterior organization during human development». En: *Nature* 582.7812 (2020), págs. 410-415. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/s41586-020-2383-9](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9). URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2383-9>.
- [131] Moritz Hofer y Matthias P. Lutolf. «Engineering organoids». En: *Nature Reviews Materials* 6.5 (2021), págs. 402-420. ISSN: 2058-8437. DOI: [10.1038/s41578-021-00279-y](https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y). URL: <https://www.nature.com/articles/s41578-021-00279-y>.
- [132] Alexis B Webb, Iván M Lengyel, David J Jörg, Guillaume Valentin, Frank Jülicher, Luis G Morelli y Andrew C Oates. «Persistence, period and precision of autonomous cellular oscillators from the zebrafish segmentation clock». En: *eLife* 5 (2016), e08438. ISSN: 2050-084X. DOI: [10.7554/eLife.08438](https://doi.org/10.7554/eLife.08438). URL: <https://elifesciences.org/articles/08438>.
- [133] Julian Lewis. «Autoinhibition with Transcriptional Delay: A Simple Mechanism for the Zebrafish Somatogenesis Oscillator». En: *Current Biology* 13.16 (2003), págs. 1398-1408. DOI: [10.1016/S0960-9822\(03\)00534-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00534-7).
- [134] Nicholas A. M. Monk. «Oscillatory expression of Hes1, p53, and NF-kappaB driven by transcriptional time delays». En: *Current biology: CB* 13.16 (2003), págs. 1409-1413. ISSN: 0960-9822. DOI: [10.1016/S0960-9822\(03\)00494-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00494-9).
- [135] M.H Jensen, K Sneppen y G Tiana. «Sustained oscillations and time delays in gene expression of protein Hes1». En: *FEBS Letters* 541.1 (2003), págs. 176-177. ISSN: 00145793. DOI: [10.1016/S0014-5793\(03\)00279-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00279-5). URL: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2803%2900279-5>.
- [136] Anna Trofka, Jamie Schwendinger-Schreck, Tim Brend, William Pontius, Thierry Emonet y Scott A. Holley. «The Her7 node modulates the network topology of the zebrafish segmentation clock via sequestration of the Hes6 hub». En: *Development* 139.5 (2012), págs. 940-947. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.073544](https://doi.org/10.1242/dev.073544). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.073544>.
- [137] Kazuya Hori, Anindya Sen y Spyros Artavanis-Tsakonas. «Notch signaling at a glance». En: *Journal of Cell Science* 126.10 (mayo de 2013), págs. 2135-2140. ISSN: 0021-9533. DOI: [10.1242/jcs.127308](https://doi.org/10.1242/jcs.127308). URL: <https://doi.org/10.1242/jcs.127308> (visitado 04-12-2024).
- [138] Raphael Kopan y Ma Xenia G. Ilagan. «The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism». En: *Cell* 137.2 (2009), págs. 216-233. ISSN: 0092-8674, 1097-4172. DOI: [10.1016/j.cell.2009.03.045](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045). URL: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(09\)00382-1](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(09)00382-1).

- [139] Fredericus J. M. van Eeden et al. «Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*». En: *Development* 123.1 (1996), págs. 153-164. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.123.1.153](https://doi.org/10.1242/dev.123.1.153). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.153>.
- [140] Scott A. Holley, Dörthe Jülich, Gerd-Jörg Rauch, Robert Geisler y Christiane Nüsslein-Volhard. «her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis». En: *Development* 129.5 (2002), págs. 1175-1183. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.129.5.1175](https://doi.org/10.1242/dev.129.5.1175). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.129.5.1175>.
- [141] Dörthe Jülich, Chiaw Hwee Lim, Jennifer Round, Claudia Nicolaije, Joshua Schroeder, Alexander Davies, Robert Geisler, Julian Lewis, Yun-Jin Jiang y Scott A. Holley. «beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation». En: *Developmental Biology* 286.2 (2005), págs. 391-404. ISSN: 0012-1606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2005.06.040](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.040). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160605004446>.
- [142] Andrew C. Oates y Robert K. Ho. «Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish». En: *Development* 129.12 (2002), págs. 2929-2946. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.129.12.2929](https://doi.org/10.1242/dev.129.12.2929). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.129.12.2929>.
- [143] Stefan Hans y José A. Campos-Ortega. «On the organisation of the regulatory region of the zebrafish deltaD gene». En: *Development* 129.20 (2002), págs. 4773-4784. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.129.20.4773](https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4773). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4773>.
- [144] Gavin J. Wright, François Giudicelli, Cristian Soza-Ried, Anja Hanisch, Linda Ariza-McNaughton y Julian Lewis. «DeltaC and DeltaD interact as Notch ligands in the zebrafish segmentation clock». En: *Development* 138.14 (2011), págs. 2947-2956. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.066654](https://doi.org/10.1242/dev.066654). URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/138/14/2947/44564/DeltaC-and-DeltaD-interact-as-Notch-ligands-in-the>.
- [145] Luis G. Morelli, Saúl Ares, Leah Herrgen, Christian Schröter, Frank Jülicher y Andrew C. Oates. «Delayed coupling theory of vertebrate segmentation». En: *HFSP Journal* 3.1 (2009), págs. 55-66. ISSN: 1955-2068. DOI: [10.2976/1.3027088](https://doi.org/10.2976/1.3027088). URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2976/1.3027088>.

- [146] Leah Herrgen, Saúl Ares, Luis G. Morelli, Christian Schröter, Frank Jülicher y Andrew C. Oates. «Intercellular Coupling Regulates the Period of the Segmentation Clock». En: *Current Biology* 20.14 (2010), págs. 1244-1253. ISSN: 09609822. DOI: [10.1016/j.cub.2010.06.034](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.034). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210007815>.
- [147] Saúl Ares, Luis G. Morelli, David J. Jörg, Andrew C. Oates y Frank Jülicher. «Collective Modes of Coupled Phase Oscillators with Delayed Coupling». En: *Physical Review Letters* 108.20 (2012), pág. 204101. ISSN: 0031-9007, 1079-7114. DOI: [10.1103/PhysRevLett.108.204101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.108.204101). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.108.204101>.
- [148] Philip J. Murray, Philip K. Maini y Ruth E. Baker. «Modelling Delta-Notch perturbations during zebrafish somitogenesis». En: *Developmental Biology* 373.2 (2013), págs. 407-421. ISSN: 0012-1606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2012.10.014](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.014). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160612005714>.
- [149] Gregory Roth, Georgios Misailidis, Maria Pappa, Jacqueline Ferralli y Charisios D. Tsiairis. «Unidirectional and phase-gated signaling synchronizes murine presomitic mesoderm cells». En: *Developmental Cell* 58.11 (2023), 967-980.e4. ISSN: 1534-5807. DOI: [10.1016/j.devcel.2023.04.002](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.04.002). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580723001557>.
- [150] Christine Ho, Laurent Jutras-Dubé, Michael Zhao, Gregor Mönke, István Z. Kiss, Paul François y Alexander Aulehla. *Nonreciprocal synchronization in embryonic oscillator ensembles*. 2024. DOI: [10.1101/2024.01.29.577856](https://doi.org/10.1101/2024.01.29.577856). URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.01.29.577856v1>.
- [151] Benjamin Pfeuty. «Multistability and transitions between spatiotemporal patterns through versatile Notch-Hes signaling». En: *Journal of Theoretical Biology* 539 (2022), pág. 111060. ISSN: 0022-5193. DOI: [10.1016/j.jtbi.2022.111060](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2022.111060). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519322000583>.
- [152] David J. Jörg, Luis G. Morelli y Frank Jülicher. «Chemical event chain model of coupled genetic oscillators». En: *Physical Review E* 97.3 (2018), pág. 032409. ISSN: 2470-0045, 2470-0053. DOI: [10.1103/PhysRevE.97.032409](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.97.032409). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.97.032409>.
- [153] Alexis Hubaud, Ido Regev, L. Mahadevan y Olivier Pourquié. «Excitable Dynamics and Yap-Dependent Mechanical Cues Drive the Segmentation Clock». En: *Cell* 171.3 (2017), 668-682.e11. ISSN: 0092-8674, 1097-4172. DOI: [10.1016/j.cell.2017.08.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.043). URL: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(17\)31001-2](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(17)31001-2).

- [154] Yue Ma y Kenichi Yoshikawa. «Self-sustained collective oscillation generated in an array of nonoscillatory cells». En: *Physical Review E* 79.4 (2009), pág. 046217. DOI: [10.1103/PhysRevE.79.046217](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.79.046217). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.79.046217>.
- [155] Yoshito Masamizu, Toshiyuki Ohtsuka, Yoshiki Takashima, Hiroki Nagahara, Yoshiko Takenaka, Kenichi Yoshikawa, Hitoshi Okamura y Ryoichiro Kageyama. «Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.5 (2006), págs. 1313-1318. DOI: [10.1073/pnas.0508658103](https://doi.org/10.1073/pnas.0508658103). URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0508658103>.
- [156] Koichiro Uriu, Yoshihiro Morishita y Yoh Iwasa. «Synchronized oscillation of the segmentation clock gene in vertebrate development». En: *Journal of Mathematical Biology* 61.2 (2010), págs. 207-229. ISSN: 1432-1416. DOI: [10.1007/s00285-009-0296-1](https://doi.org/10.1007/s00285-009-0296-1). URL: <https://doi.org/10.1007/s00285-009-0296-1>.
- [157] Ahmet Ay, Stephan Knierer, Adriana Sperlea, Jack Holland y Ertuğrul M. Özbudak. «Short-lived Her proteins drive robust synchronized oscillations in the zebrafish segmentation clock». En: *Development* 140.15 (2013), págs. 3244-3253. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.093278](https://doi.org/10.1242/dev.093278). URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/140/15/3244/45848/Short-lived-Her-proteins-drive-robust-synchronized>.
- [158] Hendrik B. Tiedemann, Elida Schneltzer, Stefan Zeiser, Wolfgang Wurst, Johannes Beckers, Gerhard K. H. Przemeck y Martin Hrabě de Angelis. «Fast Synchronization of Ultradian Oscillators Controlled by Delta-Notch Signaling with Cis-Inhibition». En: *PLOS Computational Biology* 10.10 (2014), e1003843. ISSN: 1553-7358. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1003843](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003843). URL: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003843>.
- [159] Olivier Cinquin. «Is the somitogenesis clock really cell-autonomous? A coupled-oscillator model of segmentation». En: *Journal of Theoretical Biology* 224.4 (2003), págs. 459-468. ISSN: 0022-5193. DOI: [10.1016/S0022-5193\(03\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00193-0). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519303001930>.
- [160] Koichiro Uriu, Yoshihiro Morishita y Yoh Iwasa. «Traveling wave formation in vertebrate segmentation». En: *Journal of Theoretical Biology* 257.3 (2009), págs. 385-396. ISSN: 0022-5193. DOI: [10.1016/j.jtbi.2009.01.003](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.01.003). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002251930900006X>.

- [161] Ahmet Ay, Jack Holland, Adriana Sperlea, Gnanapackiam Sheela Devakanmalai, Stephan Knierer, Sebastian Sangervasi, Angel Stevenson y Ertuğrul M. Özbudak. «Spatial gradients of protein-level time delays set the pace of the traveling segmentation clock waves». En: *Development* 141.21 (2014), págs. 4158-4167. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.111930](https://doi.org/10.1242/dev.111930). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.111930>.
- [162] James Keener, James Sneyd, S.S. Antman, J.E. Marsden y L. Sirovich, eds. *Mathematical Physiology*. Vol. 8/1. Interdisciplinary Applied Mathematics. New York, NY: Springer, 2009. ISBN: 978-0-387-75846-6 978-0-387-75847-3. DOI: [10.1007/978-0-387-75847-3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75847-3). URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-75847-3> (visitado 08-05-2025).
- [163] Norman MacDonald. «Introduction». En: *Time Lags in Biological Models*. Ed. por Norman MacDonald. Berlin, Heidelberg: Springer, 1978, págs. 1-12. ISBN: 978-3-642-93107-9. DOI: [10.1007/978-3-642-93107-9_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-93107-9_1). URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-93107-9_1.
- [164] Iván M. Lengyel, Daniele Soroldoni, Andrew C. Oates y Luis G. Morelli. «Nonlinearity arising from noncooperative transcription factor binding enhances negative feedback and promotes genetic oscillations». En: *Papers in Physics* 6 (2014), pág. 060012. ISSN: 1852-4249. DOI: [10.4279/pip.060012](https://doi.org/10.4279/pip.060012). URL: <https://www.papersinphysics.org/papersinphysics/article/view/206>.
- [165] Iván M. Lengyel y Luis G. Morelli. «Multiple binding sites for transcriptional repressors can produce regular bursting and enhance noise suppression». En: *Physical Review E* 95.4 (2017), pág. 042412. DOI: [10.1103/PhysRevE.95.042412](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.95.042412). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.95.042412>.
- [166] Germán A. Enciso. «Multisite Mechanisms for Ultrasensitivity in Signal Transduction». En: *Nonautonomous Dynamical Systems in the Life Sciences*. Ed. por Peter E. Kloeden y Christian Pötzsche. Cham: Springer International Publishing, 2013, págs. 199-224. ISBN: 978-3-319-03080-7. DOI: [10.1007/978-3-319-03080-7_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03080-7_6). URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-03080-7_6.
- [167] R. Kageyama y S. Nakanishi. «Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system». En: *Current Opinion in Genetics & Development* 7.5 (1997), págs. 659-665. ISSN: 0959-437X. DOI: [10.1016/s0959-437x\(97\)80014-7](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(97)80014-7).
- [168] A. Fisher y M. Caudy. «The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions». En: *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20.4 (1998), págs. 298-306. ISSN: 0265-9247. DOI: [10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199804\)20:4<298::AID-BIES6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199804)20:4<298::AID-BIES6>3.0.CO;2-M).

- [169] Ertuğrul M Özbudak y Julian Lewis. «Notch Signalling Synchronizes the Zebrafish Segmentation Clock but Is Not Needed To Create Somite Boundaries». En: *PLoS Genetics* 4.2 (2008). Ed. por Mary Mullins, e15. ISSN: 1553-7404. DOI: [10.1371/journal.pgen.0040015](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040015). URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.0040015>.
- [170] Michael C. Mackey y Leon Glass. «Oscillation and Chaos in Physiological Control Systems». En: *Science* 197.4300 (1977), págs. 287-289. DOI: [10.1126/science.267326](https://doi.org/10.1126/science.267326). URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.267326>.
- [171] Luis G. Morelli y Frank Jülicher. «Precision of Genetic Oscillators and Clocks». En: *Physical Review Letters* 98.22 (2007), pág. 228101. DOI: [10.1103/PhysRevLett.98.228101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.228101). URL: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.98.228101>.
- [172] Béla Novák y John J. Tyson. «Design principles of biochemical oscillators». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9.12 (2008), págs. 981-991. ISSN: 1471-0072, 1471-0080. DOI: [10.1038/nrm2530](https://doi.org/10.1038/nrm2530). URL: <http://www.nature.com/articles/nrm2530>.
- [173] Koichiro Uriu, Rajasekaran Bhavna, Andrew C. Oates y Luis G. Morelli. «A framework for quantification and physical modeling of cell mixing applied to oscillator synchronization in vertebrate somitogenesis». En: *Biology Open* 6.8 (2017), págs. 1235-1244. ISSN: 2046-6390. DOI: [10.1242/bio.025148](https://doi.org/10.1242/bio.025148). URL: <https://doi.org/10.1242/bio.025148>.
- [174] Eslim Esra Alpay, Oriana Q. H. Zinani, Xiyan Hu, Ahmet Ay y Ertuğrul M. Özbudak. «DeltaC and DeltaD ligands play different roles in the segmentation clock dynamics». en. En: *Nature Communications* 16.1 (mar. de 2025). Publisher: Nature Publishing Group, pág. 2413. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-025-57645-5](https://doi.org/10.1038/s41467-025-57645-5). URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-025-57645-5> (visitado 14-03-2025).
- [175] Anja Hanisch, Maxine V. Holder, Suma Choorapoikayil, Martin Gajewski, Ertuğrul M. Özbudak y Julian Lewis. «The elongation rate of RNA polymerase II in zebrafish and its significance in the somite segmentation clock». En: *Development* 140.2 (2013), págs. 444-453. ISSN: 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.077230](https://doi.org/10.1242/dev.077230). URL: <https://doi.org/10.1242/dev.077230>.
- [176] Daipeng Chen, Zary Forghany, Xinxin Liu, Haijiang Wang, Roeland M. H. Merks y David A. Baker. «A new model of Notch signalling: Control of Notch receptor cis-inhibition via Notch ligand dimers». En: *PLOS Computational Biology* 19.1 (2023), e1010169. ISSN: 1553-734X. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1010169](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010169). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9891537/>.

- [177] David Sprinzak, Amit Lakhanpal, Lauren LeBon, Jordi Garcia-Ojalvo y Michael B. Elowitz. «Mutual Inactivation of Notch Receptors and Ligands Facilitates Developmental Patterning». en. En: *PLOS Computational Biology* 7.6 (jun. de 2011). Publisher: Public Library of Science, e1002069. ISSN: 1553-7358. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002069](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002069). URL: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1002069> (visitado 21-04-2025).
- [178] Yoshiki Kuramoto. «Self-entrainment of a population of coupled non-linear oscillators». en. En: *International Symposium on Mathematical Problems in Theoretical Physics*. Ed. por Huzihiro Araki. Berlin, Heidelberg: Springer, 1975, págs. 420-422. ISBN: 978-3-540-37509-8. DOI: [10.1007/BFb0013365](https://doi.org/10.1007/BFb0013365).
- [179] Steven H. Strogatz. «From Kuramoto to Crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators». En: *Physica D: Nonlinear Phenomena* 143.1 (2000), págs. 1-20. ISSN: 0167-2789. DOI: [10.1016/S0167-2789\(00\)00094-4](https://doi.org/10.1016/S0167-2789(00)00094-4). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167278900000944>.
- [180] Arkady Pikovsky, Michael Rosenblum y Jürgen Kurths. *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Sciences*. Cambridge University Press, 2001-10-18. 435 págs. ISBN: 978-0-521-59285-7.
- [181] Pauli Vijaykumar y et al. «SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python». En: *Nature Methods* 17.3 (2020), págs. 261-272. ISSN: 1548-7091, 1548-7105. DOI: [10.1038/s41592-019-0686-2](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2). URL: <https://www.nature.com/articles/s41592-019-0686-2>.
- [182] Peter Dornseifer, Christina Takke y José A Campos-Ortega. «Overexpression of a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* perturbs differentiation of primary neurons and somite development». En: *Mechanisms of Development* 63.2 (1997), págs. 159-171. ISSN: 0925-4773. DOI: [10.1016/S0925-4773\(97\)00037-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00037-3). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477397000373>.
- [183] Olivier F. Venzin, Chloé Jollivet, Nicolas Chiaruttini, Olga Rossopoff, Clément Helsen, Luis G. Morelli, Koichiro Uriu y Andrew C. Oates. «Clock driven waves of *Tbx6* expression prefigure somite boundaries». En: *bioRxiv* (2023), pág. 2023.11.09.566373. DOI: [10.1101/2023.11.09.566373](https://doi.org/10.1101/2023.11.09.566373). URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.09.566373v1>.
- [184] Andrew C. Oates, Claudia Mueller y Robert K. Ho. «Cooperative function of *deltaC* and *her7* in anterior segment formation». En: *Developmental Biology* 280.1 (2005), págs. 133-149.

- ISSN: 00121606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2005.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.010). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160605000370>.
- [185] J. Westin y M. Lardelli. «Three novel Notch genes in zebrafish: implications for vertebrate Notch gene evolution and function». En: *Development Genes and Evolution* 207.1 (1997), págs. 51-63. ISSN: 0949-944X. DOI: [10.1007/s004270050091](https://doi.org/10.1007/s004270050091).
- [186] Spyros Artavanis-Tsakonas, Matthew D. Rand y Robert J. Lake. «Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development». En: *Science* 284.5415 (1999), págs. 770-776. DOI: [10.1126/science.284.5415.770](https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770). URL: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.284.5415.770>.
- [187] Ena Ladi, James T. Nichols, Weihong Ge, Alison Miyamoto, Christine Yao, Liang-Tung Yang, Jim Boulter, Yi E. Sun, Chris Kintner y Gerry Weinmaster. «The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands». En: *Journal of Cell Biology* 170.6 (sep. de 2005), págs. 983-992. ISSN: 0021-9525. DOI: [10.1083/jcb.200503113](https://doi.org/10.1083/jcb.200503113). URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.200503113> (visitado 02-05-2025).
- [188] Matthew S. Bochter, Dustin Servello, Shinako Kakuda, Rachel D'Amico, Meaghan F. Ebetino, Robert S. Haltiwanger y Susan E. Cole. «*Lfng* and *Dll3* cooperate to modulate protein interactions in *cis* and coordinate oscillatory Notch pathway activation in the segmentation clock». En: *Developmental Biology* 487 (jul. de 2022), págs. 42-56. ISSN: 0012-1606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2022.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.04.004). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160622000653> (visitado 29-11-2024).
- [189] Alliance of Genome Resources Consortium. «Alliance of Genome Resources Portal: unified model organism research platform». En: *Nucleic Acids Research* 48.D1 (2020), págs. D650-D658. DOI: [10.1093/nar/gkz813](https://doi.org/10.1093/nar/gkz813). URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz813>.
- [190] Derek G. Howe, Yvonne M. Bradford, Travis Conlin et al. «ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: updates and new directions». En: *Nucleic Acids Research* 41.D1 (2013), págs. D854-D860. DOI: [10.1093/nar/gks938](https://doi.org/10.1093/nar/gks938). URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gks938>.
- [191] Huaiyu Mi, Anushya Muruganujan, Dustin Ebert, Xiaosong Huang y Paul D. Thomas. «PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools». En: *Nucleic Acids Research* 47.D1 (2019), págs. D419-D426. DOI: [10.1093/nar/gky1038](https://doi.org/10.1093/nar/gky1038). URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1038>.

- [192] Robert A. Bone, Charlotte S. L. Bailey, Guy Wiedermann, Zoltan Ferjentsik, Paul L. Appleton, Philip J. Murray, Miguel Maroto y J. Kim Dale. «Spatiotemporal oscillations of Notch1, Dll1 and NICD are coordinated across the mouse PSM». en: *Development* 141.24 (dic. de 2014), págs. 4806-4816. ISSN: 1477-9129, 0950-1991. DOI: [10.1242/dev.115535](https://doi.org/10.1242/dev.115535). URL: <https://journals.biologists.com/dev/article/141/24/4806/46568/Spatiotemporal-oscillations-of-Notch1-Dll1-and> (visitado 28-02-2023).
- [193] Mary-Lee Dequéant, Earl Glynn, Karin Gaudenz, Matthias Wahl, Jie Chen, Arcady Mushegian y Olivier Pourquié. «A Complex Oscillating Network of Signaling Genes Underlies the Mouse Segmentation Clock». En: *Science* 314.5805 (dic. de 2006). Publisher: American Association for the Advancement of Science, págs. 1595-1598. DOI: [10.1126/science.1133141](https://doi.org/10.1126/science.1133141). URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1133141> (visitado 02-05-2025).
- [194] David Sprinzak, Amit Lakhanpal, Lauren LeBon, Leah A. Santat, Michelle E. Fontes, Graham A. Anderson, Jordi Garcia-Ojalvo y Michael B. Elowitz. «Cis Interactions between Notch and Delta Generate Mutually Exclusive Signaling States». En: *Nature* 465.7294 (2010), págs. 86-90. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/nature08959](https://doi.org/10.1038/nature08959). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886601/>.
- [195] Marcelo Boareto, Mohit Kumar Jolly, Mingyang Lu, José N. Onuchic, Cecilia Clementi y Eshel Ben-Jacob. «Jagged-Delta asymmetry in Notch signaling can give rise to a Sender/Receiver hybrid phenotype». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.5 (2015), E402-E409. DOI: [10.1073/pnas.1416287112](https://doi.org/10.1073/pnas.1416287112). URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1416287112>.
- [196] Marcelo Boareto, Mohit Kumar Jolly, Aaron Goldman, Mika Pietilä, Sendurai A. Mani, Shiladitya Sengupta, Eshel Ben-Jacob, Herbert Levine y Jose' N. Onuchic. «Notch-Jagged signalling can give rise to clusters of cells exhibiting a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype». En: *Journal of The Royal Society Interface* 13.118 (2016), pág. 20151106. DOI: [10.1098/rsif.2015.1106](https://doi.org/10.1098/rsif.2015.1106). URL: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2015.1106>.
- [197] Ma. Xenia G. Ilagan y Raphael Kopan. «SnapShot: Notch Signaling Pathway». En: *Cell* 128.6 (mar. de 2007), 1246.e1-1246.e2. ISSN: 0092-8674. DOI: [10.1016/j.cell.2007.03.011](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.011). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867407003224> (visitado 04-12-2024).

- [198] Otto Plaat. *Ordinary differential equations*. Holden-Day series in mathematics. San Francisco: Holden-Day, 1971. ISBN: 978-0-8162-6844-3.
- [199] Daipeng Chen, Xinxin Liu, Haijiang Wang, Roeland M. H. Merks y David A. Baker. «A model of Notch signalling control of angiogenesis: Evidence of a role for Notch ligand heterodimerization». en. En: *PLOS Computational Biology* 21.2 (feb. de 2025). Publisher: Public Library of Science, e1012825. ISSN: 1553-7358. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1012825](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1012825). URL: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1012825> (visitado 02-05-2025).
- [200] Yuansheng Sun, Horst Wallrabe, Soo-Ah Seo y Ammasi Periasamy. «FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of his Birth». En: *ChemPhys-Chem* 12.3 (2011), págs. 462-474. ISSN: 1439-7641. DOI: [10.1002/cphc.201000664](https://doi.org/10.1002/cphc.201000664). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphc.201000664>.
- [201] Michelle A. Digman, Rooshin Dalal, Alan F. Horwitz y Enrico Gratton. «Mapping the Number of Molecules and Brightness in the Laser Scanning Microscope». En: *Biophysical Journal* 94.6 (2008), págs. 2320-2332. ISSN: 00063495. DOI: [10.1529/biophysj.107.114645](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114645). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508705769>.
- [202] Leonardo Morsut, Kole T. Roybal, Xin Xiong, Russell M. Gordley, Scott M. Coyle, Matthew Thomson y Wendell A. Lim. «Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors». En: *Cell* 164.4 (2016), págs. 780-791. ISSN: 0092-8674. DOI: [10.1016/j.cell.2016.01.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.012). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416000520>.
- [203] Satoshi Toda, Wesley L. McKeithan, Teemu J. Hakkinen, Pilar Lopez, Ophir D. Klein y Wendell A. Lim. «Engineering synthetic morphogen systems that can program multicellular patterning». En: *Science* 370.6514 (2020), págs. 327-331. DOI: [10.1126/science.abc0033](https://doi.org/10.1126/science.abc0033). URL: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abc0033>.
- [204] Mitsuhiro Matsuda, Makito Koga, Knut Woltjen, Eisuke Nishida y Miki Ebisuya. «Synthetic lateral inhibition governs cell-type bifurcation with robust ratios». En: *Nature Communications* 6.1 (2015), pág. 6195. ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms7195](https://doi.org/10.1038/ncomms7195). URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms7195>.
- [205] Andrew Mara, Joshua Schroeder, Cécile Chalouni y Scott A. Holley. «Priming, initiation and synchronization of the segmentation clock by deltaD and deltaC». En: *Nature Cell Biology* 9.5 (2007), págs. 523-530. ISSN: 1465-7392, 1476-4679. DOI:

- 10.1038/ncb1578. URL: <http://www.nature.com/articles/ncb1578>.
- [206] Mohit Kumar Jolly, Marcelo Boareto, Mingyang Lu, José N. Onuchic, Cecilia Clementi y Eshel Ben-Jacob. «Operating principles of Notch–Delta–Jagged module of cell–cell communication». En: *New Journal of Physics* 17.5 (2015), pág. 055021. ISSN: 1367-2630. DOI: 10.1088/1367-2630/17/5/055021. URL: <https://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/17/5/055021>.
- [207] Juan C. Luna-Escalante, Pau Formosa-Jordan y Marta Ibañes. «Redundancy and cooperation in Notch intercellular signaling». En: *Development* 145.1 (2018), dev154807. ISSN: 0950-1991. DOI: 10.1242/dev.154807. URL: <https://doi.org/10.1242/dev.154807>.
- [208] Rachael Kuintzle, Leah A. Santat y Michael B. Elowitz. «Diversity in Notch ligand-receptor signaling interactions». En: *bioRxiv* (2023), pág. 2023.08.24.554677. DOI: 10.1101/2023.08.24.554677. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10473737/>.
- [209] Pau Formosa-Jordan y Marta Ibañes. «Competition in Notch Signaling with Cis Enriches Cell Fate Decisions». En: *PLOS ONE* 9.4 (2014), e95744. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0095744. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095744>.
- [210] Jacob Parres-Gold, Matthew Levine, Benjamin Emert, Andrew Stuart y Michael B. Elowitz. «Contextual computation by competitive protein dimerization networks». En: *Cell* 188.7 (2025). Publisher: Elsevier, 1984-2002.e17. ISSN: 0092-8674, 1097-4172. DOI: 10.1016/j.cell.2025.01.036. URL: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(25\)00105-9](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(25)00105-9).
- [211] Laurel A Rohde, Arianne Bercowsky-Rama, Guillaume Valentin, Sundar Ram Naganathan, Ravi A Desai, Petr Strnad, Daniele Soroldoni y Andrew C Oates. «Cell-autonomous timing drives the vertebrate segmentation clock's wave pattern». En: *eLife* 13 (2024). Ed. por Yasumasa Bessho y Didier YR Stainier. Publisher: eLife Sciences Publications, Ltd, RP93764. ISSN: 2050-084X. DOI: 10.7554/eLife.93764. URL: <https://doi.org/10.7554/eLife.93764>.
- [212] Sayumi Okigawa, Takamasa Mizoguchi, Makoto Okano, Haruna Tanaka, Miho Isoda, Yun-Jin Jiang, Maximiliano Suster, Shin-ichi Higashijima, Koichi Kawakami y Motoyuki Itoh. «Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination». En: *Developmental Biology* 391.2 (2014), págs. 196-206. ISSN: 0012-1606. DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.04.011. URL:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160614002188>.
- [213] Alejandro A. Granados, Nivedita Kanrar y Michael B. Elowitz. «Combinatorial expression motifs in signaling pathways». En: *Cell Genomics* 4.1 (2024). Publisher: Elsevier. ISSN: 2666-979X. DOI: [10.1016/j.xgen.2023.100463](https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100463). URL: [https://www.cell.com/cell-genomics/abstract/S2666-979X\(23\)00307-5](https://www.cell.com/cell-genomics/abstract/S2666-979X(23)00307-5).
- [214] Jon C. Aster, Warren S. Pear y Stephen C. Blacklow. «The Varied Roles of Notch in Cancer». En: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 12.1 (2017), págs. 245-275. DOI: [10.1146/annurev-pathol-052016-100127](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100127). URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100127>.
- [215] Yoshihiro Yamanaka et al. «Reconstituting human somitogenesis in vitro». En: *Nature* 614.7948 (2022), págs. 509-520. ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/s41586-022-05649-2](https://doi.org/10.1038/s41586-022-05649-2). URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-05649-2>.
- [216] Alfonso Martínez Arias, Yusuke Marikawa y Naomi Moris. «Gastruloids: Pluripotent stem cell models of mammalian gastrulation and embryo engineering». En: *Developmental Biology* 488 (2022), págs. 35-46. ISSN: 0012-1606. DOI: [10.1016/j.ydbio.2022.05.002](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.05.002). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160622000847>.
- [217] S. W. Harden. *pyABF* 2.3.5. 2022. URL: <https://pypi.org/project/pyabf>.
- [218] Gerrit Ansmann. «Efficiently and easily integrating differential equations with JiTCODE, JiTCDDE, and JiTCSDE». En: *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 28.4 (2018), pág. 043116. ISSN: 1054-1500, 1089-7682. DOI: [10.1063/1.5019320](https://doi.org/10.1063/1.5019320). URL: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5019320>.
- [219] L.F. Shampine y S. Thompson. «Solving DDEs in Matlab». En: *Applied Numerical Mathematics* 37.4 (2001), págs. 441-458. ISSN: 01689274. DOI: [10.1016/S0168-9274\(00\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9274(00)00055-6). URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168927400000556>.
- [220] Fabio Cramerí. *Scientific colour maps*. 2023. DOI: [10.5281/zenodo.8409685](https://doi.org/10.5281/zenodo.8409685). URL: <https://zenodo.org/records/8409685>.
- [221] Girolamo Cardano y T Richard Witmer. «Ars magna, or, The rules of algebra». En: (*No Title*) (1993).
- [222] Ronald S Irving. *Integers, polynomials, and rings: a course in algebra*. Springer, 2004.

- [223] Prakash Gorroochurn. «Some Laws and Problems of Classical Probability and How Cardano Anticipated Them». En: *CHANCE* 25.4 (2012). Publisher: ASA Website _eprint: <https://doi.org/10.1080/09332480.2012.752279>, págs. 13-20. ISSN: 0933-2480. DOI: [10 . 1080 / 09332480 . 2012 . 752279](https://doi.org/10.1080/09332480.2012.752279). URL: [https : // doi . org / 10 . 1080 / 09332480 . 2012 . 752279](https://doi.org/10.1080/09332480.2012.752279).