



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

**Dinámica de señalización celular: estructuras
oscilatorias y biestables como herramientas para la
generación de comportamientos diversos**

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

Lic. Juan Ignacio Marrone

Directora de Tesis: Dra. Alejandra C. Ventura

Director Adjunto: Dr. Hernán E. Grecco

Consejera de Estudios: Dra. Silvina M. Ponce Dawson

Lugar de Trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, UBA – CONICET

Buenos Aires, 2025

Dinámica de señalización celular: estructuras oscilatorias y biestables como herramientas para la generación de comportamientos diversos

Resumen

En biología de sistemas, abundan los modelos matemáticos capaces de reproducir el comportamiento periódico presente a nivel celular, así como también de predecir nuevas respuestas. Los ciclos de retroalimentación o *feedback* son cruciales para el desarrollo de oscilaciones, y para la existencia de dos estados estables dentro de un mismo rango de estímulos. Dependiendo de si los *feedbacks* son positivos, negativos, o una combinación de ambos tipos, las series temporales resultantes y las curvas dosis-respuesta tendrán diferentes formas. En esta Tesis, analizamos una serie de modelos biológicos cuya estructura produce biestabilidad y oscilaciones. Partiendo de la distribución modular presente en cada sistema, mostramos cómo las conexiones entre módulos enriquecen la respuesta ante estímulos.

En primer lugar, analizamos un ciclo de fosforilación simple, el cual es siempre monoestable, que desarrolla biestabilidad si algunas de sus variables pueden translocar entre compartimientos, con los parámetros de transporte resultando claves en el control de la biestabilidad. La translocación es la que construye los lazos de *feedback* positivo responsables de la nueva respuesta.

Luego, estudiamos el caso de un ciclo de doble fosforilación biestable que desarrolla oscilaciones con el agregado de una variable extra, y controlamos la biestabilidad subyacente en el sistema extendido para expandir su comportamiento periódico, con diferentes amplitudes y frecuencias, y a su vez obteniendo biestabilidad y excitabilidad. Los lazos de *feedback* positivo en el ciclo doble se combinan con un lazo de *feedback* negativo, el cual emerge de la variable extra: una quinasa inactiva que secuestra el estímulo previamente activo. Seguimos el mismo análisis en un modelo sencillo de activador-inhibidor, con resultados similares.

Más adelante, nos enfocamos en un sistema que presenta dos ciclos de doble fosforilación interconectados, ambos biestables, y desarrollamos un método basado en nulclinas para explicar las oscilaciones en el modelo y su relación con las respuestas biestables subyacentes. Aplicamos ese mismo método a un modelo de ciclo celular que combina *feedbacks* positivos y negativos, donde también es posible establecer una división en dos módulos, uno de los cuales es biestable. El análisis explica resultados previamente reportados, y permite encontrar respuestas del sistema significativamente diferentes.

Finalmente, investigamos dos modelos de cascada de tres niveles: el sistema de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) y un caso basado en el modelo de Goodwin. La cascada MAPK está compuesta por un ciclo de fosforilación simple y dos de fosforilación doble: varios de los sistemas estudiados previamente son subsistemas de esta cascada, dando información crucial para el estudio de tres niveles. En ambos modelos, transformamos su parámetro de estímulo en una variable inhibida por la especie de salida en la cascada, cerrando un lazo de *feedback* negativo. Si las cascadas, ahora subsistemas dentro de estos casos extendidos, podían oscilar, el estímulo variable puede desencadenar fases de actividad oscilatoria interrumpidas por fases silenciosas. Es decir, utilizamos estructuras oscilatorias para obtener *bursting*.

En conjunto, nuestro análisis de modelos de señalización celular nos permite entender cómo la interconexión entre variables puede generar una diversidad de comportamientos dinámicos, donde la respuesta de cada módulo aislado informa lo que ocurrirá al conectarse. Biestabilidad, oscilaciones, excitabilidad, y *bursting* pueden emerger de manera natural con las reacciones apropiadas. Nuestros resultados para cascadas de proteínas, ciclo celular, y casos paradigmáticos como Goodwin y el activador-inhibidor abren posibles rutas de análisis para otros modelos de investigación en el área de biología de sistemas.

Palabras clave: señalización celular, oscilaciones, biestabilidad, retroalimentación, modelado matemático

Cell signaling dynamics: oscillatory and bistable structures as tools for the development of diverse behaviors

Abstract

In systems biology, there are plenty of mathematical models capable of reproducing the periodic behavior found at the cellular level, as well as predicting new responses. Feedback loops are crucial for the development of oscillations, and for the existence of two stable states within the same stimuli range. Depending on whether the feedback loops are positive, negative, or a combination of both, the time series obtained, and the dose-response curves will be of different shapes. In this Thesis, we analyze a series of biological models whose structure produces bistability and oscillations. Starting from the modular distribution present in each system, we show how the connection between modules enriches the response to stimuli.

First, we analyze a single phosphorylation cycle, which is always monostable, and develops bistability if some of its variables can shuttle between compartments, with the transport parameters being key in controlling the bistability. The shuttling is what constructs positive feedback loops responsible for the new response.

Then, we studied the case of a bistable double phosphorylation cycle, which develops oscillations when adding one extra variable, and control the underlying bistability in the extended system to expand its periodic behavior, with varying amplitude and frequency values, while also obtaining bistability and excitability. The positive feedback loops in the double cycle are combined with a negative feedback loop, which emerges from the extra variable: an inactive kinase which sequesters the previously active stimulus. We perform the same analysis in a simple activator-inhibitor model, finding similar results.

Later, we focus on a system consisting of two interconnected double phosphorylation cycles, both bistable, and develop a method based on nullclines to explain the oscillations in the model and its relationship to the underlying bistable responses. We apply this same method to a cell cycle model combining positive and negative feedbacks, where it is also possible to establish a separation between two modules, one of which is bistable. The analysis explains previously reported results, while allowing to find system responses which are significantly different.

Finally, we researched two cascade models of three levels each: the Mitogen Activated Protein Kinase system (MAPK), and a case based on the Goodwin model. The MAPK cascade is made up of one single phosphorylation cycle and two double phosphorylation cycles: several of the systems previously studied are subsystems of this cascade, providing crucial information for the three-level study. In both models, we transformed its stimulus parameter into a variable inhibited by the output species of the cascade, closing a negative feedback loop. If the cascades, now subsystems within these extended cases, could oscillate, the variable stimulus can trigger phases of oscillatory activity interrupted by silent phases. Meaning, we use oscillatory structures to obtain bursting.

Altogether, our analysis of cell signaling models allows us to understand how the interconnection between variables can generate a diversity of dynamical behaviors, where the response of each isolated module informs us of what will happen after connecting. Bistability, oscillations, excitability, and bursting can emerge naturally with the appropriate reactions. Our results for protein cascades,

cell cycle, and well known cases like Goodwin and the activator-inhibitor open up possible analysis paths for other research models in systems biology.

Keywords: cell signaling, oscillations, bistability, feedback, mathematical modeling

Agradecimientos

After Shi Qiang finished speaking, he stood and waited a few seconds. Then he raised his hands, said to the stunned crowd, "That's it," turned, and left.

The Three-Body Problem,
Novela escrita por Liu Cixin

"Excuse me. Can we do a full run-through of the Third Movement?"

Liz and the Blue Bird,
Película dirigida por Yamada Naoko

A Ale, por dirigir mi trabajo todos estos años. Por siempre tener la disponibilidad para reunirse. Por toda la ayuda, la orientación, el *feedback*. Un montón de texto, figuras, pósteres, charlas, publicaciones, cartas, planes, etc. Todo bajo tu atenta dirección, llevándome a esta tesis. Qué laburo.

A Hernán, por toda tu ayuda en este camino. Por todas tus respuestas, por darme una mano si la necesitaba.

A Debi, por el trabajo que realizamos en 2019-2020, al principio de mi doctorado. Por la buena onda para una rápida reunión virtual cuando teníamos que discutir detalles.

A Jacques, por tantas oscilaciones. Las reuniones virtuales, las visitas, toda la colaboración desde lados opuestos del Atlántico. Aprendí muchísimo en todos estos años. *Merci beaucoup*.

Al CONICET y la UBA, por darme la posibilidad de hacer este doctorado.

Al grupo de investigación. A Maru, Maia y Manu. A Julián, por el viaje a Rosario. A Cande, por todas las conversaciones de oficina.

A Agus, Bruno, Chechu, Max, Orne, y Rago, del grupo *No me interesa*. Por las juntadas y las comidas. Por la novela.

A Fede y Juli, también de *No me interesa*, y del grupo de investigación. Por los días en la ofi. Por los viajes a Mar del Plata, Brasil, y Madryn. Por todos esos momentos. Por la novela.

A la Yaya y la Coneja, que me acompañan desde el otro lado de la cordillera.

Y a mi mamá, por todo lo que has hecho por mí. Por estos últimos años en particular, y todo lo que vivimos. Por el apoyo incansable. Por estar donde ahora estoy.

Índice

Resumen	3
Abstract	5
Agradecimientos	7
Índice	9
Introducción	11
Modelado en biología	11
Oscilaciones, biestabilidad, y bifurcaciones	11
Ciclos de modificación covalente y cascada MAPK	13
Módulos, <i>inputs</i> y <i>outputs</i>	15
Objetivos y organización de la Tesis	15
Capítulo 1: Biestabilidad por compartimientos	17
Antecedentes	17
Resultados	19
Ciclo de fosforilación/desfosforilación en dos compartimientos	19
Caracterización de la región biestable	21
Ciclos de feedback positivo involucrados en la biestabilidad	24
Discusión	27
Métodos	28
Capítulo 2: Diferentes tipos de oscilaciones obtenidas mediante biestabilidad subyacente	33
Antecedentes	33
Osciladores, feedbacks, y clasificación	33
Biestabilidad de un nivel, oscilaciones de dos (y tres) niveles	35
Dos tipos de oscilaciones, un solo oscilador	36
Resultados	37
Un mínimo modelo de señalización produce una variedad de oscilaciones	37
La cascada MAPK de dos niveles enriquece el comportamiento oscilatorio con respecto al modelo mínimo	47
El modelo activador-inhibidor recupera los diferentes tipos de oscilaciones con solo dos componentes	51
Discusión	56
Métodos	61
Capítulo 3: Pseudo-nulclinas como método de análisis y predicción	63
Antecedentes	63

Métodos	64
Resultados	65
Método de pseudo-nulclinas aplicado a un modelo de ciclo celular que combina ciclos de feedback positivo y negativo	65
Subsistema de MAPK donde ambos módulos son capaces de biestabilidad.....	72
Discusión	77
Capítulo 4: <i>Bursting</i> en cascadas de señalización celular	79
Antecedentes	79
Resultados	80
Un ciclo de feedback negativo del output al input induce dinámica de bursting en la cascada MAPK alrededor de bifurcaciones de Hopf subcríticas	80
Un set de parámetros balanceado sostiene el bursting mientras modula la frecuencia.	82
Un modelo de Goodwin modificado provee información sobre bursting en cascadas ...	83
Retraso temporal adicional de output a input en cascadas induce bursting previamente ausente	86
Estimulación periódica lleva a resonancia no-lineal, transformando bursting amortiguado en bursting sostenido	89
Discusión	92
Métodos	94
Conclusiones y perspectivas	97
Apéndice	99
Apéndice: Capítulo 1	99
Adimensionalización	99
Tablas Suplementarias.....	102
Figuras Suplementarias.....	105
Apéndice: Capítulo 2	109
Figuras Suplementarias.....	109
Cálculo del grafo de interacción de la Fig. 2.8.....	116
Apéndice: Capítulo 3	120
Descripción general del método de pseudo-nulclinas	120
Tangencia y bifurcación.....	121
Modelo de ciclo celular de Tsai et al. (2014)	123
Modelo 2 + 2.....	125
Apéndice: Capítulo 4	130
Figuras Suplementarias.....	130
Referencias.....	135

Introducción

Modelado en biología

Los sistemas de señalización celular han sido ampliamente estudiados en biología de sistemas. El modelado matemático y computacional ha jugado un importante rol en el proceso de entender resultados experimentales previamente obtenidos, y también ha servido como herramienta para proponer y descubrir nuevos comportamientos.

De manera recurrente, existe un compromiso a la hora de construir un modelo mediante un sistema de ecuaciones diferenciales. Se debate entre asignarle un mínimo grado de complejidad tal que pueda representar de manera confiable su contraparte experimental, y que la resolución analítica y/o numérica sea fácil de obtener. Típicamente, la solución analítica estará fuera del alcance, y el modelado computacional será clave para el análisis.

Una manera ampliamente usada de escribir un modelo es siguiendo la Ley de Acción de Masas, donde la tasa de reacción de cada especie será proporcional al producto de las concentraciones involucradas. Los parámetros correspondientes, denominados constantes de velocidad, representan el efecto de cada reacción. Por ejemplo, consideremos una reacción de la siguiente forma:



Denominamos a las constantes de velocidad como k_1 , k_2 , y k_3 , que simbolizan la asociación de A y B en AB , disociación de AB en A y B , y catálisis de un producto A^* (y recuperación de B). Las ecuaciones diferenciales de este sistema son:

$$\begin{aligned}\dot{[A]} &= -k_1[A][B] + k_2[AB] \\ \dot{[B]} &= -k_1[A][B] + (k_2 + k_3)[AB] \\ \dot{[AB]} &= k_1[A][B] - (k_2 + k_3)[AB] \\ \dot{[A^*]} &= k_3[AB]\end{aligned}$$

La concentración de cada variable se representa entre corchetes. En este caso en particular, hay una cantidad conservada: $[B_{tot}] = [B] + [AB]$. Así, quedan determinadas las variables (A , B , AB , A^*) y parámetros (k_1 , k_2 , y k_3) para esta simple reacción. Modelar sistemas de señalización celular compuestos por este tipo de reacciones y estudiar cómo evolucionan dichos sistemas ante modificaciones en sus parámetros constituyen pilares fundamentales en el trabajo aquí presentado.

Oscilaciones, biestabilidad, y bifurcaciones

Uno de los comportamientos prevalentes en procesos celulares es el de oscilaciones biológicas. La variedad de ejemplos es sumamente amplia, así como también las características oscilatorias. Rutas de respuesta de calcio, metabólicas, redes regulatorias genéticas, con períodos que cambian no solo en sus valores, sino también en sus rangos. Casos donde la frecuencia debe ser sintonizable, y otros donde debe ser robusta, como en el sistema circadiano [1], [2], [3].

La existencia de ciclos de retroalimentación (*feedback*) es clave en el desarrollo de estos comportamientos periódicos.

En un ciclo de *feedback* positivo, un aumento en la concentración de una cierta especie desencadena un efecto. Este efecto eventualmente vuelve (retroalimenta) generando un nuevo aumento en la concentración de la especie original, el cual, a su vez, provoca un aumento mayor.

Si, por otro lado, al cerrar el ciclo se produce una disminución en la concentración de la especie, es un *feedback* negativo. Ahora bien, la sola existencia de un *feedback* positivo puede dar lugar a otro comportamiento recurrente en biología: la biestabilidad [4], [5].

Partiendo de una simple curva dosis-respuesta, donde se le aplica al sistema de estudio una dosis de entrada o *input* (un parámetro del sistema), se estudia la respuesta de alguna variable del sistema que actúa como salida, en inglés *output*. Esta variable usualmente está relacionada a procesos que se llevan a cabo en otros sistemas, de manera que nuestro primer *output* juega el rol de *input* en otro contexto. Modificaciones postraduccionales, activación genética, diferenciación, entre otros, son algunos ejemplos.

Para analizar los comportamientos de cada sistema en estudio, en esta Tesis usaremos diferentes conceptos y herramientas de dinámica no lineal, como espacios de fases y nulclinas. Y en las curvas dosis-respuesta o *input-output*, mover el parámetro de *input* puede dar lugar a un cambio cualitativo en el comportamiento del sistema. Hablamos aquí de bifurcaciones.

En el caso de biestabilidad, al aumentar el *input* de un sistema y luego llevarlo de vuelta a cero, aparecen dos trayectorias distintas, donde cada punto es un estado posible del sistema. Es decir, existirá un rango de *inputs* donde hay dos valores de *output* posibles, a los cuales el sistema accede dependiendo de la trayectoria que siga (ver Fig. I.1).

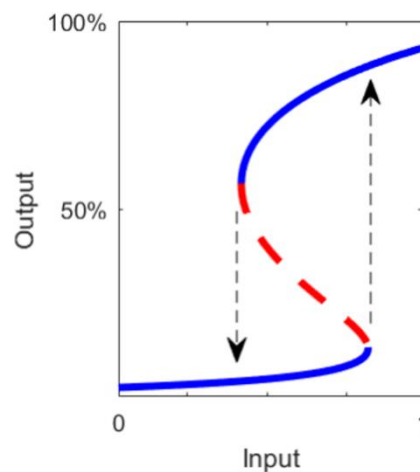


Figura I.1: Ejemplo de curva input-output biestable, donde cada punto de las líneas azules corresponde a un estado estable, y cada punto de la línea roja intermedia representa un estado inestable. Al aumentar el input desde cero, el output del sistema “salta” a la rama superior, como indica la flecha. Al disminuir el input, vuelve a la rama inferior en un valor de input distinto.

Específicamente, lo que ocurre en esta curva es la aparición de dos bifurcaciones denominadas *saddle-node*. En estas bifurcaciones, un equilibrio estable (el nodo o *node*, en las líneas azules) y uno inestable (la silla o *saddle*, en la línea roja intermedia) colisionan y desaparecen [6].

La biestabilidad está usualmente asociada a procesos todo-o-nada, donde se requiere superar cierto umbral para que la variable se active, y así desencadene otro proceso [7]. Controlando el resto de los

parámetros (los que no son el *input*), esta biestabilidad puede ser manipulada, ya sea aumentando su rango o incluso hacerla desaparecer. Ahora bien, así como un simple lazo de *feedback* positivo puede dar lugar a biestabilidad, uno de *feedback* negativo puede ser el responsable de oscilaciones. Si entre dos especies interactuantes X e Y , donde X activa a Y para que luego Y inhiba a X , existe suficiente retraso temporal o *delay*, la respuesta puede ser periódica. Si X crece con un *input*, activa a Y , y logra alcanzar cierto nivel de concentración antes de sufrir la inhibición ejercida por Y , podrá completar un ciclo de subida (antes del efecto de la inhibición) y bajada (después). Ahora bien, el *delay* funciona también en el otro sentido. La especie Y crecerá hasta que X vea disminuida su concentración, con lo que recién luego de un dado tiempo experimentará un descenso. Con el inhibidor ahora en niveles bajos, se puede reiniciar el ciclo con un aumento de X [8].

Este *delay* puede estar dado en un modelo de manera explícita en el tiempo, o introducido mediante variables intermedias. Si existe una variable Z ubicada en el lazo de inhibición que va de Y hasta X , esta última variable podrá aumentar su concentración antes de ser inhibida. Otra manera de introducir *delay* es mediante el otro tipo de *feedback*, el positivo. La idea es similar: ante la ausencia de un retraso en la inhibición, se puede contrarrestar (temporalmente) el efecto inhibitorio si X aumenta con X . Esto se puede lograr con un simple paso de auto-activación, o involucrando otras variables y reacciones.

Típicamente, si un sistema presenta oscilaciones, la curva *input-output* tendrá una bifurcación de Hopf. En una bifurcación de Hopf, un punto de equilibrio estable pierde su estabilidad y da origen a oscilaciones en el sistema mediante la creación de un ciclo límite, una trayectoria cerrada en el espacio de fases. Si el ciclo límite es estable (todas las trayectorias cercanas convergen al ciclo) se trata de una bifurcación de Hopf supercrítica. Si el ciclo límite es inestable (repele las trayectorias cercanas), es una bifurcación de Hopf subcrítica [6].

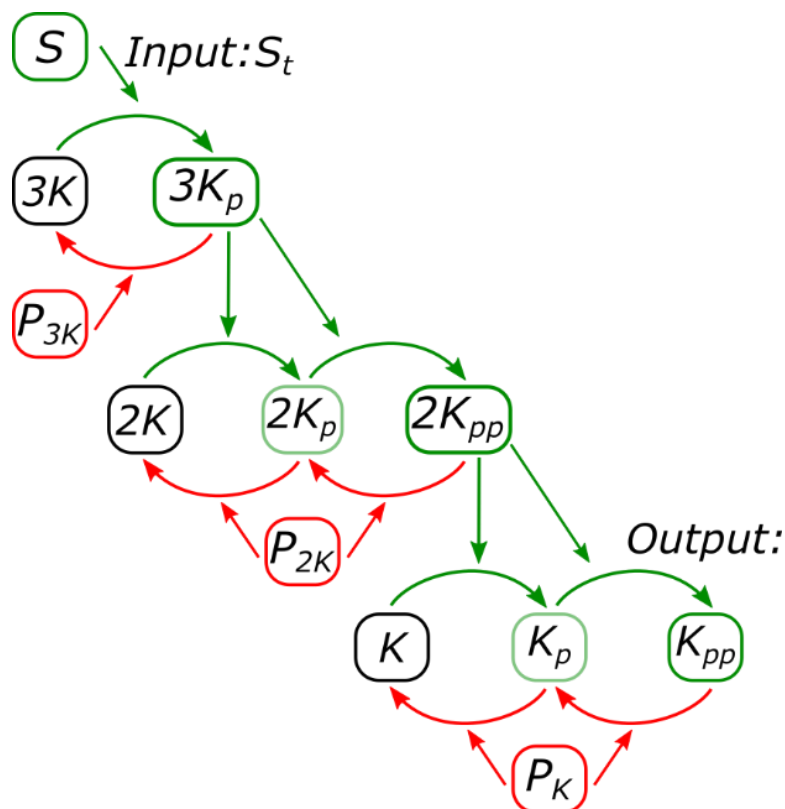
Tanto las bifurcaciones *saddle-node* como Hopf son locales, donde los cambios se registran en la vecindad de las bifurcaciones, y de codimensión-1, es decir, aparecen con el cambio de un solo parámetro del sistema. Más adelante, introduciremos otras bifurcaciones relevantes de codimensión-1, y algunas de codimensión-2 (variación de dos parámetros en simultáneo).

La combinación de *feedbacks* positivos y negativos es recurrente en los sistemas oscilatorios, donde diferentes procesos pueden dar lugar a cada tipo de retroalimentación. Es natural, entonces, que los dos comportamientos emergentes de estos *feedbacks* puedan ser co-protagonistas. Si un *feedback* positivo es responsable de que la respuesta sea biestable para cierto sistema, y luego se le introduce un *feedback* negativo resultando en un sistema extendido, este último puede registrar oscilaciones. Si bien la respuesta del nuevo sistema puede ya no ser biestable, eso no quiere decir que la del *subsistema* (el sistema original) haya perdido su comportamiento con dos respuestas estables. Si la estructura de ese subsistema no fue modificada (las ecuaciones para las variables involucradas son las mismas) y lo mismo ocurre para las tasas de las reacciones (los parámetros son iguales que antes), entonces existe una biestabilidad *subyacente* en el nuevo sistema. Al estudiar el ciclo límite responsable por las oscilaciones, puede verse cómo la biestabilidad del subsistema actúa como un “motor” para el comportamiento periódico: si el *input* sube y baja alrededor de este ciclo de histéresis, es esperable que la separación entre las ramas biestables desemboque en niveles altos y bajos de respuesta alternados en el tiempo [3], [9].

Ciclos de modificación covalente y cascada MAPK

Un *motif* muy estudiado en biología de sistemas es el ciclo de modificación covalente, un caso de modificación postraduccional reversible. Un sustrato es fosforilado por una quinasa, y luego

Dentro de esta área de la biología, la cascada de quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) es un sistema ampliamente analizado [9], [12], [13], [14]. Señales de factores de crecimiento (el *input*) en receptores ubicados en la superficie de la célula activan tres niveles secuenciales de proteínas. Formada por un ciclo simple que activa a un ciclo doble, que a su vez activa a un segundo ciclo doble, esta cascada tiene a su proteína de salida (*output*) como responsable en la fosforilación de múltiples factores de transcripción, explicando su rol en proliferación y diferenciación [14], [15], [16], [17]. En la Fig. 1.2, se presenta el modelo de Huang y Ferrell [12].



Si bien no son evidentes, la cascada posee múltiples ciclos de *feedback* positivos y negativos, que explican la emergencia de biestabilidad y oscilaciones en el sistema [11], [13]. De los dos últimos niveles de la cascada, los ciclos de doble fosforilación, por lo menos uno de ellos debe mostrar una respuesta biestable ante cambios en su *input* para que el sistema completo sea oscilatorio [9]. Es decir, dentro de la cascada oscilatoria de tres niveles, el segundo y/o el tercero serán subsistemas biestables.

14

estos subsistemas puede ayudar a entender cómo la biestabilidad subyacente es responsable de las oscilaciones, y cómo obtener diferentes comportamientos en la cascada completa.

Módulos, *inputs* y *outputs*

El caso de la cascada MAPK es evidentemente modular, donde cada nivel es un módulo, y los tres poseen conexiones claras entre ellos. La estructura subyacente a varios modelos puede representarse mediante módulos, donde la pieza fundamental es establecer qué actúa como *input* de cada módulo, y qué actúa como *output*.

El ejemplo más sencillo es el de un sistema de dos variables o nodos, donde cada nodo es un módulo, y la salida de uno es la entrada del otro. En la descripción sencilla de *feedbacks* realizada anteriormente, X es el activador de Y , con lo que puede describirse a X como el *output* del módulo 1 y el *input* del módulo 2. A su vez, Y es un *input* del módulo 1. Si se analiza cada módulo por separado, toda entrada puede considerarse un parámetro, más allá de que en el sistema completo sea una variable. Conociendo el comportamiento de cada módulo por separado puede ampliarse el análisis a la hora de ver el ejemplo completo.

Si bien en el caso recién descrito solo hay dos variables, las mismas pueden representar una multiplicidad de procesos. A esto nos referimos al hablar de compromiso entre complejidad y factibilidad de análisis. Partiendo de este caso, la cantidad de variables en cada módulo puede ser mayor, y siempre que se establezcan de manera clara las conexiones entre las partes, el análisis de cada módulo o subsistema será de enorme utilidad. Los comportamientos obtenidos con un solo módulo pueden enriquecerse al conectar los múltiples subsistemas, con los *inputs* y *outputs* correctos.

Objetivos y organización de la Tesis

La Tesis, luego de la presente Introducción, consiste en cuatro capítulos con análisis y resultados. Cada capítulo cuenta con una introducción propia en una sección de Antecedentes, luego Resultados, Discusión y Métodos (con información adicional en Apéndices).

El primer capítulo de resultados se enfoca en un modelo de compartimentalización, donde un ciclo de fosforilación simple posee variables que translocan entre dos compartimientos, citoplasma y núcleo. Esta translocación es responsable de la emergencia de biestabilidad en el sistema, que no es posible sin el transporte entre regiones. El objetivo es estudiar la robustez de la biestabilidad, esto es, qué tan frecuente es la aparición del comportamiento ante cambios en los valores de parámetros. A su vez, se analiza la jerarquía de estos parámetros en el desarrollo de la biestabilidad, determinando cuáles son más influyentes para que la respuesta múltiple aparezca. También, qué parámetros controlan (y en qué medida) las diferentes características del ciclo biestable, siendo estas el ancho, altura y área. Finalmente, se simplifica el sistema removiendo reacciones y componentes, buscando en todo momento mantener la biestabilidad. Con esto, buscamos entender en más detalle cómo funciona la organización espacial del sistema para complejizar su respuesta.

El segundo capítulo de resultados toma a la biestabilidad como punto de partida para entender el comportamiento oscilatorio en tres modelos distintos. Dos de ellos corresponden a versiones alternativas de los dos primeros niveles de la cascada MAPK: ciclo simple más ciclo doble. El tercero es un ejemplo sencillo de activador-inhibidor. Sabiendo que la biestabilidad en un subsistema es necesaria para que estos sistemas desarrollen ciclos límites, nuestro objetivo es controlar dicha

biestabilidad subyacente a cada ejemplo y encontrar así diferentes tipos de oscilaciones, caracterizados por valores y rangos de amplitud y frecuencia marcadamente distintos. También, manipulamos los parámetros de cada sistema para trasladarlo de oscilaciones a biestabilidad y excitabilidad, consecuencia natural de la dinámica emergente. Las funciones biológicas asociadas a oscilaciones son variadas, y nuestro trabajo establece cómo cada modelo es capaz de entregar respuestas oscilatorias heterogéneas, a la vez que presenta una hoja de ruta para analizar otros ejemplos de oscilaciones nacidas de biestabilidad.

El tercer capítulo de resultados establece un método de análisis para sistemas compuestos por dos módulos, basado en el concepto de nulclinas. El propósito es extender esta típica herramienta de dinámica no lineal, aplicada a modelos de 2 dimensiones, a casos de 3 o más ecuaciones. Para ello, analizamos dos modelos, uno de ciclo celular y otro, una cascada de dos niveles, con ciclos de doble fosforilación. En el capítulo anterior, fueron los dos primeros niveles de la cascada MAPK. En este capítulo, los dos últimos. De esta manera, avanzamos en el análisis de la cascada completa, aprovechando el desarrollo del método. Así como las nulclinas son de suma utilidad para entender rápidamente la dinámica de un sistema bidimensional, nuestras pseudo-nulclinas hacen lo propio con modelos más complejos. Al mismo tiempo, su carácter geométrico permite buscar nuevos comportamientos, mediante el control de las curvas proyectadas y sus intersecciones. Cada uno de los modelos posee subsistemas biestables y respuestas oscilatorias, sirviendo como continuación de los capítulos anteriores y profundizando el estudio de la relación entre los dos comportamientos.

El cuarto y último capítulo de resultados arriba a la cascada MAPK completa de tres niveles, y a un modelo más sencillo, modificado del caso paradigmático de Goodwin [18]. El objetivo es aprovechar las oscilaciones presentes en estos modelos y llevar la respuesta a *bursting*, esto es, oscilaciones en grupos separados por fases silenciosas. Así como antes tomamos la biestabilidad subyacente para entender y enriquecer las oscilaciones, ahora utilizamos las oscilaciones para llegar a un comportamiento muy presente en neurociencia, pero con menor prevalencia en estudios de señalización celular. Los ingredientes típicos en el desarrollo de oscilaciones, como *delay*, coexistencia de estados estables, *feedbacks* positivos y negativos, son puestos al servicio de obtener *bursting*. El modelo de Goodwin modificado no solo sirve como auxiliar para entender y mejorar lo obtenido en la cascada MAPK, también actúa como representante de cascadas más sencillas.

Finalmente, un capítulo de discusión pondrá en contexto todo lo realizado y planteará posibles caminos a seguir dentro de otros sistemas de señalización celular. Nuestro objetivo general es entender, a partir de la física y el modelado matemático y computacional, cómo las conexiones entre componentes celulares llevan a diferentes tipos de respuesta, buscando variar el nivel de complejidad entre los sistemas estudiados para arribar a una visión lo más amplia posible.

Capítulo 1: Biestabilidad por compartimientos

Antecedentes

Las células eucariotas son sistemas espacialmente organizados en donde diferentes moléculas presentan grados de heterogeneidad distintivos (Fig. 1.1a). La mayoría de las moléculas involucradas en sistemas de transmisión de señales deben translocar constantemente entre compartimientos intracelulares para cumplir con sus funciones específicas. Hay claros beneficios en restringir moléculas de señalización a compartimientos subcelulares específicos [19]. Mantenerlas cerca de sus *targets* y reguladores correctos, y lejos de los incorrectos, puede llevar a una mayor especificidad en la transmisión de señales [20]. También, confinar espacialmente moléculas de señalización aumenta la concentración local, lo que lleva a que los encuentros entre ellas sean más frecuentes, y por lo tanto la velocidad en la transmisión de señales aumenta. Desde la perspectiva de la transferencia de información, los sistemas no homogéneos aumentan la capacidad computacional al permitir que diferentes reacciones bioquímicas procedan de manera simultánea en diferentes partes de la célula [21].

Más allá de estos evidentes beneficios, la translocación regulada de moléculas presenta otra consecuencia potencialmente importante: puede, en principio, modificar la naturaleza de la respuesta de un sistema autorizando una dinámica enriquecida. En este capítulo, nos concentramos principalmente en respuestas biestables, las cuales han sido mostradas como un resultado emergente de la compartimentalización de un ciclo monoestable de activación/desactivación [22]. Las respuestas biestables, como la de la MAPK p42 en la maduración de un ovocito [23], son una de las tantas relaciones *input-output* por las cuales las redes de procesamiento de señales transforman señales simples en respuestas complejas, precisamente ajustadas para las funciones fisiológicas que controlan. A diferencia de las respuestas ultrasensibles o graduales (Fig. 1.1b), los valores intermedios son imposibles de obtener ya que la curva estímulo-respuesta presenta una discontinuidad. Las respuestas biestables exhiben histéresis: una vez que el estímulo es lo suficientemente alto para encender el sistema, éste permanecerá en el estado *on* aun después de que el estímulo sea disminuido por debajo del umbral [24]. Solo después de que el estímulo baje de un umbral de desactivación, el sistema volverá al estado *off*. Para intensidades del estímulo entre los umbrales de activación y desactivación, la respuesta del sistema dependerá de cómo el estímulo fue modificado (Fig. 1.1b, biestable).

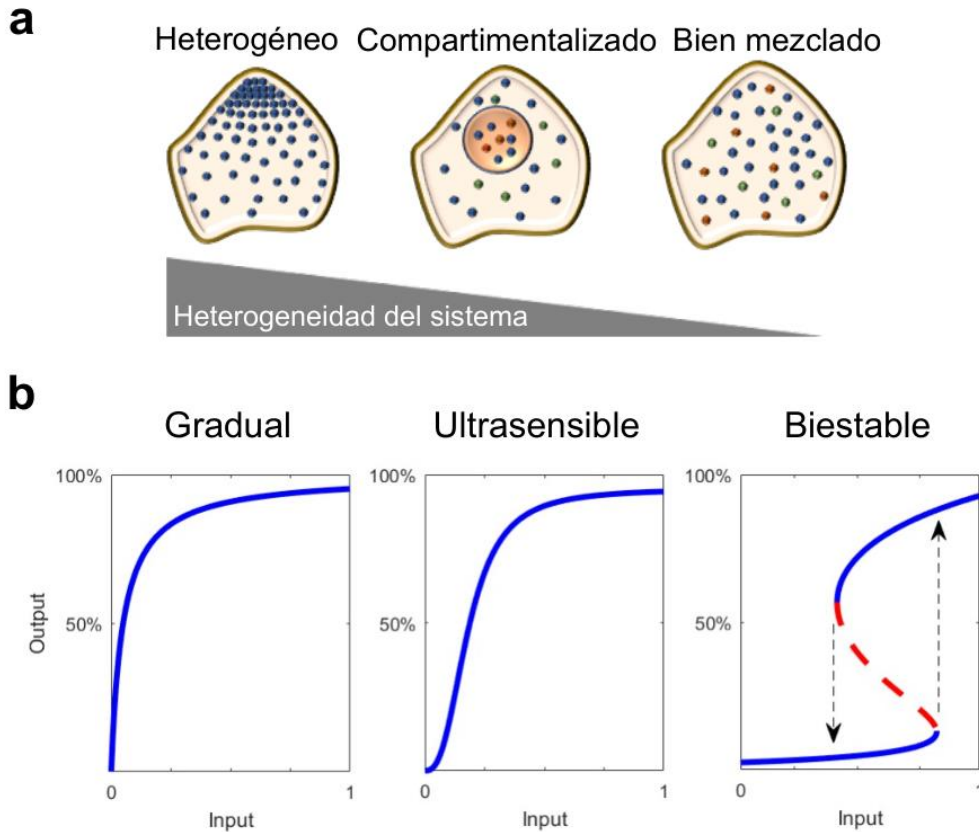


Figura 1.1: Redes celulares, heterogeneidad, y diferentes funciones respuesta. **a:** Grados de heterogeneidad espacial. **b:** Ejemplos de diferentes comportamientos input/output que un sistema puede mostrar.

Como introdujimos al principio de esta Tesis, la existencia de más de un estado estacionario bajo condiciones biológicas particulares está estrechamente relacionada con la existencia de ciclos de retroalimentación positiva (*feedback* positivo). Esto se mostró en primer lugar para redes de regulación genética [25]. Soulé luego demostró que un *feedback* positivo era una condición necesaria para la biestabilidad [4]. Estos *motifs* biestables son comunes, como mencionamos, en redes que exhiben respuestas todo-o-nada, gobernando comportamientos celulares como proliferación, diferenciación, y apoptosis. En estas redes, las células avanzan –usualmente de manera irreversible– a un camino específico entre un set discreto de posibilidades.

Sabemos que acoplar ciclos de modificación postraducciona reversible es un mecanismo común para generar biestabilidad [11]. Un ciclo doble de fosforilación/desfosforilación con un mecanismo distributivo para las enzimas puede ser biestable. Cuando introdujimos la cascada MAPK, destacamos estos *feedbacks* positivos no evidentes como responsables de la biestabilidad que puede emerger a nivel cascada completa.

Ahora bien, la presencia de un compartimento genera un ciclo de *feedback* positivo, resultando en biestabilidad emergente. Desde un punto de vista matemático y describiendo el proceso de la manera más simple posible, la translocación hacia adentro y afuera de un compartimento les agrega un término lineal a las ecuaciones diferenciales asociadas con el sistema y aumenta la dimensionalidad de tanto el sistema como de su espacio de parámetros.

Típicamente, es difícil identificar el impacto que cada parámetro tiene en el *output* de un modelo cuando se trata de un sistema dinámico de alta dimensionalidad. Se han propuesto diferentes

estrategias, desde abordajes locales como análisis de sensibilidad [26] a globales combinando exploración del espacio de parámetros y test estadísticos [27]. Recientemente, métodos intermedios han sido desarrollados que emplean *random sampling* para identificar múltiples sets de parámetros que conducen al *output* deseado y lo combinan con un estimador de sensibilidad global [28].

En este capítulo, buscamos explorar la robustez de la biestabilidad emergente por compartimentalización. Luego de una caracterización inicial de un ciclo de fosforilación en un compartimiento, llevamos a cabo un análisis estadístico de los resultados para determinar la sensibilidad de la biestabilidad a diferentes parámetros. También, cuantificamos la extensión de la biestabilidad al computar el área del ciclo de histéresis, encontrando que los parámetros de translocación son los principales responsables en su control. Además, develamos los ciclos de *feedback* positivo necesarios usando un método que se basa en un criterio de inyectividad. Con esta información, simplificamos gradualmente el modelo para obtener un sistema reducido que todavía muestra biestabilidad inducida por compartimientos. De esta manera, otorgamos más detalle sobre cómo la organización espacial de los sistemas celulares genera una respuesta dinámica enriquecida.

Resultados

Ciclo de fosforilación/desfosforilación en dos compartimientos

Consideramos, como un primer bloque básico, un ciclo simple de fosforilación y desfosforilación modelado con reacciones de Michaelis-Menten [21]. Como mencionamos en la Introducción, este ciclo es monoestable [11]:



Estas dos reacciones modelan la modificación reversible del sustrato S en su forma fosforilada S^* . La fosforilación y desfosforilación son catalizadas enzimáticamente por E (quinasa) y F (fosfatasa), respectivamente, lo cual involucra la formación de complejos intermedios X , Y . k_{on} , k_{off} , y k_{cat} son las constantes de velocidad para la asociación, disociación, y catálisis.

Usamos este bloque inicial en dos compartimientos. Las células eucariotas están caracterizadas por compartimientos nucleares y citoplasmáticos bien diferenciados, separados por una doble membrana. Esta membrana es penetrada por complejos porosos nucleares que permiten el intercambio de macromoléculas entre los dos compartimientos, mediado por proteínas específicas [29]. En este trabajo, consideramos una modificación reversible de un sustrato, como describimos arriba, y permitimos la translocación nucleocitoplasmática de algunas especies, resultando en un nuevo sistema con compartimientos, de dimensionalidad aumentada (Fig. 1.2). La translocación es modelada de la manera más sencilla posible, es decir, con reacciones lineales, lo que asume que la cantidad de transportadores no es limitante.

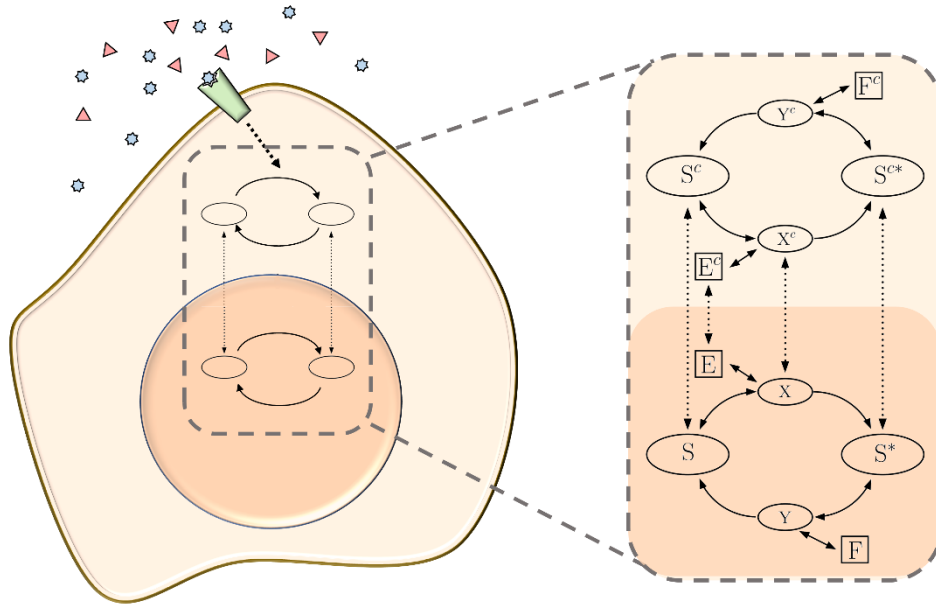


Figura 1.2: Compartimentalización en señalización celular eucariota. Izquierda: Esquema, con proteínas receptoras en la membrana, que reconocen señales externas y las transmiten al interior de la célula. Esto activa vías de señalización en el citoplasma, las que a su vez transmiten la señal al núcleo, donde se ejecutan respuestas adecuadas. Derecha: Reacciones compartimentalizadas. Un ciclo simple de fosforilación/desfosforilación en dos compartimientos (por ejemplo, citoplasma y núcleo). En cada compartimiento, el sustrato S es fosforilado por una quinasa E mediante la formación de la especie intermedia X y desfosforilado por una fosfatasa F a través de la acumulación de la especie intermedia Y . Cuando se permite la translocación entre compartimientos, se ha mostrado que el sistema puede ser biestable [22]. Figura adaptada de [22].

La dinámica de este nuevo sistema está descrita por las siguientes Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDOs), definiendo la evolución en el tiempo de la concentración de cada especie bioquímica:

$$\begin{aligned}
 [\dot{E}] &= (k_{off,E} + k_{cat,E})[X] - k_{on,E}[E][S] - k_{out,E}[E] + k_{in,E}[E^c], \\
 [\dot{X}] &= -(k_{off,E} + k_{cat,E})[X] + k_{on,E}[E][S] - k_{out,X}[X] + k_{in,X}[X^c], \\
 [\dot{S}] &= k_{off,E}[X] - k_{on,E}[E][S] + k_{cat,F}[Y] - k_{out,S}[S] + k_{in,S}[S^c], \\
 [\dot{S}^*] &= k_{cat,E}[X] - k_{on,F}[S^*][F] + k_{off,F}[Y] - k_{out,S^*}[S^*] + k_{in,S^*}[S^{c*}], \\
 [\dot{F}] &= -k_{on,F}[S^*][F] + k_{off,F}[Y] + k_{cat,F}[Y], \\
 [\dot{Y}] &= k_{on,F}[S^*][F] - k_{off,F}[Y] - k_{cat,F}[Y], \\
 [\dot{E}^c] &= (k_{off,E}^c + k_{cat,E}^c)[X^c] - k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{out,E}[E] - k_{in,E}[E^c], \\
 [\dot{X}^c] &= -(k_{off,E}^c + k_{cat,E}^c)[X^c] + k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{out,X}[X] - k_{in,X}[X^c], \\
 [\dot{S}^c] &= k_{off,E}^c[X^c] - k_{on,E}^c[E^c][S^c] + k_{cat,F}^c[Y^c] + k_{out,S}[S] - k_{in,S}[S^c], \\
 [\dot{S}^{c*}] &= k_{cat,E}^c[X^c] - k_{on,F}^c[S^{c*}][F^c] + k_{off,F}^c[Y^c] + k_{out,S^*}[S^*] - k_{in,S^*}[S^{c*}], \\
 [\dot{F}^c] &= -k_{on,F}^c[S^{c*}][F^c] + k_{off,F}^c[Y^c] + k_{cat,F}^c[Y^c], \\
 [\dot{Y}^c] &= k_{on,F}^c[S^{c*}][F^c] - k_{off,F}^c[Y^c] - k_{cat,F}^c[Y^c]
 \end{aligned} \tag{2}$$

Las especies que translocan entre compartimientos son S , S^* , E , y X . El superíndice “c” indica que la especie está en el citosol, y la ausencia del superíndice significa que está en el núcleo. k_{in} y k_{out} son las constantes de velocidad para la translocación hacia adentro y afuera del núcleo. El sistema de EDOs aquí descrito ha dado lugar a una respuesta biestable para cierta elección de los valores de parámetros [22].

Considerando la concentración total de la proteína quinasa total $E_{tot} = [E] + [X] + [E^c] + [X^c]$ como el estímulo, y la concentración del sustrato fosforilado en el núcleo S^* como la respuesta, el sistema involucra 23 parámetros de control: 12 constantes de velocidad bioquímicas, 8 tasas de translocación, y 3 concentraciones totales de especies (las concentraciones $S_{tot} = [S] + [S^*] + [X] + [Y] + [S^c] + [S^{c*}] + [X^c] + [Y^c]$, $F_{tot} = [F] + [Y]$, y $F^c_{tot} = [F^c] + [Y^c]$ de sustrato total, fosfatasa nuclear total, y fosfatasa citoplásmica total, respectivamente). El sistema EDO fue convertido a una forma adimensional, como se detalla en el Apéndice de este capítulo. El sistema adimensional resultante tiene 21 parámetros libres y consideramos c_1 y s^* como el estímulo (parámetro) y la respuesta (variable), respectivamente:

$$c_1 = \frac{E_{tot}}{S_{tot}}, \quad s^* = \frac{[S^*]}{S_{tot}} \quad (3)$$

El resto de los parámetros adimensionales y sus definiciones se listan en la Fig. 1.3a.

Caracterización de la región biestable

Con el fin de caracterizar la región biestable, combinamos una batería de métodos, cada uno de los cuales es descrito en más detalle en la sección Métodos. Brevemente, el Criterio de Inyectividad del Jacobiano permite, si es posible, derivar las condiciones para garantizar la existencia de un solo estado estacionario [30]. La herramienta CRNToolbox, desarrollada por el grupo de Horn, Jackson, y M. Feinberg, decide si existe alguna combinación de parámetros que lleva a la biestabilidad. MatCont ejecuta un análisis de continuación. El análisis “*going-up and coming-down*” es un método numérico para detectar curvas *input-output* biestables [31]. Latin Hypercube Sampling es una técnica para asegurar un muestreo homogéneo del espacio de parámetros [27], [32]. Combinamos todos estos métodos como describimos a continuación.

a

$$\begin{aligned}
b_1 &= \frac{k_{on,E} S_{tot}}{k_{cat,E}} & b_2 &= \frac{k_{off,E}}{k_{cat,E}} & b_3 &= \frac{k_{on,F} S_{tot}}{k_{cat,E}} \\
b_4 &= \frac{k_{off,F}}{k_{cat,E}} & b_5 &= \frac{k_{cat,F}}{k_{cat,E}} & b_6 &= \frac{k_{on,E}^c S_{tot}}{k_{cat,E}} \\
b_7 &= \frac{k_{off,E}^c}{k_{cat,E}} & b_8 &= \frac{k_{cat,E}^c}{k_{cat,E}} & b_9 &= \frac{k_{on,F}^c S_{tot}}{k_{cat,E}} \\
b_{10} &= \frac{k_{off,F}^c}{k_{cat,E}} & b_{11} &= \frac{k_{cat,F}^c}{k_{cat,E}}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
s_1 &= \frac{k_{in,X}}{k_{cat,E}} & s_2 &= \frac{k_{out,X}}{k_{cat,E}} & s_3 &= \frac{k_{in,S^*}}{k_{cat,E}} \\
s_4 &= \frac{k_{out,S^*}}{k_{cat,E}} & s_5 &= \frac{k_{in,E}}{k_{cat,E}} & s_6 &= \frac{k_{out,E}}{k_{cat,E}} \\
s_7 &= \frac{k_{in,S}}{k_{cat,E}} & s_8 &= \frac{k_{out,S}}{k_{cat,E}}
\end{aligned}$$

$$c_2 = \frac{F_{tot}}{S_{tot}} \quad c_3 = \frac{F_{tot}^c}{S_{tot}}$$

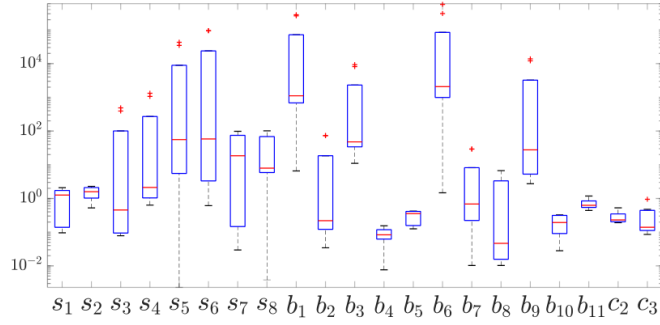
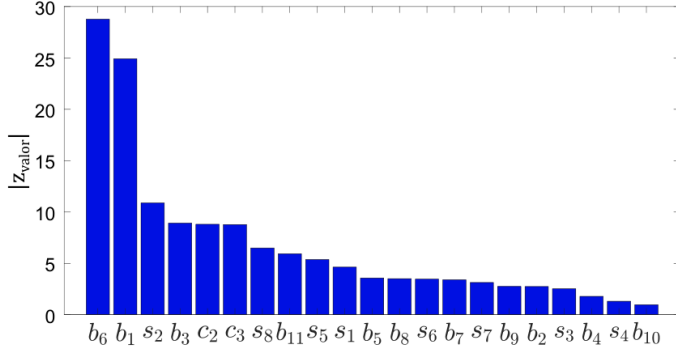
b**c**

Figura 1.3: Dependencia de la biestabilidad de los valores de parámetros. **a:** Parámetros adimensionales. **b:** Boxplot obtenido de nueve sets de parámetros (ver Tabla Suplementaria 1.1 en el Apéndice) para los cuales el sistema exhibe respuestas biestables, obtenidos mediante CRNToolbox. Las cajas delimitan los percentiles 25 y 75, las líneas rojas representan las medianas. Las cruces rojas corresponden a outliers, y las líneas punteadas se extienden a los valores más extremos no considerados outliers. Este análisis nos permitió restringir los rangos de muestreo para cada parámetro. **c:** Gráfico de barras para los resultados del test U de Mann-Whitney sobre la fracción biestable. Los parámetros adimensionales se ordenan según el valor absoluto de su z-valor.

En primer lugar, caracterizamos la extensión del comportamiento biestable previamente reportado [22] usando CRNToolbox y MatCont. CRNToolbox permite identificar sets de parámetros que producen biestabilidad, y MatCont, obtener el diagrama de bifurcación comenzando de esos sets. Exploramos cada uno de los parámetros individualmente, con el resto de los parámetros fijos, y generamos los respectivos diagramas de bifurcaciones. Encontramos que la biestabilidad se preserva para cambios de uno o más órdenes de magnitud para la mayoría de los parámetros estudiados individualmente (ver Métodos y en el Apéndice, la Fig. S1.1).

Si bien este abordaje nos permitió evaluar la biestabilidad alrededor de un dado set de parámetros, quisimos evaluar la existencia de otros sets con el mismo comportamiento. Debido a la alta dimensionalidad del sistema, es computacionalmente difícil encontrar semejantes sets al variar de manera *random* una combinación de parámetros en un rango predeterminado. Por lo tanto, primero empleamos CRNToolbox para encontrar diferentes puntos biestables del sistema, lo que nos permitió restringir los intervalos de muestreo para cada valor (ver Métodos y Tabla Suplementaria 1.1 en el Apéndice), como se indica en la Fig. 1.3b. Usando esos intervalos, estudiamos el comportamiento del sistema usando el análisis “*going-up and coming-down*” con un estímulo de entre 10^{-3} a 10^3 (barrido ida y vuelta sobre este rango de estímulo) sobre aproximadamente 100.000 sets de parámetros

diferentes seleccionados aleatoriamente mediante un muestreo con LHS (detalles del análisis “*going-up and coming-down*” y muestreo LHS en la sección de Métodos).

Para cuantificar la influencia de cada parámetro, primero establecimos bins logarítmicos para sus rangos de variación y luego calculamos la fracción de casos biestables (f^b) para cada bin (ver Fig. S1.2 en el Apéndice). Como era de esperar, el porcentaje biestable por clase resultó extremadamente bajo (menor a 8%). Algunos parámetros fueron críticos en el control de la fracción de casos biestables. Usando un test U de *Mann-Whitney* (analiza si los datos observados evidencian una diferencia estadísticamente significativa entre la población biestable y la monoestable) ordenamos los parámetros según su influencia en la biestabilidad del sistema (Fig. 1.3c, ver Métodos). Para destacar, los parámetros de translocación s_2 y s_8 se ubicaron entre los de mayor influencia. Esto fue complementado con un test de enriquecimiento, indicando en qué sub-rango de cada parámetro el comportamiento biestable se vio enriquecido (ver Fig. S1.3 en el Apéndice, y Métodos). Si bien es posible que algunos casos etiquetados como monoestables en realidad son biestables con un rango de estímulo por fuera del barrido, consideramos que esto es poco probable ya que un análisis posterior de los casos biestables resultantes mostró que todos los *switches* ocurren para valores del parámetro de control cómodamente dentro del rango establecido en la búsqueda.

Para los sets de parámetros que llevan a biestabilidad, también cuantificamos dicho comportamiento con cuatro criterios distintos: computamos el rango de biestabilidad (ancho), la distancia entre las dos ramas biestables calculadas de dos maneras distintas como se explica en Métodos y se ilustra en la Fig. 1.4a (altura o distancia), y el área del ciclo de histéresis. Un valor grande del ancho indica que existe un rango no despreciable de *inputs* que conducen al sistema a biestabilidad, un valor grande de la altura indica que los dos *outputs* estables son distinguibles entre sí, y un valor grande del área integra la información de los otros dos aspectos (ancho y altura). Los resultados de estos cálculos se muestran en la Fig. 1.4b (y Fig. S1.4 del Apéndice), y los detalles de los cálculos se explican en la sección de Métodos. La Fig. 4a contiene la influencia de cada parámetro en las propiedades mencionadas (ancho, altura, área) según el orden que se desprende de un test U de *Mann-Whitney*. Significativamente, los dos parámetros más influyentes en el control de las cuatro propiedades son parámetros de translocación. Para complementar estos resultados, incluimos las distribuciones de anchos, alturas y áreas en la Fig. S1.4a, y un gráfico de *scatter* indicando cómo los dos parámetros más importantes en la Fig. 1.4b controlan la correspondiente propiedad (Fig. S1.4b).

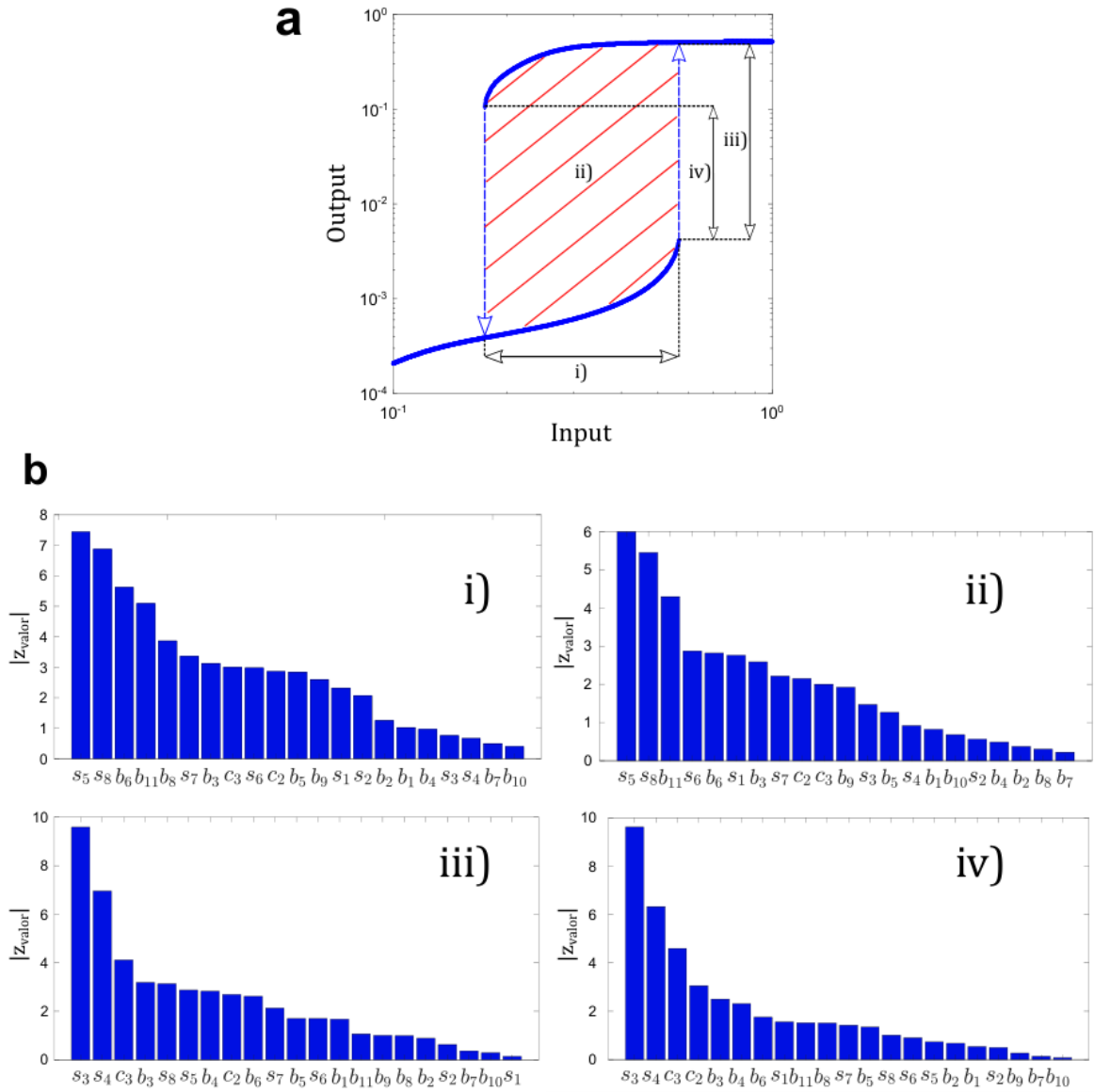


Figura 1.4: Dependencia en los parámetros de las diferentes propiedades de la región biestable. **a**: Ejemplo de curva biestable, con ancho (i), área (ii, líneas rojas diagonales), distancia entre ramas en $Stim_{on}$, extremo derecho del rango biestable (iii) y entre el output de la rama superior en $Stim_{off}$ - extremo izquierdo del rango biestable- y de la rama inferior en $Stim_{on}$ (iv). **b**: Gráficos de barras para el test U de Mann-Whitney para cada una de las cuatro propiedades. Los parámetros se ordenan según el valor absoluto del z-valor.

Ciclos de feedback positivo involucrados en la biestabilidad

Usando el criterio de inyectividad (ver Métodos) identificamos seis ciclos de *feedback* positivo necesarios para la biestabilidad, los cuales son indicados en la Fig. 1.5a con seis colores distintos sobre el esquema representando el sistema (el esquema aparece duplicado para mostrar solo tres ciclos a la vez, por claridad). Cuatro de ellos involucran translocación de especies entre compartimentos, confirmando que la compartimentalización y translocación son responsables por la emergencia de biestabilidad en un sistema que de otro modo sería monoestable. Por ejemplo, cuando la cantidad de sustrato desfosforilado en el núcleo (S) aumenta, la formación del complejo intermedio X también

aumenta, lo que lleva a que la cantidad de enzima libre en el núcleo disminuya. Esa caída conlleva una disminución en la cantidad de enzima libre en el citoplasma (E^c), provocando que el sustrato se acumule y se limite la formación del complejo intermedio X^c . Finalmente, como el sustrato puede translocar entre los dos compartimientos, la concentración aumentada del sustrato en el citoplasma lleva a que la concentración del sustrato nuclear aumente, cerrando el ciclo de *feedback* positivo.

Para entender más en detalle la fuente de la biestabilidad, nos propusimos simplificar este modelo mediante la búsqueda de uno más compacto que conserve la biestabilidad dada por la espacialidad. Para ello, removimos reacciones y componentes del modelo inicial. La razón para esto es que los métodos que combinamos solo funcionan con reacciones, en lugar de ecuaciones diferenciales. En primer lugar, removimos la fosfatasa en el citoplasma. El criterio de inyectividad identifica en este sistema simplificado cinco ciclos de *feedback* que también estaban presentes en el sistema original (A, B, C, D, E), tres de los cuales (A, B, E) involucran translocación (Fig. 1.5b y Tabla Suplementaria 2). El ciclo restante, F, es roto.

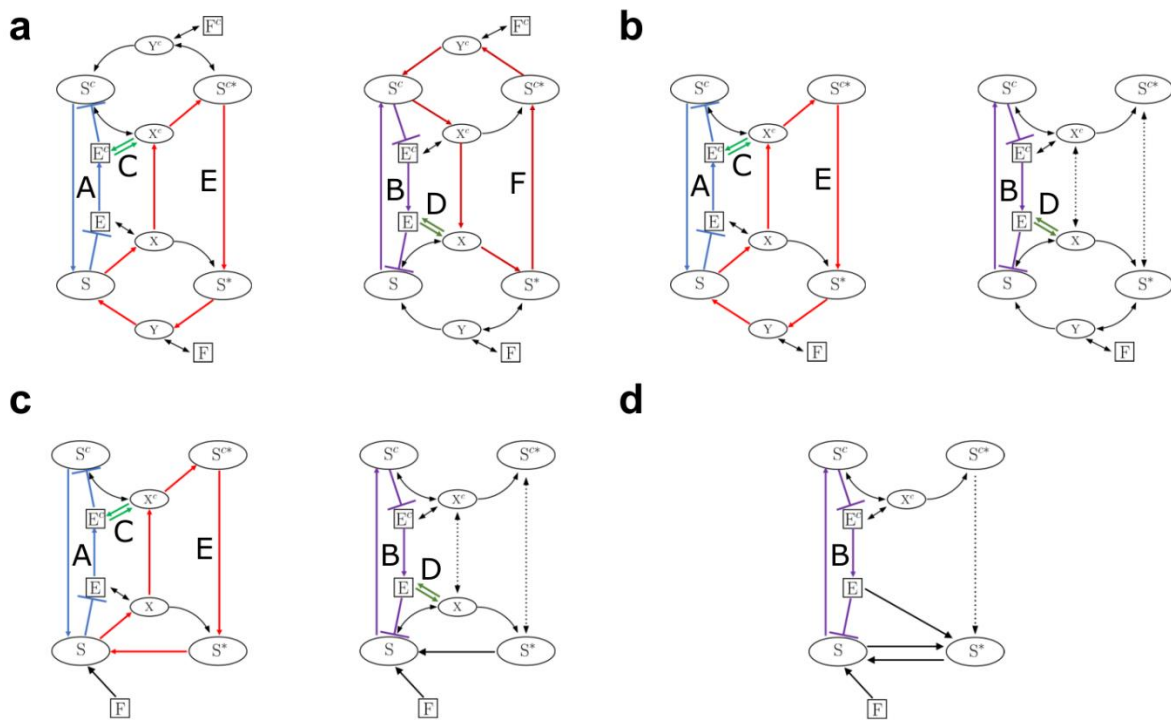


Figura 1.5: Simplificación a un modelo compacto que conserva la biestabilidad dada por la espacialidad. El sistema original (**a**) fue reducido en cuatro pasos consecutivos. Izquierda: el *feedback* **A** en azul, el **C** en verde, el **E** en rojo. Derecha: el *feedback* **B** en violeta, el **D** en verde oscuro, el **F** en rojo oscuro. **b**: La fosfatasa citoplasmática fue removida. **c**: La desfosforilación enzimática de dos pasos en el núcleo fue reemplazada por una reacción de un solo paso. **d**: La fosforilación en el núcleo fue reemplazada por una reacción en un solo paso. Finalmente, las reacciones de translocación reversible de los sustratos fosforilados y sin fosforilar fueron reemplazadas por mecanismo irreversibles. En cada panel, los ciclos de *feedback* relevantes están marcados con letras A-F y en diferentes colores.

Luego, simplificamos aún más el modelo al considerar que la desfosforilación en el núcleo ocurre en una reacción de un solo paso:



El sistema siguió siendo biestable y la mayoría de los ciclos de *feedback* positivo se mantuvieron intactos (A, B, C, D), con excepción del *feedback* (E) mediado por el complejo fosfatasa-sustrato *Y*, *feedback* que incluye translocación (Fig. 1.5c y Tabla Suplementaria 2).

Como paso siguiente, removimos el estado intermedio en la fosforilación nuclear:



Tal simplificación mantuvo la biestabilidad, pero cambió los ciclos de *feedback* necesarios (Fig. 1.5d y Tabla Suplementaria 2). Al eliminar el complejo intermedio, tres ciclos (A y E, que involucran translocación, y D, que no) son rotos. En particular, el ciclo A se rompe porque la enzima nuclear ya no es secuestrada por el sustrato para formar el complejo intermedio *X*. El ciclo B permanece cerrado, pero es modificado, ya que ahora el ciclo de *feedback* positivo se complete a través de la reacción simplificada r_{phos} . Finalmente, si bien el ciclo C todavía existe, ya no es relevante para la biestabilidad.

Para finalizar, y reducir aún más el número de parámetros del sistema, reemplazamos las reacciones de translocación de los sustratos fosforilados y desfosforilados por reacciones irreversibles:



Verificamos que la biestabilidad se conserva, y que el ciclo de *feedback* positivo relevante es el mismo del caso anterior. Este modelo mínimo contiene 5 variables independientes y 8 parámetros adimensionales, cuando el modelo inicial era de 8 y 21, respectivamente.

El set completo de reacciones para el sistema final se presenta en la Fig. 1.5d y en la Tabla Suplementaria 1.2 del Apéndice, y se describe con el sistema de EDOs adimensional presentado en el Apéndice. Para este sistema reducido, usamos el análisis “*going-up and coming-down*” con valores de estímulos entre 10^{-6} y 10^1 sobre aproximadamente 30.000 sets de parámetros diferentes muestreados con LHS, con todos los parámetros variados al azar sobre el rango $[10^{-3}, 10^3]$. Siguiendo el mismo camino que antes, calculamos la fracción de casos biestables por cada bin espaciado de manera logarítmica, para cada parámetro. Los gráficos obtenidos se presentan en la Fig. S1.5. La fracción de casos biestables sigue siendo baja, con sus máximos obtenidos para valores altos de b_2 (8.5%), valores altos de b_3 (4.9%), y valores bajos de s_1 (5.1%). La biestabilidad puede ser anulada controlando cualquiera de las cuatro tasas bioquímicas. Por un lado, nuestro análisis no encontró ningún caso biestable para $b_2 < 10$ o $b_3 < 10^{-1}$. Esto es consistente con el hecho de que llevar a 0 cualquiera de estos parámetros cortaría el ciclo de *feedback* relevante (ver Fig. S1.5). Por otro lado, la biestabilidad desaparece para $b_1 > 10^2$ o $b_4 > 10^2$. En los rangos de parámetros muestreados, s_1 es el único parámetro de translocación con la capacidad de anular la biestabilidad. Sin embargo, al aplicar el Criterio de Inyectividad del Jacobiano [30] a este sistema reducido, obtenemos que para valores extremadamente bajos de s_3 , el sistema es necesariamente monoestacionario. El criterio también confirma que la multiestacionariedad no puede ocurrir para valores muy bajos de b_2 , b_3 , o muy altos de s_1 . Realizando un test de enriquecimiento (Fig. S1.5b) se confirmaron los resultados obtenidos para la fracción de casos biestables por clase. Finalmente, un test *U* de *Mann-Whitney* seleccionó b_2 , b_3 , s_1 , y b_1 como los parámetros líderes en el control de la biestabilidad en los rangos considerados en el análisis (Fig. S1.5c).

Discusión

En este capítulo, hemos explorado la extensión y el origen de la biestabilidad inducida por compartimentalización. Comenzando de un sistema previamente descrito, compuesto por dos módulos monoestables actuando en compartimientos celulares diferentes y compartiendo especies a través de reacciones de translocación, exploramos su amplio espacio de parámetros con el fin de evaluar la robustez de la biestabilidad emergente. Para ello, desarrollamos un método que es una combinación de técnicas conocidas. El método se basa fuertemente en encontrar varios sets de parámetros que conducen a comportamiento biestable y, con esos sets, construir un espacio de parámetros restringido para el análisis. Para encontrar numerosos sets que llevaran a biestabilidad, aplicamos la herramienta CRNT en repetidas ocasiones con las reacciones en diferente orden. Por más simple que esto parezca, este camino resultó novedoso y útil, y permite una exploración del espacio de parámetros que cumple dos propósitos. Primero, da la oportunidad de evaluar la robustez del comportamiento de interés (en este caso, biestabilidad), con robustez entendida como la frecuencia en su ocurrencia dentro del espacio de parámetros. Segundo, informa sobre qué parámetros, y en qué rangos, controlan la emergencia y características de dicho comportamiento.

Encontramos que una fracción muy pequeña del (restringido) espacio de parámetros muestreado produce una respuesta biestable, indicando que el sistema tiene que ser sintonizado apropiadamente para que este comportamiento emerja. Con sintonización apropiada nos referimos a que los parámetros tienen que tomar valores en rangos específicos y restringidos para producir biestabilidad, y, aun así, en ese espacio restringido los casos biestables representan menos del 8%. Más importante, los parámetros de translocación estuvieron entre los más influyentes en controlar esta propiedad. En resumen, encontramos varios sets que conducen a biestabilidad, y cada uno de ellos fue robusto según un análisis local. El (restringido) espacio de parámetros construido con todos esos sets derivó en un bajo número de resultados biestables. Concluimos que el sistema analizado posee “islas de biestabilidad”. Si el sistema está en una de estas islas, el comportamiento biestable será robusto bajo fluctuaciones de los parámetros.

Evaluamos la extensión de la biestabilidad cuantificando el rango de estímulo que produce una respuesta biestable, la distancia entre las dos respuestas en el régimen biestable, y el área del ciclo de histéresis. Encontramos que los parámetros de translocación controlan todas estas propiedades. Este resultado muestra no solo la importancia de la translocación para encontrar comportamiento biestable, sino también el hecho de que, una vez dentro de los rangos restringidos, sintonizar ciertos parámetros de translocación influye significativamente en las propiedades de la región biestable. Esto permite la optimización de las propiedades biestables (por ejemplo, si se requiere un rango amplio de estímulo o una distancia lo suficientemente grande entre ramas) y provee detalles acerca de potenciales jerarquías entre parámetros, en sistemas con biestabilidad inducida por compartimentalización.

Para describir más en detalle el origen de la biestabilidad, procedimos de la siguiente manera. Del sistema original con dos reacciones enzimáticas en cada compartimiento y translocación de ciertas especies entre ellas, con un total de 8 variables adimensionales, 21 parámetros adimensionales y 6 ciclos de *feedback* positivo relevantes, realizamos simplificaciones graduales y monitoreamos que la biestabilidad no desapareciera, y fuimos identificando los ciclos relevantes responsables por la biestabilidad [5]. Primero, removimos las reacciones con fosfatasa cuando era posible. Segundo, simplificamos las reacciones enzimáticas omitiendo la formación del complejo intermedio, lo cual solo fue posible en el compartimiento nuclear. Finalmente, hicimos unidireccionales las reacciones de translocación que no cortan el ciclo de *feedback*. En resumen, el sistema simplificado nuevamente

conecta dos sistemas monoestables con mínimas no linealidades mediante un set reducido de reacciones de translocación lineal que circulan las especies en los dos compartimientos.

El procedimiento utilizado para obtener un sistema reducido, si bien no es exhaustivo, combina conocimiento biológico sobre las reacciones involucradas con el resultado del análisis de los *feedbacks*. De esta manera, pudimos evitar las limitaciones actuales de la *Chemical Reaction Network Toolbox* (CRNT), ya que este método solo funciona con reacciones en lugar de EDOs, y la complejidad del modelo obstruye incluso una aproximación cuasiestacionaria. Esta típica aproximación en una reacción enzimática es complicada en las ecuaciones que estudiamos sin mayores suposiciones (no rigurosas), porque las reacciones de translocación acoplan todas las reacciones enzimáticas en el modelo.

En su lugar, el procedimiento que seguimos fue el de remover reacciones o componentes, por ejemplo, una fosfatasa, una por vez, monitoreando que la biestabilidad no desaparezca. En el caso de la fosfatasa, esto puede representar un sistema real donde la fosfatasa se encuentra exclusivamente en un compartimiento específico, como el caso de la fosfatasa Ptp2 de Hog1, la cual se sabe que es nuclear [33]. En el procedimiento, probamos diferentes combinaciones, y las que reportamos son las que aseguran biestabilidad. No queda demostrado que el modelo es mínimo, pero al mismo tiempo, no pudimos remover ninguna variable o reacción extra sin perder por completo la biestabilidad. En ese sentido, es mínimo. El modelo detallado tiene seis ciclos de *feedback* relevantes, mientras que el reducido, solo uno. Este modelo reducido es biestable basado en los mismos mecanismos que aseguran biestabilidad en el caso más detallado: reacciones enzimáticas (y enzimáticas simplificadas) que transforman variables, y reacciones de translocación que circulan dichas variables, generando de esta manera un ciclo de *feedback* positivo que es el origen de la biestabilidad.

Resumiendo, la originalidad de nuestro trabajo se basa en tres aspectos. Primero, el abordaje mismo. En el artículo por Feliu y colaboradores, utilizan CRNT para encontrar un set de parámetros que conduzca a biestabilidad, seguido por un análisis local alrededor de esos valores de parámetros. Explican que la exploración de un espacio de parámetros de alta dimensión tiene baja chance de ser exitosa. En este capítulo, pudimos llevar a cabo una exploración del espacio de parámetros definiendo primero un espacio reducido mediante sucesivas aplicaciones de CRNT. Segundo, con este abordaje, un análisis que no es completamente global pero que tampoco es local, fue realizado. Presentó una visión sobre qué tan robusta es la biestabilidad en el sistema considerado, y cómo los diferentes tipos de parámetros, asociados con reacciones, translocación y concentración, controlan no solo la emergencia de la biestabilidad, sino también sus propiedades. Tercero, un modelo muy compacto con biestabilidad inducida por compartimientos fue obtenido.

Los sistemas biestables están entre los principales componentes involucrados en comportamientos más complejos como oscilaciones y memoria. Por lo tanto, esperamos que la metodología propuesta y los resultados que surgen de ella den lugar a entender cómo estos comportamientos pueden emerger de la compartimentalización.

Métodos

Chemical Reaction Network Toolbox. La *Chemical Reaction Network Theory* (CRNT) desarrollada por el grupo de Horn, Jackson, y M. Feinberg establece relaciones entre la estructura de redes de reacción químicas y sus propiedades cualitativas, como la existencia, unicidad, multiplicidad, y estabilidad de sus puntos fijos. Entre otras preguntas, esta teoría nos permite decidir si existe alguna combinación de valores de constantes de velocidad tal que una cierta red de reacciones tiene la capacidad de mostrar biestabilidad. Hemos implementado CRNT como una *Toolbox* computacional, usando la versión v2.3.

La CRNToolbox produce distintas soluciones dependiendo del orden en el que se introducen las reacciones. Para este sistema, se encontraron nueve soluciones diferentes (Tabla Suplementaria 1).

Análisis *going-up and coming-down*. Para identificar comportamientos biestables y sus umbrales (ver más adelante) en las estructuras capaces de biestabilidad propuestas por CRNToolbox, implementamos el análisis *going-up and coming-down* [31] en MATLAB. Brevemente, la curva estacionaria de respuesta al incrementarse el estímulo (rama *going-up*) es comparada con la curva obtenida cuando el estímulo se disminuye (rama *coming-down*). Para cada estímulo, la condición inicial es el estado estacionario del *output* obtenido en la simulación previa. Si el sistema es monoestable, ambas ramas van a coincidir, ya que en este caso la solución de estado estacionario es única para cada estímulo. Por otro lado, para un sistema biestable las ramas no van a coincidir dentro de cierto rango de estímulo. En los límites inferior ($Stim_{off}$) y superior ($Stim_{on}$) de ese rango, las ramas *coming-down* y *going-up* mostrarán respectivamente una discontinuidad.

Implementamos el análisis describiendo el modelo de interés como un sistema de EDOs, donde entre sus parámetros se encuentra el que se considera como el estímulo. El resto de los parámetros definen el set donde se determina la capacidad de obtener una respuesta biestable.

El código computacional que desarrollamos evoluciona numéricamente el sistema de EDOs para un dado set de parámetros y un valor predefinido de estímulo hasta que el cambio relativo en concentraciones es despreciable y, por lo tanto, se considera que un estado estacionario ha sido obtenido. El proceso se repite primero subiendo y luego bajando a lo largo de un vector de estímulos predefinido. Para el primer valor de estímulo, las concentraciones iniciales son elegidas tal que todas las enzimas se encuentran en el estado citoplasmático inactivo. La respuesta estacionaria obtenida se usa luego como la condición inicial para el siguiente valor de estímulo, donde se deja evolucionar el sistema hacia un nuevo estado estacionario. Se identifican discontinuidades en ambas ramas de la curva dosis-respuesta como aquellos valores que se desvían significativamente de la tendencia dada por los valores vecinos. Específicamente, decimos que existe una discontinuidad en el valor de estímulo $Stim_i$ si la diferencia entre la respuesta encontrada para $Stim_i$ y $Stim_{i-1}$ es al menos cinco veces mayor que la diferencia entre el *output* para $Stim_{i-1}$ y $Stim_{i-2}$, y es mayor a 10^{-3} . Este último umbral fue seleccionado empíricamente para reducir la posibilidad de falsos positivos. Si una discontinuidad es encontrada para cada una de las ramas, el sistema es clasificado como biestable. Si no se registran discontinuidades, el set de parámetros se clasifica como monoestable. Ahora bien, si solo se encuentra una discontinuidad, se etiqueta el sistema para analizar más en detalle y evaluar si se trata realmente de un *switch* en un solo sentido, o si el vector de estímulo definido no fue el apropiado (por ejemplo, el rango considerado no incluye una discontinuidad o las componentes del vector están muy separadas entre sí). Restringimos el análisis a respuestas mayores o iguales a 10^{-2} para al menos un valor de estímulo.

Muestreo de parámetros. Usando Latin Hypercube Sampling (LHS) [27], [32], para asegurar un muestreo homogéneo, escaneamos el espacio de parámetros multidimensional e identificamos regiones de biestabilidad. Para investigar la existencia de patrones, realizamos un test de enriquecimiento para cada parámetro [34] seguido por un test de influencia.

Dado un set de valores para un parámetro, los test de enriquecimiento [34] pueden utilizarse para determinar si los miembros de un subset del set original están distribuidos de manera aleatoria o si se encuentran agrupados en regiones específicas. Aquí, realizamos tests de enriquecimiento para investigar la existencia de patrones en los valores de parámetros que dan lugar a comportamiento biestable. Los valores muestreados fueron separados en clases logarítmicas. Si, por ejemplo, un parámetro fue muestreado en el rango $[10^{-3}, 10^2]$, la primera clase será $[10^{-3}, 10^{-2}]$, la segunda $[10^{-2}, 10^{-1}]$

^{1]}, etc. Sea N el número total de valores muestreados para un dado parámetro, y M el número de valores para los que el sistema fue biestable. También, sean y_i y x_i los números de esos valores que corresponden a la clase i -ésima en N y M , respectivamente, tal que $\sum_i y_i = N$ y $\sum_i x_i = M$. La idea principal es determinar si el comportamiento en cada clase está enriquecido con respecto al caso donde los M valores del parámetro en estudio fueron seleccionados independiente y uniformemente de manera aleatoria sin reemplazo entre los N valores muestreados (hipótesis nula). Si ese fuera el caso, la probabilidad de observar al menos x_i valores en la clase i -ésima dando lugar a biestabilidad seguiría un distribución hipergeométrica:

$$P(n = x_i | y_i, M, N) = \frac{\binom{y_i}{x_i} \binom{N - y_i}{M - x_i}}{\binom{N}{M}}.$$

Luego, podemos calcular un p-valor p_i para medir la significación estadística de la probabilidad de observar al menos x_i valores dando lugar a biestabilidad en la clase i -ésima, donde se asume que la hipótesis nula es la verdadera distribución subyacente. En este trabajo, se consideró a la clase i -ésima como enriquecida si $p_i < 10^{-4}$.

Para evaluar la influencia de cada parámetro en el control de la biestabilidad, dividimos la distribución de valores para cada parámetro en dos grupos: el grupo positivo contenía los valores del parámetro para los cuales el sistema presentaba comportamiento biestable, mientras que en el grupo negativo se ubicaban los valores donde el sistema era monoestable. Mediante un test U de Mann-Whitney [35], implementado en MATLAB, se determinó si los datos observados evidencian una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones.

MatCont. Usamos MatCont, un paquete gráfico de MATLAB implementado para el análisis numérico interactivo de sistemas dinámicos [36]. Para realizar una continuación del equilibrio en MatCont, es necesario introducir primero el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias cuya dinámica se quiere estudiar, e ingresar valores para los parámetros del sistema. Luego, se debe simular el sistema hasta llegar a un estado estacionario, mediante el uso de los integradores implementados en el paquete. A continuación, se utiliza el estado estacionario alcanzado como punto inicial y luego, se selecciona el parámetro del sistema que se quiere variar durante la continuación.

Métodos para el análisis del ancho, área y distancia de la región biestable. Luego de remover los sets de parámetros con respuestas menores a 10^{-2} , estudiamos los *outputs* biestables. Para cada set de parámetros, medimos las siguientes cuatro propiedades: el ancho de la región biestable ($Stim_{on} - Stim_{off}$), el área del ciclo de histéresis (área de la rama *coming down* - área de la rama *going up*), y la distancia entre las dos ramas (distancia₁ = diferencia entre las ramas en $Stim_{on}$; distancia₂ = diferencia entre el *output* en $Stim_{off}$ -rama superior- y $Stim_{on}$ -rama inferior-).

Primero, graficamos la distribución de valores para la variable correspondiente (ancho, área, distancia) en clases logarítmicas (ver los resultados en el Apéndice, Fig. S1.4a). Esto resultó en 7 clases para el ancho (entre 10^{-6} and 10^1), 9 para el área (entre 10^{-8} and 10^1), 6 para distancia₁ (entre 10^{-3} and 10^0 , divididas en mitades: $10^{-3} - 0.5 \times 10^{-2}$, $0.5 \times 10^{-2} - 10^{-2}$, etc.) y 7 para distancia₂ (entre 10^{-4} and 10^0 , divididas en mitades, con la clase $10^{-4} - 0.5 \times 10^{-3}$ vacía).

Luego, definimos dos grupos en los sets de parámetros: uno con las clases para los mayores valores para cada variable, el otro con el resto de las clases. El valor que separa los dos grupos para las cuatro variables es el mismo: 10^{-1} . Usando un test U de Mann-Whitney implementado en MATLAB, pudimos analizar la influencia de cada parámetro en los valores de las cuatro variables.

Finalmente, para los dos parámetros con los mayores valores absolutos del z-valor, graficamos un parámetro versus el otro en un *colormap* como función de la correspondiente variable. Esto nos permitió interpretar el tipo de control que los dos parámetros tienen sobre las variables (ver los resultados en el Apéndice, Fig. S1.4b).

Algunas consideraciones: para el primer paso en este método, las clases para las distancias fueron divididas en mitades de manera tal de tener un mayor número de clases; en el tercer paso, solo los dos parámetros con los mayores valores absolutos del z-valor mostraron un patrón en el *colormap*. A su vez, de los 1117 sets de parámetros con curvas biestables (con forma de “S”), 78 mostraron valores negativos para el área, debido a valores relativamente pequeños en el ancho, lo que resultó en errores de integración. Estos casos no fueron considerados en el análisis.

Criterio de Inyectividad del Jacobiano. Dada una red de especies interactuantes, el Criterio de Inyectividad del Jacobiano [30] nos permite excluir multiestacionariedad u obtener las condiciones en las constantes de velocidad que garanticen monoestacionariedad [22]. Dada una función diferenciable $f = (f_1, \dots, f_n): \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$, el Jacobiano en un punto $x = (x_1, \dots, x_n)$ en $\mathbb{R}^n$, $J_x(f)$, está definido como la matriz $n \times n$ con $\frac{\partial f_i}{\partial x_j}$ como el elemento (i, j) . Si f es una función polinomial, entonces todos los elementos de $J_x(f)$ son polinomiales en x , y también lo es su determinante. El Criterio de Inyectividad del Jacobiano establece que si todos los f_i son polinomiales de orden menor o igual a dos, y el determinante del Jacobiano no es cero en un dominio convexo $\Omega \subseteq \mathbb{R}^n$, entonces f es inyectiva en Ω .

Los estados estacionarios positivos para un sistema de reacciones bioquímicas descritas por la Ley de Acción de Masas están dados por las soluciones positivas de un sistema de ecuaciones polinomiales $f_{\kappa,i}(x) = 0$, $i = 1, \dots, n$, donde n es el número de especies en el sistema. Los coeficientes de los polinomiales $f_{\kappa,i}$ dependen de la forma de las ecuaciones de conservación y de las constantes de velocidad $\kappa = \{k_j\}$, donde k_j es la constante de velocidad para la reacción r_j . Si la función $f_\kappa = (f_{\kappa,1}, \dots, f_{\kappa,n})$ es inyectiva sobre los números reales positivos $\mathbb{R}_+^n$, entonces no puede existir más de una solución positiva a la ecuación $f_\kappa(x) = (0, \dots, 0)$, y la multiestacionariedad no puede ocurrir. Por lo tanto, el Criterio de Inyectividad del Jacobiano nos permite encontrar condiciones que aseguren la inyectividad de f_κ y consecuentemente, la monoestacionariedad de la red. Si todos los coeficientes del determinante de $J_x(f_\kappa)$ tienen el mismo signo, no desaparecerá para ningún valor positivo de x , y, por lo tanto, f_κ será inyectiva en $\mathbb{R}_+^n$ y el sistema no presentará más de un estado estacionario. Sin embargo, si ese no es el caso, el criterio todavía nos permite encontrar condiciones para las constantes de velocidad que son necesarias para que tenga lugar la multiestacionariedad [22].

Es posible usar este criterio para crear un algoritmo que elija los ciclos de feedback positivo estructurales que son relevantes para la emergencia de la biestabilidad. Estructurales porque no dependen de la forma funcional exacta de los flujos, y relevantes porque, si todos son rotos, se pierde la biestabilidad. Para este trabajo, utilizamos una implementación en Maple de este algoritmo [5].

Capítulo 2: Diferentes tipos de oscilaciones obtenidas mediante biestabilidad subyacente

Antecedentes

Osciladores, feedbacks, y clasificación

En la Introducción de esta Tesis, presentamos los lineamientos básicos para la obtención de oscilaciones. Los principios de diseño de osciladores bioquímicos han sido analizados en detalle [8], [37], [38], [39]. Por sobre todas las cosas, la existencia de un ciclo de retroalimentación negativo (*feedback* negativo) es un requisito excluyente para cualquier oscilador no lineal [40]. Pero no es suficiente, ya que el *feedback* negativo debe ser retrasado (el *delay* que mencionamos anteriormente) para prevenir que el sistema encuentre su estado homeostático, mediante *overshoots* y *undershoots* permanentes de las variables en el tiempo [8]. Existen diferentes mecanismos para inducir un retraso temporal en el *feedback* negativo.

Como mencionamos, una manera de obtener oscilaciones es incorporar un retraso explícito en el modelado [41]. Otra es considerar un esquema de reacciones con múltiples pasos intermedios, describiendo, por ejemplo, modificaciones intermedias o traslocaciones de las especies bioquímicas [18], [38]. Una manera alternativa que imita un retraso temporal, discutida en la literatura [8], es introducir al sistema un ciclo de retroalimentación positivo (*feedback* positivo) -como puede ser un proceso auto-catalítico- el cual puede inducir un mecanismo de histéresis. Este fenómeno de histéresis está asociado con la memoria interna del sistema y crea comportamientos de *overshoot* de manera natural.

Los osciladores biológicos que combinan *feedbacks* positivos y negativos han sido estudiados y caracterizados en la literatura [3], respondiendo a la pregunta de qué ventajas trae el ciclo positivo, dando por sentado que un simple ciclo negativo tiene el potencial de generar oscilaciones sostenidas. Generalmente, es difícil ajustar la frecuencia de un oscilador de *feedback* negativo sin poner en riesgo su amplitud. Mediante el uso de ciclos positivos y negativos, se puede obtener una frecuencia sintonizable y amplitud casi constante. Aún más, la combinación de las dos clases de *feedback* ha sido reconocida como ingrediente fundamental para revelar un amplio repertorio de tipos oscilatorios en osciladores no lineales [3], [14], [28], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50]. Esta categoría de sistemas puede ser representada por una variedad de modelos de 2 componentes donde una de las dos especies actúa como un auto-activador [38]. En este capítulo, analizaremos *motifs* de señalización con más de 2 componentes, pero naturalmente caracterizados por *feedbacks* tanto positivos como negativos. Como mencionaremos, una característica crucial de estos modelos es que sin el ciclo de *feedback* positivo, no se registran oscilaciones. Y cuando el ciclo positivo está presente, diferentes tipos de oscilaciones emergen.

De la literatura, hay dos tipos principales de osciladores, clasificados según la manera en que aparecen mediante bifurcaciones. Aquí debemos introducir otras dos bifurcaciones: la *Saddle-Homoclinic* (SHom) y *Saddle-Node on an Invariant Circle* (SNIC) [6], [51], [52]. Se presenta un esquema en la Fig. 2.1a.

La bifurcación SNIC ocurre en combinación entre una bifurcación *Saddle-Node* (SN) y lo que se denomina un círculo invariante en el espacio de fases, donde cualquier solución que comienza en el círculo permanece en el mismo. En ese círculo, un nodo y un punto silla/*saddle* colisionan (bifurcación SN), pero esa colisión da lugar a un ciclo límite (el círculo invariante). La SNIC es una bifurcación de

codimensión-1 (como la SN, ocurre con el cambio en un solo parámetro) pero no es local, sino global. El cambio en el espacio de fases ya no se restringe a la vecindad de la bifurcación, ya que crea (o destruye, según cómo se varía el parámetro) un ciclo límite en su totalidad.

La bifurcación SHom es otra global de codimensión-1, con la diferencia de que el ciclo límite presente en el sistema colisiona con un punto *saddle*. Tanto para la SNIC como para la SHom, cuando el parámetro está cerca de la bifurcación y el ciclo límite está presente, el mismo registra un período que se acerca a infinito, o frecuencia cero. En la bifurcación, el período es infinito. Al cruzar la bifurcación, los ciclos límites dejan de existir.

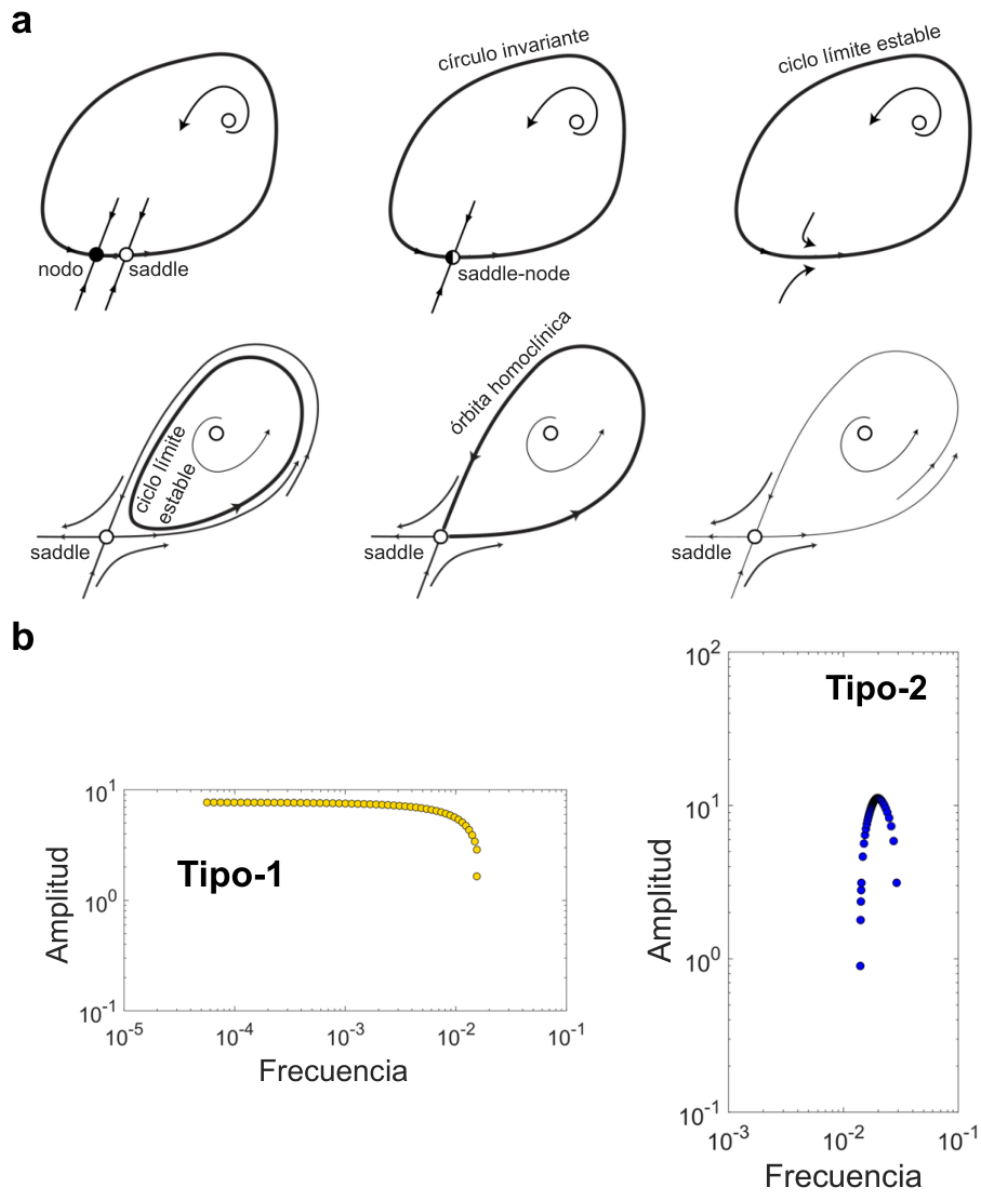


Figura 2.1: Bifurcaciones globales y curvas de amplitud vs. frecuencia. a: Esquema de las bifurcaciones Saddle-Node on an Invariant Circle (fila superior) y Saddle-Homoclinic (fila inferior). Figura adaptada de [6]. b: Ejemplos de curvas amplitud vs. frecuencia para los dos tipos de osciladores. Figura basada en [3].

Los osciladores Tipo-1 nacen a través de bifurcaciones de frecuencia cero como la SNIC y SHom. Cuando los parámetros de entrada se mueven alrededor de la bifurcación, las oscilaciones correspondientes son caracterizadas por oscilaciones de relajación, con una frecuencia que varía desde cero hasta un máximo valor, mientras la amplitud permanece prácticamente constante. Generalmente, el diagrama amplitud-frecuencia de oscilaciones Tipo-1 corresponde a una línea plana horizontal [3]. Los osciladores Tipo-2 comprenden oscilaciones de frecuencia finita, con un perfil casi armónico, y caracterizados por bifurcaciones de Hopf [51], [52]. Para bifurcaciones supercríticas de Hopf, cuando un parámetro de entrada se varía alrededor de la bifurcación, la amplitud de las oscilaciones cambia entre cero y un valor máximo, mientras la frecuencia permanece relativamente constante dentro de un angosto intervalo. El diagrama amplitud-frecuencia de las oscilaciones de Tipo-2 está caracterizado por una forma de “U invertida” [3]. Se presentan ejemplos de este tipo de curvas en la Fig. 2.Ib.

Biestabilidad de un nivel, oscilaciones de dos (y tres) niveles

Uno de los trabajos que citamos en la Introducción corresponde al de Qiao y co-autores de 2007. Enfocándose en modelos de vías de señalización celular, el estudio de Qiao et al. analizó el reconocido modelo de cascada MAPK desarrollado por Huang y Ferrell [12], obteniendo una amplia región de respuestas oscilatorias [9]. Encontraron que el comportamiento oscilatorio emergente requiere al menos dos niveles, uno de los cuales debe estar basado en doble fosforilación (esquema de este ciclo en la Fig. 2.IIa). De sus resultados, los autores concluyeron que la biestabilidad de un nivel es una condición necesaria para las oscilaciones en la cascada, lo cual es consistente con el hecho de que la doble fosforilación muestra biestabilidad para elecciones particulares de los valores de parámetros [10]. Remarcan que las oscilaciones están construidas alrededor de un ciclo de histéresis, y que dichas oscilaciones en la cascada MAPK tienen carácter de relajación. En la Fig. 2.IIb, presentamos un ejemplo del trabajo de Qiao et al. En el mismo, se grafica el ciclo límite para el *output* de la cascada de dos niveles, ciclo de modificación covalente que activa a un ciclo de doble fosforilación, comparado con la curva biestable subyacente al ciclo doble.

En otro estudio de la cascada MAPK, los autores se enfocan en el control dependiente de sustrato de la proteína ERK, encontrando que la aparición de oscilaciones depende de la biestabilidad, de manera similar al oscilador canónico de van der Pol [53].

Un trabajo de Suwanmajo y Krishnan analizó el comportamiento de sistemas de fosforilación en múltiples sitios como parte de vías de señalización [54]. Presentaron un oscilador mínimo basado en un ciclo de doble fosforilación, donde las oscilaciones fueron inducidas por la presencia de activación/inactivación lineal de las enzimas. Este modelo es de particular interés ya que removiendo la variable correspondiente a la enzima inactiva resulta en el típico ciclo de doble fosforilación, el cual no puede presentar oscilaciones por su cuenta.

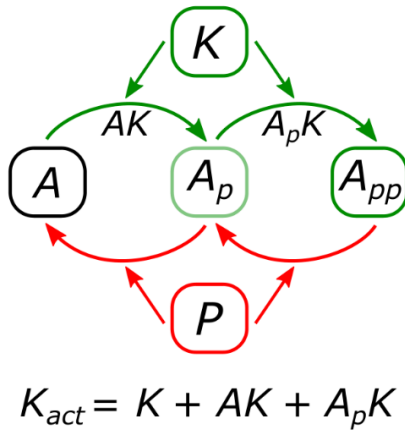
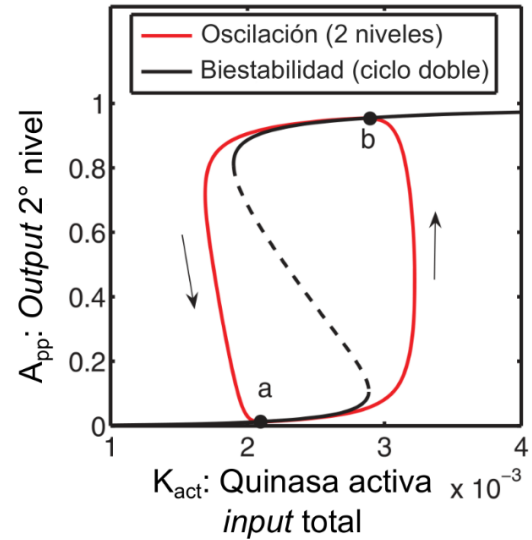
a**b**

Figura 2.II: Biestabilidad subyacente y oscilaciones. **a:** Esquema del ciclo de doble fosforilación. Reacciones de fosforilación en verde, desfosforilación en rojo. Todas involucran asociación, disociación, y catálisis de complejos intermedios (ver detalle de las reacciones en el Apéndice, Fig. S2.1). La cantidad total de quinasa activa input, K_{act} , es la suma de la quinasa activa libre y los dos complejos intermedios, uno en cada paso de fosforilación. **b:** Ejemplo de ciclo límite (en rojo) en el sistema formado por los dos primeros niveles de la cascada MAPK, comparado con la curva biestable subyacente al segundo nivel, el ciclo de doble fosforilación (curva en negro, línea punteada para la rama inestable). K_{act} es una variable en el sistema de dos niveles (donde la quinasa puede desactivarse), pero es un parámetro en el ciclo doble aislado (con el que se obtiene la curva biestable). Los puntos “a” y “b” corresponden a los saltos entre las ramas de la curva biestable. Las flechas indican la trayectoria que describe el sistema de dos niveles. Figura adaptada de [9].

Dos tipos de oscilaciones, un solo oscilador

Trabajos previos en biología de sistemas han analizado diferentes tipos de oscilaciones para diferentes diseños de un sistema [3], [37], [55]. En este capítulo, mostramos que *feedbacks* positivos y negativos combinados, dando a lugar a un módulo biestable anidado dentro de un ciclo de *feedback* negativo, puede producir diferentes tipos de oscilaciones yendo de Tipo-1 a Tipo-2 dentro del mismo diseño del sistema. Nos enfocamos en dos modelos con doble fosforilación, de múltiples componentes cada uno (mayor a 2), y los estudiamos sin reducir el número de variables. Como mencionamos, la biestabilidad en el ciclo de doble fosforilación es una condición necesaria para que las oscilaciones ocurran, dando a entender que un ciclo de *feedback* positivo está presente. Nuestro análisis se enfoca en determinar si el ciclo positivo o el negativo es el que está dominando las oscilaciones en el sistema, y como el *output* se relaciona con la biestabilidad subyacente. Análisis de bifurcaciones, curvas amplitud-frecuencia, y series temporales nos dieron la información necesaria para nuestros estudios.

Entender cómo las oscilaciones emergen en sistemas de señalización es un tema de suma importancia y ampliamente estudiado. Sin embargo, el mecanismo que proponemos aquí es nuevo en su rol de producir dos tipos diferentes de oscilaciones. Se basa en biestabilidad y secuestro. El secuestro es producido por la unión entre componentes, por lo cual es omnipresente en vías de señalización. Su magnitud y, por lo tanto, su relevancia y efectos dependen en los valores de los parámetros del sistema. La biestabilidad puede ser obtenida en diferentes estructuras de señalización, con la doble

fosforilación siendo una de ellas. Las enzimas compartidas pueden llevar a biestabilidad [11], y dado lo ubicuo que es este proceso, es probable que la biestabilidad sea una característica recurrente en señalización. En resumen, los ingredientes que estamos considerando pueden aparecer juntos en la mayoría de las vías de señalización. Por esta razón, es importante entender las funciones biológicas que pueden emerger de ellas, particularmente dos tipos distintos de comportamiento oscilatorio y la posibilidad de sintonizar el sistema de un tipo a otro, con propiedades marcadamente distintas, o en algún punto intermedio, con propiedades mixtas.

En primer lugar, estudiamos en este capítulo un ciclo de doble fosforilación con mínimas adiciones las cuales aseguran secuestro. Identificamos dos tipos de comportamiento oscilatorio, y una ruta en el espacio de parámetros conectando a ambos que deja en evidencia los cambios en la jerarquía de los *feedbacks*. Luego, aplicamos un estudio similar a la primera parte de la cascada MAPK, con resultados también similares. Más adelante, evaluamos el comportamiento de un modelo simplificado que utiliza un módulo biestable distinto. Concluimos discutiendo potenciales utilidades e implicaciones de los resultados en este capítulo, incluyendo un breve análisis de un modelo oscilatorio basado en datos experimentales. Los valores de parámetros no informados en las Figuras y en Resultados pueden encontrarse en la sección Métodos.

Resultados

Un mínimo modelo de señalización produce una variedad de oscilaciones

Nos enfocamos en un modelo propuesto por Suwanmajo y Krishnan [54], que consiste en un ciclo de doble fosforilación (ciclo DP por sus siglas en inglés) presentando una quinasa y una fosfatasa compartidas, con la adición de un módulo de activación para la quinasa (Fig. 2.1, ver detalle de las reacciones en el ciclo DP en el Apéndice, Fig. S2.1). En este módulo, la activación e inactivación son ambas directas y permite una variable extra, la quinasa inactiva, respecto al ciclo DP aislado. Este módulo de activación puede representar la conexión entre un módulo previamente aislado y una vía de señalización. Por lo tanto, el modelo resultante combina una estructura capaz de demostrar biestabilidad, posible gracias a *feedbacks* positivos subyacentes [5], [24], con el secuestro de una enzima, lo que a su vez produce un *feedback* negativo no-explicito [56]. Con esto nos referimos a una estructura de *feedback* que no es explícitamente aparente en la red bioquímica. Si nos referimos al esquema en la Fig. 2.1, el mismo no devela la presencia de un ciclo de *feedback* negativo, el cual será discutido más adelante. La relativa simplicidad del sistema, que solo le agrega una variable al ciclo DP, junto con la combinación de ciclos de *feedback* positivos y negativos no-explicitos, resulta en un modelo de especial interés en el estudio de oscilaciones en sistemas de señalización. En esta sección de Resultados, buscamos analizar cómo obtener diferentes tipos de oscilaciones al manipular: la separación de escalas temporales entre la quinasa inactiva y el ciclo DP; el secuestro de la quinasa activa libre K ; y el comportamiento biestable del ciclo DP.

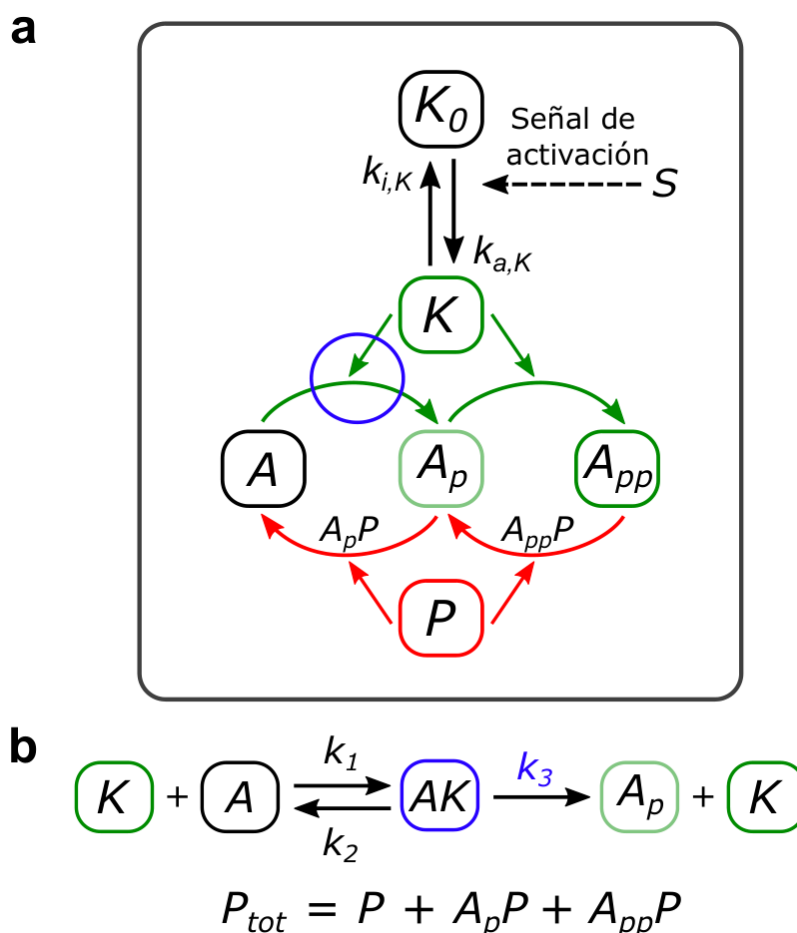


*Figura 2.1: Esquema del modelo de Suwanmajo-Krishnan, basado en su figura [54]. **a**: Reacciones en el modelo (verde para fosforilación, rojo para desfosforilación). Todas las reacciones en el ciclo doble involucran asociación, disociación, y catálisis de complejos intermedios. El input es el parámetro S , una señal de activación, y el output es el sustrato doblemente fosforilado, A_{pp} . **b**: Reacciones en el primer paso de fosforilación, mostrando las reacciones alrededor del complejo intermedio AK , y las variables que componen la fosfatasa total, cantidad relevante para resultados en esta sección. El esquema del resto de las reacciones en el ciclo DP se presenta en el Apéndice, Fig. S2.1.*

Empezando por el modelo de EDOs de Suwanmajo y Krishnan (modelo SK) [54], es posible reescribir la ecuación correspondiente a la quinasa inactiva (K_0), tal que la constante de velocidad para la inactivación multiplica al resto de la ecuación:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_2[AK] - k_1[A][K] + k_{12}[A_pP],$$

$$\frac{d[AK]}{dt} = k_1[A][K] - (k_2 + k_3)[AK],$$

$$\frac{d[A_p]}{dt} = k_3[AK] - k_4[A_p][K] + k_5[A_pK] + k_9[A_{pp}P] + k_{11}[A_pP] - k_{10}[A_p][P],$$

$$\frac{d[A_pK]}{dt} = k_4[A_p][K] - (k_5 + k_6)[A_pK],$$

$$\frac{d[A_{pp}]}{dt} = k_6[A_pK] + k_8[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P],$$

$$\frac{d[P]}{dt} = (k_8 + k_9)[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P] + (k_{11} + k_{12})[A_pP] - k_{10}[A_p][P],$$

$$\frac{d[A_{pp}P]}{dt} = k_7[A_{pp}][P] - (k_8 + k_9)[A_{pp}P],$$

$$\frac{d[A_pP]}{dt} = k_{10}[A_p][P] - (k_{11} + k_{12})[A_pP],$$

De nuestros estudios computacionales, decidimos tomar $k_c = 1$ ($k_{a,K} = k_{i,K}$), ya que para esta condición el sistema exhibe comportamiento oscilatorio. De esta manera, la constante de inactivación actúa como un parámetro de separación de escalas temporales entre la quinasa inactiva y el resto de las variables.

En la Fig. 2.2, mostramos los resultados al estudiar el sistema con diferentes valores de separación de escalas temporales. En la Fig. 2.2a, presentamos un diagrama de bifurcaciones 2D para $k_{i,K}$ vs. S , la señal de entrada o *input* (como mencionamos, $k_{a,K} = k_{i,K}$). Cada punto de la curva representa una bifurcación de Hopf, y cada set de parámetros debajo de esta curva corresponde a un punto oscilatorio. Una bifurcación Generalizada de Hopf (GH) es obtenida, la cual separa las bifurcaciones supercríticas (en negro en la Fig. 2.2a) de las subcríticas (en rojo). La bifurcación GH es un ejemplo de codimensión-2, al ser obtenida mediante un barrido de parámetros bidimensional.

Quedan definidas dos regiones al realizar un barrido en S : arriba de la GH, se obtienen dos bifurcaciones de Hopf supercríticas, mientras que debajo de la GH, una supercrítica de Hopf ocurre a la izquierda de la región oscilatoria y una subcrítica a la derecha. Este diagrama permite elegir un dado valor de $k_{i,K}$, cambiar la señal de activación S , y encontrar diferentes bifurcaciones de Hopf.

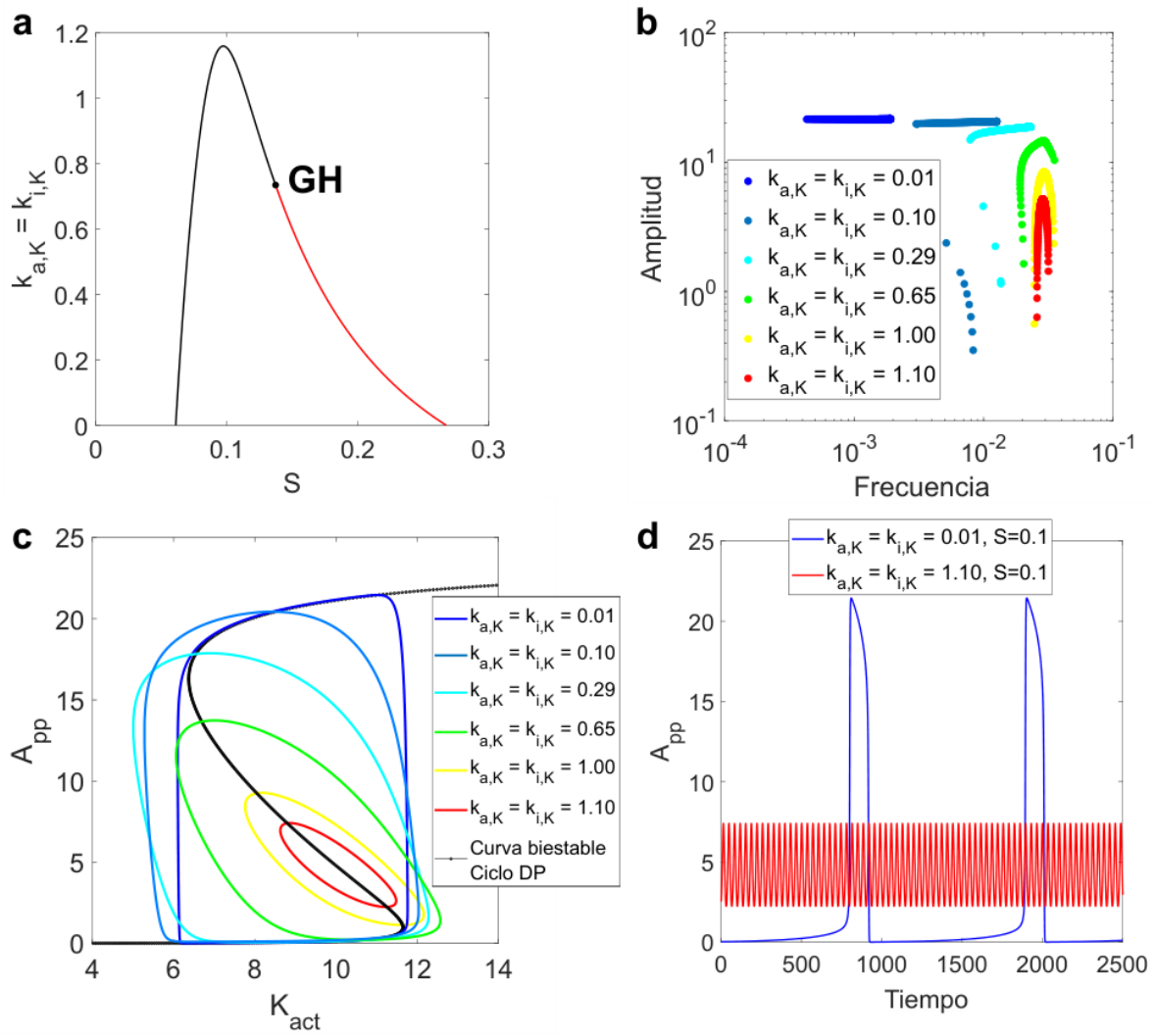


Figura 2.2: Resultados para el análisis de separación de escalas temporales en el modelo SK. **a:** Diagrama de bifurcaciones 2D de $k_{i,K}$ vs. S . En negro, la curva de Hopf supercríticas. En rojo, la curva de Hopf subcríticas. La bifurcación Generalizada de Hopf (GH) se incluye en negro. La región oscilatoria está limitada por el eje x y ambas curvas Hopf. El rango de S donde ocurren las oscilaciones aumenta con la separación de escalas temporales. **b:** Curvas de amplitud vs. frecuencia para seis valores distintos de $k_{a,K} = k_{i,K}$, escaneando el parámetro de input S . A medida que la separación de escalas temporales aumenta, las curvas se mueven hacia la izquierda y arriba, yendo de rangos de amplitud anchos y de frecuencia angostos al caso inverso. Para los valores más bajos de $k_{i,K}$, algunos puntos de amplitud bajos pueden ser hallados en la parte izquierda de las curvas, donde hay una bifurcación de Hopf supercrítica, si el parámetro es lo suficientemente preciso. **c:** Ciclos límite vs. curva biestable subyacente en el ciclo de doble fosforilación, para $S = 0.1$ y cada uno de los seis casos de $k_{i,K}$. La curva biestable se obtuvo escaneando el parámetro de quinasa activa en el ciclo DP (K_{act}). Los ciclos límite aprovechan más la amplitud biestable a medida que $k_{i,K}$ decrece. **d:** Series temporales para dos casos extremos, mostrando la clara diferencia en amplitud y frecuencia.

En la Fig 2.2b, presentamos curvas de amplitud vs. frecuencia para seis valores seleccionados de $k_{a,K} = k_{i,K}$. Estas curvas son obtenidas mediante un barrido de S , y corresponden a las características oscilatorias de la variable de salida u *output*, el sustrato doblemente fosforilado A_{pp} . Siguiendo una

clasificación de osciladores previamente reportada (y citada anteriormente), aquellos basados en solo *feedback* negativo exhiben una curva amplitud vs. frecuencia con la forma de una “U invertida”, mientras que los contruados con *feedback* positivo más negativo presentan curvas mayormente planas [8]. De las curvas obtenidas para diferentes valores de $k_{a,K}$ y $k_{i,K}$, es evidente que tanto el ancho de los rangos para amplitud y frecuencia, como los valores absolutos de amplitud y frecuencia, dependen fuertemente de la separación de escalas temporales. Para $k_{a,K} = k_{i,K} = 1$, la curva es una “U invertida”, con un rango extendido de valores de amplitud en contraste con un rango angosto para la frecuencia. Esto es consistente con los resultados para los modelos de *feedback* negativo en el trabajo de Tsai et al. [3], aun cuando el modelo que estamos analizando presenta tanto *feedbacks* positivos como negativos.

Al incrementar la separación de escalas temporales (menores valores para $k_{a,K} = k_{i,K}$), la curva amplitud-frecuencia cambia su forma, permitiendo un rango más extendido de frecuencias, pero más restringido para la amplitud. Los osciladores de *feedback* positivo-más-negativo estudiados en Tsai et al. muestran este comportamiento robusto en amplitud y sensible en frecuencia [8]. Los autores también presentan un modelo de ciclo celular para el cual pueden ajustar la curva, al cambiar un parámetro responsable de la fortaleza del *feedback* positivo. En nuestro modelo estudiado, cambiar los valores de $k_{a,K} = k_{i,K}$ no afecta el *feedback* positivo, pero puede interpretarse como una manera de cambiar la fortaleza relativa de los ciclos positivos y negativos. La quinasa inactiva puede verse como una variable de secuestro, donde la quinasa activa libre K no está disponible para el módulo DP al haber sido desactivada. Como se explicará en breve más detalladamente, el módulo de activación juega el rol de un ciclo de *feedback* negativo para el módulo DP. Por lo tanto, cuando los valores del módulo de activación de la quinasa son disminuidos, la fortaleza del *feedback* negativo también disminuye frente al ciclo positivo.

En términos de los valores de amplitud y frecuencia, se muestra como una mayor separación de escalas temporales aumenta los primeros y decrece los segundos. Un cambio en la amplitud y frecuencia de las oscilaciones en el previamente mencionado modelo de ciclo celular [3] es estudiado en un posterior trabajo [46]. Los autores destacan que el sistema actúa de manera efectiva como un oscilador de *feedback* negativo para el caso de menor amplitud y mayor frecuencia. Aun cuando nuestro trabajo se centra en un modelo mínimo de señalización con *feedbacks* no-explícitos, los resultados obtenidos en términos de separación de escalas temporales muestran la posibilidad de realizar una transición entre diferentes modos de oscilación.

Cuando $k_{a,K}$ y $k_{i,K}$ son disminuidos, el módulo biestable (el ciclo DP) posee reacciones más rápidas comparadas con las del módulo de activación de la quinasa. En este caso, la dinámica biestable es más veloz que el secuestro llevado a cabo en el primer nivel del modelo. En la Fig. 2.2c, presentamos una comparación de los ciclos límites obtenidos en el modelo Suwanmajo-Krishnan y la correspondiente curva biestable del ciclo DP aislado. Como definimos previamente, la cantidad total de quinasa activa, K_{act} , es la suma de la quinasa activa libre y los dos complejos intermedios, uno en cada paso de fosforilación ($K_{act} = K + AK + A_pK$). K_{act} pasa de ser un parámetro en el ciclo DP a convertirse en una variable en el sistema extendido, y nos permite evaluar la relación entre la biestabilidad del subsistema y las oscilaciones emergentes. Como los únicos parámetros modificados corresponden al módulo de activación, la curva biestable subyacente permanece igual. Cuando la separación de escalas es grande, el ciclo límite sigue de cerca el ciclo de histéresis que emerge en el módulo biestable, mostrando una típica oscilación de relajación. Al decaer la separación de escalas, el ciclo límite se vuelve más suave y de menor tamaño, pero sigue siendo determinado por la posición de la curva biestable. En la Fig. 2.2d, mostramos series temporales para los dos extremos, y como difieren en amplitud y frecuencia. Esto es mayor evidencia de que el simple módulo de activación puede cambiar el sistema entre diferentes modos oscilatorios.

Nuevas bifurcaciones manipulando la biestabilidad subyacente

Un cierto grado de separación de escalas temporales está usualmente presente en osciladores de relajación, y como hemos mostrado en la anterior subsección, aumentarlo permite mayores valores de amplitud y periodo, junto con una forma tipo punta o *spike*. Sin embargo, es posible obtener diferentes tipos de oscilaciones fijando la separación de escalas, y en su lugar, manipular la biestabilidad existente dentro del sistema. Procedemos a estudiar qué sucede en el ciclo DP cuando modificamos un parámetro específico, y cómo el comportamiento del módulo biestable se traduce a oscilaciones en el sistema completo.

En la Fig. 2.3, mostramos el mismo tipo de análisis presentado en la Fig. 2.2, esta vez estudiando el efecto de la constante de velocidad catalítica para el primer paso de fosforilación: el parámetro k_3 (ver Fig. 2.1b, con las reacciones k_1 , k_2 y k_3 para el primer paso de fosforilación). Para todos estos resultados, $k_{a,K} = k_{i,K} = 0.65$, lo que representa una separación de escalas de tiempo relativamente pequeña.

En la Fig. 2.3a, el diagrama de bifurcaciones 2D para k_3 vs. S muestra la aparición no solo de bifurcaciones GH, sino también de otras bifurcaciones de codimensión-2: Bogdanov-Takens (BT) y un *Cusp Point* (CP). Esto es relevante para nuestros estudios, ya que la presencia de puntos BT y CP es evidencia de bifurcaciones *Saddle-Homoclinic* (SHom) y *Saddle-Node* (SN) en el sistema [57]. En una bifurcación BT, se cruzan curvas de bifurcaciones de Hopf, SN y SHom. En una CP, se juntan dos curvas SN.

Como sabemos, una bifurcación SHom tiene un efecto drástico en las oscilaciones: cerca de esta bifurcación, la amplitud permanece constante mientras que el periodo aumenta significativamente. Una bifurcación SN indica que hay biestabilidad en alguna región del espacio de parámetros. Con esto, es posible definir tres regiones en este diagrama 2D: una oscilatoria, una excitable (de tres puntos fijos -3 PF-) y una biestable (como se indica con flechas en la versión aumentada de la Fig. 2.3a).

En la Fig. 2.3b, mostramos curvas de bifurcación no incluidas en el panel anterior: SHom y *Limit Point Cycle* (LPC). Estas curvas están muy cerca una de otra. La presencia de una curva de bifurcaciones de Hopf subcríticas es consistente con una curva LPC: los ciclos límites que nacen de dichas Hopf son inestables, y colisionan con ciclos límites estables en una LPC. El nombre de la bifurcación LPC proviene del nombre alternativo para la SN (*Limit Point*), e indica su rol de SN sobre un ciclo limite estable y otro inestable. En la Fig. 2.3b, la curva SHom aparece entre curvas SN, donde un punto silla o *saddle* puede ser encontrado.

Para valores altos de k_3 , dentro de la región oscilatoria, las bifurcaciones corresponden a supercríticas de Hopf, lo que se condice con las curvas de amplitud vs. frecuencia presentadas en la Fig. 2.3c, para $k_3 = 2$ y $k_3 = 3$ al variar S . El rango de frecuencia es pequeño relativo al rango de amplitud: la amplitud es más fácil de manipular. Para menores valores de k_3 , el sistema se aproxima a las bifurcaciones SHom y la región biestable, lo que resulta en rangos de amplitud más angostos. Para $k_3 = 1$, la bifurcación de Hopf a la derecha es ahora subcrítica, lo que explica los valores de amplitud limitados que se observan en la parte derecha de la curva amplitud-frecuencia. Para $k_3 = 0.84$, ambos extremos de la curva provienen de Hopf subcríticas, reduciendo el rango total de amplitud. Por otra parte, los valores de frecuencia se movieron a la izquierda a medida que k_3 bajaba.

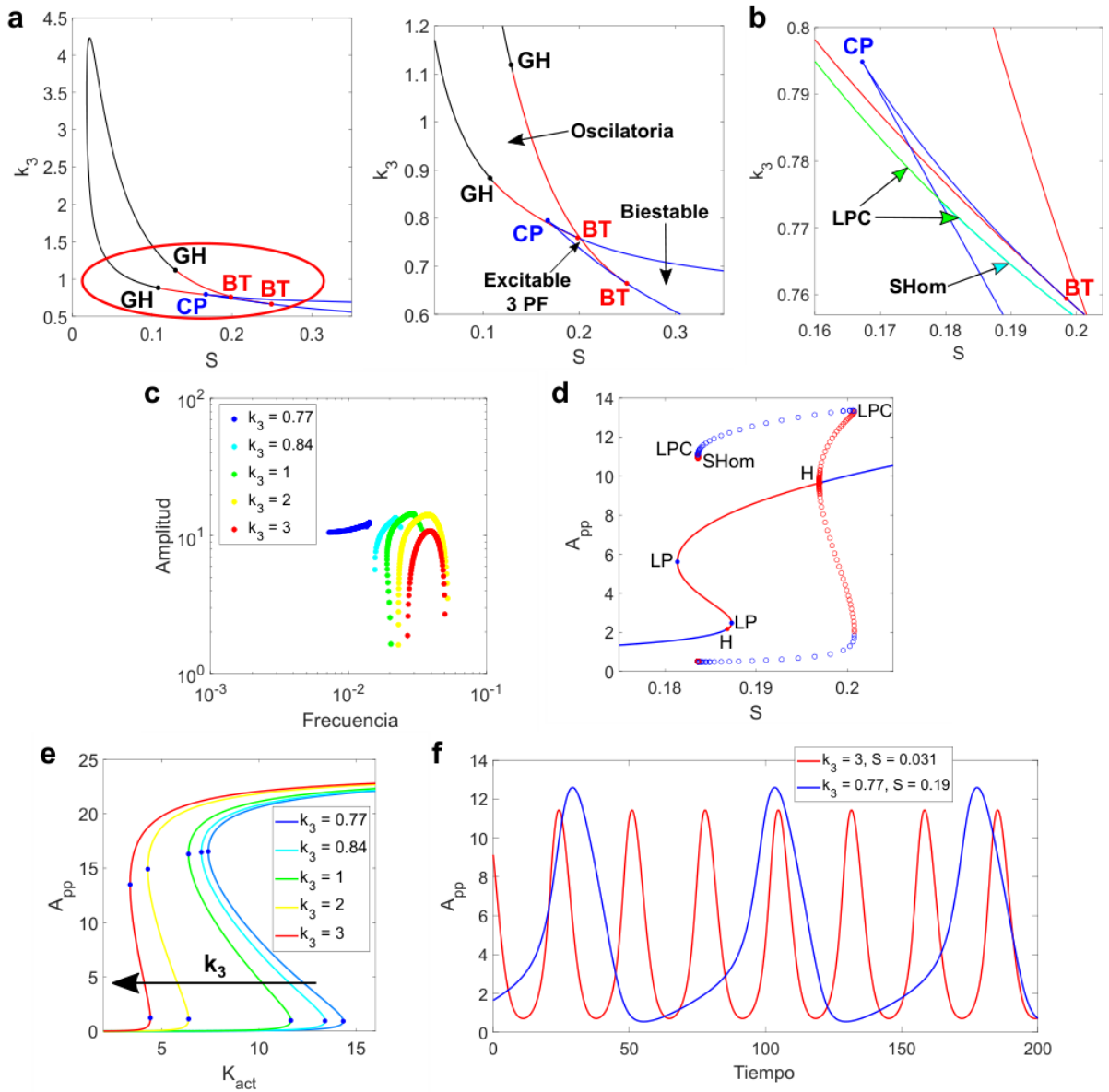


Figura 2.3: Resultados para el análisis k_3 vs. S en el modelo SK. **a:** Diagrama de bifurcaciones 2D para k_3 y S . En negro, la curva de Hopf supercríticas. En rojo, la de subcríticas. En azul, las curvas de Saddle-Node (SN), con el punto cúspide o cusp point (CP) en la unión, también en azul. Las bifurcaciones de Bogdanov-Takens (BT) en rojo. Una región biestable aparece para valores bajos de k_3 y altos valores de S , separada de la región excitable por una porción de la curva de Hopf subcríticas. **b:** Acercamiento del diagrama de bifurcaciones 2D con las curvas de bifurcaciones Saddle-Homoclinic (SHom, en cian) y Limit Point Cycle (LPC, en verde). Los ciclos límite estables terminan en las curvas LPC, pero los inestables aumentan su período al acercarse a las bifurcaciones SHom. **c:** Curvas de amplitud vs. frecuencia para cinco valores distintos de k_3 , escaneando S . Las "U" invertidas están cerca de la cima de la región oscilatoria, y hay una transición en la forma de las curvas a medida que el sistema se acerca a las regiones biestables y excitables. Amplitud más robusta, valores de frecuencia menores y rangos relativamente más anchos de frecuencia se observan para menor k_3 . **d:** Diagrama de bifurcaciones 1D para $k_3 = 0.77$ y un barrido de S . Estados estacionarios: estables en líneas azules e inestables en rojas. Mismos colores en círculos para los máximos y mínimos valores de los ciclos límite. Ciclos límite inestables nacen de la bifurcación subcrítica de Hopf a la derecha y continúan hasta la LPC. Ciclo límite estables están delimitados por las LPCs. Otros ciclos límite inestables quedan delimitados entre la LPC

de la izquierda y una SHom (en un rango muy angosto de S). La bifurcación subcrítica de Hopf a la izquierda está “desconectada” de la LPC a la izquierda: empezando de dicha Hopf, hay ciclos límite inestables en un rango pequeño de S que terminarán en otra rama de SHom (no mostrada). **e**: Curvas biestables en el ciclo DP al escanear K_{act} para cada uno de los cinco casos estudiados. Puntos SN en azul. Un claro cambio en el rango de la quinasa activa, permitiendo cambios en la frecuencia del oscilador, mientras que la amplitud varía levemente para cada valor de k_3 . **f**: Serie temporal para dos pares de k_3 y S , representando la variedad de outputs oscilatorios.

Para $k_3 = 0.77$, una bifurcación SHom emerge a la izquierda del rango oscilatorio para S , y la amplitud se vuelve robusta. Si bien el sistema está en presencia de esta bifurcación, el ciclo límite estable termina en una LPC antes de que el periodo pueda llegar a valores más altos. Esto se refleja en el rango relativamente angosto para la frecuencia observado en la Fig. 2.3c (notar que el eje está en escala logarítmica).

En la Fig. 2.3d, mostramos el diagrama de bifurcaciones 1D para $k_3 = 0.77$ al barrer el *input* S . La bifurcación SHom está conectada a un ciclo límite inestable, el cual registra valores de periodo cada vez mayores. Esto deja al sistema sin la posibilidad de aumentar su periodo de oscilación mediante ciclos límites estables (ver leyenda de la Figura para una descripción de las curvas).

El comportamiento de las curvas amplitud vs. frecuencia está estrechamente relacionado con la biestabilidad subyacente del ciclo DP. En la Fig. 2.3e, se muestran las curvas biestables para los valores de k_3 estudiados en el sistema completo. A medida que k_3 baja, el rango biestable se expande, lo que explica los periodos más largos: a mayor rango, más tiempo le toma al sistema completar un ciclo. Por otra parte, la amplitud permanece prácticamente idéntica. Un comportamiento biestable más fuerte en el subsistema DP lleva a diferentes modos de oscilación en el sistema completo, al punto tal que es posible encontrar biestabilidad también en este sistema completo. Para un valor suficientemente bajo de k_3 , el modelo formado por el ciclo DP + activación de quinasa presenta comportamiento biestable, en lo que puede calificarse como una “transferencia de biestabilidad” del subsistema al *motif* de señalización que incluye el paso de activación [58]. Esto quiere decir que la biestabilidad en el ciclo DP se vuelve lo suficientemente fuerte tal que el sistema completo es biestable, mientras que las oscilaciones que ocurren en la vecindad de la región biestable son significativamente distintas de las halladas en el extremo opuesto del rango oscilatorio para k_3 .

En este punto, es importante remarcar dos cosas. Primero, estos resultados no aparecieron cuando sólo se controlaba la separación de escalas temporales. No había ninguna “transferencia de biestabilidad”, ya que el ciclo DP permanecía igual al cambiar $k_{a,K}$ y $k_{i,K}$. Segundo, solo un parámetro fue modificado en esta subsección: k_3 . Al seleccionar un parámetro en el ciclo DP capaz de cambiar las características de la biestabilidad subyacente, las oscilaciones en el sistema completo pueden ser controladas.

En la Fig. 2.3f, se presentan dos ejemplos de oscilaciones, para extremos opuestos del rango de k_3 . Hay un cambio evidente en el periodo, mientras que la amplitud es similar, como fue mostrado en las diferentes curvas amplitud-frecuencia. Para $k_3 = 0.77$, es posible cambiar el valor de S y obtener diferentes formas para las oscilaciones (ver en el Apéndice, la Fig. S2.2).

Control de la amplitud y la frecuencia con dos parámetros del ciclo DP

Es posible aprovechar la variedad de parámetros disponible en el ciclo límite para manipular aún más la biestabilidad subyacente y analizar su impacto en las oscilaciones. En la Fig. 2.4, presentamos los resultados obtenidos al variar dos parámetros del ciclo DP: k_3 y P_{tot} , el segundo siendo la cantidad total de fosfatasa (ver Fig. 2.1b). Mientras que k_3 puede representar una reacción difícil de manipular, desde un punto de vista experimental es plausible modificar la cantidad total de fosfatasa (aunque un cambio en los niveles de fosfatasa puede afectar a otras vías de señalización).

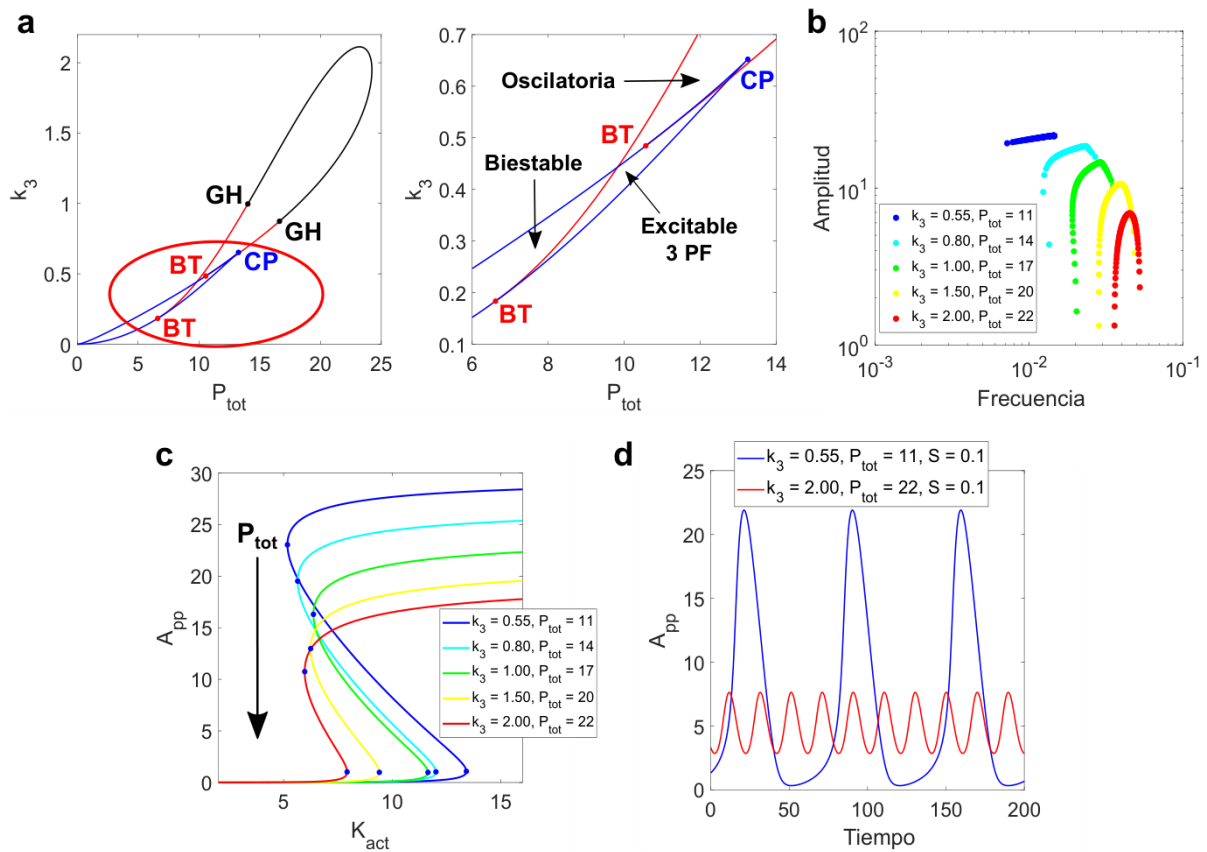


Figura 2.4: Resultados para el análisis k_3 vs. P_{tot} en el modelo SK. **a:** Diagrama de bifurcaciones 2D para los dos parámetros. En negro, la curva de Hopf supercríticas. En rojo, la de subcríticas. En azul, las curvas de SN, con el CP en la unión. Las bifurcaciones BT en rojo, las GH en negro. Una región biestable aparece para valores bajos de k_3 y valores bajos de P_{tot} . **b:** Curvas de amplitud vs. frecuencia para diferentes pares de k_3 y P_{tot} , escaneando el parámetro S . Se observa una transición como en el análisis anterior donde solo se modificaba k_3 en el ciclo DP, pero ahora la amplitud alcanza mayores valores. **c:** Curvas biestables en el ciclo DP al escanear K_{act} para cada par elegido, mostrando un claro aumento en la amplitud cuando se reduce P_{tot} . Puntos SN en azul. **d:** Series temporales para dos casos extremos, mostrando el contraste en formas dentro de la región oscilatoria.

En la Fig. 2.4a, presentamos un barrido de parámetros 2D en el plano $k_3 - P_{tot}$. Esto requirió fijar un valor de S . Elegimos $S = 0.1$, donde el rango oscilatorio de $k_{i,K}$ está cerca de su mayor extensión (ver Fig. 2.2a).

Como para el caso k_3 vs. S , la variación de los dos parámetros DP elegidos muestra una región oscilatoria al lado de una biestable, y una excitable. Nuevamente, aparecen bifurcaciones BT, con curvas SHom presentes en la cercanía (no mostradas para claridad de la figura).

Luego, elegimos diferentes pares (P_{tot}, k_3) de manera de abarcar la región oscilatoria y llevamos a cabo un barrido de S para cada par. En la Fig. 2.4b, presentamos las curvas amplitud-frecuencia para cada par elegido. En valores altos de k_3 y P_{tot} , la curva presenta una forma de “U invertida” con un pequeño rango de frecuencias comparado con el de amplitud. A medida que el par de parámetros se aproxima a la región biestable, el rango de frecuencia se ensancha. Al mismo tiempo, los valores de amplitud aumentan, mientras las frecuencias decrecen. Nuevamente, esto se relaciona con el comportamiento biestable subyacente en el ciclo DP. En la Fig. 2.4c, se presentan las curvas DP para cada par seleccionado. A diferencia del caso k_3 , aquí la amplitud muestra un cambio significativo. Aumentar la cantidad de fosfatasa resulta en menor amplitud para el *output* doblemente fosforilado, consistente con su rol. Al mismo tiempo, como k_3 también es distinto para cada curva, el rango de K_{act} cambia. Ambos parámetros, entonces, explican por qué los valores de amplitud y frecuencia dependen del par elegido. Ver, por ejemplo, el caso $k_3 = 2$ y $P_{tot} = 22$ (curvas rojas en la Fig. 2.4b, c). Si la amplitud biestable es menor, entonces la amplitud oscilatoria será consecuentemente menor. Si el rango biestable es más angosto, los valores de periodo serán más cortos, y la frecuencia será mayor.

En la Fig. 2.4d, mostramos un par de ejemplos de series temporales oscilatorias, para los dos casos extremos seleccionados. Si bien ambos ocurren para el mismo valor de $k_{a,K} = k_{i,K}$, es clara la diferencia en amplitud y frecuencia. Estos resultados indican que controlar la biestabilidad subyacente en un oscilador puede resultar en *outputs* muy contrastantes.

Como mostramos para el parámetro k_3 , también es posible obtener un “transferencia de biestabilidad” al disminuir apropiadamente k_3 y P_{tot} . Para una biestabilidad suficientemente fuerte en el ciclo DP, el sistema mostrará valores de amplitud tanto altos como robustos a cambios en el *input*. Pero eventualmente, la biestabilidad subyacente apaga el efecto del *feedback* negativo. Las oscilaciones desaparecerán, y el sistema completo será biestable.

La constante catalítica k_3 regula la jerarquía de feedbacks

Como fue mostrado en las subsecciones anteriores, controlar los parámetros del ciclo DP tiene un efecto importante en las oscilaciones resultantes en el sistema completo. En particular, la constante catalítica para el primer paso de fosforilación, k_3 , es capaz de determinar el ancho de la curva biestable subyacente. A su vez, para un valor lo suficientemente bajo, tendrá lugar una “transferencia de biestabilidad”: no solo el ciclo DP aislado es biestable, el sistema completo también muestra este comportamiento. Por otro lado, valores altos de k_3 resultan en curvas de amplitud vs. frecuencia y bifurcaciones esperadas en un oscilador Tipo-2 (o Tipo-Hopf).

El parámetro k_3 juega un rol clave en cómo la quinasa activa libre (K) reacciona con ambos módulos, el de activación de quinasa y el ciclo DP. Controla parte del secuestro de K en el segundo nivel: la unión del sustrato sin fosforilar del segundo nivel (A) con K , para formar un complejo intermedio (AK , ver Fig. 2.1b). Este complejo protege K del secuestro en el primer nivel, el cual toma la forma de una inactivación directa.

El *feedback* negativo no-explicito en este sistema es el resultado del secuestro en el primer nivel, que compete con el sustrato A para reaccionar con K . Un mayor valor de k_3 significa que la protección dada por AK contra la inactivación de la quinasa es debilitada, ya que el complejo reacciona más rápido para dar el producto, formado por el sustrato fosforilado una vez (A_p) y K . Con la quinasa activa nuevamente libre, el primer nivel puede secuestrarlo para la desactivación y por lo tanto decrecer A_{pp} . Esto quiere

decir que aumentar k_3 puede aumentar el efecto del *feedback* negativo por sobre los positivos, presentes en el ciclo de doble fosforilación, lo que le da la ventaja al *feedback* negativo en la jerarquía.

En el caso opuesto, disminuir k_3 aumenta la protección dada por el estado intermedio AK contra la inactivación, reduciendo el efecto del *feedback* negativo. Esto explica por qué en los diagramas de bifurcación k_3 vs. S y k_3 vs. P_{tot} , valores altos de k_3 resultan en un par de bifurcaciones de Hopf supercríticas al barrer los parámetros de *input*, mientras que valores bajos de k_3 llevan al sistema a bifurcaciones de Hopf subcríticas y Homoclínicas. Para valores aún menores de k_3 , el sistema visita una región biestable, donde los *feedback* positivos silencian por completo la presencia del *feedback* negativo.

En resumen, no solo la variación de k_3 regula la fortaleza de los *feedback* positivos en el ciclo DP (al regular el ancho de la curva biestable), también modula el efecto combinado de los *feedbacks* positivos y negativo interconectados, este último emergente del secuestro de la quinasa activa libre en el primer nivel.

La cascada MAPK de dos niveles enriquece el comportamiento oscilatorio con respecto al modelo mínimo.

En la sección anterior, analizamos un oscilador basado en la biestabilidad de un ciclo DP, que solo añade una variable (la quinasa inactiva) al módulo biestable. Este modelo parece ser el oscilador más simple que se puede obtener al combinar un ciclo DP con el secuestro de una de sus enzimas (en el trabajo de Suwanmajo y Krishnan, también presentan el caso donde se añade una fosfatasa inactiva en lugar de una quinasa inactiva [54]). En esta sección, estudiamos la cascada MAPK truncada a sus primeros dos niveles. Este *motif* de señalización es una extensión natural del modelo anterior y se acerca en su descripción a la cascada completa de Huang-Ferrell, uno de los sistemas más estudiados a la hora de describir vías de señalización [12].

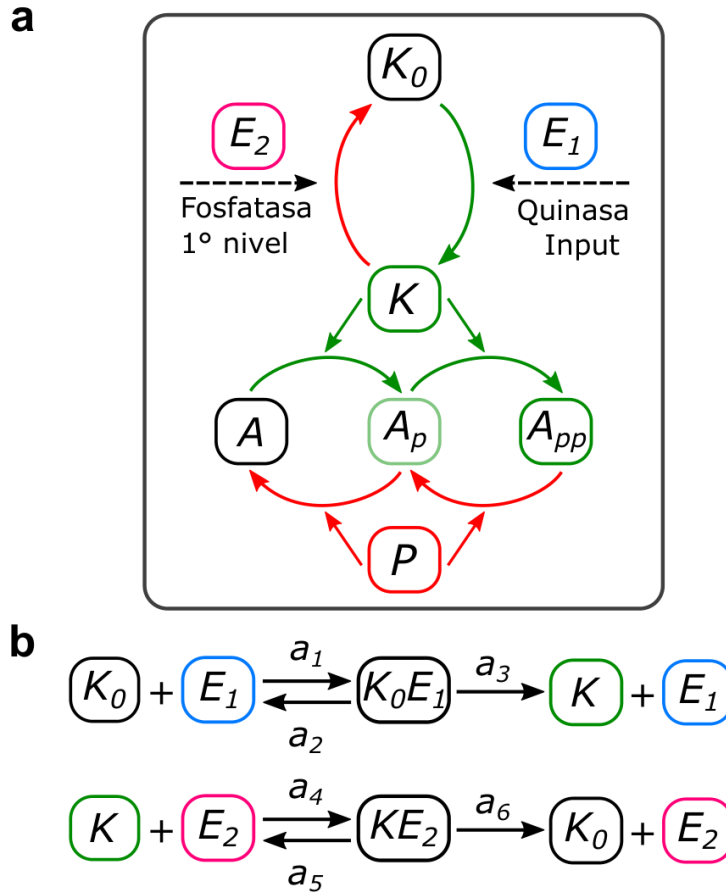


Figura 2.5: Esquema del sistema 1 + 2 y sus reacciones enzimáticas del primer nivel. **a**: Esquema del modelo, con la quinasa E_1 y fosfatasa E_2 involucradas en las reacciones del primer nivel, las cuales contrastan con el módulo de activación en el modelo SK. **b**: Reacciones para la activación e inactivación de la quinasa del primer nivel, las cuales involucran complejos intermedios con E_1 y E_2 .

En la Fig. 2.5a, mostramos el esquema para la cascada MAPK de dos niveles, donde la activación e inactivación de la quinasa en el primer nivel ocurre mediante asociación, disociación, y catálisis. Estas reacciones enzimáticas, presentadas en la Fig. 2.5b, se contrastan con la activación e inactivación directa que tienen lugar en el modelo SK. Cuatro variables adicionales son necesarias (la quinasa *input* E_1 , fosfatasa E_2 , y dos complejos intermedios, ver Fig. 2.5b), y seis constantes de velocidad están involucradas (cuando solo dos aparecían en el *motif* SK). El parámetro de *input* es la quinasa total $E_{1\text{tot}}$ (cantidad conservada, distribuida entre E_1 y el correspondiente complejo intermedio K_0E_1).

Este sistema ha sido estudiado por Qiao et al., en un trabajo donde la cascada completa Huang-Ferrell es analizada [9]. Como corresponde a los dos primeros niveles de dicha cascada, lo llaman el modelo “1 + 2”. Así lo llamaremos de aquí en adelante (también se puede interpretar como un modelo 1 + 2 ya que combina un ciclo de fosforilación simple con uno doble). Buscamos mostrar cómo obtener diferentes tipos de oscilaciones en este modelo, y cómo el método es similar al aplicado para el oscilador mínimo considerado en la sección previa.

Las ecuaciones para el modelo 1 + 2 son las mismas que para el modelo SK en el ciclo DP, y tienen nuevos términos para la quinasa activa libre (reemplazando a los de activación/inactivación directa), una nueva ecuación para la quinasa inactiva del primer nivel, y el agregado de cuatro nuevas variables:

$$\begin{aligned}\frac{d[K]}{dt} &= (k_2 + k_3)[AK] - k_1[A][K] + (k_5 + k_6)[A_p K] - k_4[A_p][K] \\ &\quad + a_3[K_0 E_1] - a_4[K][E_2] + a_5[KE_2], \\ \frac{d[K_0]}{dt} &= -a_1[K_0][E_1] + a_2[K_0 E_1] + a_6[KE_2], \\ \frac{d[K_0 E_1]}{dt} &= a_1[K_0][E_1] - (a_2 + a_3)[K_0 E_1], \\ \frac{d[KE_2]}{dt} &= a_4[K][E_2] - (a_5 + a_6)[KE_2], \\ \frac{d[E_1]}{dt} &= -a_1[K_0][E_1] + (a_2 + a_3)[K_0 E_1], \\ \frac{d[E_2]}{dt} &= -a_4[K][E_2] + (a_5 + a_6)[KE_2]\end{aligned}$$

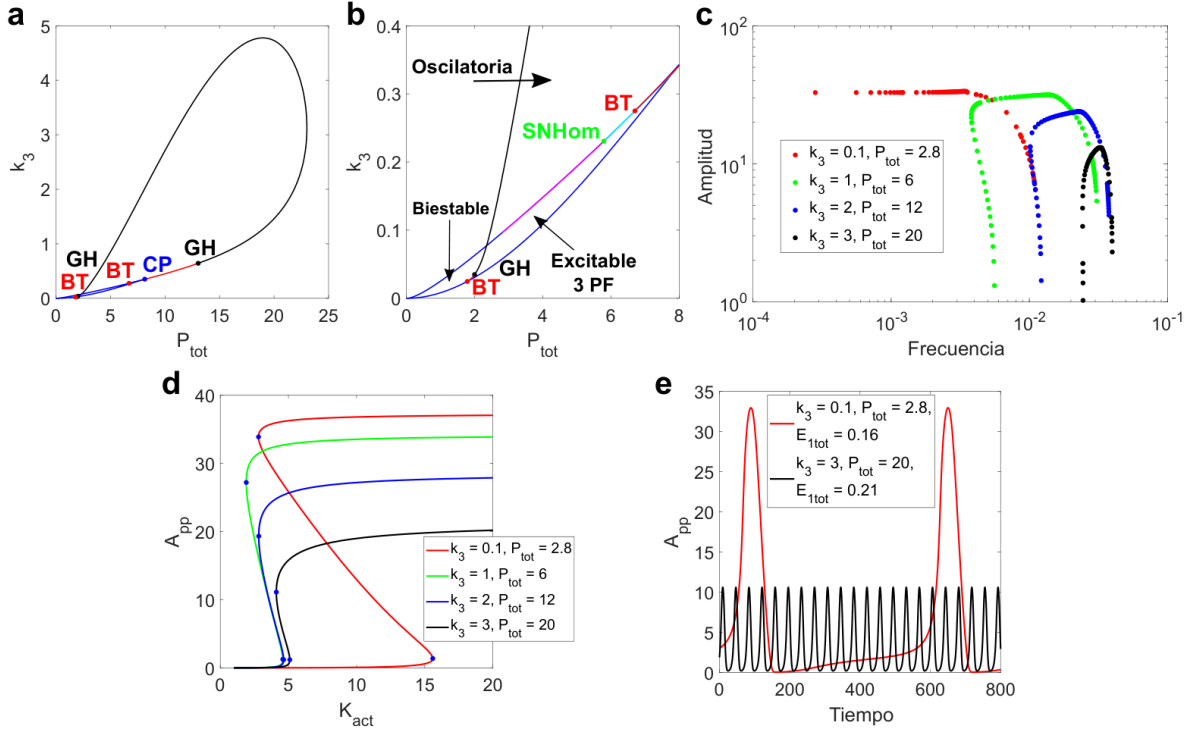


Figura 2.6: Resultados para el análisis k_3 vs. S en el modelo 1 + 2. **a**: Diagrama de bifurcaciones 2D para los dos parámetros. En negro, la curva de Hopf supercríticas. En rojo, la de subcríticas. En azul, las curvas de SN, con el CP en la unión. Las bifurcaciones BT en rojo, las GH en negro. La región oscilatoria es considerablemente mayor que en el modelo SK. **b**: Acercamiento del diagrama 2D, mostrando las diferentes regiones y las bifurcaciones globales. Como en el modelo SK, una región biestable emerge para valores bajos de k_3 y P_{tot} . La curva de bifurcaciones SNIC, en magenta, siguiendo el camino de una de las curvas SN. Esta curva SNIC se conecta con una curva SHom relativamente pequeña mediante un punto SNHom. Luego, la curva SHom se conecta con la curva Hopf a través de una bifurcación BT. **c**: Curvas de amplitud vs. frecuencia para cuatro pares distintos de k_3 y P_{tot} , escaneando el parámetro E_{1tot} . Hay mayor flexibilidad en la transición de estas curvas comparado con el modelo SK. Una bifurcación SNIC permite que la frecuencia sea disminuida significativamente para el par de parámetros más

cercana a la región biestable. Bifurcaciones de Hopf supercríticas permiten que la amplitud alcance menores valores en las otras ramas de las curvas, aunque el escaneo del input se vuelve más preciso cerca de las bifurcaciones Hopf a medida que el sistema se mueve a la parte inferior izquierda del diagrama 2D. **d**: Curvas biestables en el ciclo DP al barrer K_{act} para cada par elegido, mostrando, como antes, un aumento en la amplitud con menor P_{tot} . **e**: Series temporales para dos casos extremos dentro de la región oscilatoria.

En la Fig. 2.6, presentamos los resultados para el análisis en el plano $k_3 - P_{tot}$, como previamente lo hicimos en el modelo SK. Los valores son los mismos para todos los parámetros que el sistema 1 + 2 y el SK tienen en común (cada constante de velocidad en el ciclo DP, la cantidad total de quinasa MAP en el primer nivel, sustrato en el segundo nivel, y fosfatasa para el segundo nivel). Todas las constantes de velocidad en el primer nivel son iguales a 1, y haciendo un barrido del input E_{1tot} se obtuvo un rango oscilatorio.

La forma de la curva de Hopf en la Fig. 2.6a es comparable a la encontrada para el modelo SK. Esto es consistente, ya que los parámetros cuyo barrido se presenta pertenecen al mismo módulo DP. Nuevamente, una región biestable emerge para valores bajos de k_3 y P_{tot} , junto con una zona excitable de tres puntos fijos. En la Fig. 2.6b, señalamos estas regiones y las bifurcaciones globales encontradas, las cuales son tanto SHom como *Saddle-Node Homoclinic on an Invariant Circle* (SNIC).

Estas bifurcaciones globales son responsables por limitar la región oscilatoria una vez que la curva de Hopf finaliza en el punto BT. Es posible que para el modelo SK, bifurcaciones SNIC puedan aparecer para otras combinaciones de los parámetros del sistema. Sin embargo, es interesante que, dados los mismos valores para todos los parámetros que son comunes a ambos modelos, esta otra bifurcación global emerge.

Aún más, cuando comparamos los dos sistemas, puede verse fácilmente que la región oscilatoria en el plano $k_3 - P_{tot}$ es más grande en el caso 1 + 2. Esto se debe principalmente al rango oscilatorio extendido para k_3 . Como explicamos, los valores de parámetros en el ciclo DP no han cambiado respecto del análisis en el modelo SK, lo que significa que la región biestable en el ciclo DP aislado es el mismo. En particular, el rango para k_3 donde es posible encontrar comportamiento biestable en dicho módulo no ha cambiado (ver Fig. S2.3 en el Apéndice). Esto quiere decir que el rango oscilatorio más amplio proviene de la diferente estructura del primer nivel.

En el Apéndice, mostramos cómo la región oscilatoria en el modelo SK para k_3 vs. S se expande a medida que la separación de escalas temporales aumenta (Fig. S2.4 en el Apéndice). En esta sección, estamos mostrando un efecto similar, pero al cambiar el mecanismo que activa la quinasa, el cual involucra reacciones de asociación, disociación, y catálisis. El sistema aprovecha en mayor medida la biestabilidad subyacente para el desarrollo de oscilaciones.

A su vez, si bien la región oscilatoria encontrada para el modelo 1 + 2 es más grande que la obtenida para el sistema SK, la mayor parte de esa diferencia viene de la región limitada por la curva de Hopf supercrítica. Las dos bifurcaciones GH ocurren debajo de $k_3 = 1$, con una de ellas ubicada en la frontera de la región oscilatoria (la otra GH está en el segmento de la curva que separa la región excitable de tres puntos fijos de la biestable). Para los sets de parámetros del modelo SK, la GH con el mayor valor de k_3 estaba en $k_3 = 1$. Es decir, en ambos casos, la curva de Hopf por arriba de $k_3 = 1$ está compuesta de bifurcaciones supercríticas. Como el rango oscilatorio extendido para k_3 en el caso 1 + 2 está basado en esta porción supercrítica más larga de la curva de Hopf, hay una región más vasta para encontrar oscilaciones de amplitud sintonizable y frecuencia robusta.

En la Fig. 2.6c, mostramos curvas amplitud vs. frecuencia para cuatro pares (P_{tot}, k_3) distintos dentro de la región oscilatoria. Como en el modelo SK, barrimos el parámetro *input* para cada caso, encontrando resultados similares: un rango de frecuencias más ancho, menores valores de frecuencia, y una mayor y más robusta amplitud a medida que el sistema se mueve a valores menores de k_3 y P_{tot} .

Al mismo tiempo, la transición de una curva con amplitud robusta a una “U invertida” tiene notables diferencias con los resultados para el modelo SK. Es posible encontrar rangos de frecuencias más anchos y también decrecer la amplitud en los extremos de los rangos oscilatorios. Comparando con las curvas en el caso SK, es evidente que las curvas intermedias muestran mayor variación en la frecuencia. La caída en los valores de amplitud se debe a la prevalencia de bifurcaciones de Hopf supercríticas, las cuales limitan todos los extremos de las cuatro curvas, con excepción del caso $k_3 = 0.1$ y $P_{tot} = 2.8$. Este último set tiene una bifurcación SNIC, permitiendo una sustancial reducción de la frecuencia al tiempo que la amplitud permanece fija. Comparada con la curva de amplitud robusta obtenida en el modelo SK, es clara la diferencia en el rango de frecuencia. No hay curva LPC donde el ciclo límite estable finaliza, como sucedía en el modelo previo. La expansión en la región oscilatoria que ocurre en el caso 1 + 2 al cambiar k_3 y P_{tot} lleva a curvas amplitud vs. frecuencia capaces de mayor flexibilidad en su forma con respecto al modelo mínimo.

Cada una de las curvas amplitud-frecuencia tiene su correspondiente curva biestable en el ciclo DP, mostrado en la Fig. 2.6d. La relación entre ellas es como la encontrada en el sistema SK: bajar k_3 aumenta el rango biestable, y una disminución en P_{tot} lleva a un incremento en la amplitud, resultando en frecuencias menores y amplitudes mayores en el oscilador. Finalmente, presentamos cursos temporales en la Fig. 2.6e para los casos extremos, con esperadas diferencias.

Estos resultados para el análisis del 1 + 2 muestran que la simplificación de las reacciones en el primer nivel, presente en el modelo SK, no es un requerimiento para obtener distintos tipos de oscilaciones. Activación o inactivación directa de la quinasa simplifica el análisis, especialmente al cambiar la separación de escalas temporales entre los niveles de la cascada. Aun así, reducir en un orden de magnitud las seis constantes de velocidad en el primer nivel del 1 + 2 muestra resultados similares al modelo SK (ver Fig. S2.5 en el Apéndice).

La complejidad extra del modelo 1 + 2 mantiene las diferentes características del modelo Suwanmajo-Krishnan, al mismo tiempo que amplía la región oscilatoria y permite el acceso a menores frecuencias gracias a la bifurcación SNIC.

El modelo activador-inhibidor recupera los diferentes tipos de oscilaciones con solo dos componentes

En esta sección, analizamos un modelo de 2 componentes con biestabilidad emergente desde auto catálisis: un modelo de activador-inhibidor. Tenemos dos propósitos: primero, mostrar un ejemplo que solo tiene dos variables, a diferencia de los modelos SK y 1 + 2 que involucran un número relativamente grande de variables y parámetros; segundo, presentar un caso donde la biestabilidad no proviene de un ciclo DP, y aun así los resultados pueden ser obtenidos como antes.

Trabajos anteriores han lidiado con variaciones del modelo activador-inhibidor. Sensse y Eiswirth mencionan cómo es posible obtener diagramas de bifurcación 2D que involucran Hopf, *Saddle-Nodes*, Bogdanov-Takens y *Cusp Point* [59]. Krishna et al. estudian la emergencia de oscilaciones a partir de la biestabilidad subyacente, haciendo una analogía con el modelo ferromagnético de spines al describir las oscilaciones como un caso de biestabilidad frustrada [60]. En el presente trabajo, mostramos cómo

aprovechar las bifurcaciones y biestabilidad subyacente para encontrar diferentes comportamientos en las oscilaciones, de la misma manera en que lo hicimos para los modelos de ciclo DP.

El sistema de ecuaciones que utilizamos fue tomado de un trabajo de Tyson [38], donde los sets de parámetros dados forman nuestro punto de partida:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\varepsilon^2 + x^2}{1 + x^2} \frac{1}{1 + y} - ax,$$

$$\tau \frac{dy}{dt} = b - \frac{y}{1 + cx^2}$$

En la Fig. 2.7a, presentamos un esquema del modelo. En lo que sigue, el parámetro b será considerado el *input* del sistema y el activador x el *output*. El *input* aumenta la tasa de crecimiento de la variable inhibidora y será usado para construir las curvas amplitud-frecuencia.

En la Fig. 2.7b, presentamos el diagrama de bifurcaciones 2D, usando ε y b como los parámetros de barrido. ε puede controlar la biestabilidad subyacente y, tal como está escrita en las ecuaciones de Tyson, es igual a la raíz cuadrada de la tasa basal (la tasa constante de síntesis que está presente aun cuando ambas variables son iguales a cero). Al manipular dicha biestabilidad, cumple el rol que tenía k_3 en los osciladores DP.

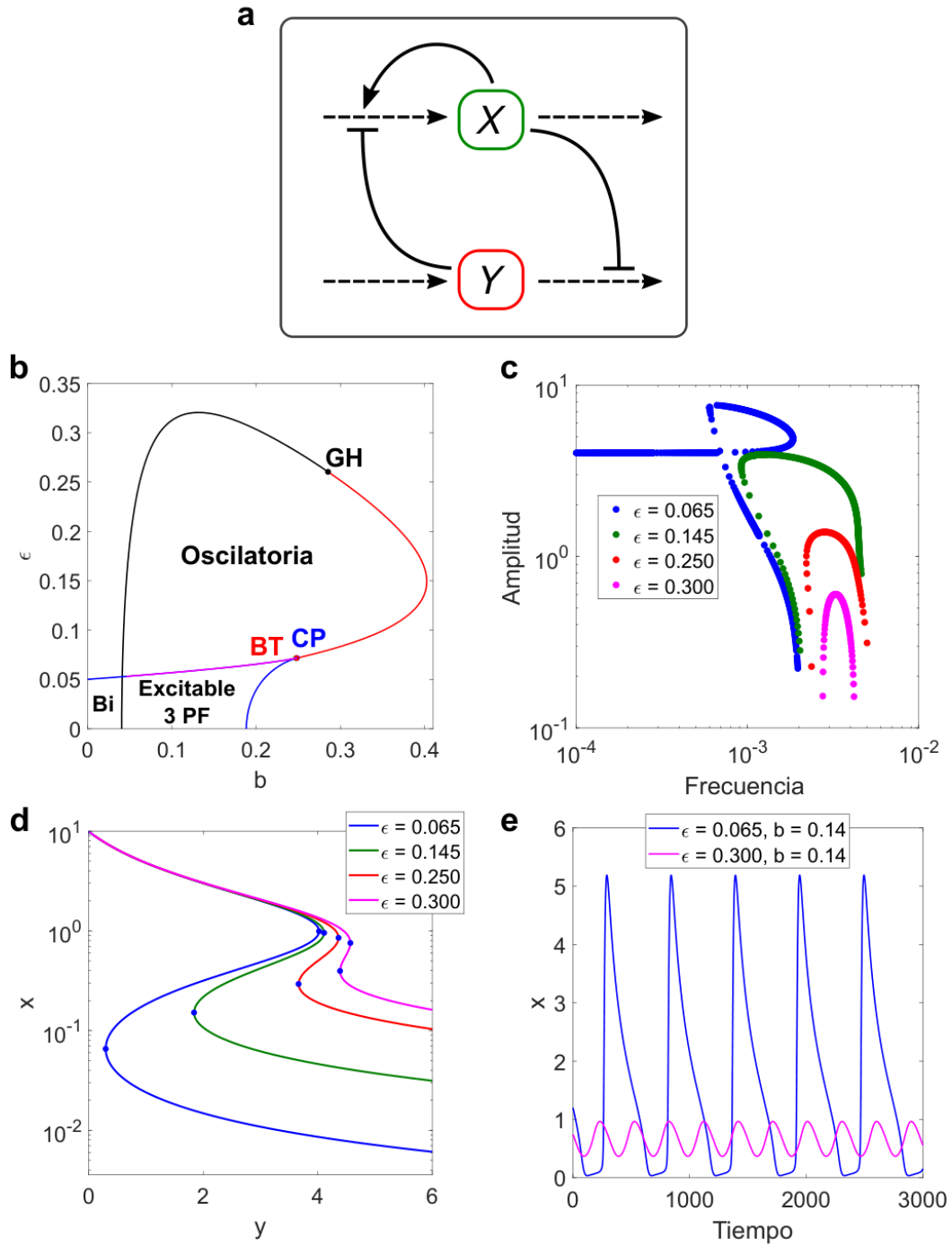


Figura 2.7: Esquema y resultados para el modelo activador-inhibidor estudiado por Tyson, basado en su trabajo [38]. **a**: Esquema: tanto el activador x como el inhibidor y sufren reacciones de producción y degradación. El activador tiene un ciclo auto-catalítico, y forma un ciclo de feedback negativo con el inhibidor. x inhibe la degradación de y , mientras que y inhibe la producción de x . El input considerado será la producción del inhibidor (el parámetro b) y el output será el activador. **b**: Diagrama de bifurcaciones 2D para los parámetros ϵ y b . En negro, la curva de Hopf supercríticas. En rojo, la de subcríticas. En azul, las curvas de SN, con el CP en la unión. La bifurcación BT en rojo, la GH en negro. Las bifurcaciones BT y CP están cerca entre sí. En magenta, la curva SNIC (contenida en la curva SN). Esta curva se une mediante un punto SNHom con una curva SHom (no mostrada por su pequeño tamaño). Para valores bajos de ϵ , emergen una región biestable y otra excitable. **c**: Curvas amplitud vs. frecuencia en cuatro casos diferentes de ϵ cuando se barre el parámetro b . Transición en la forma de

las curvas cuando se cambia ϵ , con una curva describiendo una vuelta para el menor valor. Una SNIC es responsable por la disminución de la frecuencia en este caso extremo de ϵ . Para este caso, y para la disminución de la amplitud en el otro extremo de la curva, el escaneo del parámetro de *input* es muy preciso. **d**: Curvas biestables para la variable auto-catalítica, para cada uno de los casos en el panel previo. Los puntos SN, en azul. El eje del *output* está en escala logarítmica para claridad visual. Cambios evidentes en las amplitudes y rangos biestables. **e**: Series temporales para valores extremos de ϵ y el mismo valor de *input*.

Como en los modelos previos, encontramos regiones mostrando oscilaciones, excitabilidad de tres puntos fijos, y biestabilidad, con bifurcaciones de codimensión-2 BT, CP, y GH. En este modelo, y con estos valores de parámetros, las bifurcaciones BT y CP están muy próximas entre sí, logrando una clara separación entre las tres regiones. Para valores altos de ϵ , un barrido del parámetro de *input* determina oscilaciones entre bifurcaciones de Hopf supercríticas. Debajo del punto GH, una de las bifurcaciones de Hopf es ahora subcrítica, limitando el rango de valores de amplitud a medida que el sistema se mueve a esa bifurcación. Una vez que las bifurcaciones de Hopf subcríticas desaparecen, las oscilaciones pasan a estar limitadas por bifurcaciones SNIC (en magenta en la Fig. 2.7b), contenidas dentro de la curva SN (en azul en la Fig. 2.7b). Aquí, el periodo puede tomar valores mucho más altos, expandiendo el rango de frecuencia.

Para valores bajos de ϵ , el sistema puede ser biestable o excitable (o monoestable si el *input* es lo suficientemente alto). Mientras el *output* es la variable que presenta el *feedback* positivo, el *input* es el responsable por la producción del inhibidor. Entonces, si el *input* toma valores bajos, eso favorece al *feedback* positivo por sobre el negativo. Esto es consistente con la presencia de una región biestable para ϵ y b de valores bajos: el *feedback* positivo domina, y no solo el *output* auto-activado es biestable, el modelo de dos variables también lo es, en otro ejemplo de “transferencia de biestabilidad”.

En la Fig. 2.7c, mostramos cuatro curvas amplitud vs. frecuencia, para diferentes valores de ϵ y construidas con un barrido del *input*. Encontramos resultados similares a los obtenidos en los modelos DP, con una transición de una curva “U invertida” a una con un rango más ancho de frecuencias a medida que el sistema se aproxima a las zonas excitable y biestable (al ir de alto a bajo ϵ), así como también valores menores de frecuencia y mayores de amplitud.

Una diferencia importante con resultados previos es la forma de la curva con el menor valor de ϵ (en azul en la Fig. 2.7c), que da una vuelta tal que dos valores posibles de amplitud están disponibles dentro de un cierto rango de frecuencias (tres valores si se cuentan los punto de más baja amplitud, los cuales están muy próximos a la bifurcación de Hopf supercrítica y a valores bajos de b). Cuando se mira la curva con el segundo valor más bajo de ϵ (en verde en la Fig. 2.7c), es posible notar un cierto camino que toma la parte izquierda de la curva: de valores bajos de amplitud y una leve baja de la frecuencia a valores más altos de frecuencia. Esto también ocurría en el sistema 1 + 2, pero en ese caso, la parte izquierda de la curva se transformaba de una sección vertical (amplitud baja) a una horizontal (frecuencia baja) una vez que la bifurcación SNIC aparecía. Aquí, en el activador-inhibidor, en lugar de ir “directamente” a una región de baja frecuencia, la curva da una vuelta.

A medida que el *input* aumenta en el barrido, el sistema se mueve de una bifurcación de Hopf supercrítica a una SNIC, algo que se verifica rápidamente al observar el diagrama de bifurcaciones 2D. En el sistema 1 + 2, el camino era el inverso: empezaba en una SNIC y terminaba en la Hopf supercrítica. Esto puede deberse a los efectos opuestos de los *inputs* en ambos modelos: el parámetro de *input* en el 1 + 2 favorecía al *output*, mientras que en el activador-inhibidor lo perjudica. Sin embargo, al probar con un *input* que favorece al *output* (multiplicando el termino de auto-activación con un parámetro

“nu”), la vuelta de la curva persiste. Es posible que la causa provenga de la forma en que se escriben las ecuaciones (no siguen acción de masas, como en los sistemas DP). Aun así, el activador-inhibidor muestra un rango de frecuencias más extendido debido a la presencia de la bifurcación de SNIC, al mismo tiempo que accede a múltiples valores de amplitud para la misma frecuencia.

En la Fig. 2.7d, mostramos curvas biestables para el nodo aislado con auto-activación, obtenidas al variar el (ahora) parámetro de *input* y , para cada uno de los valores de ε elegidos en las curvas amplitud vs. frecuencia. Es notable el aumento en amplitud y rango biestable cuando decrece ε . El hecho de que el estado estacionario estable inferior se acerca a cero cuando ε es menor es consistente con el rol de ε como la (raíz cuadrada de) la tasa basal. Si el *output* auto-activado se encuentra en este estado inferior, y ε es más chico, el valor del *input* inhibitorio para que ocurra la transición al estado superior también deberá ser más chico. La conexión con los resultados para el oscilador es clara. Bajar ε lleva a que el módulo de *feedback* positivo muestre mayores amplitudes y rangos biestables. Al añadir el *feedback* negativo y decrecer la tasa basal, el sistema mostrará una transición en los tipos de oscilaciones obtenidas, eventualmente entrando a una región excitable o biestable.

En la Fig. 2.7e, presentamos un par de series temporales oscilatorias para los valores extremos de ε , al mismo valor de *input* ($b = 0.14$). Hay claras diferencias entre ambos *outputs*. Mientras la serie para el valor más chico de ε tiene una forma tipo *spike* con alta amplitud, la otra serie es más parecida a una pequeña onda sinusoidal, con una mayor cantidad de picos en la misma ventana temporal. Estos dos casos están cerca de los bordes de la región oscilatoria y, como tales, representan extremos opuestos del espectro de *outputs*. También es posible fijar, por ejemplo, $\varepsilon = 0.065$ y obtener frecuencias muy diferentes, al modificar lentamente el parámetro de *input* cerca de la bifurcación SNIC. Los resultados obtenidos mediante análisis de bifurcaciones y curvas amplitud vs. frecuencia permiten probar diferentes combinaciones de parámetros para obtener el resultado deseado.

Es importante notar que los dos parámetros elegidos para el análisis de bifurcaciones controlan un *feedback* cada uno: ε actúa sobre el *feedback* positivo, modificando la amplitud y el rango biestables, mientras que el parámetro de *input* b está involucrado en el ciclo negativo, al regular la producción de la variable inhibitoria. En un modelo como el activador-inhibidor, esta selección de parámetros es facilitada por la relativa simplicidad de la red.

Un aspecto que no hemos considerado en este modelo es la separación de escalas temporales entre las variables. El parámetro τ gobierna la escala de tiempo (ver sistema de ecuaciones), y lo fijamos para nuestro análisis en $\tau = 10$. Es posible disminuirlo y todavía obtener resultados similares. Sin embargo, para un valor lo suficientemente bajo el diagrama ε vs. b solo mostrará bifurcaciones de Hopf (ver Fig. S2.6 en el Apéndice). Esto es consistente con los resultados para el modelo SK cuando $k_{i,K}$ es cercano a 1 (Fig. S2.4 en el Apéndice). Como en el modelo SK, esto muestra que existe otra ruta en el análisis del activador-inhibidor que puede ser combinada con el control de la biestabilidad subyacente.

Los resultados presentados en esta sección muestran cómo abordar un oscilador con un módulo biestable diferente al de las secciones anteriores. Si hay un parámetro capaz de manipular la biestabilidad subyacente, debería ser posible encontrar un espectro de comportamientos en los *outputs* oscilatorios. Puede tratarse de un sistema relativamente complejo como el ciclo DP, o algo más directo como un nodo que se activa a sí mismo. Nuestros métodos pueden ser aplicados a otros osciladores con subsistemas biestables.

Discusión

El concepto de ciclo de retroalimentación o *feedback* es preponderante en el análisis de los mecanismos fundamentales que gobiernan la existencia de oscilaciones temporales de un sistema [8]. La identificación de estos ciclos de *feedback* puede ser sencilla, como en varios modelos biológicos de solo dos componentes (por ej., activador-inhibidor, predador-presa, etc.). En otros casos, con más de dos componentes, los *feedbacks* positivos o negativos están todavía relacionados a mecanismos físicos claramente identificados (como en modelos basados en conductancia [44]). Pero en ciertos sistemas biológicos, la identificación de *feedbacks* no es completamente evidente. Aquí, el análisis de oscilaciones temporales se vuelve aún más interesante, por su estrecha relación con algunos aspectos del sistema que en un principio pueden estar relativamente escondidos.

Específicamente, éste puede ser el caso en redes bioquímicas (como vías de señalización, redes genéticas, o redes metabólicas), representadas gráficamente de múltiples maneras en la literatura, tal que flechas y otros símbolos usados en estos grafos pueden tener significados muy distintos: activación, transporte, unión, una transformación química sencilla, reacción enzimática, etc. Estas representaciones gráficas pueden ser sumamente útiles para diagramar relaciones causa-efecto en estos sistemas, y en particular, para resaltar ciclos de *feedbacks* simples pero esenciales en el comportamiento del objeto de estudio. Por otro lado, estos sistemas pueden también incluir ciclos de *feedbacks implícitos* (o *no-explicitos*), que no son obvios en el diagrama bioquímico, pero siguen jugando un rol esencial en la comprensión de los comportamientos. Por ejemplo, la gran mayoría de los diagramas de vías de señalización contienen ciclos de *feedback* que son implícitos [56], [61], [62]. Desde un punto de vista bioquímico, es relativamente simple identificar en una reacción enzimática una interacción “negativa” asociada con secuestro enzimático [63]. Pero destacar un ciclo de *feedback* negativo entero en la red requiere un análisis en mayor profundidad, que no es necesariamente intuitivo. Esto es lo que hemos logrado, y lo que le da una faceta interesante a nuestro trabajo, donde el análisis de oscilaciones temporales resultantes de los patrones de señalización estudiados revela la existencia de estos *feedbacks* implícitos.

En este capítulo, consideramos un ciclo de doble fosforilación, un componente de señalización ubicuo, con la habilidad de mostrar biestabilidad [10]. La existencia de más de un estado estacionario bajo condiciones biológicas particulares está fuertemente relacionada con la existencia de ciclos de *feedback* positivo, como fue mostrado primero para redes de regulación genética [25] y luego demostrado como una condición necesaria [4]. Si este componente, caracterizado por ciclos de *feedback* positivo y multiestabilidad emergente, está conectado a otros elementos de señalización, es muy probable que tenga lugar algún tipo de interacción proteína-proteína, reportada como generadora de *feedbacks* escondidos. Dependiendo del específico escenario de señalización y de los autores en cuestión, el efecto de estas conexiones ha llevado el nombre de secuestro [56], retroactividad [62], efecto de componentes compartidas [11], interacciones con elementos de una red más extendida [64], control dependiente de sustrato [53], modulación inducida por carga [65], efectos fuera de *target* [66], o efectos de competencia [67].

En numerosos casos, estas interacciones proteína-proteína resultan en un efecto de *feedback* negativo no-explicito, lo que lleva a *feedbacks* positivos y negativos interconectados. Esta combinación fue estudiada en la literatura como una manera de generar oscilaciones de tipo relajación [3], [9], [53]. Aquí, mostramos que los dos *feedbacks* juntos garantizan dos tipos de oscilaciones, las de relajación y un grupo de oscilaciones más suaves que funcionan en un rango angosto de frecuencias, tal que fuera de ese rango la amplitud de las oscilaciones se ve severamente comprometida. Aún más, mostramos que los dos tipos de *feedbacks* son esenciales para que ambos tipos oscilatorios emerjan, y es su jerarquía la que determina el tipo de oscilación en juego.

Otros estudios en la literatura estudian diferentes tipos de oscilaciones, pero como añaden un *feedback* positivo a un sistema que ya tiene la habilidad de comportamiento oscilatorio, como tres nodos con retraso temporal [47], [50], [68], difieren del ciclo de doble fosforilación analizado en nuestro trabajo. Como mencionamos previamente para las cascadas de dos o tres niveles, el *feedback* positivo presente en el ciclo DP, que lo conduce a biestabilidad, es esencial para las oscilaciones [9].

En las primeras dos secciones, estudiamos diferentes modelos basados en el ciclo de doble fosforilación, preponderante en señalización celular. En nuestros estudios, este ciclo está activado por una quinasa de 2 estados (activa o inactiva) o por un ciclo de simple fosforilación. En ambos casos, si bien la estructura de *feedback* en los componentes de señalización es no-explicita dentro del esquema bioquímico, usando un enfoque cuasiestacionario se puede reducir el sistema inicial a una red de 3 variables. Esta red revela que el grafo de interacción subyacente está caracterizado por dos ciclos interconectados, uno positivo y uno negativo (ver Fig. 2.8, y Apéndice para el cálculo del grafo de interacción). Además, en los casos estudiados, el subsistema correspondiente al ciclo DP muestra biestabilidad. Por lo tanto, nuestros modelos oscilatorios pueden ser representados por un módulo biestable anidado dentro de un ciclo de *feedback* negativo. Eligiendo parámetros capaces de manipular el subsistema biestable subyacente, identificamos las correspondientes bifurcaciones al escanear pares de parámetros relevantes. Aún más, analizamos el *output* de los osciladores en términos de sus amplitudes y frecuencias al mover el *input*.

El primer modelo analizado, diseñado por Suwanmajo y Krishnan, es el oscilador más simple basado en un ciclo de doble fosforilación biestable, puesto en marcha por una quinasa de 2 estados. Primero, analizamos los cambios en las características oscilatorias causadas por la diferencia de escalas temporales entre la activación de la quinasa y el resto del sistema. Esto demostró la posibilidad de obtener distintos tipos de oscilaciones mientras la biestabilidad subyacente permanecía intacta. Los rangos y valores para la amplitud y la frecuencia del *output* oscilatorio dependían considerablemente en la elección de escalas temporales. Esto es, la existencia del estado inactivo para la quinasa no solo es responsable de la emergencia de oscilaciones [54], sino que también abre al sistema a diferentes *outputs* mediante el control de la velocidad en las reacciones del módulo de activación.

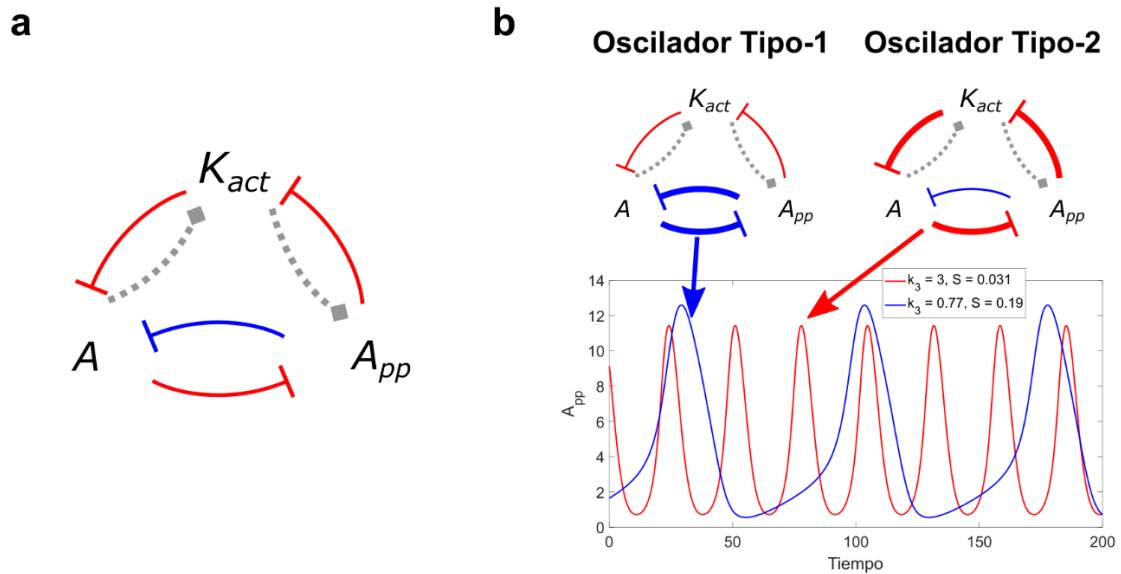


Figura 2.8: Red de *feedbacks* entre las variables K_{act} , A , y A_{pp} del motif reducido para Suwanmajo-Krishnan. **a**: En rojo, las tres interacciones negativas que constituyen el ciclo de *feedback* negativo. Las interacciones azul y roja entre A y A_{pp} forman el ciclo de *feedback* positivo. En gris, las interacciones

que pueden ser tanto positivas como negativas. **b**: Los dos posibles tipos de oscilador, dependiendo de la fortaleza relativa entre los feedbacks. Esta fortaleza está modulada por los parámetros bioquímicos. Por ejemplo, cuando k_3 es relativamente bajo, las oscilaciones serán de relajación (azul intenso para el ciclo de feedback positivo, serie temporal en azul). Cuando k_3 es alto, el output será suave y simétrico (rojo intenso para el ciclo de feedback negativo, serie temporal en rojo).

Para oscilaciones de relajación, es usual encontrar modelos con diferentes escalas temporales en las variables. Sin embargo, como estamos trabajando con modelos donde la biestabilidad es clave para dar lugar a oscilaciones, procedimos a manipular dicho comportamiento biestable presente en el subsistema, al tiempo que mantuvimos una separación de escalas moderada. Quisimos mostrar que un grado relativamente alto de separación de escalas no es necesario para obtener una variedad de oscilaciones.

En el modelo SK, uno de los parámetros involucrados en el primer paso de fosforilación del sustrato, el parámetro k_3 , es de particular importancia. Influye en cómo la quinasa activa libre reacciona en el ciclo DP, y cuánto de ella está disponible para la inactivación en el primer nivel. Nuestros resultados para el barrido de k_3 y el *input* S mostraron diferencias significativas en comparación con los estudios de separación de escalas. Una bifurcación de Bogdanov-Takens (de codimensión-2) fue obtenida, resultando en bifurcaciones *Saddle-Homoclinic* y *Saddle-Node*. La primera, del tipo global, tiene un efecto drástico en la amplitud de las oscilaciones, mientras la segunda, del tipo local, da lugar a una región de biestabilidad en el sistema. El mapa dinámico fue enriquecido comparando con el caso donde solo se cambiaban las escalas temporales, y en simultáneo, se mostró que una gran separación de escalas no es esencial para obtener distintos tipos de oscilaciones.

Al sumar otro parámetro de control del ciclo DP, la fosfatasa total P_{tot} , queda en evidencia cuánto potencial tiene el subsistema biestable en determinar las oscilaciones. Mientras k_3 modifica el rango biestable, P_{tot} trabaja en la amplitud. Con ambos parámetros, se puede operar sobre la amplitud y la frecuencia del *output* en el mismo sistema. Vale mencionar que este tipo de manipulación no tiene que restringirse a nuestra elección de parámetros. Otras constantes de velocidad, e incluso la cantidad total de sustrato, puede tener un efecto notable en las oscilaciones. Al mismo tiempo, nos propusimos mostrar cómo partiendo de valores de parámetros previamente elegidos [54] es posible hallar diferentes tipos de oscilaciones. Nuestro análisis funciona en regiones del espacio de parámetros que exploramos y puede ser extendido a otras donde la biestabilidad subyacente está presente. Estudios previos [69] pueden ser aprovechados para testear y analizar nuevas regiones biestables del ciclo DP. En resumen, nuestros resultados muestran que con elegir solo algunos parámetros y valores todo un espectro de comportamientos oscilatorios puede emerger.

Como fue mencionado, el parámetro k_3 fue clave en interpretar los resultados, ya que controla cuánto de la quinasa activa libre es secuestrada en cada nivel: una parte es desactivada en el primer nivel y otra es utilizada para formar un complejo intermedio con el sustrato sin fosforilar en el segundo nivel. k_3 modula las fortalezas relativas de los ciclos anidados de *feedback* positivo y negativo, esquematizados en la Fig. 2.8b, y por lo tanto permite en el *motif* de señalización el cambio de un tipo oscilatorio por otro.

El primer modelo estudiado considera que la activación e inactivación de la quinasa del primer nivel se llevan a cabo en un paso cada una. Una extensión natural de este modelo es el caso donde esa quinasa es sujeta a un ciclo de modificación covalente. En este sentido, el segundo modelo es equivalente a una cascada MAPK restringida a sus primeros dos niveles. Esto nos permitió analizar una cascada de dos niveles con mayor complejidad, mostrando que la metodología previamente aplicada aún puede

resultar en diferentes tipos oscilatorios. Si bien los resultados generales de analizar este llamado modelo 1 + 2 fueron similares al caso de activación directa, hubo marcadas diferencias.

El análisis de bifurcaciones mostró una región oscilatoria de mayor tamaño que para el modelo Suwanmajo-Krishnan, con los mismos valores para cada parámetro DP fijo. El rango oscilatorio expandido para k_3 fue la principal característica de este cambio, aun cuando el rango biestable subyacente para k_3 era el mismo. Las reacciones añadidas al primer nivel le permitieron al sistema aprovechar mejor la biestabilidad del ciclo DP. Por ejemplo, se encontraron bifurcaciones SNIC, que llevaron a la frecuencia a valores considerablemente menores. Esto no fue posible en el modelo SK, donde los valores de parámetros elegidos contaban con bifurcaciones LPC cercanas a las bifurcaciones SHom, impidiendo que los ciclos límites estables aumentaran su periodo. Mientras la bifurcación SNIC permite un rango más grande de frecuencias, la prevalencia de bifurcaciones de Hopf supercríticas lleva a menores valores de amplitud, lo que se observa en las diferentes curvas amplitud vs. frecuencia. Resumiendo, el modelo 1 + 2 presenta cambios significativos respecto del modelo mínimo previamente estudiado.

Al mismo tiempo, como manipular la biestabilidad del módulo DP da lugar a un amplio espectro de *outputs* periódicos, podría ser interesante explorar otras posibilidades de secuestro. Nos concentramos en la quinasas, pero como fue señalado, Suwanmajo y Krishnan también presentaron un modelo mínimo con activación e inactivación de fosfatasa. También se podría secuestrar el *output* con un ciclo de simple fosforilación (un modelo “2 + 1”) e investigar el nuevo *output* en ese ciclo simple para diferentes sets biestables del nivel DP. Nuestros resultados pueden constituir una guía para el análisis de numerosos osciladores basados en un ciclo de doble fosforilación. Empezando desde ese módulo aislado, los sistemas extendidos responderán de manera acorde.

Para expandir nuestro análisis más allá de osciladores basados en un ciclo DP, estudiamos un ejemplo del modelo activador-inhibidor, donde la biestabilidad subyacente proviene de un simple paso autocatalítico. Nuevamente, tomamos un parámetro capaz de manipular dicha biestabilidad y llevamos a cabo un barrido de ese parámetro versus un *input*. Si bien el *input* actuaba de manera opuesta a la de los sistemas DP, y las ecuaciones diferenciales no fueron escritas según acción de masas, los resultados obtenidos fueron similares a los de los modelos previos. Como en el caso 1 + 2, bifurcaciones de SNIC estuvieron presentes en el activador-inhibidor, permitiendo un significativo incremento del periodo. La curva amplitud vs. frecuencia levantada cerca de la región biestable mostró una forma distinta a las obtenidas en los casos de ciclo DP.

Los tres modelos estudiados fueron capaces de producir una variedad de oscilaciones, con diferentes rangos y valores para la amplitud y la frecuencia. El análisis de bifurcaciones mostró la posibilidad de ir desde regímenes oscilatorios a biestables y excitables. Como los tres sistemas son capaces de oscilar gracias a la biestabilidad subyacente, es lógico que puedan entrar a estos otros regímenes para los valores de parámetros apropiados. Si dicho módulo biestable es lo suficientemente fuerte, bifurcaciones SN aparecerán en los sistemas completos, dando lugar a una región biestable. También, bifurcaciones de Hopf pueden desestabilizar uno de los dos estados estacionarios estables, produciendo un *output* excitable.

En particular, esta región excitable que encontramos puede ser de posible interés. Hasta donde sabemos, hay pocos estudios que lidian con la idea de excitabilidad en sistemas de señalización [70], [71], [72], en comparación con biestabilidad y oscilaciones, por lo que nuestros resultados tienen potencial utilidad para el análisis de este comportamiento en mayor detalle.

A su vez, nuestro foco en la respuesta a parámetros de entrada puede ser particularmente apropiado al analizar un modelo experimental. En un trabajo de 2010 de Tigges et al. estudiaron un modelo de

ese tipo, presentando un ciclo de *feedback* positivo localizado dentro de uno negativo [73]. Como el subsistema correspondiente al ciclo de *feedback* positivo parece mostrar biestabilidad, este ejemplo experimental es representativo de los sistemas estudiados en nuestro trabajo. Al ser construido para un reloj circadiano, su frecuencia debería permanecer dentro de un rango particularmente estrecho. Tal como mostramos, la biestabilidad subyacente puede llevar un sistema a bifurcaciones globales donde el periodo diverge (y también puede empujarlo a un régimen biestable o excitable).

Usando el set de parámetros de referencia presentado en el trabajo, analizando las dos variables que constituyen el ciclo de *feedback* positivo, y tomando la variable *input* como un parámetro, encontramos que un rango biestable emerge. También, uno de los parámetros del sistema es capaz de controlar dicho rango. Desde aquí, al hacer un barrido de solo dos parámetros, pudimos localizar bifurcaciones SHom, resultando en diferentes curvas amplitud vs. frecuencia como las mostradas para los tres modelos previamente analizados (ver Fig. S2.7 en el Apéndice para los resultados de este modelo).

Estos resultados muestran cómo nuestros métodos pueden ser aplicados a un caso experimental. Al mostrar un camino en el espacio de parámetros que conduce a *outputs* no deseados (frecuencia sintonizable en un reloj circadiano), nuestros hallazgos destacan la importancia de elegir apropiadamente los valores de parámetros para obtener un *output* consistente con los datos. La existencia de un módulo biestable anidado en un oscilador que necesita mostrar frecuencias fijas debe ser considerada con especial cuidado.

Los comportamientos oscilatorios que encontramos para los sistemas SK y 1 + 2 serán puntos de partida en el análisis de otros dos modelos: el 2 + 2 y la cascada completa. La adición de un segundo ciclo DP introducirá otro nivel capaz de comportamiento biestable, aunque no es necesario que ambos módulos DP sean biestables para obtener oscilaciones [9]. Estudiar cómo la amplitud y el periodo de las oscilaciones dependen de las diferentes combinaciones de parámetros para los dos ciclos DP será clave en los siguientes capítulos.

Nuestro estudio destaca la riqueza de la dinámica oscilatoria que existe en un sistema formado por un módulo biestable anidado dentro de un ciclo de *feedback* negativo. Muestra cómo moverse entre diferentes tipos de oscilaciones y otros comportamientos dinámicos como excitabilidad, al tiempo que provee una estructura para estudiar otros sistemas como la cascada MAPK de tres niveles. A su vez, nuestros resultados pueden ser útiles para analizar otros tipos de módulos biestables, ya que funciona en casos muy diferentes como el ciclo DP y el nodo auto-catalítico, y también en un caso de doble interacción positiva como el de Tigges et al. [73]. En el capítulo anterior, estudiamos un ciclo de fosforilación simple con traslocación entre compartimientos, lo que resultaba en biestabilidad [74]. Se pueden obtener oscilaciones a partir del secuestro de una de sus variables [Tesis de Licenciatura, Alan Givré], como ocurre en el ciclo DP con la inactivación de la quinasas. En otro caso, estudiado en 2018 por Pérez-Carrasco et al., el tipo de comportamiento oscilatorio que emerge de combinar un *toggle switch* y un Repressilator no puede obtenerse cuando los dos módulos están separados [75]. Se podría manipular el *switch* biestable para investigar diferentes *outputs* oscilatorios. Básicamente, cualquier sistema oscilatorio con un subsistema biestable es un potencial candidato para nuestro tipo de estudio. Controlar la biestabilidad subyacente puede conducir al tipo de resultados aquí presentados.

Al mismo tiempo, nuestro análisis puede ser útil para casos experimentales. El trabajo de 2014 de Tsai et al. en un sistema de ciclo celular muestra la importancia de analizar diferentes tipos oscilatorios en un modelo computacional, ya que logra explicar hallazgos experimentales [46]. Mientras que un trabajo reciente en un modelo de ciclo celular investiga la robustez oscilatoria como función de la densidad citoplasmática, donde encuentran que los ciclos límites forman un ciclo de histéresis [76].

Las simulaciones realizadas explican este resultado mediante bifurcaciones subcríticas de Hopf, mostrando la importancia de estudios dinámicos en ejemplos experimentales. También se encontraron cambios en el periodo, abriendo una posible ruta de análisis para la amplitud y la frecuencia. Resumiendo, nuestro trabajo puede proveer un mapa para no solo entender datos experimentales, sino también predecir nuevos comportamientos en osciladores biológicos.

Métodos

MatCont y MATLAB. Para el análisis de bifurcaciones, usamos MatCont [36]. Para las series temporales y curvas de amplitud vs. frecuencia, MATLAB. El integrador de EDOs fue el ode15s (también usado en MatCont), con tolerancias relativas y absolutas de 10^{-6} y 10^{-8} , respectivamente, para obtener resultados numéricos confiables. Estos valores de tolerancia fueron reducidos en casos puntuales cuando se creyó necesario (por ejemplo, cerca de una bifurcación SNIC).

Curvas amplitud-frecuencia. Para las curvas amplitud vs. frecuencia, primero usamos en MATLAB la Transformada Rápida de Fourier (fft, por sus siglas en inglés) para discriminar los casos oscilatorios. Si una serie era oscilatoria, se simulaba una segunda vez usando el último punto de la simulación previa como nuevo primer punto, con el fin de descartar posibles oscilaciones transitorias. Así, se obtenía un *output* oscilatorio final a lo largo de la ventana temporal. Esta nueva serie temporal fue usada para calcular la amplitud y frecuencia, hallando los picos y valles en la serie. Calculando la diferencia de *output* entre cada pico y su valle vecino, un promedio de las diferencias fue computado para la amplitud. Usando los diferentes intervalos de tiempo entre picos, el promedio de dichos intervalos resultó en el periodo. La ventana temporal para cada simulación fue determinada de manera de tener un número relativamente alto de picos, peor tratando de limitar el tiempo de cómputo (por ejemplo, periodos más cortos llevan a elegir ventanas temporales más cortas).

Valores de parámetros. Como se mencionó en la Discusión, buscamos mostrar cómo, a partir de sets de parámetros previamente reportados, es posible encontrar diferentes tipos de oscilaciones. Estos sets de trabajos previos fueron el punto de partida para diferentes exploraciones llevadas a cabo en los análisis de bifurcaciones y la medición de curvas amplitud-frecuencia. Nuestro análisis función en las regiones del espacio de parámetros que exploramos y puede ser extendido a otras regiones donde la biestabilidad subyacente esté presente.

Las mismas figuras proveen los valores cambiado al graficar diferentes resultados (curvas amplitud vs. frecuencia, ciclos límite, curvas biestables, y series temporales). El resto de la información se presenta a continuación:

Modelo SK. Excepto donde se especifican valores distintos en lo que sigue, los valores de parámetros son: $A_{tot} = 40$, $K_{tot} = 17$, $P_{tot} = 17$, $k_1 = 8$, $k_6 = 50$, con todas las otras constantes de velocidad igual a 1. Esto también aplica a los parámetros del ciclo DP al mostrar sus curvas biestables.

Figura 2: a) se escaneó $k_{a,K} = k_{i,K}$ vs. S ; b) se escaneó S para diferentes casos $k_{a,K} = k_{i,K}$; c) $S = 0.1$ para diferentes casos $k_{a,K} = k_{i,K}$; d) ver valores en el panel.

Figura 3: $k_{a,K} = k_{i,K} = 0.65$ en todos los paneles. a), b) se escaneó k_3 vs. S ; c) se escaneó S para diferentes casos k_3 ; d) se escaneó S para $k_3 = 0.77$; e) se escaneó K_{act} en el ciclo DP para diferentes casos k_3 ; f) ver valores en el panel.

Figura 4: $k_{a,K} = k_{i,K} = 0.65$ en todos los paneles. a) se escaneó k_3 vs. P_{tot} con $S = 0.1$; b) se escaneó S para diferentes casos k_3 and P_{tot} ; c) se escaneó K_{act} en el ciclo DP para diferentes casos k_3 y P_{tot} ; d) ver valores en el panel.

Modelo 1 + 2. Todos los parámetros del ciclo DP tienen los mismo valores que en el modelo SK, a menos que se especifique lo contrario (diferentes valores de k_3 y P_{tot}). Todas las constantes de velocidad en el primer nivel son iguales a 1. La cantidad total de fosfatasa en el primer nivel es igual a 1.

Elegimos 1 como el valor para las nuevas constantes de velocidad (nuevas respecto del modelo SK), siguiendo el set de parámetros usados en SK. No solo muchas de las constantes de velocidad de SK eran iguales a 1 en el ciclo DP, sino también nuestra elección de valores para los parámetros del primer nivel es del mismo orden de magnitud que las constantes de activación e inactivación de la quinasa en el modelo SK. Nuestro objetivo fue obtener un set oscilatorio que no fuera significativamente distinto del set de SK original, para que la comparación de resultados entre modelos fuera más robusta.

Figura 6: a), b) se escaneó k_3 vs. P_{tot} con $E_{1tot} = 0.21$; c) se escaneó E_{1tot} para diferentes casos k_3 y P_{tot} ; d) se escaneó K_{act} en el ciclo DP para diferentes casos k_3 y P_{tot} ; e) ver valores en el panel.

Modelo activador-inhibidor. $\alpha = 0.1$, $c = 100$ y $\tau = 10$ en todos los casos, como usados en [38].

Figura 7: b) se escaneó ε vs. b ; c) se escaneó b para diferentes valores de ε ; d) se escaneó y en el nodo auto-catalítico para diferentes valores de ε ; e) ver valores en el panel.

Capítulo 3: Pseudo-nulclinas como método de análisis y predicción

Antecedentes

En señalización celular, el modelado matemático juega un rol importante en analizar y predecir el comportamiento de diferentes sistemas. El rango de complejidad es amplio, con ejemplos tan distintos como el modelo bidimensional de Fitzhugh-Nagumo [77] y una descripción de la cascada MAPK con 23 ecuaciones [14]. Esto también se observa en los sistemas analizados hasta el momento en esta Tesis, con dos ecuaciones en el activador-inhibidor como el ejemplo más sencillo, y múltiples reacciones enzimáticas en los modelos de ciclos de fosforilación/desfosforilación.

En general, se sabe que la mayoría de las ecuaciones diferenciales que modelan sistemas biológicos no pueden ser resueltas analíticamente. Por lo tanto, el objetivo del análisis cuantitativo de sistemas dinámicos es proveer información acerca de sus posibles comportamientos sin tener acceso a sus soluciones analíticas. En este contexto, un poderoso método para analizar cuantitativamente un sistema planar (esto es, 2D) es el uso de nulclinas: curvas donde la derivada de una de sus variables es igual a cero. Estas curvas separan regiones del plano donde el signo de sus derivadas es constante. A su vez, estas intersecciones corresponden a estados estacionarios en la dinámica del sistema. Esta información puede servir como una manera rápida de esquematizar el retrato de fases del sistema, como por ejemplo el antes mencionado modelo de Fitzhugh-Nagumo. Así, esta técnica de nulclinas es a veces suficiente para entender la dinámica cualitativa del sistema sin integrar sus ecuaciones diferenciales.

Sin embargo, esta técnica no se puede extender de manera directa a espacios de fase de dimensión mayor que 2 porque los objetos geométricos correspondientes a las nulclinas ya no son curvas, sino de manera más general (híper-)superficies de codimensión-1. Aun así, hay casos donde el retrato de fases del sistema todavía puede ser proyectado sobre un subespacio bidimensional, con algunas curvas jugando el rol de pseudo-nulclinas. Cuando es posible de aplicar, el análisis de fases, y en particular el concepto de nulclinas, ha sido una de las herramientas más útiles para el análisis cualitativo de los sistemas dinámicos. Como la principal limitación del método de nulclinas es su aplicación restringida a un espacio de fases bidimensional, cualquier extensión de dicho método a un número mayor de dimensiones será valioso.

En este capítulo, estudiamos modelos de señalización de dimensión mayor a 2, donde se definen pseudo-nulclinas y se utilizan para analizar la dinámica del sistema en cuestión. El primero es un modelo de ciclo celular en la etapa temprana, en embriones de *Xenopus laevis* [46]. Los autores estudian el cambio en el comportamiento oscilatorio durante esta fase del desarrollo, presente en diferentes categorías del reino animal. Este trabajo fue citado en el Capítulo 2, relevante al tratarse de un sistema con un cambio significativo en la amplitud y frecuencia de sus oscilaciones. El segundo ejemplo que analizamos en el presente Capítulo corresponde a un subsistema de la cascada MAPK, encontrada en todas las células eucariotas. Como mencionamos en la Introducción, señales de factores de crecimiento en receptores ubicados en la superficie de la célula activan tres niveles secuenciales de proteínas, con el output de la cascada responsable de la fosforilación de múltiples factores de transcripción. Esto conduce a su rol en respuestas como proliferación y diferenciación [14], [15], [17]. El conocido modelo de Huang y Ferrell consiste en 22 ecuaciones describiendo la cascada de tres niveles [12]. Los últimos dos niveles, correspondientes a ciclos de doble fosforilación (ciclos DP), constituyen el *motif* que estudiaremos. De esta manera, analizaremos el siguiente subsistema de la

cascada de tres niveles, luego del análisis de los modelos de Suwanmajo-Krishnan y 1 + 2 en el Capítulo 2 que representaban los primeros dos niveles.

Nuestro método aplica cuando un sistema puede descomponerse en 2 módulos, los cuales están mutuamente acoplados a través de 2 variables escalares. Mostramos que, al proyectar la dinámica completa en el subespacio subtendido por las dos variables escalares, podemos definir curvas que juegan el rol de pseudo-nulclinas. Las intersecciones de estas pseudo-nulclinas corresponden a estados estacionarios del sistema completo. Si bien el uso de estas pseudo-nulclinas es más limitado que para verdaderas nulclinas, mostramos que este enfoque puede ser útil para descifrar la emergencia de oscilaciones, y otros comportamientos dinámicos como excitabilidad, para un sistema cuya dimensión es mayor que 2. Otros trabajos utilizan pseudo-nulclinas para analizar diferentes modelos de ciclo celular [78], mediante características específicas que solo se aplican a esos modelos. Proponemos aquí un enfoque más sistemático basado en la modularidad de los sistemas analizados.

Ilustramos que situaciones donde las pseudo-nulclinas intersecan transversal o tangencialmente permiten la distinción de retratos de fases de oscilaciones descritas respectivamente por Hopf supercríticas o por bifurcaciones *Saddle-Node on an Invariant Circle* (SNIC), al tiempo que apuntan hacia la posibilidad de bifurcaciones *Saddle-Homoclinic* (SHom). Por otra parte, mostramos que estas pseudo-nulclinas admiten una interpretación natural en términos de funciones de respuestas de cada módulo cuando es sometido al *input* constante del otro módulo.

Métodos

La idea del método es descomponer el sistema en 2 módulos, asumiendo que el acople entre ambos es unidimensional. Esto significa que, si las variables de los módulos están descritas respectivamente por dos sets de variables reales, es decir, $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ and $y = (y_1, y_2, \dots, y_m)$, las ecuaciones del modelo pueden ser escritas como:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= f(x, \alpha(y)) \\ \frac{dy}{dt} &= g(y, \beta(x))\end{aligned}\tag{I}$$

Donde $\alpha(y)$ and $\beta(x)$ son dos funciones de valores reales. Tal sistema puede interpretarse como un primer módulo, descrito por las ecuaciones $\frac{dx}{dt} = f(x, a)$, donde a es un parámetro de entrada o *input*, interconectado con un segundo módulo cuyas ecuaciones son $\frac{dy}{dt} = g(y, b)$, con b el correspondiente parámetro de *input*. La interconexión proviene de reemplazar el *input* a del primer módulo por la función $\alpha(y)$, y el *input* b del segundo módulo por $\beta(x)$. Descomponer un sistema en dos módulos interconectados ha sido considerado en la literatura por Angeli et al. [79].

Para simplificar la presentación y la notación, en lo que sigue continuaremos con un ejemplo básico, donde las funciones de acople son simplemente $\alpha(y) = y_1$ y $\beta(x) = x_1$. La extensión a una función más general está incluida en el Apéndice, junto con un diagrama del esquema general.

Así, un estado estacionario (x^*, y^*) del sistema (I) es una solución del sistema de ecuaciones:

$$f(x, y_1) = 0$$

$$g(y, x_1) = 0$$

Si suponemos que las soluciones de este sistema de ecuaciones pueden ser escritas como sigue:

$$x = X(y_1)$$

$$y = Y(x_1)$$

(II)

Entonces, al proyectar estas funciones en el plano de coordenadas (x_1, y_1) , definimos las pseudo-nulclinas del sistema como dos curvas C_1 y C_2 cuyos grafos están dados respectivamente por las parametrizaciones $(X_1(y_1), y_1)$ y $(x_1, Y_1(x_1))$. La primera curva puede interpretarse como la función de respuesta del primer módulo con respecto a su parámetro de *input* y_1 . Análogamente, puede leerse la segunda pseudo-nulclina como la función de respuesta del segundo módulo sometido a su parámetro de *input* x_1 . Una ventaja de esta definición es que, por construcción, dichos estados estacionarios de los módulos acoplados deben ser hallados entre las intersecciones de las dos pseudo-nulclinas. Por definición, (x_1^*, y_1^*) puede ser escrita de dos maneras, ya sea como $(X_1(y_1^*), y_1^*)$ o $(x_1^*, Y_1(x_1^*))$, perteneciendo por lo tanto a los dos grafos de C_1 y C_2 .

A su vez, si (x_1^*, y_1^*) pertenece al set de intersecciones de las pseudo-nulclinas C_1 y C_2 , entonces:

$$x_1^* = X_1(y_1^*)$$

$$y_1^* = Y_1(x_1^*)$$

Y por construcción, las funciones X e Y satisfacen las ecuaciones para los estados estacionarios:

$$f(X(y_1^*), y_1^*) = 0$$

$$g(Y(x_1^*), x_1^*) = 0$$

En otras palabras, $x^* = X(y_1^*)$ e $y^* = Y(x_1^*)$ constituyen un estado estacionario del sistema acoplado ya que satisfacen el sistema de ecuaciones:

$$f(x^*, y_1^*) = 0$$

$$g(y^*, x_1^*) = 0$$

Otra ventaja de este método geométrico es su capacidad para revelar una bifurcación de *limit point*, como una bifurcación de *Saddle-Node*. Como se muestra en el Apéndice, esto ocurre cuando un estado estacionario corresponde a una intersección tangencial de las pseudo-nulclinas. En particular, este aspecto permite la distinción entre una bifurcación SNIC y una de Hopf, porque en el primer caso las oscilaciones aparecen mediante una bifurcación tangencial, mientras que en el segundo las pseudo-nulclinas intersecan transversalmente. Ambos casos son ilustrados al aplicar nuestro método a diferentes *motifs* de señalización en la sección Resultados.

Resultados

Método de pseudo-nulclinas aplicado a un modelo de ciclo celular que combina ciclos de feedback positivo y negativo

En [46], los autores estudian un modelo de ciclo celular oscilatorio en embriones de *X. laevis*, donde el periodo y forma de la oscilación cambia entre el primer ciclo mitótico y los ciclos subsiguientes.

Analizan el sistema obteniendo datos experimentales y ejecutando simulaciones computacionales. Un esquema del modelo es presentado en la Figura 3.1a, mostrando los dos ciclos de *feedback* positivos y el ciclo negativo involucrados.

El sistema de ecuaciones se presenta a continuación (ver Apéndice para los valores de parámetros):

$$\begin{aligned}\frac{d[cdk1_a]}{dt} &= k_{synth} - k_{dest}[apc_a][cdk1_a] \\ &\quad + \frac{1}{\sqrt{r}}k_{cdk1on} \left(1 + p \frac{[cdk1_a]^{ncdc25}}{[cdk1_a]^{ncdc25} + ec50_{cdc25}^{ncdc25}} \right) [cdk1_i] \\ &\quad - \sqrt{r}k_{cdk1off} \left(1 + p \frac{ec50_{wee1}^{nwee1}}{[cdk1_a]^{nwee1} + ec50_{wee1}^{nwee1}} \right) [cdk1_a] \\ \frac{d[cdk1_i]}{dt} &= -k_{dest}[apc_a][cdk1_i] - \frac{1}{\sqrt{r}}k_{cdk1on} \left(1 + p \frac{[cdk1_a]^{ncdc25}}{[cdk1_a]^{ncdc25} + ec50_{cdc25}^{ncdc25}} \right) [cdk1_i] \\ &\quad + \sqrt{r}k_{cdk1off} \left(1 + p \frac{ec50_{wee1}^{nwee1}}{[cdk1_a]^{nwee1} + ec50_{wee1}^{nwee1}} \right) [cdk1_a] \\ \frac{d[plx_a]}{dt} &= k_{plxon} \left(\frac{[cdk1_a]^{nplx}}{[cdk1_a]^{nplx} + ec50_{plx}^{nplx}} \right) (plx_{tot} - [plx_a]) - k_{plxoff}[plx_a] \\ \frac{d[apc_a]}{dt} &= k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{napc}}{[plx_a]^{napc} + ec50_{apc}^{napc}} \right) (1 - [apc_a]) - k_{apc} [apc_a]\end{aligned}$$

Observando las ecuaciones y el esquema del sistema, una separación en dos módulos es clara: 1) los dos estados (activo e inactivo) de los complejos *Cdk1* interactuando con *Cdc25* y *Wee1*, que forman los *feedbacks* positivos; 2) *Plx_a* y *Apc_a*, que forman el ciclo de *feedback* negativo con *Cdk1*. Las primeras dos ecuaciones están conectadas con las últimas dos a través de *Apc_a*, que degrada los complejos. Por otro lado, *Apc_a* depende de *Plx_a*, que a su vez depende de *Cdk1_a*.

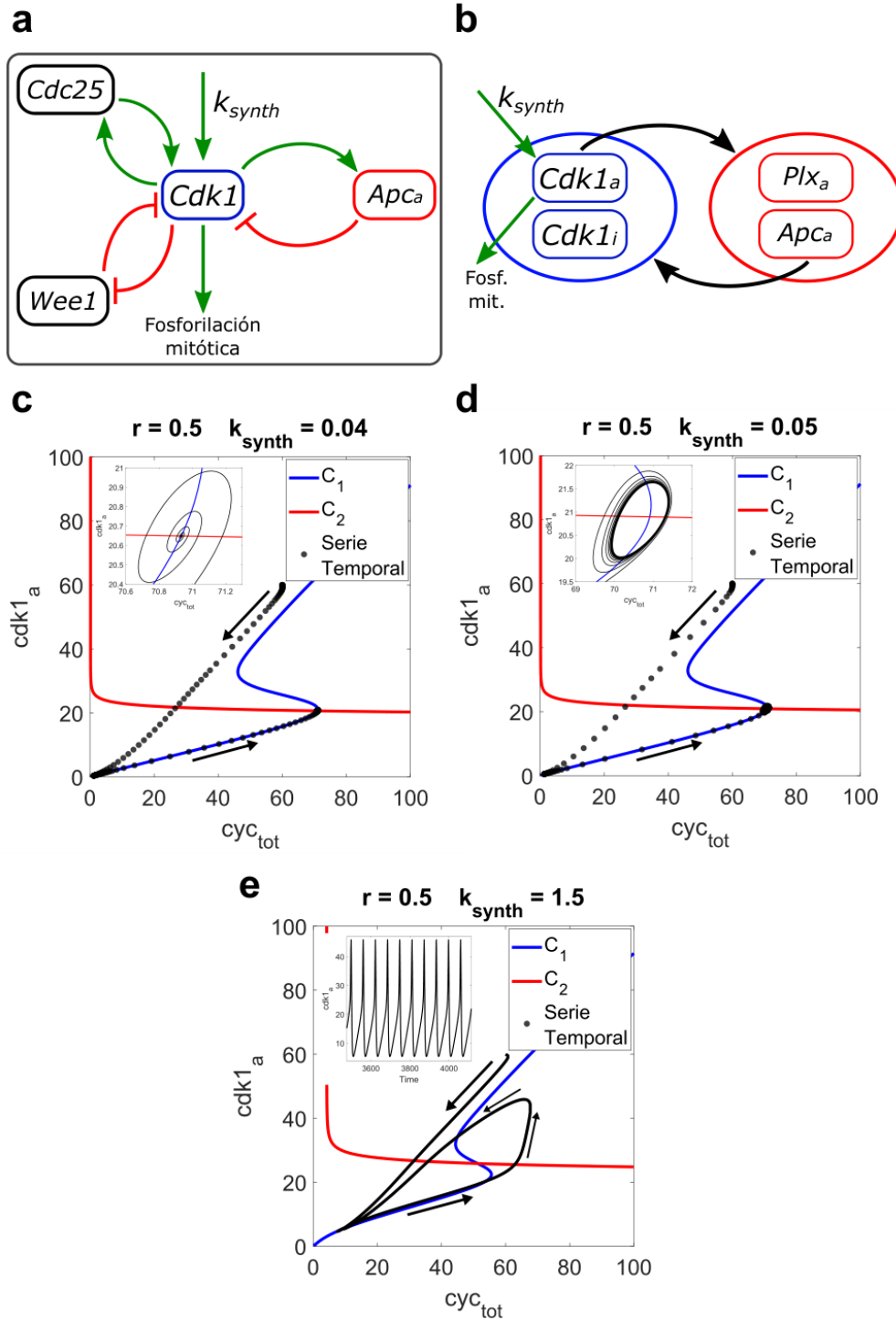


Figura 3.1: **a**: Esquema del modelo de ciclo celular, basado en el presentado en [46]. El parámetro k_{synth} (tasa de síntesis de la ciclina) actúa como el input del sistema. Dos feedbacks positivos (con Cdc25 y Wee1) y uno negativo (con Apc_a) gobiernan el modelo. El output Cdk1 (activo) está involucrado en la fosforilación mitótica. **b**: Esquema del motif basado en el método de pseudo-nulclinas, separando los dos módulos, y representando cómo están interconectados. **c**: Pseudo-nulclinas C_1 (en azul) y C_2 (en rojo) para $r = 0.5$ e input = 0.04, con las correspondientes series temporales (en negro). Las flechas denotan la trayectoria del sistema, desde $Cdk1_a = 60$ a un estado estacionario representado por la intersección de las curvas. **d**: El input es ahora 0.05, llevando a un pequeño ciclo límite alrededor de la intersección. **e**: Con input = 1.5, el ciclo límite crece en amplitud, siguiendo la rama inferior de C_1 , pero no la superior, cómo se muestra en [3].

De manera más clara, las ecuaciones pueden escribirse como:

$$\frac{d[cdk1_a]}{dt} = f_1([cdk1_a], [cdk1_i], [apc_a])$$

$$\frac{d[cdk1_i]}{dt} = f_2([cdk1_a], [cdk1_i], [apc_a])$$

$$\frac{d[plx_a]}{dt} = g_1([plx_a], [cdk1_a])$$

$$\frac{d[apc_a]}{dt} = g_2([apc_a], [plx_a])$$

El primer módulo, con f_1 y f_2 , consiste en dos ecuaciones que dependen de tres variables. La última de estas tres, Apc_a , es la única que pertenece al segundo módulo y, por lo tanto, es considerada como un parámetro de *input* para el primer módulo.

Tomando $f_2 = 0$, llegamos a una expresión para $Cdk1_i$ que depende de $Cdk1_a$ y Apc_a :

$$[cdk1_i] = \frac{\sqrt{r}k_{cdk1off} \left(1 + p \frac{ec50_{wee1}^{nwwee1}}{[cdk1_a]^{nwwee1} + ec50_{wee1}^{nwwee1}} \right) [cdk1_a]}{k_{dest}[apc_a] + \frac{1}{\sqrt{r}}k_{cdk1on} \left(1 + p \frac{[cdk1_a]^{ncdc25}}{[cdk1_a]^{ncdc25} + ec50_{cdc25}^{ncdc25}} \right)}$$

Luego, con esta ecuación, se puede reemplazar $Cdk1_i$ en $f_1 = 0$ y el resultado es una expresión que solo depende de $Cdk1_a$ y Apc_a . Realizando un escaneo numérico de $Cdk1_a$, queda una ecuación implícita para Apc_a . La resolvemos con MATLAB, obteniendo diferentes pares $(Apc_a, Cdk1_a)$. Esta es la pseudo-nulclina para el primer módulo, resultado de igualar a cero las dos ecuaciones diferenciales para los complejos $Cdk1$. Escrito de otra manera, al igualar ambas ecuaciones a cero se llega a una expresión que determina la primera pseudo-nulclina:

$$F([cdk1_a], [apc_a]) = 0$$

En el segundo módulo, con g_1 y g_2 , también tenemos dos ecuaciones y tres variables. El parámetro de *input* del otro módulo es $Cdk1_a$. Aplicamos el mismo procedimiento de antes a las ecuaciones de Plx_a y Apc_a . Tomando $g_1 = 0$:

$$[plx_a] = \frac{k_{plxon} \left(\frac{[cdk1_a]^{nplx}}{[cdk1_a]^{nplx} + ec50_{plx}^{nplx}} \right) plx_{tot}}{k_{plxon} \left(\frac{[cdk1_a]^{nplx}}{[cdk1_a]^{nplx} + ec50_{plx}^{nplx}} \right) + k_{plxoff}}$$

Con esta expresión, reemplazamos Plx_a en la siguiente ecuación, obtenida para $g_2 = 0$:

$$[apc_a] = \frac{k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{nape}}{[plx_a]^{nape} + ec50_{apc}^{nape}} \right)}{k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{nape}}{[plx_a]^{nape} + ec50_{apc}^{nape}} \right) + k_{apcconf}}$$

Así, llegamos a una ecuación explícita para Apc_a , que solo depende de $Cdk1_a$. Nuevamente, realizamos un escaneo numérico para $Cdk1_a$, obteniendo diferentes pares $(Apc_a, Cdk1_a)$. Esta es la pseudo-nulclina

para el segundo módulo, obtenida de igualar a cero las ecuaciones diferenciales para Plx_a y Apc_a . Es decir, arribamos a una expresión para la segunda pseudo-nulclina:

$$G([apc_a], [cdk1_a]) = 0$$

De esta manera, Apc_a y $Cdk1_a$ son las variables de acople del sistema.

Finalmente, para ambas curvas realizamos un cambio de variables. Sumando las ecuaciones para los complejos $Cdk1$, obtenemos:

$$\frac{d([cdk1_a] + [cdk1_i])}{dt} = k_{synth} - k_{dest}[apc_a]([cdk1_a] + [cdk1_i])$$

La suma de los dos complejos define la ciclina total, Cyc_{tot} . Al igual su ecuación diferencial a cero:

$$\frac{k_{synth}}{k_{dest}[apc_a]} = [cyc_{tot}]$$

Ahora, podemos realizar un cambio de variables de Apc_a a Cyc_{tot} luego de obtener los diferentes pares (Apc_a , $Cdk1_a$). Así, trabajamos en el espacio de fases (Cyc_{tot} , $Cdk1_a$), espacio usado en los dos trabajos de Tsai et al. [3], [46].

En la Figura 3.1b, mostramos un esquema del modelo siguiendo esta descripción modular, a modo de comparación con el esquema previo basado en el trabajo de Tsai et al. Todos los valores de parámetros se encuentran en el Apéndice. Los parámetros que fueron cambiados se reportan en el texto a continuación y en las figuras.

En la Figura 3.1c, presentamos las pseudo-nulclinas para el sistema y la trayectoria en el tiempo correspondiente (tomando $Cdk1_a = 60$ nM como punto de partida) para $k_{synth} = 0.04$, valor cercano al rango oscilatorio, pero fuera del mismo (en el Apéndice, Fig. S3.1, se muestra el diagrama de bifurcación con el parámetro k_{synth} , dando lugar a dos bifurcaciones de Hopf supercríticas). El parámetro que controla la fortaleza del *feedback* positivo, r , es igual a 0.5 (usado en el trabajo de Tsai et al.). La trayectoria del sistema desciende para luego subir siguiendo la rama inferior de la curva C_1 , formando una espiral antes de terminar en un punto fijo. El punto fijo y la intersección de las pseudo-nulclinas se ubican a una distancia relativa muy pequeña, con lo que la intersección representa el estado estacionario del sistema.

En la Figura 3.1d, $k_{synth} = 0.05$, lo que corresponde a un ciclo límite de amplitud relativamente pequeña. La intersección de las curvas ocurre dentro del ciclo, representando el estado estacionario inestable, y está localizado justo por debajo del pliegue o *fold* de C_1 . En un sistema 2D analizado con verdaderas nulclinas, se esperaría que las oscilaciones ocurran solo cuando la intersección se encuentra entre los dos pliegues de la curva con forma de "S". El hecho de que nuestras pseudo-nulclinas se crucen cerca, pero por debajo del pliegue, y el caso anterior donde había una mínima distancia entre la intersección y el punto final de la serie temporal, reflejan el carácter "pseudo" de nuestro método al tiempo que sigue demostrando su utilidad.

En la Figura 3.1e, $k_{synth} = 1.5$, el valor usado en el trabajo de Tsai et al. Nuevamente, la trayectoria sigue la rama inferior de C_1 , pero no la superior. Esto es consistente con los resultados presentados por los autores en 2008 [3].

Dada la forma biestable de la pseudo-nulclina para el módulo de $Cdk1$, surge la pregunta de si ambas curvas pueden interactuar de manera tangencial. Los resultados hasta el momento solo involucran intersecciones transversales, con un punto fijo estable o ciclos límites alrededor de un punto inestable,

nacido a través de bifurcaciones de Hopf. Curvas tangentes representarían una bifurcación de *Saddle-Node*, la cual podría actuar como una SNIC o indicar la existencia de una SHom, ya que de la bifurcación SN tendríamos una *saddle*, sumado al establecido ciclo límite. Estas bifurcaciones globales permitirían mayor control sobre el periodo de lo que es posible bajo bifurcaciones de Hopf.

Considerando la forma de C_1 , la distancia con C_2 , y la composición de funciones de Hill que llevan a C_2 , realizamos algunas modificaciones en el modelo con el objetivo de lograr curvas tangentes. Primero, añadimos un parámetro extra en la ecuación diferencial para Apc_a :

$$\frac{d[apc_a]}{dt} = k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{n_{apc}} + \text{extra}}{[plx_a]^{n_{apc}} + ec50_{apc}^{n_{apc}}} \right) (1 - [apc_a]) - k_{apcoff}[apc_a]$$

Tomando la ecuación diferencial igual a cero:

$$[apc_a] = \frac{k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{n_{apc}} + \text{extra}}{[plx_a]^{n_{apc}} + ec50_{apc}^{n_{apc}}} \right)}{k_{apcon} \left(\frac{[plx_a]^{n_{apc}} + \text{extra}}{[plx_a]^{n_{apc}} + ec50_{apc}^{n_{apc}}} \right) + k_{apcoff}}$$

Como valores bajos de Apc_a corresponden a valores altos de Cyc_{tot} (fuera de la escala en el gráfico), añadir el parámetro extra puede llevar a C_2 a una caída en $Cdk1_a$ cerca del pliegue derecho de C_1 . Al mismo tiempo, este parámetro extra puede representar la actividad basal de Apc_a en ausencia de Plx_a .

Con $k_{synth} = 1.5$ y $r = 10$ (valor usado en [3]), y aumentando $ec50$ para Plx_a de manera de ajustar el umbral de C_2 , llegamos a la Figura 3.2a. La distancia entre las pseudo-nulclinas cerca del pliegue derecho de C_1 es lo suficientemente pequeña para que las curvas puedan ser tangentes. Simulamos el modelo en MatCont y encontramos dos bifurcaciones SN para $k_{synth} = 1.516765$ y 1.530532 . Las Figuras 3.2b y 3.2c muestran las pseudo-nulclinas en estos valores, donde se puede apreciar el comportamiento tangencial. Para el valor de input menor, el punto de tangencia ocurre entre los pliegues de C_1 y, por otro lado, la intersección transversal está fuera de los pliegues, correspondiendo al estado estacionario estable. Para el input mayor, el punto de tangencia está mucho más cerca del pliegue de C_1 y la intersección se halla entre los pliegues, representando un estado estacionario inestable alrededor del cual tiene lugar un ciclo límite. Para el sistema completo, se encontró una bifurcación SHom entre las dos SN, en $k_{synth} = 1.527$.

En la Figura 3.2d, mostramos un caso para $k_{synth} = 1.52$, valor por fuera del rango oscilatorio, pero entre las dos bifurcaciones SN. Dependiendo de la condición inicial, el sistema puede 1) dar una vuelta por el espacio de fases describiendo un pico de *output* en el tiempo antes de terminar en un estado estacionario o 2) tomar un camino corto hacia ese punto fijo. Con la condición inicial de la Figura 3.2d, justo por arriba del punto silla/*saddle* representado por la intersección en el medio, realiza una vuelta. En la Figura 3.2e, comienza por debajo de la *saddle*, con lo que viaja directo a la intersección inferior, el punto fijo estable. El modelo muestra excitabilidad en esta región del espacio de parámetros, bien descrita por las pseudo-nulclinas.

Resumiendo, no solo nuestro método es consistente con bifurcaciones emergentes del set de parámetros original, sino que también nos permitió encontrar una nueva bifurcación a través de la manipulación de las dos pseudo-nulclinas. Al mover un solo parámetro, las intersecciones entre las curvas cambian. Así, esta sencilla exploración permite encontrar nuevos resultados. En este sistema en particular, el uso de funciones de Hill revela un camino útil para dicha exploración, al modificar la amplitud y el umbral de la curva C_2 . Como las funciones de Hill son recurrentes en biología de sistemas, argumentamos que este ejemplo puede servir como inspiración para el análisis de muchos otros casos.

Al mismo tiempo, para cualquier modelo, las pseudo-nulclinas proveerán una guía visual para encontrar nuevos comportamientos.

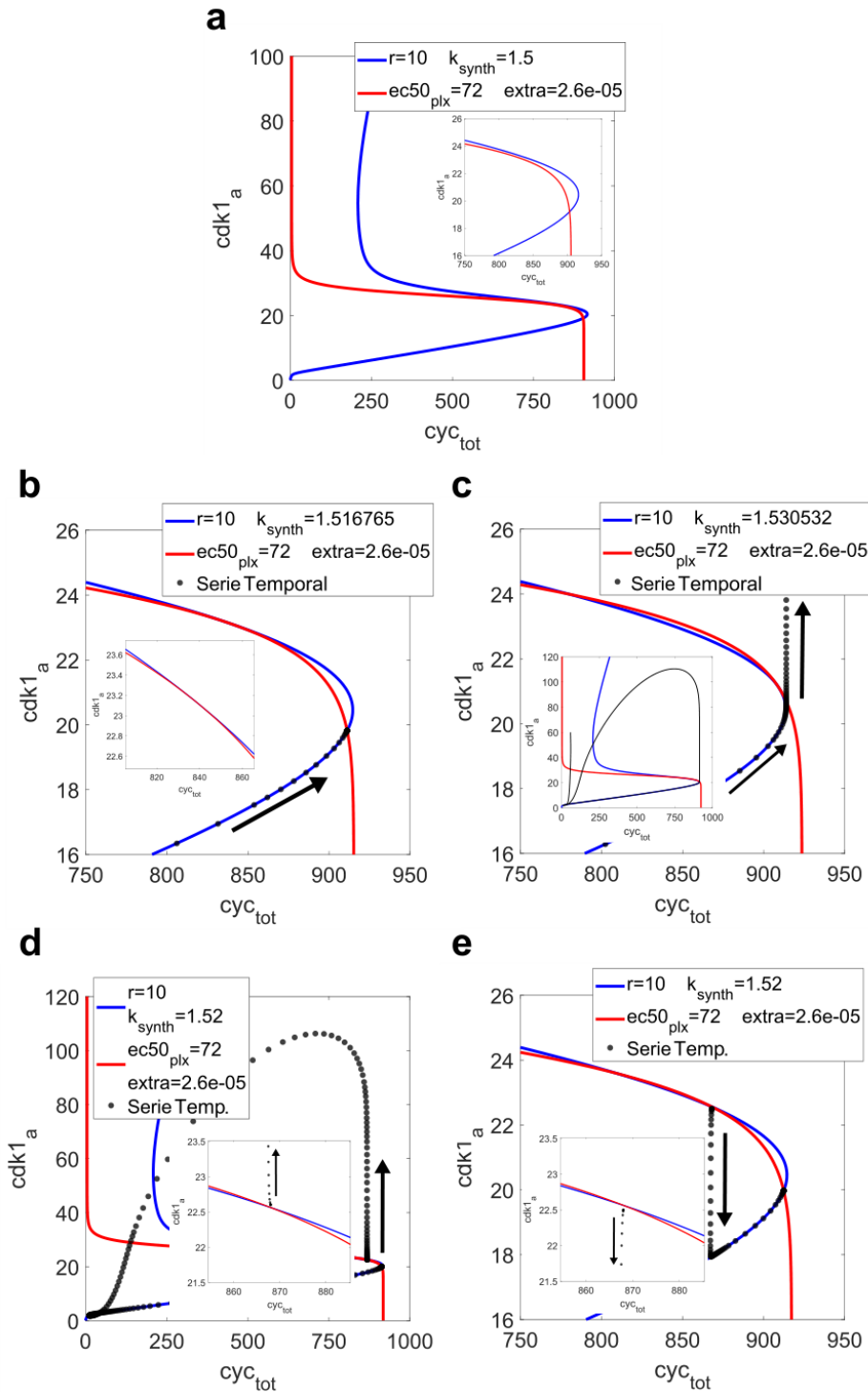


Figura 3.2: Modelo de ciclo celular, con pseudo-nulclinas C_1 (en azul) y C_2 (en rojo) para $r = 10$, $ec50_{plx} = 72$, $extra = 2.6e-5$ y diferentes valores de input. **a:** Input = 1.5, las pseudo-nulclinas están cerca de una tangencia, aprovechando el pliegue derecho de C_1 . **b:** Input = 1.516765, tangencia a una distancia del pliegue derecho de C_1 , con la serie temporal que termina en la intersección inferior (el estado estacionario estable). **c:** Input = 1.530532, tangencia cercana al pliegue, intersección entre los pliegues (un estado estacionario inestable), y un ciclo límite emerge. **d:** Input = 1.52, aprovechando la saddle se pueden elegir diferentes condiciones iniciales para obtener (o no) excitabilidad. Por arriba de la saddle,

el sistema describe una vuelta en el espacio de fases antes de finalizar en el estado estacionario estable. *e*: Input = 1.52, con una condición inicial pero debajo de la saddle, el sistema viaja directo al estado estacionario estable.

Subsistema de MAPK donde ambos módulos son capaces de biestabilidad

El segundo modelo estudiado en este trabajo corresponde a los últimos dos niveles de la cascada MAPK. Consiste en un ciclo de doble fosforilación (DP) donde su *output*, el sustrato doblemente fosforilado, actúa como la quinasa para otro ciclo DP. Lo llamaremos el sistema 2 + 2, siguiendo la doble modificación presente en cada nivel. Presentamos un esquema en la Figura 3.3a. Este *motif* es de interés para nuestro trabajo, al llevar la aplicación del método a un subsistema de un relevante y ampliamente estudiado modelo en biología. Pero, además, hay dos importantes diferencias con el *motif* de ciclo celular de la subsección anterior: es de mayor dimensión (17 variables contra 4) y capaz de biestabilidad en ambos módulos [10].

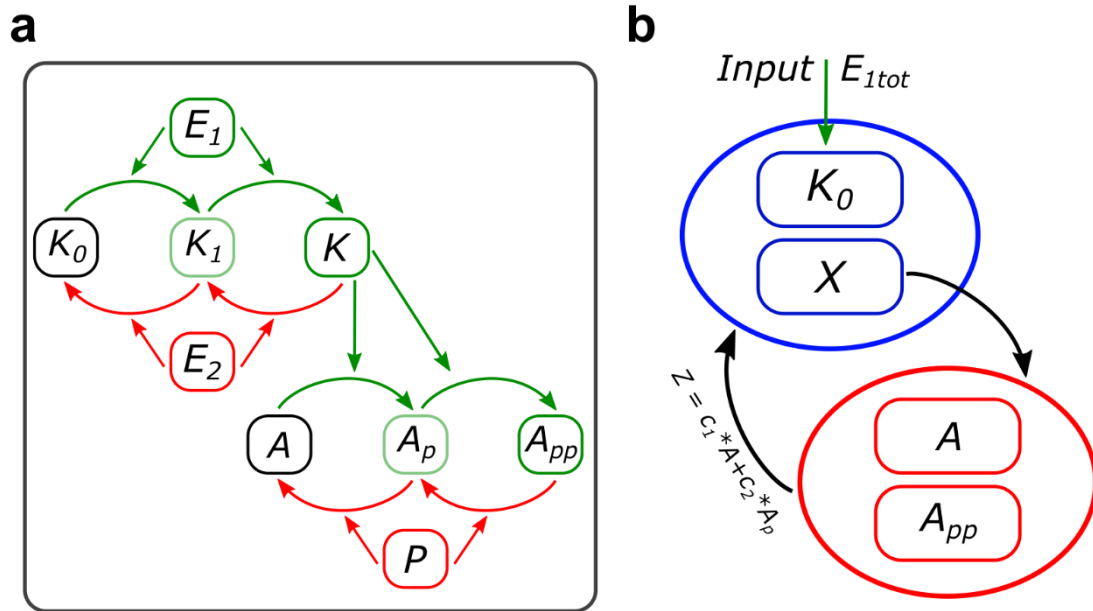


Figura 3.3: **a**: Esquema del modelo 2 + 2. La quinasa input E_1 activa la quinasa K del primer nivel, que atraviesa dos pasos de fosforilación para, a su vez, fosforilar el sustrato A del segundo nivel, también en dos pasos. **b**: Esquema del motif basado en el método de pseudo-nulclinas, representando los módulos del primer y segundo nivel, y cómo están interconectados a través de X y Z . Más detalles de cómo se redujo el sistema en el Apéndice.

El set de parámetros elegido proviene de nuestro análisis previo de los sistemas de Krishnan y 1 + 2, donde el ciclo DP era biestable cuando se escaneaba la quinasa input. Esto era una condición necesaria para obtener oscilaciones en esos ejemplos, y valioso para el presente análisis ya que la presencia de biestabilidad en cada uno de los dos módulos (encontrada a través de las bifurcaciones SN y sus pliegues/*folds*), y de oscilaciones en todo el sistema pondrán a prueba el método de pseudo-nulclinas.

El sistema 2 + 2, de 17 ecuaciones, se escribe de la siguiente manera:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_2[AK] - k_1[A][K] + k_{12}[A_pP],$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[AK]}{dt} &= k_1[A][K] - (k_2+k_3)[AK], \\
\frac{d[A_p]}{dt} &= k_3[AK] - k_4[A_p][K] + k_5[A_pK] + k_9[A_{pp}P] + k_{11}[A_pP] - k_{10}[A_p][P], \\
\frac{d[A_pK]}{dt} &= k_4[A_p][K] - (k_5+k_6)[A_pK], \\
\frac{d[A_{pp}]}{dt} &= k_6[A_pK] + k_8[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P], \\
\frac{d[A_{pp}P]}{dt} &= k_7[A_{pp}][P] - (k_8+k_9)[A_{pp}P], \\
\frac{d[A_pP]}{dt} &= k_{10}[A_p][P] - (k_{11}+k_{12})[A_pP], \\
\frac{d[P]}{dt} &= (k_8+k_9)[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P] + (k_{11}+k_{12})[A_pP] - k_{10}[A_p][P], \\
\frac{d[K_0]}{dt} &= l_2[K_0E_1] - l_1[K_0][E_1] + l_{12}[K_1E_2], \\
\frac{d[K_0E_1]}{dt} &= l_1[K_0][E_1] - (l_2+l_3)[K_0E_1], \\
\frac{d[K_1]}{dt} &= l_3[K_0E_1] - l_4[K_1][E_1] + l_5[K_1E_1] + l_9[KE_2] + l_{11}[K_1E_2] - l_{10}[K_1][E_2], \\
\frac{d[K_1E_1]}{dt} &= l_4[K_1][E_1] - (l_5+l_6)[K_1E_1], \\
\frac{d[K]}{dt} &= (k_2+k_3)[AK] - k_1[A][K] + (k_5+k_6)[A_pK] - k_4[A_p][K] + l_6[K_1E_1] - l_7[K][E_2] \\
&\quad + l_8[KE_2], \\
\frac{d[KE_2]}{dt} &= l_7[K][E_2] - (l_8+l_9)[KE_2], \\
\frac{d[K_1E_2]}{dt} &= l_{10}[K_1][E_2] - (l_{11}+l_{12})[K_1E_2], \\
\frac{d[E_2]}{dt} &= (l_8+l_9)[KE_2] - l_7[K][E_2] + (l_{11}+l_{12})[K_1E_2] - l_{10}[K_1][E_2], \\
\frac{d[E_1]}{dt} &= (l_2+l_3)[K_0E_1] - l_1[K_0][E_1] + (l_5+l_6)[K_1E_1] - l_4[K_1][E_1]
\end{aligned}$$

Para aplicar el método de pseudo-nulclinas, trabajamos con una versión reducida del sistema 2 + 2, obtenida a partir de la aproximación cuasi-estacionaria. Este modelo reducido puede escribirse como sigue (ver Apéndice para la reducción detallada de las 17 ecuaciones originales):

$$\begin{aligned}
\frac{d[K_0]}{dt} &= l_{12}d_4[K_1] \frac{E_{2tot}}{1 + d_3 \frac{X}{1+Z} + d_4[K_1]} - l_3d_1[K_0] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1[K_0] + d_2[K_1]} \\
\frac{dX}{dt} &= l_6d_2[K_1] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1[K_0] + d_2[K_1]} - l_9d_3X \frac{E_{2tot}}{(1+Z)(1+d_4[K_1]) + d_3X}
\end{aligned}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{12}c_4[A_p] \frac{P_{tot}}{1 + c_3[A_{pp}] + c_4[A_p]} - k_3c_1[A] \frac{X}{1 + Z}$$

$$\frac{d[A_{pp}]}{dt} = k_6c_2[A_p] \frac{X}{1 + Z} - k_9c_3[A_{pp}] \frac{P_{tot}}{1 + c_3[A_{pp}] + c_4[A_p]}$$

X y Z son funciones de algunas de las variables originales:

$$X = [K] + [AK] + [A_pK]$$

$$Z = c_1[A] + c_2[A_p]$$

X y Z son las funciones de acople del modelo, una para cada módulo, conectando el primer ciclo DP con el segundo. Las ecuaciones de conservación quedan:

$$K_{tot} = [K_0] + [K_1] + X + E_{1tot} \frac{d_1[K_0] + d_2[K_1]}{1 + d_1[K_0] + d_2[K_1]} + E_{2tot} \frac{d_3[K] + d_4[K_1]}{1 + d_3[K] + d_4[K_1]}$$

$$A_{tot} = [A] + [A_p] + [A_{pp}] + X \frac{c_1[A] + c_2[A_p]}{1 + c_1[A] + c_2[A_p]} + P_{tot} \frac{c_3[A_{pp}] + c_4[A_p]}{1 + c_3[A_{pp}] + c_4[A_p]}$$

La variable K puede escribirse de la siguiente manera (ver Apéndice):

$$[K] = \frac{X}{1 + Z}$$

El nuevo sistema de ecuaciones diferenciales puede escribirse de manera más genérica:

$$\frac{d[K_0]}{dt} = f_1([K_0], [K_1], X, Z)$$

$$\frac{dX}{dt} = f_2([K_0], [K_1], X, Z)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = g_1([A], [A_p], [A_{pp}], X, Z)$$

$$\frac{d[A_{pp}]}{dt} = g_2([A], [A_p], [A_{pp}], X, Z)$$

Con las ecuaciones f_1 y f_2 igualadas a cero, llegamos a dos expresiones para Z, dependientes de K_0 , K_1 y X. Igualándolas, obtenemos una ecuación explícita para K_0 , que depende únicamente de K_1 y parámetros (X aparece como factor común). Con MATLAB, escaneamos K_1 para obtener K_0 . Con la ecuación de conservación para K_{tot} y usando cualquiera de las expresiones para Z, llegamos a una ecuación implícita para X (la variable K se puede escribir como función de X y Z, con Z dependiente de K_0 , K_1 y X). Resolvemos la misma con MATLAB, y solo queda reemplazar en las expresiones mencionadas para encontrar Z. Esta es la primera pseudo-nulclina.

Para la segunda pseudo-nulclina, usamos 1) Z como función de A y A_p , 2) las dos ecuaciones diferenciales para A y A_{pp} iguales a cero, 3) la ecuación de conservación para A_{tot} . Es decir, cuatro ecuaciones con cinco incógnitas (A, A_p , A_{pp} , X, Z). La ecuación de conservación puede escribirse como función de A_p y A_{pp} . Escaneando A_{pp} , obtenemos A_p . Luego, obtenemos A, que conduce a Z, y finalmente a X.

Todos los valores de parámetros se presentan en el Apéndice. Para el parámetro de *input*, sus valores se reportan a continuación y en las Figuras. A su vez, en el Apéndice (Fig. S3.2), presentamos un

diagrama de bifurcación para el sistema completo (de 17 ecuaciones) con el input E_{tot} como el parámetro de control, mostrando cuatro bifurcaciones SN y dos de Hopf.

En la Figura 3.4a, mostramos los resultados para $input = 0.26$, incluyendo la serie temporal para el sistema reducido. Solo existe una intersección, que corresponde a un punto fijo estable, y es donde la serie llega a su fin. Es importante remarcar nuevamente que ambos módulos son capaces de biestabilidad, con lo que es esperable que ambas pseudo-nulclinas tengan pliegues. En la Figura 3.4b, el $input$ alcanza una bifurcación SN (en el análisis del sistema completo), y las dos curvas son tangentes una de otra. Las dos nuevas intersecciones en la Figura 3.4c representan los nuevos estados estacionarios que surgen luego de la SN.

En la Figura 3.4d, el $input$ lleva al sistema a la segunda SN, y la tangencia entre pseudo-nulclinas ocurre a un mayor valor de Z que en la Figura 3.4b. También, este segundo punto de tangencia tiene lugar cerca de un pliegue de la curva del primer nivel que es diferente al caso anterior.

Empezando desde este valor de $input$, las oscilaciones emergen, como se muestra en la Figura 3.4e. Solo existe una intersección de curvas, representando un estado estacionario inestable. Este punto está ubicado entre los dos pliegues tanto de C_1 como de C_2 . El $output$ pasa la mayor parte de cada periodo en un nivel bajo, con breves picos de actividad.

En la Figura 3.4f, el sistema está cerca de la siguiente SN. Las curvas se encuentran cerca de tener un punto de tangencia, a un valor justo por arriba de $Z = 0$. La intersección previamente encontrada entre los pliegues sigue existiendo, y dos nuevas intersecciones están a punto de ocurrir. El $output$ ahora pasa mayor tiempo en un nivel alto, con caídas relativamente cortas.

La naturaleza de estas oscilaciones proviene de la proximidad del sistema a bifurcaciones globales. Cuando las pseudo-nulclinas son casi tangentes y el comportamiento es oscilatorio, la trayectoria del sistema es más lenta en la vecindad de la zona de quasi-tangencia. Para el $input$ de la Figura 3.4e, esta zona se ubica para Z alto, A_{pp} bajo (Z es combinación de A y A_p , entonces si es alto, A_{pp} es bajo). El sistema puede permanecer aquí por un tiempo relativamente largo. En la Figura 3.4f, con Z bajo y A_{pp} alto, el tiempo del nivel alto de $output$ puede ser extendido con manipulaciones precisas del $input$, dando lugar a caídas estrechas de $output$.

Un aspecto interesante de este caso es que no hemos podido confirmar la presencia de bifurcaciones SNIC vía MatCont para el sistema completo (aunque sí se encuentran bifurcaciones SN cuando las curvas son tangentes), mientras que el sistema reducido no puede ser analizado debido a las ecuaciones implícitas para las conservaciones. Así, argumentamos que nuestro método provee mayor evidencia de bifurcaciones globales cuando un programa reconocido en el análisis de bifurcaciones no alcanza a confirmar lo encontrado.

Una vez que el $input$ llega a la siguiente SN, en la Figura 3.4g, las curvas son tangentes, y la serie temporal se detiene en ese punto. Aquí, las oscilaciones desaparecen. El rango para ciclos límite estables parece limitado por dos bifurcaciones SN(IC), con el ciclo límite aprovechando la amplitud dada por C_2 a lo largo del rango oscilatorio.

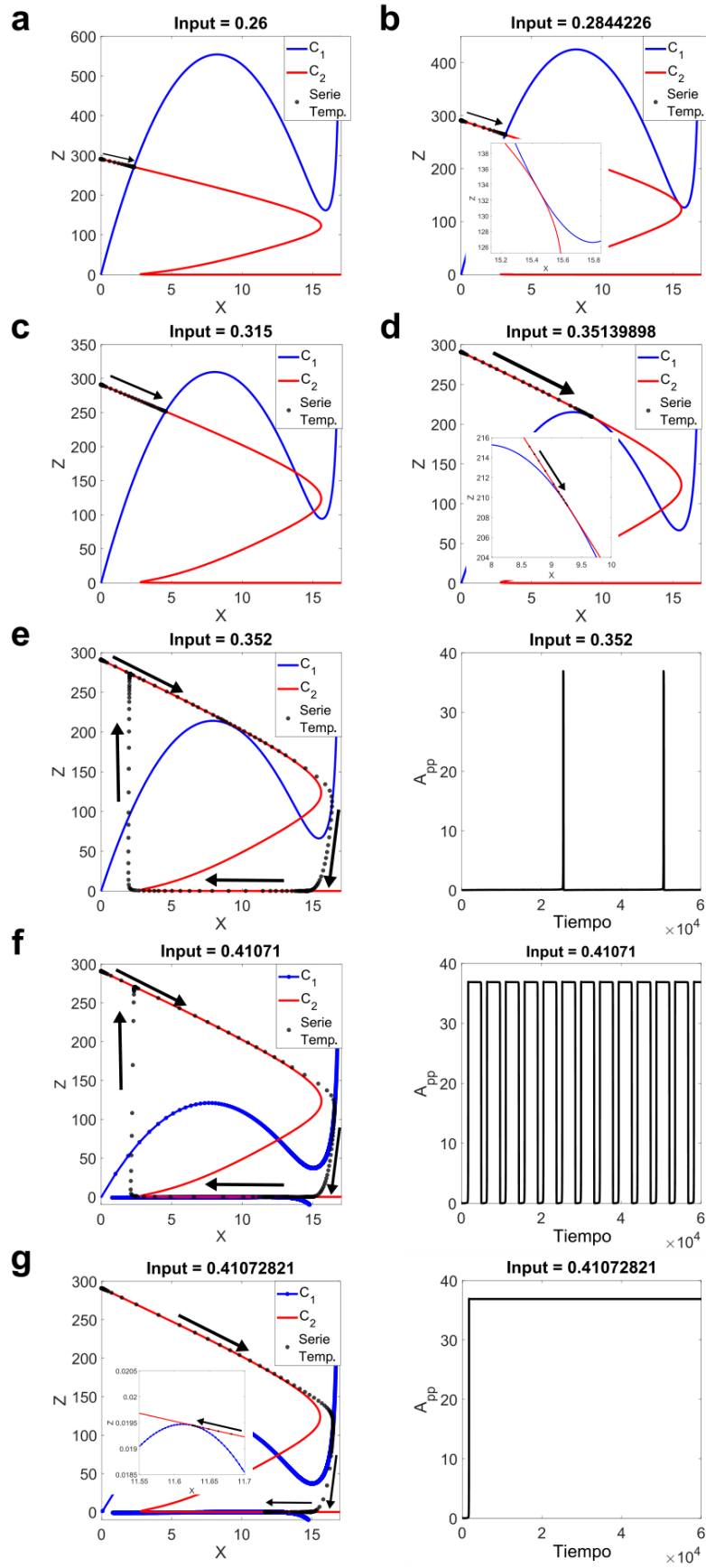


Figura 3.4: Modelo 2+2, con pseudo-nulclinas C_1 (en azul) y C_2 (en rojo) para diferentes valores de input con las correspondientes series temporales del modelo reducido (en negro). Las flechas denotan las

trayectorias tomadas por el sistema. **a:** Input = 0.26, solo una intersección, donde termina la serie temporal. **b:** Input = 0.2844226, una tangencia entre las curvas, donde se encuentra una bifurcación SN en el sistema completo. **c:** Input = 0.315, se encuentran tres intersecciones, con la serie temporal que termina en la intersección que representa el punto fijo estable. **d:** Input = 0.35139898, una segunda tangencia para la segunda SN en el sistema completo. **e:** Input = 0.352. Izquierda: el ciclo límite aprovecha al máximo la amplitud de la curva C_2 . Solo queda una intersección, el estado estacionario inestable. Derecha: los picos son angostos comparados con los intervalos donde el output está casi en cero. **f:** Input = 0.41071. Izquierda: cerca de la siguiente SN, el sistema sigue oscilando con amplitud relativamente igual, y la pseudo-nulclina aparece para valores bajos de Z (eje vertical graficado desde un valor negativo para claridad de la presentación). Las curvas están cerca una de otra, pero no son (todavía, para este input) tangentes. Derecha: el output está en un nivel alto por un tiempo más largo, con breves caídas. **g:** Input = 0.41072821. Izquierda: ocurre la tangencia para Z bajo, donde se encuentra la siguiente SN del sistema completo. Derecha: la serie temporal ya no es oscilatoria.

Continuando el barrido muestra lo esperado, con dos nuevas intersecciones y la serie temporal deteniéndose en la más baja en Z (la mayor en A_{pp}). Eventualmente, el último punto SN del sistema completo es representado por una nueva tangencia cercana al pliegue izquierdo de la curva del segundo nivel (ver Apéndice, Fig. S3.3).

Si bien en la Figura 4 hemos graficado la trayectoria del sistema reducido, pueden encontrarse resultados similares al integrar el completo. Y si bien no podemos obtener con MatCont un diagrama de bifurcación para el sistema reducido (como mencionamos, por la naturaleza implícita de las ecuaciones de conservación), hemos elegido valores de *input* siguiendo las bifurcaciones del sistema completo, con resultados consistentes.

Discusión

En este capítulo, aplicamos nuestro método de pseudo-nulclinas en dos modelos, uno correspondiente al ciclo celular embrionario y otro a un subsistema de la cascada MAPK. Representan dos conocidos e importantes ejemplos en biología de sistemas. Los sets de parámetros involucraron diferentes bifurcaciones y comportamientos, con el propósito de poner a prueba el método.

Para el *motif* de Tsai et al., no solo encontramos consistencia en nuestros resultados usando los valores de parámetros tomados de su trabajo, sino también fuimos capaces de manipular las pseudo-nulclinas hacia diferentes bifurcaciones y, por lo tanto, nuevos comportamientos. El uso de funciones de Hill para las ecuaciones diferenciales fue conveniente en este sentido, y su uso recurrente en el modelado matemático de sistemas biológicos apunta a la utilidad del método para el análisis dinámico en numerosos sistemas.

El *motif* 2 + 2, a diferencia del primer caso, mostró pliegues para ambas pseudo-nulclinas, representando la biestabilidad subyacente en cada ciclo de doble fosforilación y así expandiendo la aplicación de las curvas a un ejemplo con biestabilidad en ambos módulos. El método dio resultados consistentes con el comportamiento del *motif*, aun cuando se requirió como primer paso una reducción del sistema de ecuaciones, y también ayudó a rastrear bifurcaciones no confirmadas con MatCont. Queda por saber si el método continúa entregando resultados útiles y consistentes en otras regiones del espacio de parámetros. En este sentido, la variedad de bifurcaciones presente en los

resultados da buenos indicios. Por otro lado, una pregunta pendiente es si el método puede extenderse a modelos de tres módulos, como la cascada MAPK completa.

Un caso de interés en la literatura proviene de estudios realizados por De Boeck et al., donde analizan el ciclo celular embrionario a través de dos *switches* biestables (en un sistema de tres ecuaciones). Los autores encuentran oscilaciones de gran amplitud con mejorada robustez: una mayor región oscilatoria del espacio de parámetros que en el caso con un solo *switch* biestable [80]. Nuestros resultados, para 1) un *motif* de ciclo celular con un módulo biestable y 2) un sistema compuesto por dos módulos biestables, pueden ser utilizados en esta área de biología celular cuando se consideran las ventajas del trabajo de De Boeck et al. (progresión correcta del ciclo celular) y las de nuestro análisis (comportamientos consistentes y variados para un sistema de cuatro ecuaciones). En particular, una publicación reciente de Parra-Rivas et al. presenta un estudio de bifurcaciones bien detallado de múltiples modelos de ciclo celular, incluyendo la combinación de dos *switches* biestables [81]. Nuestro método de pseudo-nulclinas puede ser útil para una mayor interpretación del origen de dichas bifurcaciones, que incluyen, como los dos modelos de nuestro trabajo, aquellas del tipo global.

Pueden encontrarse en la literatura casos donde nuestro método no puede aplicarse, como en [82] donde el sistema en cuestión es un modelo grande de ciclo celular en levadura dividido en numerosos módulos, algunos de ellos con más de una conexión con el resto. Es posible que algún tipo de reducción o aproximación del modelo sea necesaria antes de analizarlo mediante pseudo-nulclinas. Por otro lado, existen ejemplos que a primera vista lucen como candidatos para el método. En [75], los autores combinan dos *motifs* sencillos y genéricos para llegar a un sistema capaz de diferentes comportamientos, no obtenidos cuando cada *motif* está aislado. La descripción realizada en el trabajo mediante tres ecuaciones es tal que dos módulos pueden diferenciarse rápidamente, cada uno dependiendo del otro a través de sus variables de acople. Lo mismo puede decirse de los *motifs* en [50], donde los autores disminuyen el nivel de cooperatividad necesario para obtener oscilaciones en ciclos de *feedback* negativos de tres componentes, mediante el agregado de *feedbacks* positivos. De esta manera, argumentamos que nuestro método es de gran valor en biología de sistemas, con enriquecedor análisis y potenciales descubrimientos en biología experimental.

Capítulo 4: *Bursting* en cascadas de señalización celular

Antecedentes

En este último capítulo, analizamos el modelo de Huang-Ferrell para la cascada MAPK de tres niveles [12]. Con los estudios realizados hasta el momento, hemos ganado intuición acerca del comportamiento oscilatorio y biestable emergente en este sistema a partir de los diferentes subsistemas presentes. Sabemos del requerimiento de (por lo menos) un nivel biestable para una respuesta oscilatoria, a partir del trabajo de Qiao [9]. A lo largo de esta Tesis, el análisis de bifurcaciones fue clave para controlar el tipo de comportamiento obtenido, partiendo de la biestabilidad de un nivel y así, llegar a oscilaciones, biestabilidad, y excitabilidad en dos niveles. Ahora, nuestra idea es comenzar de un *output* oscilatorio en la cascada de tres niveles, e inducir una respuesta más compleja.

Se ha encontrado en la literatura que incorporar un ciclo de *feedback* negativo en el modelo de Huang-Ferrell, donde el *feedback* se basa en el output inhibiendo al input, es necesario para recuperar las oscilaciones encontradas en resultados experimentales [83]. Por otro lado, trabajos computacionales han revelado la posibilidad de reverberaciones, vistas como una transición entre estados estacionarios que involucran un tren intermedio de oscilaciones, y obtenidas mediante un prendido o apagado del input [84]. Si el sistema opera dentro de un set oscilatorio de parámetros y el *input* puede cruzar la bifurcación que separa el estado estacionario de los comportamientos periódicos, entonces el *output* podría exhibir dinámica de *bursting*.

Bursting es un fenómeno complejo estudiado ampliamente en neurociencias, que ocurre cuando las variables del sistema exhiben oscilaciones rápidas seguidas de periodos de quiescencia. Este patrón de actividad de alta frecuencia seguido por estados de reposo puede ser sostenido en el tiempo [85], [86]. Si bien este comportamiento es recurrente en modelos de neurociencia, a nuestro entender, no ha sido reportado en cascadas de señalización.

En este capítulo, nuestro objetivo es revelar dinámica de *bursting* en la cascada MAPK de Huang-Ferrell que luego puede ser adjudicada a diferentes funciones biológicas. Además del modelo MAPK, estudiamos una versión modificada del modelo de Goodwin, que consiste en solo tres variables. Este *motif* representa una versión más directa de una cascada de señalización, donde el comportamiento oscilatorio se basa en un ciclo de *feedback* negativo con *delay* (impuesto por la segunda variable) y en ausencia de ciclos de *feedback* positivo, presentes en los módulos de doble fosforilación de la cascada MAPK. Como tal, este sistema de Goodwin expande nuestro análisis de *bursting* en cascadas.

Buscamos explorar los mecanismos detrás de *bursting* en sistemas de señalización, involucrando ingredientes como delay inducido por pasos intermedios, feedback positivos, múltiples feedbacks negativos, y la coexistencia entre estados estacionarios y ciclos límite estables. Si bien todos estos componentes y comportamientos son comunes en señalización, mostramos cómo pueden ser combinados y explotados para lograr nuevos y complejos outputs periódicos.

En primer lugar, presentamos los resultados para los dos modelos estudiados. Incorporamos un ciclo de feedback negativo explícito en la cascada MAPK, y mostramos cómo controlar el comportamiento de *bursting* alrededor de bifurcaciones de Hopf subcríticas. Para el modelo de Goodwin, hacemos lo mismo, donde el ciclo de feedback negativo añadido es el segundo ciclo explícito (el primero, el original responsable de las oscilaciones). Luego, expandimos el análisis para los dos sistemas, induciendo *bursting* alrededor de bifurcaciones de Hopf supercríticas mediante la modificación del ciclo de feedback añadido. Finalmente, examinamos el comportamiento del caso de Goodwin al aplicar estimulación periódica.

Resultados

Un ciclo de feedback negativo del output al input induce dinámica de bursting en la cascada MAPK alrededor de bifurcaciones de Hopf subcríticas

Comenzamos nuestro análisis del modelo de Huang-Ferrell de la cascada MAPK usando un set de parámetros de Mitra et al. [84] (ver Fig. 4.1a para un esquema del modelo -excluyendo la línea gris y punteada- y Métodos para el sistema de ecuaciones y valores de parámetros). Este set se encuentra dentro de los rangos dados por Huang y Ferrell, los cuales también son considerados en los estudios de Mitra et al. y Qiao et al. Por conveniencia, solo cambiamos el valor de un parámetro: la cantidad total de sustrato en el segundo nivel. De esta manera, obtenemos dos bifurcaciones de Hopf subcríticas, como se muestra en el diagrama de bifurcaciones unidimensional de la Fig. 4.1b, con la cantidad total de *input* S_t como parámetro de control (la suma de S libre y el complejo intermedio con la quinasa del primer nivel), y la quinasa doblemente fosforilada K_{pp} en el tercer nivel como *output*. La idea es tener un diagrama de bifurcaciones relativamente directo que muestre coexistencia entre ciclos límite estables y estados estacionarios estables.

En este punto del análisis, agregamos un ciclo de *feedback* negativo en el modelo al permitir que el *output* de la cascada K_{pp} inhiba su *input* (ver Fig. 4.1a, con la inhibición representada por la línea gris y punteada). La correspondiente ecuación diferencial resulta:

$$[\dot{S}_t] = S_{rate} - neg_{feed}[K_{pp}][S_t]$$

S_{rate} es un parámetro positivo. Es decir, pasamos de un modelo con una quinasa *input* total constante (el típico modelo de MAPK) a uno donde la quinasa total varía, con una tasa de producción constante y una tasa de degradación dependiente del *output* de la cascada. La tasa negativa es proporcional a 1) el parámetro neg_{feed} , 2) el output K_{pp} (la inhibición que cierra el ciclo negativo), y 3) la concentración de *input* (auto-regulación, mantiene positivo el valor de concentración). Vale la pena destacar que, con este ciclo de *feedback* negativo añadido, ya no tenemos una conservación para S . Usamos el nombre " S_t " como abreviación de " S_{tot} " tanto como una forma de recordar la estructura original del input, y para indicar su nueva dependencia del tiempo.

Desde aquí, aprovechamos el diagrama de bifurcaciones subyacente para la cascada MAPK sin el ciclo agregado y permitimos que el *input* viaje una y otra vez alrededor de las bifurcaciones de Hopf subcríticas. Los únicos parámetros que manipulamos son S_{rate} y neg_{feed} . Nuestro punto de partida para sus valores fue alcanzado luego de diferentes simulaciones, observando la serie temporal para el *input* hasta ubicarse en las cercanías de las bifurcaciones.

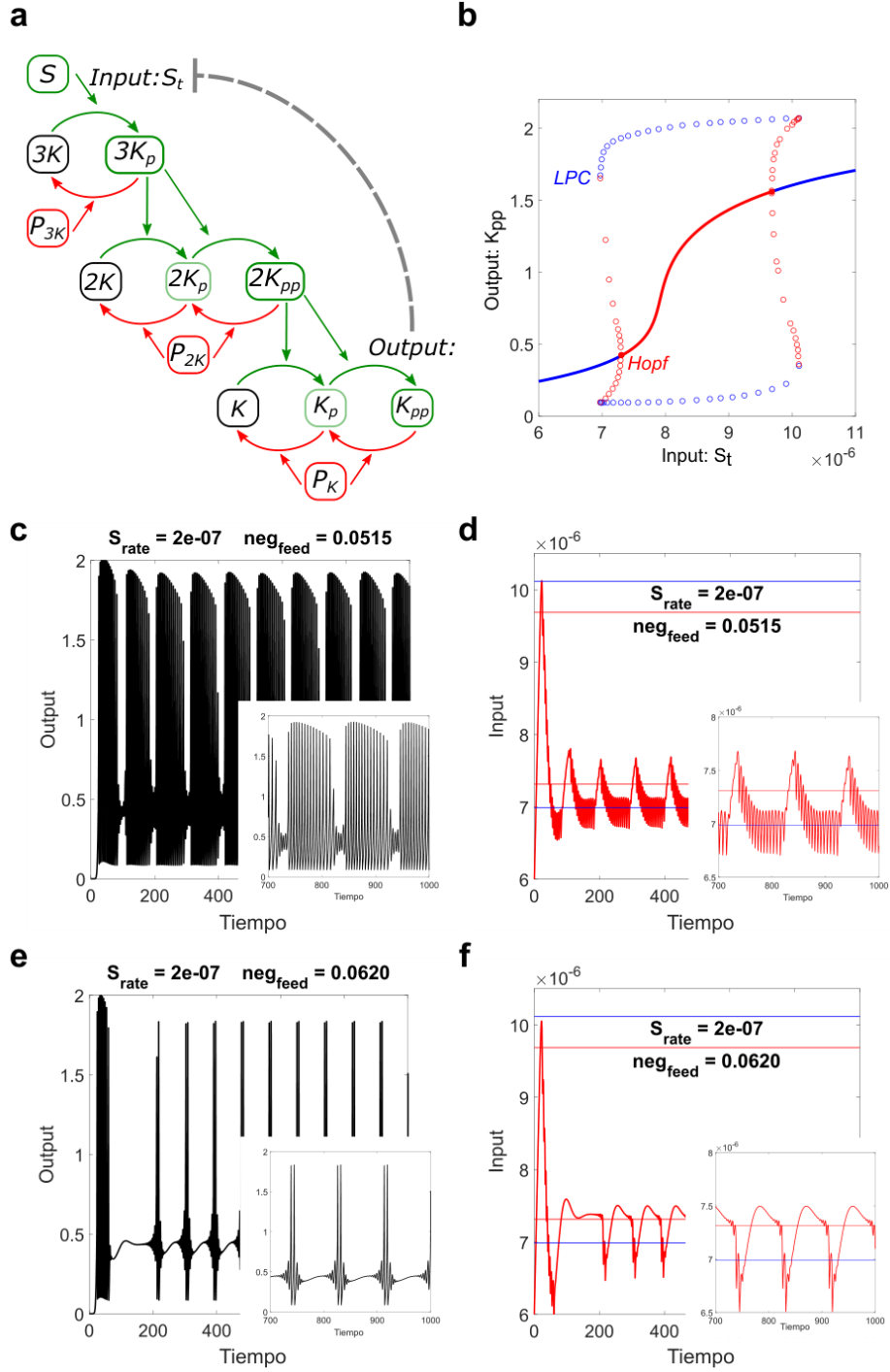


Figura 4.1: Bursting sostenido en la cascada MAPK alrededor de bifurcaciones de Hopf subcríticas. **a:** Esquema del modelo Huang-Ferrell para la cascada MAPK. El input corresponde a la cantidad total de S , S_t , que es la suma del estado libre de S y el complejo intermedio con $3K$. El output es la quinasa doblemente fosforilada del tercer nivel, K_{pp} . El ciclo de feedback negativo añadido es representado por la línea gris y punteada. **b:** Diagrama de bifurcaciones unidimensional para el modelo (sin el ciclo añadido), usando el input S_t como el parámetro de control, para un set de parámetros tomado de Mitra et al. Dos bifurcaciones de Hopf subcríticas emergen, con las correspondientes bifurcaciones Limit Point Cycle (LPC), estableciendo dos intervalos de coexistencia entre un estado estacionario estable (línea azul) y un ciclo límite estable (máximos y mínimos en círculos azules). Estados estacionarios inestables en la línea roja, máximos y mínimos en ciclos límites inestables en círculos rojos. **c, d:** Bursting sostenido en el output, obtenido para un par de parámetros en la ecuación de input, y la correspondiente serie

temporal para el input, la cual cruza la bifurcación de Hopf (línea roja horizontal) y LPC (línea azul). *e*, *f*: Bursting sostenido en el output luego de incrementar el parámetro de feedback negativo, y la correspondiente serie temporal para el input, mostrando un cambio significativo en el número de picos por burst y duración de la fase silenciosa. Output e input en μM , tiempo en minutos.

Presentamos resultados para la bifurcación de la izquierda, manteniendo la tasa positiva fija y comparando diferentes casos para neg_{feed} . Para el menor valor de dicho parámetro (Fig. 4.1c, d), el output presenta *bursts* de 15 picos cada uno y una fase silenciosa relativamente corta con oscilaciones de menor amplitud. El input oscila alrededor de las bifurcaciones y refleja lo que sucede con el output. Durante la fase de *bursting* del output, el input desciende lentamente en promedio, mientras que, durante la fase silenciosa, el input crece rápidamente. Esto ocurre porque, una vez que el input cruza la bifurcación de Hopf (línea roja en la Fig. 4.1d), induce oscilaciones de gran amplitud en la quinasa output. Como consecuencia, la quinasa input es sometida a inhibición pulsátil y comienza a bajar, con cada pico del output reforzando dicha inhibición. Estos son los picos del input que vemos en la figura. A medida que los picos de output se “apagan” y la cascada entra en la fase silenciosa, la quinasa input ya no se encuentra inhibida y puede volver a crecer. Esos pequeños picos de output se reflejan en el ascenso brusco del input.

Aquí, observamos la ventaja de la coexistencia entre el estado estacionario estable y los ciclos límites estables. Cuando el input entra desde la izquierda en el diagrama de bifurcaciones (desde abajo en la serie temporal), el output permanece relativamente restringido, exhibiendo oscilaciones amortiguadas características de la región ubicada a la izquierda de la bifurcación de Hopf. El input aumenta aun después de cruzar la bifurcación, debido al *delay* inherente a la cascada de tres niveles. En cambio, con el output activado y el input moviéndose desde la derecha en el diagrama de bifurcaciones (desde arriba en la serie temporal), las oscilaciones de output persisten aun luego de cruzar la bifurcación *Limit Point Cycle* (LPC). Dependiendo de si el input cruza de izquierda a derecha o viceversa, el sistema exhibe oscilaciones pequeñas y amortiguadas o grandes y sostenidas. Esta coexistencia, combinada con el *delay* en la transmisión de la señal de input a output, facilita la emergencia de dinámica de *bursting*.

Si ahora aumentamos neg_{feed} (Fig. 4.1e, f), el número de picos por *burst* desciende. Como el sistema entra la región oscilatoria desde la izquierda, un *feedback* negativo más fuerte sacará al sistema de esa región, lo que lleva a una fase silenciosa más larga and menor cantidad de picos en cada *burst* de output. En el Apéndice, mostramos como fijando neg_{feed} y subiendo S_{rate} se obtiene el resultado opuesto (ver Fig. S4.1). También, presentamos resultados para la bifurcación de la derecha, donde el efecto de cambiar los parámetros del input se invierte, consistente con entrar a la región oscilatoria por la derecha (ver Fig. S4.2).

Un set de parámetros balanceado sostiene el bursting mientras modula la frecuencia

Hasta ahora, los valores de parámetros para las dos constantes de velocidad en la ecuación del input fueron elegidos para producir *bursting* dentro de un rango razonable, usando sets de parámetros de referencia. Mitra et al. usaron $10^{-6} \mu\text{M}$ para S_i . Con nuestra elección para la cantidad total de sustrato en el segundo nivel, el rango oscilatorio para el input se mueve a la derecha respecto del original. Sigue siendo del mismo orden de magnitud para la bifurcación de la izquierda, y es de aproximadamente $10^{-5} \mu\text{M}$ para la de la derecha.

La pregunta clave es cuánto se pueden ajustar los dos nuevos parámetros y preservar el *bursting* en el *output*. Nuestros resultados sugieren que se debe mantener un cierto balance. Enfocándonos en la bifurcación de la izquierda, un incremento en neg_{feed} reducirá el número de picos en cada *burst*, mientras que fijando neg_{feed} y aumentando S_{rate} , aumentará ese número. Si un parámetro permanece fijo mientras que el otro excede un umbral crítico, el *bursting* desaparecerá, ya sea conduciendo a oscilaciones sostenidas (sin fase silenciosa) o alcanzando un estado estacionario.

En la Fig. 4.2, mostramos tres casos de *bursting* alrededor de la bifurcación de la derecha, donde ambos valores de parámetros aumentan progresivamente del primer panel al último. Mientras que el número de picos en cada *burst* es similar para los tres casos, la frecuencia general del *bursting* cambia significativamente: mayores valores de parámetros llevan a mayores frecuencias. Esto se puede entender considerando cómo evoluciona el *input* en el tiempo: constantes de velocidad mayores resultan en una dinámica más rápida. Cuando la producción y la inhibición permanecen balanceadas, el sistema puede repetidamente entrar y salir de la región oscilatoria. En el Apéndice, presentamos resultados similares para la bifurcación de la izquierda (ver Fig. S4.3).

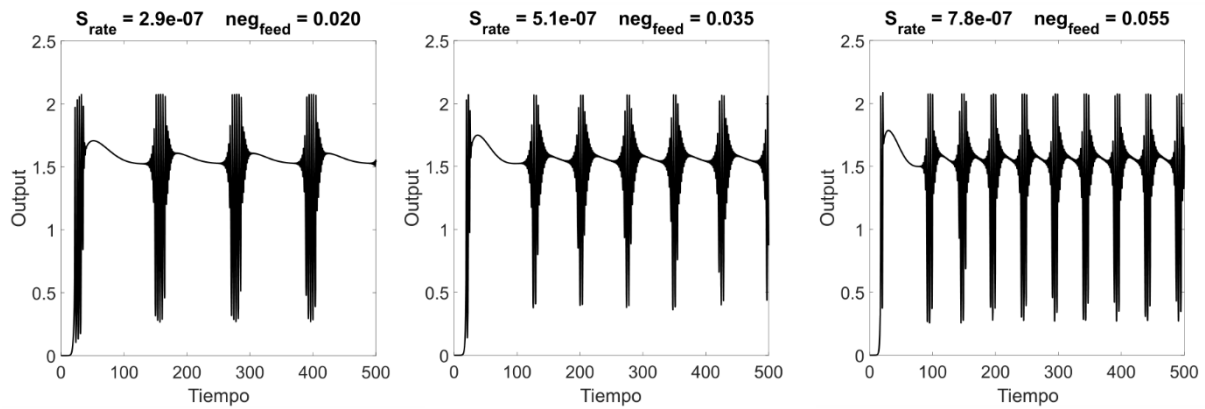


Figura 4.2: Balance en los valores de parámetros mantiene el output en *bursting* y cambia la frecuencia del comportamiento. De izquierda a derecha, los valores de parámetros en la ecuación del input crecen, y también aumenta la frecuencia. Output e input en μM , tiempo en minutos.

Hasta aquí, hemos mostrado que una simple ecuación diferencial para el *input*, incorporando un ciclo de *feedback* negativo de *output* a *input*, puede llevar a la cascada MAPK a producir *bursting*. Este abordaje nos permite controlar el número de picos por *burst*, la frecuencia de *bursting*, y la bifurcación alrededor de la cual el *bursting* ocurre. Ahora buscamos aplicar este marco en otra cascada, considerando que la sola presencia de bifurcaciones de Hopf subcríticas puede servir como base para generar *bursting*.

Un modelo de Goodwin modificado provee información sobre *bursting* en cascadas

Ahora analizamos un segundo modelo de cascada, una versión modificada del conocido sistema de Goodwin [18]. Nuestro objetivo es extender los resultados obtenidos para el modelo MAPK a un *motif* diferente, capaz de representar otros sistemas de cascada, y al mismo tiempo analizar si los nuevos resultados pueden revelar otros hallazgos en el caso MAPK. La relativa simplicidad del modelo de

Goodwin -no hay ningún ciclo de *feedback* positivo, solo un ciclo negativo- sirve como un valioso contrapunto a la complejidad emergente de la interacción entre ciclos de simple y doble fosforilación. Demostrar *bursting* en ambos casos fortalece el argumento de que nuestro abordaje para generar *bursting* en señalización no está limitado a un modelo específico.

Adoptamos el modelo de Bliss, Painter y Marr [87], el cual consiste en tres ecuaciones, con la tasa de degradación para el *output* expresada como una función de Michaelis-Menten (ver esquema en la Fig. 4.3a -excluyendo la línea gris y punteada-). El sistema de ecuaciones es el siguiente:

$$\dot{x}_1 = \frac{a}{(1 + x_3)} - b_1 x_1$$

$$\dot{x}_2 = b_1 x_1 - b_2 x_2$$

$$\dot{x}_3 = b_2 x_2 - \frac{c x_3}{(K + x_3)}$$

Esta simple modificación a la degradación lineal original elimina la necesidad de un coeficiente de Hill mayor que 1 en el paso de *feedback* del primer nivel de la cascada, o la inclusión de múltiples variables intermedias. Como resultado, nuestro análisis puede comenzar con solo tres ecuaciones, una para cada nivel.

Empezamos con un diagrama de bifurcaciones bidimensional (Fig. 4.3b), usando los valores de parámetros de Tyson en [38], pero estableciendo $b_1 = b_2 = 0.01$ (menor que el valor original de Tyson de 0.2). Estos valores fueron elegidos basados en múltiples simulaciones, guiados por el razonamiento de que menores valores para estos parámetros aumentan el *delay* del primer nivel al último, lo que facilita la detección de oscilaciones.

Seleccionamos a y c como los parámetros para el diagrama de bifurcación, donde a representa el *input* y c la tasa de degradación del *output*. Una bifurcación Generalizada de Hopf (GH) fue identificada en $c = 16$, con una Hopf subcrítica ocurriendo para cada valor mayor y una supercrítica para cada valor menor. La región oscilatoria se encuentra a la derecha de la curva de Hopf (y arriba de la misma para valores bajos de c). Comenzamos nuestro análisis con $c = 20$, lo que da una bifurcación de Hopf subcrítica, y la asociada coexistencia de un ciclo límite estable y un estado estacionario estable.

Presentamos el diagrama de bifurcaciones unidimensional para $c = 20$, con la evidente coexistencia de estados (Fig. 4.3c). La amplitud de los ciclos límites estables para el *output* x_3 aumenta significativamente para valores crecientes del *input*. Como antes, introducimos una ecuación diferencial para el *input*, con la misma forma que en el caso MAPK, y parámetros llamados d_1 y d_2 (equivalentes a S_{rate} y neg_{feed}):

$$\dot{a} = d_1 - d_2 x_3 a$$

Luego de diferentes intentos, identificamos valores de parámetros que dan lugar a *bursting*. Comparamos resultados para dos valores de la tasa de producción d_1 , dejando la tasa negativa d_2 fija. En el primer caso (Fig. 4.3d, e), no hay una fase silenciosa completa entre los *bursts*, el periodo de quiescencia (relativa) es mínimo, y las oscilaciones exhiben amplitudes significativamente diferentes, como es de esperar de la estructura de bifurcaciones subyacente.

Una examinación en más detalle de la serie temporal del *input* revela que la concentración aumenta suavemente, y continúa su ascenso aun luego de superar la bifurcación de Hopf subcrítica. Una vez que el *delay* de *input* a *output* es superado, el *output* se enciende (mayor amplitud) y el *input* comienza a decrecer debido al *feedback* negativo añadido. Aquí, el *input* muestra un descenso “en pasos”, al

reflejar los picos de *output*. El sistema continúa oscilando aún luego de cruzar la bifurcación LPC, nuevamente por el *delay* de *input* a *output*. Luego de que el *output* alcanza un nivel bajo, el *input* aumenta, repitiendo el ciclo. A diferencia de la cascada MAPK, en este sistema los *bursts* son simétricos, debido al movimiento creciente del *input* que produce amplitudes de *output* mayores, y nuevamente a amplitudes bajas cuando decrece.

Reduciendo la tasa de producción del *input*, una verdadera fase silenciosa aparece (Fig. 4.3f, g). Una tasa de producción reducida se traduce en un aumento más lento del *input* y una entrada más lenta a la región oscilatoria, lo que resulta en una fase silenciosa marcadamente larga. El *input* logra una amplitud mayor, llevando a un patrón de *bursting* bien definido. En el Apéndice, presentamos una comparación para diferentes valores de d_2 , mostrando resultados consistentes: aumentando d_2 alarga la fase silenciosa, similar al efecto de reducir d_1 (ver Fig. S4.4).

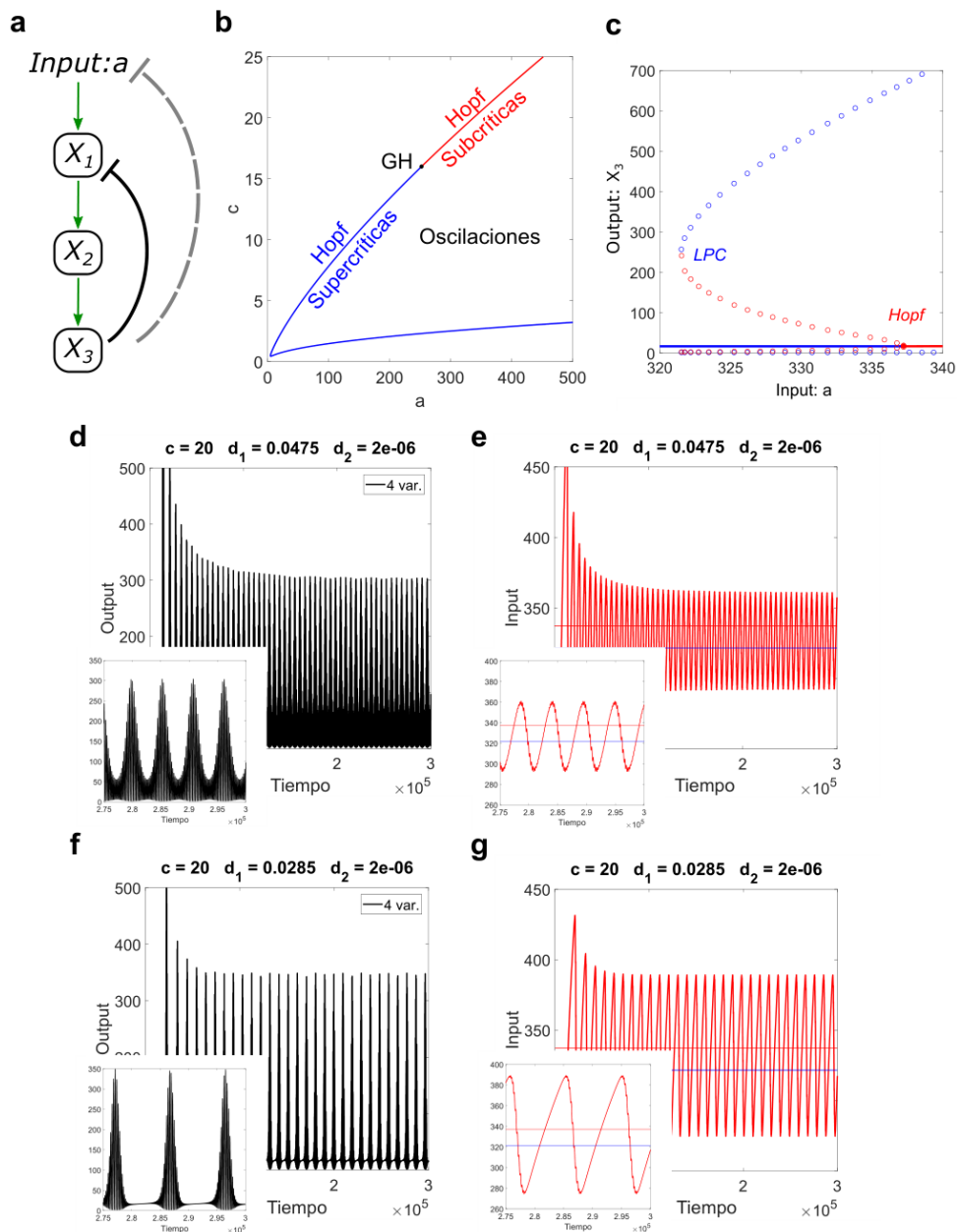


Figura 4.3: Bursting en una versión modificada de la cascada Goodwin. **a**: Esquema del modelo, con el parámetro de input a , y output x_3 . Un simple ciclo de feedback negativo (línea negra) junto con la

variable intermedia x_2 como delay logran el comportamiento oscilatorio. El ciclo de feedback negativo añadido está representado por la línea gris y punteada. **b**: Diagrama de bifurcaciones bidimensional (sin añadir el segundo ciclo) para los parámetros c y a , donde emerge un región oscilatoria. Dependiendo del valor para c , la bifurcación al mover a puede ser una Hopf supercrítica o subcrítica. **c**: Diagrama de bifurcaciones unidimensional para el modelo (sin añadir el segundo ciclo) para $c = 20$, usando el input a . En azul, los estados estables, y en rojo, los inestables (líneas para estados estacionarios, círculos para máximos y mínimos de los ciclos límite). Coexistencia entre estados estables a partir de la bifurcación de Hopf subcrítica. **d, e**: Bursting sostenido en el output, obtenido para un par de valores de los parámetros en la ecuación del input, y la correspondiente serie temporal para el input, que cual cruza la bifurcación de Hopf (línea roja horizontal) y LPC (línea azul). **f, g**: Bursting sostenido en el output luego de disminuir la tasa de producción del input, y la correspondiente serie temporal para el input, mostrando un cambio significativo en el número de picos por burst y duración de la fase silenciosa.

Retraso temporal adicional de output a input en cascadas induce bursting previamente ausente

En el diagrama de bifurcaciones bidimensional del modelo modificado de Goodwin (previo a la adición del segundo ciclo negativo), identificamos un significativo rango para el parámetro c donde la bifurcación es una supercrítica de Hopf. Esto lleva a la pregunta: ¿es posible generar *bursting* alrededor de una bifurcación de Hopf supercrítica, en ausencia de *feedback* positivo y sin coexistencia entre estado estacionario y ciclo límite? Hay casos en la literatura donde se desarrolla *bursting* cuando el sistema en cuestión cruza una bifurcación supercrítica de Hopf, pero hay *feedbacks* positivos involucrados [88]. Incluso la cascada MAPK que analizamos incluye *feedbacks* positivos implícitos a través de sus ciclos de doble fosforilación, como hemos mencionado [5].

Buscamos evaluar un caso en el sistema modificado de Goodwin con una bifurcación de Hopf supercrítica, sin la coexistencia entre estados estables. Para algunos valores de c por debajo de la bifurcación GH el sistema exhibió, además de la Hopf supercrítica, dos bifurcaciones LPC, llevando a una coexistencia entre ciclos límites estables. Para $c = 12.5$, obtuvimos un diagrama de bifurcación más directo (Fig. 4.4a), sin coexistencia. Notablemente, el aumento de la amplitud tiene una transición relativamente abrupta cerca de la bifurcación supercrítica de Hopf.

Múltiples simulaciones del sistema que analizamos, incluyendo las tres variables originales más un *input* autónomo, no condujeron a *bursting* sostenido para $c = 12.5$. La ausencia de coexistencia entre un estado estacionario y un ciclo límite debe ser compensada. En el sistema sin la ecuación adicional para el *input*, el *delay* de *input* a *output* jugó un rol clave en la generación de oscilaciones. Luego de incorporar el *input* autónomo, este *delay* se volvió esencial para la emergencia de *bursting* y la clara distinción entre sus dos fases. Una manera de inducir *bursting* en el sistema en estos valores de parámetros es incrementando el *delay* de *output* a *input*.

En la Fig. 4.4b, presentamos el esquema para el *motif* de Goodwin modificado, el cual incluye dos variables adicionales después del *output*, con la última variable inhibiendo el *input* a . Esta extensión aumenta el *delay* en el ciclo de *feedback* negativo que introducimos al modelo. Las ecuaciones correspondientes son:

$$\dot{a} = d_1 - d_2 x_5 a$$

$$\dot{x}_1 = \frac{a}{(1 + x_3)} - b_1 x_1$$

$$\dot{x}_2 = b_1 x_1 - b_2 x_2$$

$$\dot{x}_3 = b_2 x_2 - \frac{c_3 x_3}{(K_3 + x_3)}$$

$$\dot{x}_4 = b_3 x_3 - b_4 x_4$$

$$\dot{x}_5 = b_4 x_4 - \frac{c_5 x_5}{(K_5 + x_5)}$$

Obtener un *output* con *bursting* requirió extensas simulaciones. El parámetro d_2 es significativamente mayor que antes, para compensar la extensión del ciclo de *feedback*. Además, los parámetros nuevos, b_3 y b_4 , son menores que b_1 y b_2 , facilitando la introducción de *delay*. En la Fig. 4.4c, d, presentamos resultados para un set específico de parámetros en $c = 12.5$. El comportamiento de *bursting* es claramente visible, con una forma simétrica y una fase silenciosa bien definida. La Fig. 4.4d muestra que la serie temporal del *input* oscila alrededor del umbral asociado a la bifurcación supercrítica de Hopf.

Construyendo sobre este enfoque, aplicamos la misma idea a la cascada MAPK, usando un set de parámetros que muestra exclusivamente bifurcaciones de Hopf supercríticas (Fig. 4.4e). En este caso, añadimos una variable extra, x_{inter} (intermedia entre *output* e *input*) donde la ecuación diferencial sigue de Goodwin (ver Fig. 4.4f para un esquema simplificado):

$$[\dot{x}_{inter}] = b_1 [K_{pp}] - b_2 [x_{inter}]$$

La producción de x_{inter} depende del output K_{pp} y tiene su propia tasa de degradación. Luego de esta variable, el ciclo de *feedback* negativo se cierra con la inhibición del *input*:

$$[\dot{S}_t] = S_{rate} - neg_{feed}[x_{inter}][S_t]$$

En la Fig. 4.4f, g, presentamos los resultados para un caso donde el *input* oscila alrededor de la bifurcación de Hopf ubicada a la izquierda. Usando los mismos valores para S_{rate} and neg_{feed} sin la variable adicional resultó en *output* sin *bursting*.

Si bien es posible que, en ambos modelos sin las variables extra (respectivamente, x_4 y x_5 para el caso Goodwin, x_{inter} para la cascada MAPK) ciertas combinaciones de parámetros pueden inducir *bursting*, nuestras simulaciones demuestran que introduciendo este *delay* adicional en el ciclo de *feedback* negativo entre *output* e *input* permite la emergencia de *bursting* donde previamente estaba ausente.

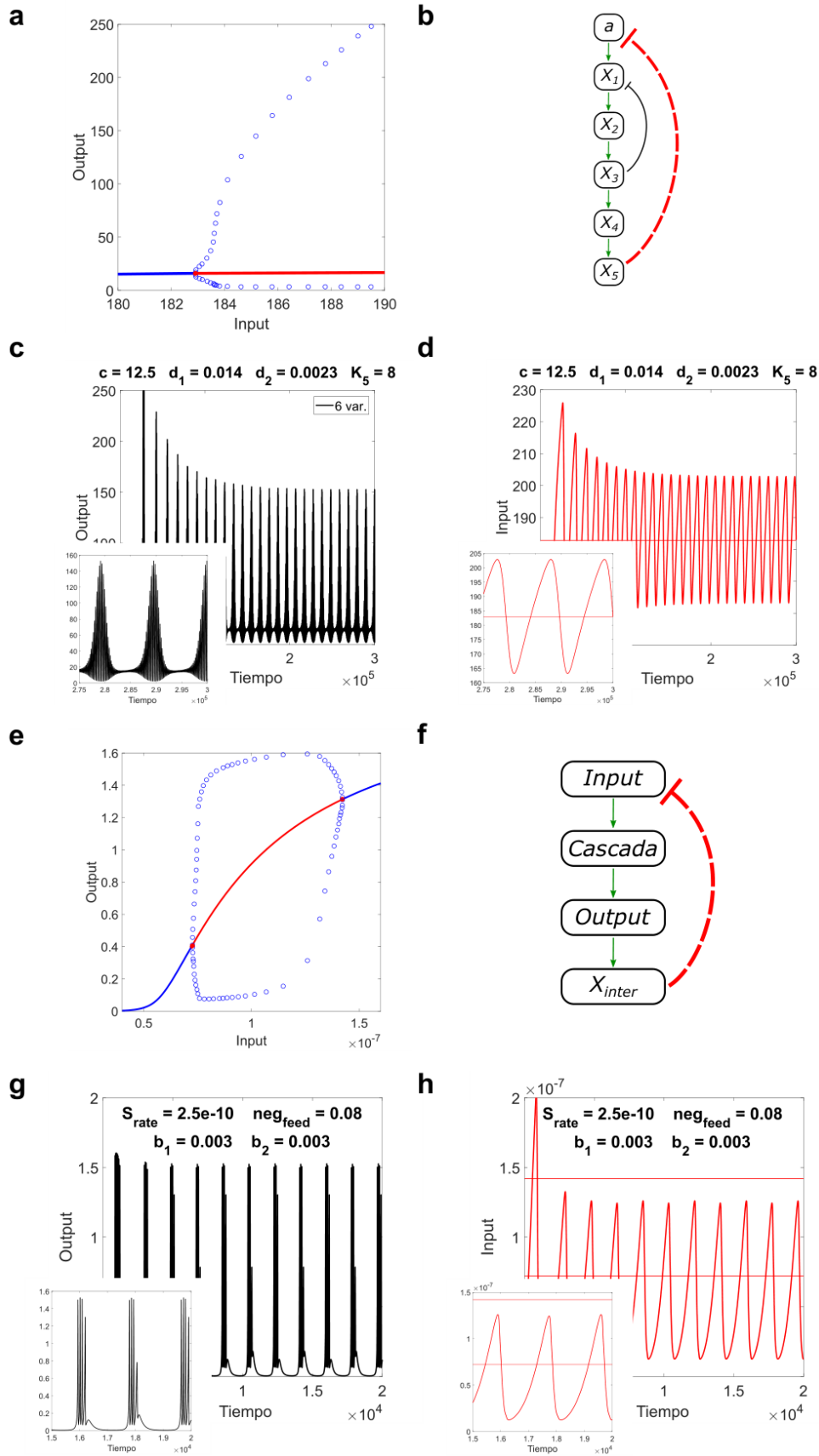


Figura 4.4: Extensión del ciclo de feedback negativo añadido a través del agregado de variables. **a**: Diagrama de bifurcaciones unidimensional para el modelo de Goodwin modificado (sin el segundo ciclo negativo) para $c = 12.5$, usando el input a . En azul, los estados estables, y en rojo, los inestables (líneas

para estados estacionarios, círculos para máximos y mínimos de los ciclos límite). Bifurcación de Hopf supercrítica, sin coexistencia. **b**: Esquema del modelo de Goodwin modificado, luego de agregar dos variables (x_4 y x_5), introduciendo delay en el segundo ciclo negativo. **c, d**: Bursting sostenido en el output, obtenido para un par de valores de parámetros en la ecuación del input, $K_5 = 8$, y la correspondiente serie temporal para el input, que cruza la bifurcación de Hopf (línea roja horizontal). **e**: Diagrama de bifurcaciones unidimensional para el modelo MAPK, usando el input S_t , para un set de parámetros tomado de Qiao et al. (2007). En azul, los estados estables, y en rojo, los inestables (líneas para estados estacionarios, círculos para máximos y mínimos de los ciclos límite). Bifurcación de Hopf supercrítica, sin coexistencia. **f**: Esquema del modelo de MAPK luego de añadir una variable (x_{inter}), introduciendo delay al ciclo negativo añadido. Representación resumida a través del nivel "Cascada". **g, h**: Bursting sostenido en el output, obtenido para un par de valores de parámetros en la ecuación del input, $b_1 = b_2 = 0.003$, y la correspondiente serie temporal para el input, que cruza la bifurcación de Hopf (línea roja horizontal). En el modelo MAPK, output e input en μM , tiempo en minutos.

Estimulación periódica lleva a resonancia no-lineal, transformando bursting amortiguado en bursting sostenido

Examinando el modelo de Goodwin antes de introducir el *delay* adicional en el ciclo de *feedback*, observamos que cambios en los parámetros de *input* tienen un claro impacto en el comportamiento de *bursting*. Una tasa de producción menor incrementa la fase silenciosa, llevando a una clara separación entre los *bursts* (ver Fig. 4.3, comparando los paneles d y f). Para que el sistema exhiba *bursting*, ambos parámetros deben estar apropiadamente balanceados, similar a lo encontrado en la cascada MAPK. Manteniendo una tasa de degradación constante como antes, y aumentando la tasa de producción, resulta en oscilaciones sostenidas en lugar de *bursting* (Fig. 4.5a, b). Sin embargo, la parte transitoria de la serie temporal indica que el sistema permanece cerca del régimen de *bursting* en el espacio de parámetros, al observar oscilaciones de gran amplitud en el *input* antes de estacionarse en valores de amplitud mucho menores. Durante este intervalo temporal, el *output* muestra *bursting* transitorio, con fases silenciosas que gradualmente desaparecen. Así como un sistema puede tener oscilaciones amortiguadas en las cercanías de una bifurcación de una región oscilatoria, esta versión del modelo de Goodwin puede presentar *bursting* amortiguado.

No hemos podido encontrar perfiles similares en la cascada MAPK, con algunos resultados incluidos en el Apéndice (ver Fig. S4.5). Esto puede deberse a diferencias en la estructura de bifurcaciones subyacente, ya que la amplitud del *output* en el sistema de Goodwin es significativamente sensible al *input*, haciendo más probable que ocurran variaciones transitorias amplias.

Ahora, estos resultados en el caso de Goodwin provienen de un set de parámetros donde sabemos que, al cambiar un valor, obtendremos *bursting* sostenido. Esto introduce la pregunta: ¿puede el sistema todavía exhibir *bursting* a través de un mecanismo distinto? Previamente, introdujimos variables adicionales con el fin de incrementar el *delay* en el ciclo negativo. Otra abordaje es aplicar una estimulación periódica externa al *input*, forzándolo a oscilar con una amplitud mayor, llevando así al sistema a un régimen de *bursting* sostenido.

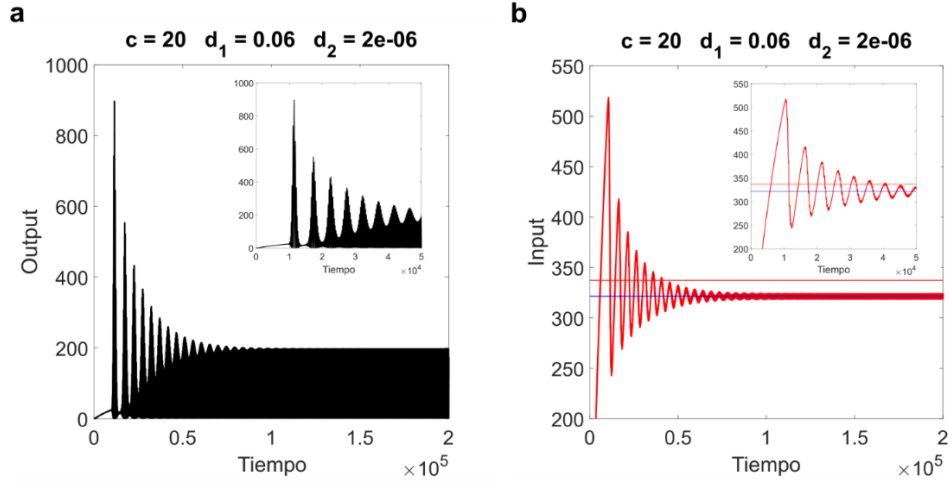


Figura 4.5: Bursting amortiguado en el modelo modificado de Goodwin. **a**: Serie temporal para el output cuando el parámetro d_1 es aumentado respecto del valor en la Fig. 4.3. Luego de una fase transitoria, el sistema se estaciona en oscilaciones regulares. **b**: Serie temporal correspondiente para el input, con oscilaciones amortiguadas hasta terminar en oscilaciones de amplitud pequeña alrededor de la bifurcación LPC (línea azul horizontal).

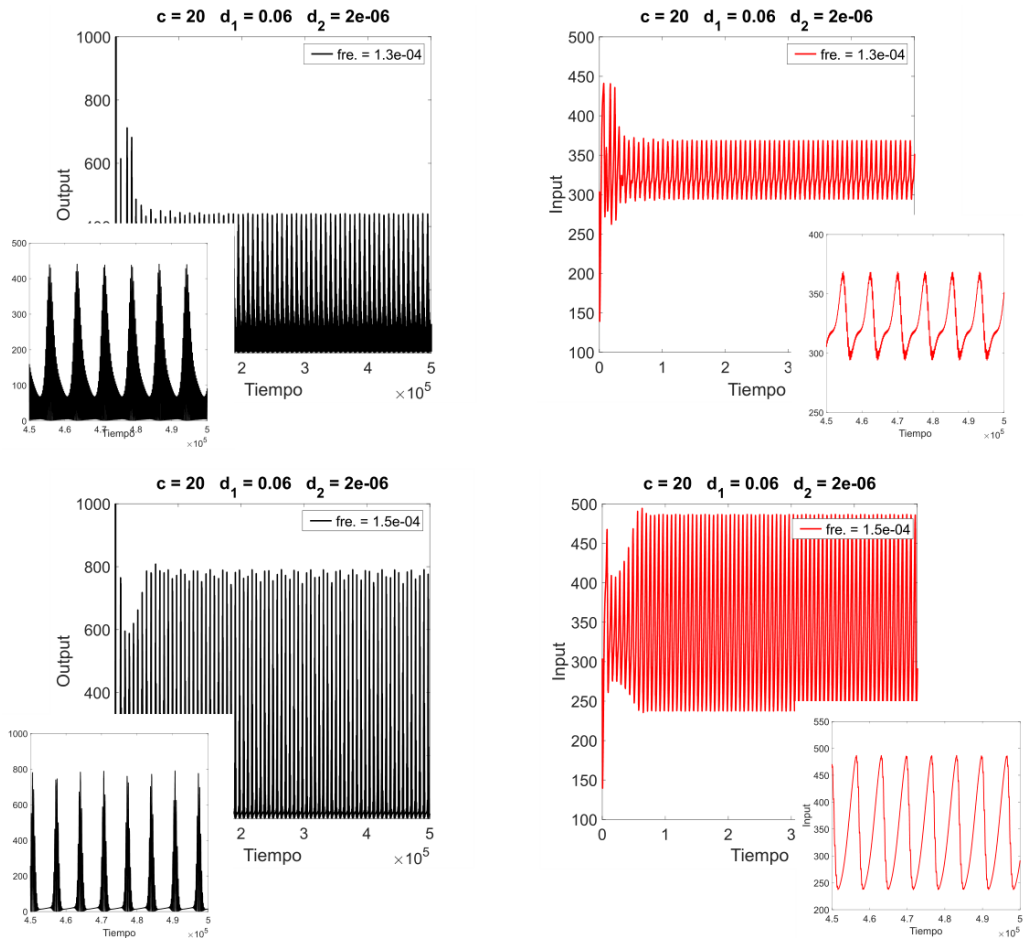


Figura 4.6: Dos ejemplos de bursting a través de la estimulación periódica del input, para diferentes frecuencias forzadas. Significativas diferencias tanto en la duración de la fase silenciosa como en el máximo valor de output. Las correspondientes series temporales para el input muestran diferentes amplitudes, consistentes con los valores de output: menor amplitud en el input, output más restringido.

Introducimos un término forzado a la tasa positiva del *input*, con su amplitud A y frecuencia f como los dos nuevos parámetros. Estableciendo la amplitud en cero recupera la versión original de la ecuación diferencial:

$$\dot{a} = d_1[1 + A \sin(2\pi f t)] - d_2 x_3 a$$

Para nuestras simulaciones, seleccionamos una amplitud forzada que condujo a oscilaciones alrededor de la bifurcación ($A = 0.5$), y luego exploramos múltiples frecuencias forzadas. En la Fig. 4.6, presentamos ejemplos de series temporales para dos frecuencias, donde ambas exhiben *bursting* sostenido. La amplitud y la duración de la fase silenciosa varían significativamente entre ambos casos.

Luego, realizamos un barrido de frecuencias, midiendo el máximo valor de *output* para cada caso para entender como el *input* forzado influencia el sistema.

Para la primera simulación del barrido de frecuencia, elegimos una condición inicial de 0 para las tres variables (x_1, x_2, x_3), y un valor de *input* cercano a la bifurcación de Hopf ($a = 300$). Medimos el máximo valor de *output* para el último tercio de la serie temporal, para descartar cualquier parte transitoria. Para las siguientes frecuencias, con valores en aumento (barrido *going up*), la condición inicial fue tomada de la simulación inmediatamente previa, como se explicará en breve. Una vez alcanzado el final del rango de frecuencias, repetimos el barrido hacia el valor más bajo de la secuencia (barrido *coming down*), nuevamente usando como condición inicial un punto de la simulación anterior. Es decir, recorrimos cada frecuencia y medimos dos valores máximos de *output*. Dependiendo de cómo ejecutamos estos barridos, esos dos valores máximos pueden ser iguales o no.

Inicialmente, seleccionamos el último punto de cada serie temporal como la condición inicial para la siguiente frecuencia en el barrido. Sin embargo, este método llevó a una “mezcla” de dos ramas dentro de un rango específico de frecuencias. Por lo tanto, decidimos también usar otros dos métodos de continuación: tomar el último máximo de la serie temporal del *input*, y el último mínimo de dicha serie (junto con los correspondientes valores para las tres variables x). Los resultados, presentados en la Fig. 4.7, muestran la diferencia entre las tres elecciones de condición inicial.

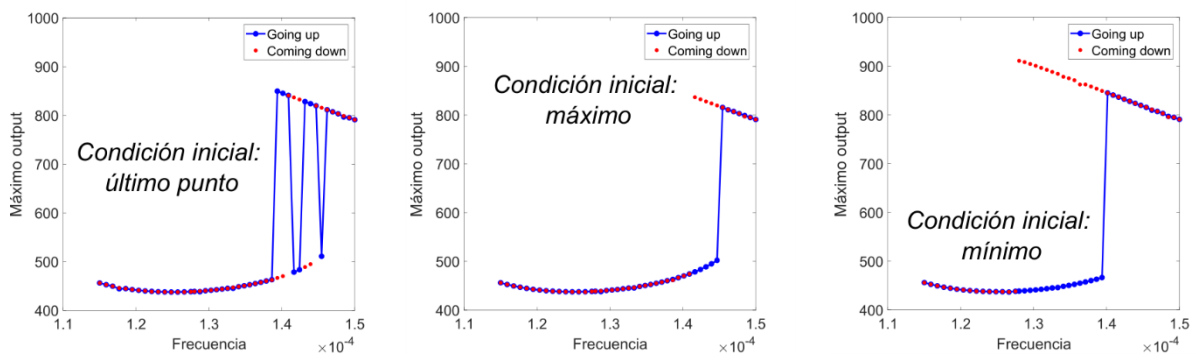


Figura 4.7: Resonancia no-lineal y dependencia en la condición inicial para el máximo valor de output cuando ejecutando un escaneo de la frecuencia forzada. Resultados mixtos cuando se toma el último punto de la serie anterior como condición inicial, y ciclos de histéresis al seleccionar un criterio específico (máximo, mínimo de input).

Para los tres casos, ocurre un fenómeno de histéresis, resultando en curvas superpuestas de los dos barridos. Consecuentemente, el máximo valor para el *output* depende de la condición inicial. Según lo

que sabemos, este comportamiento es nuevo, con similitudes al fenómeno de resonancia no lineal en osciladores forzados [89].

A diferencia de lo encontrado en curvas biestables de estados estacionarios, por ejemplo, donde para cada valor de *input* hay una clara elección de condición inicial (el estado estacionario previo), el sistema que analizamos aquí no solo oscila, también lo hace en *bursts*. Como tal, el último punto en cada serie temporal dada depende de qué tan extensa sea dicha serie. Diferentes ventanas temporales cambiarán la forma de las curvas máximo vs. frecuencia cuando se elija el último punto como condición inicial para la siguiente frecuencia. Es decir, los resultados “mezclados” de la Fig. 4.7 dependerán de la ventana temporal de las simulaciones.

Como contraste, tomando el último máximo o mínimo del *input* actúa como una condición inicial bien definida, que conduce a resultados reproducibles. Los ciclos de histéresis obtenidos para estos dos barridos son marcadamente distintos, no solo en su ancho sino también en su barrido *going up*. Comenzando de la frecuencia más baja, para la condición inicial con el máximo de *input*, la rama inferior del gráfico se extiende más allá de 1.4×10^{-4} . Para la condición con el mínimo de *input*, la rama inferior es más corta. Lo opuesto ocurre para la rama superior, al realizar el barrido *coming down*.

Discusión

En este capítulo, estudiamos dos conocidos modelos de cascadas de señalización, de diferente complejidad. Comenzando con sets de parámetros oscilatorios identificados en estudios previos y llevando a cabo análisis de bifurcaciones usando al *input* como el parámetro de barrido, fuimos capaces de reunir la información necesaria para guiar la transición de oscilaciones regulares a *bursting*.

Para el modelo de cascada MAPK, con una combinación de ciclos de *feedback* positivo y negativo que conduce a oscilaciones, introducimos un ciclo adicional de *feedback* negativo entre *output* e *input*. Aprovechando la coexistencia de estados estacionarios estables y ciclos límite con origen en bifurcaciones de Hopf subcríticas, obtuvimos *bursting*. Los dos nuevos parámetros en el *input* controlaron el perfil de *bursting*. Como el sistema original de MAPK permanece intacto, argumentamos que otros sets de parámetros responsables de bifurcaciones de Hopf subcríticas pueden ser analizados de la misma manera. La simplicidad en la estructura del nuevo ciclo de *feedback*, con solo dos nuevos parámetros, hace que los resultados sean especialmente interesantes.

En la cascada de Goodwin, las oscilaciones emergen de un ciclo de *feedback* negativo entre el último nivel y el primero junto con un *delay* a través de una variable intermedia. Nuevamente introducimos un ciclo de *feedback* negativo secundario, conectando el *output* con el *input*. Con la misma estructura para el nuevo ciclo, las bifurcaciones de Hopf subcríticas producen resultados similares a los obtenidos en la cascada MAPK. La amplitud subyacente sensible al *input* resulta en *bursts* simétricos. Vale la pena destacar la ausencia de *feedbacks* positivos en este modelo, mostrando que un ciclo de *feedback* negativo, el original para obtener oscilaciones, y el segundo, introducido al modelo, fueron ambos necesarios y suficientes para producir *bursting*.

Al modificar los sets de parámetros para obtener bifurcaciones de Hopf supercríticas -donde estados estables estacionarios y ciclos límites estables dejan de coexistir- ajustar los parámetros regulando las tasas del *input* fue insuficiente para inducir *bursting* sostenido. En su lugar, extendimos el ciclo de *feedback* negativo introduciendo variables intermedias, incrementando así el *delay*. Este abordaje es un reflejo de las oscilaciones inducidas por *delay* en el modelo de Goodwin original. Añadir dos variables extra entre el *output* y el *input* restauró con éxito el *bursting* en el modelo de Goodwin,

mientras que en la cascada MAPK, una sola variable adicional dentro del ciclo extra fue suficiente para lograr *bursting* bajo condiciones de Hopf supercrítica.

Fuera del rango de parámetros con *bursting* sostenido, el modelo de Goodwin mostró un comportamiento novedoso el cual llamamos “*bursting* amortiguado”, análogo a las oscilaciones amortiguadas en sistemas clásicos. Esta fase de *bursting* transitoria, donde los *bursts* decaen en el tiempo, sugiere un comportamiento dinámico previamente no reportado.

Dado que el *input* exhibe oscilaciones amortiguadas, exploramos un método alternativo para sostener el *bursting* mediante estimulación periódica externa. Forzando al *input* a oscilar con suficiente amplitud, se registró *bursting* sostenido, ofreciendo un mecanismo distinto más allá de la extensión del ciclo de *feedback* añadido.

Un barrido de frecuencia del *input* forzado reveló picos en los máximos valores de *output*, algo característico de resonancia no-lineal. Al mismo tiempo, la manera en que el barrido de frecuencia fue realizado llevó a resultados contrastantes. Cuando la condición inicial para cada frecuencia correspondía al último máximo o mínimo en la serie temporal de *input* previa, había un claro ciclo de histéresis. Por otro lado, si la condición inicial correspondía tan solo al último punto en la serie previa, las ramas de las curvas de histéresis estaban mezcladas. En este caso, diferentes ventanas temporales modificarán las curvas de máximo valor de *output* vs. frecuencia.

Para resumir, descubrimos comportamiento de *bursting* en modelos de cascadas de señalización, comportamiento que, hasta donde sabemos, no ha sido previamente reportado. Usamos componentes típicos de sistemas oscilatorios y los aprovechamos para obtener *bursting*, con la adición de un ciclo de *feedback* negativo de *output* a *input* como protagonista. Este ciclo tuvo una estructura bien directa, y su implementación a cualquier sistema oscilatorio podría revelar *bursting*. Si bien la coexistencia entre estados estacionarios y ciclos límites facilitó el *bursting*, no fue estrictamente requerida. La modificación de la estructura de *feedback* negativo compensó la ausencia de la coexistencia. Además, la estimulación periódica del *input* contribuyó una ruta alternativa para alcanzar *bursting*, revelando tanto resonancia no lineal y sensibilidad a condiciones iniciales.

Si bien *bursting* ha sido estudiado de manera amplia en sistemas neuronales, se han reportado otros sistemas que presentan dinámica similar a *bursting*, con intervalos de quiescencia alternados con actividad oscilatoria [90]. La importancia funcional de dicha organización temporal en señalización celular o regulación genética puede diferir de su rol en *bursting* neuronal. Dos estudios teóricos han explorado posibles ventajas de señales tipo *bursting* en estos contextos. Schuster et al. proponen que señales de *bursting*, modeladas como fases oscilatorias sucesivas de baja y alta amplitud, pueden permitir la transmisión simultánea de dos señales distintas, llevando a regulación diferencial [91]. Por otro lado, Cournac et al. identifican simples topologías de redes regulatorias que son tanto sensibles como selectivas a oscilaciones de *bursting* [92]. Más precisamente, diseñan un mecanismo de filtro de bandas basado en *motifs* de ciclos *feedforward* incoherentes [93] que permite transmitir señales con trenes de pulsos periódicos específicos, describiendo en particular un patrón de *bursting*.

Otros ejemplos en la literatura pueden ser candidatos para nuestro tipo de análisis. En un trabajo por De Boeck et al. [80], los autores estudian diferentes modelos para el ciclo celular embrionario, combinando módulos capaces de mostrar diferentes funciones respuesta encontradas en este tipo de sistemas. Considerando las ecuaciones propuestas en el trabajo, las cuales incluyen inhibición a través de términos de degradación, y el acoplado de módulos en una organización de cascada, nuestro método para obtener *bursting* puede ser de interés en estos *motifs* de ciclo celular.

En un futuro análisis, los parámetros de *input* que proponemos podrían ser reemplazados por versiones que evolucionan en el tiempo, incrementando la complejidad del enfoque. Al mismo tiempo, se contemplaría la posibilidad de que el sistema estudiado no permanezca en la vecindad de una bifurcación. En este caso, *bursting* transitorio podría emerger, donde el *input* del sistema se mueve ida y vuelta a través de la bifurcación por un periodo finito de tiempo, antes de converger a oscilaciones regulares o estados estacionarios.

Métodos

Para el análisis de bifurcaciones, usamos MATCONT [36]. Para las series temporales, MATLAB y el integrador *ode15s* (también usado en MATCONT), con tolerancias relativas y absolutas de 10^{-8} y 10^{-10} respectivamente para obtener resultados numéricos confiables.

El sistema de ecuaciones para la cascada MAPK de Huang-Ferrell es como se presenta [12]:

$$\begin{aligned}
\frac{d[3K]}{dt} &= -k_1[S][3K] + k_{-1}[S \cdot 3K] + kp_2[3K_P \cdot P_{3K}] \\
\frac{d[S \cdot 3K]}{dt} &= k_1[S][3K] - (k_{-1} + k_2)[S \cdot 3K] \\
\frac{d[3K_P \cdot P_{3K}]}{dt} &= kp_1[P_{3K}^f][3K_P] - (kp_2 + kp_{-1})[3K_P \cdot P_{3K}] \\
\frac{d[3K_P]}{dt} &= k_2[S \cdot 3K] - kp_1[P_{3K}^f][3K_P] + kp_{-1}[3K_P \cdot P_{3K}] - k_3[3K_P][2K] + (k_{-3} + k_4)[3K_P \cdot 2K] \\
&\quad - k_5[3K_P][2K^*] + (k_{-5} + k_6)[3K_P \cdot 2K^*] \\
\frac{d[2K]}{dt} &= -k_3[3K_P][2K] + k_{-3}[3K_P \cdot 2K] + kp_4[2K_P \cdot P_{2K}] \\
\frac{d[3K_P \cdot 2K]}{dt} &= k_3[3K_P][2K] - (k_{-3} + k_4)[3K_P \cdot 2K] \\
\frac{d[2K_P \cdot P_{2K}]}{dt} &= kp_3[P_{2K}^f][2K_P] - (kp_4 + kp_{-3})[2K_P \cdot P_{2K}] \\
\frac{d[2K_P]}{dt} &= k_4[3K_P \cdot 2K] - kp_3[P_{2K}^f][2K_P] + kp_{-3}[2K_P \cdot P_{2K}] - k_5[3K_P][2K_P] + k_{-5}[3K_P \cdot 2K_P] \\
&\quad + kp_6[2K_{PP} \cdot P_{2K}] \\
\frac{d[3K_P \cdot 2K_P]}{dt} &= k_5[3K_P][2K_P] - (k_{-5} + k_6)[3K_P \cdot 2K_P] \\
\frac{d[2K_{PP} \cdot P_{2K}]}{dt} &= kp_5[P_{2K}^f][2K_{PP}] - (kp_6 + kp_{-5})[2K_{PP} \cdot P_{2K}] \\
\frac{d[2K_{PP}]}{dt} &= k_6[3K_P \cdot 2K_P] - kp_5[P_{2K}^f][2K_{PP}] + kp_{-5}[2K_{PP} \cdot P_{2K}] - k_7[2K_{PP}][K] + (k_{-7} \\
&\quad + k_8)[2K_{PP} \cdot K] - k_9[2K_{PP}][K_P] + (k_{-9} + k_{10})[2K_{PP} \cdot K_P] \\
\frac{d[K]}{dt} &= -k_7[2K_{PP}][K] + k_{-7}[2K_{PP} \cdot K] + kp_8[K_P \cdot P_K] \\
\frac{d[2K_{PP} \cdot K]}{dt} &= k_7[2K_{PP}][K] - (k_{-7} + k_8)[2K_{PP} \cdot K]
\end{aligned}$$

$$\frac{d[K_P \cdot P_K]}{dt} = kp_7[P_K^f][K_P] - (kp_8 + kp_{-7})[K_P \cdot P_K]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[K_P]}{dt} = & k_8[2K_{PP} \cdot K] - kp_7[P_K^f][K_P] + kp_{-7}[K_P \cdot P_K] - k_9[2K_{PP}][K_P] + k_{-9}[2K_{PP} \cdot K_P] \\ & + kp_{10}[K_{PP} \cdot P_K] \end{aligned}$$

$$\frac{d[2K_{PP} \cdot K_P]}{dt} = k_9[2K_{PP}][K_P] - (k_{-9} + k_{10})[2K_{PP} \cdot K_P]$$

$$\frac{d[K_{PP} \cdot P_K]}{dt} = kp_9[P_K^f][K_{PP}] - (kp_{10} + kp_{-9})[K_{PP} \cdot P_K]$$

$$\frac{d[K_{PP}]}{dt} = k_{10}[2K_{PP} \cdot K_P] - kp_9[P_K^f][K_{PP}] + kp_{-9}[K_{PP} \cdot P_K]$$

Las ecuaciones para la quinasa libre S y las tres fosfatasa son como siguen, usando las correspondientes conservaciones:

$$[S] = S_{tot} - [S \cdot 3K]$$

$$[P_{3K}^f] = P_{3Ktot} - [3K_P \cdot P_{3K}]$$

$$[P_{2K}^f] = P_{2Ktot} - [2K_P \cdot P_{2K}] - [2K_{PP} \cdot P_{2K}]$$

$$[P_K^f] = P_{Ktot} - [K_P \cdot P_K] - [K_{PP} \cdot P_K]$$

La ecuación para S fue cambiada al añadir el nuevo ciclo de *feedback* negativo, reemplazando S_{tot} por:

$$[\dot{S}_t] = S_{rate} - neg_{feed}[K_{pp}][S_t]$$

Los valores de parámetros usados son:

Modelo MAPK (Figs. 4.1 and 4.2):

$$\begin{aligned} [k_1, kp_1, k_3, kp_3, k_5, kp_5, k_7, kp_7, k_9, kp_9] = \\ = [3.67, 1.97, 2.71, 2.96, 2.83, 4.82, 4.69, 2.46, 1.66, 3.39] * 10^3 (\mu M \cdot min)^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [k_{-1}, kp_{-1}, k_{-3}, kp_{-3}, k_{-5}, kp_{-5}, k_{-7}, kp_{-7}, k_{-9}, kp_{-9}] = \\ = [3.68, 6.76, 2.82, 1.81, 5.79, 7.35, 2.35, 1.18, 5.56, 6.39] * 10^2 min^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [k_2, kp_2, k_4, kp_4, k_6, kp_6, k_8, kp_8, k_{10}, kp_{10}] = \\ = [7.26, 3.14, 1.53, 3.59, 1.97, 6.82, 1.27, 5.00, 5.14, 6.49] * 10^2 min^{-1} \end{aligned}$$

$$P_{3Ktot} = 1.02 * 10^{-4} \mu M$$

$$P_{2Ktot} = 1.30 * 10^{-3} \mu M$$

$$P_{Ktot} = 1.75 * 10^{-1} \mu M$$

$$3K_{tot} = 1.25 * 10^{-2} \mu M$$

$$2K_{tot} = 0.58 \mu M$$

$$K_{tot} = 3.10 \mu M$$

Modelo MAPK (Fig. 4.4):

$$[k_1, kp_1, k_3, kp_3, k_5, kp_5, k_7, kp_7, k_9, kp_9] =$$

$$= [1.0962, 1.5576, 1.9179, 0.36894, 4.5836, 2.0219, 2.6634, 1.4435, 0.54366, 0.4399]$$

$$* 10^3 (\mu\text{M} \cdot \text{min})^{-1}$$

$$[k_{-1}, kp_{-1}, k_{-3}, kp_{-3}, k_{-5}, kp_{-5}, k_{-7}, kp_{-7}, k_{-9}, kp_{-9}] =$$

$$= [4.3207, 9.4394, 7.5216, 41.710, 33.742, 43.905, 5.9598, 4.0101, 22.211, 17.642,] * 10^1 \text{ min}^{-1}$$

$$[k_2, kp_2, k_4, kp_4, k_6, kp_6, k_8, kp_8, k_{10}, kp_{10}] =$$

$$= [7.26, 3.14, 1.53, 3.59, 1.97, 6.82, 1.27, 5.00, 5.14, 6.49] * 10^2 \text{ min}^{-1}$$

$$P_{3K_{tot}} = 1.2115 * 10^{-4} \mu\text{M}$$

$$P_{2K_{tot}} = 9.4579 * 10^{-5} \mu\text{M}$$

$$P_{K_{tot}} = 7.5372 * 10^{-2} \mu\text{M}$$

$$3K_{tot} = 3.7112 * 10^{-3} \mu\text{M}$$

$$2K_{tot} = 4.0658 \mu\text{M}$$

$$K_{tot} = 2 \mu\text{M}$$

$$b_1 = b_2 = 0.003$$

Sistema modificado de Goodwin (Figs. 4.3 y 4.5):

$$b_1 = b_2 = 0.01, K = 1$$

Sistema modificado de Goodwin con dos variables a adidas (Figs. 4.4):

$$b_1 = b_2 = 0.01, K_3 = 1, b_3 = b_4 = 0.003, K_5 = 8$$

Sistema modificado de Goodwin con input forzado (Figs. 4.6 y 4.7):

$$b_1 = b_2 = 0.01, K = 1, A = 0.5$$

Conclusiones y perspectivas

En esta Tesis, hemos analizado diferentes modelos de señalización celular, con particular atención a la cascada MAPK y sus diferentes subsistemas. A partir del modelado físico-matemático y la exploración en el espacio de parámetros, supimos obtener de manera sistemática una variedad de comportamientos, desde biestabilidad hasta *bursting*.

En el Capítulo 1, el estudio de la robustez de la biestabilidad en un ciclo de modificación covalente con compartimentalización mostró, mediante la translocación de un conjunto de variables con componentes lineales en las ecuaciones, cómo puede emerger un tipo de respuesta previamente ausente. La existencia de la respuesta biestable y sus características dependían de los parámetros de translocación, como se esperaba. Una modificación relativamente directa del ciclo de modificación abre la puerta a un *output* más complejo, justificada en la prevalencia de compartimientos en redes de señalización celular. La simplificación que llevamos a cabo del modelo, removiendo reacciones y componentes, presentó la posibilidad de mantener la dinámica biestable en un modelo más sencillo. Esto demuestra que la curva dosis-respuesta obtenida no es exclusiva del modelo tal como fue inicialmente establecido.

Si bien el modelo del Capítulo 1 no fue estudiado en los Capítulos siguientes, varias de las ideas y conceptos presentados fueron sostenidos en los posteriores análisis. Modificaciones sencillas a un sistema previamente estudiado que amplían la dinámica presente, dependencia de los nuevos comportamientos respecto de parámetros claves, y sistemas de variada complejidad, pero con los mismos tipos de respuesta, son algunos de los puntos en común de todo el trabajo presentado en esta Tesis.

El Capítulo 2 parte de la biestabilidad como requerimiento para otro tipo de respuesta: oscilaciones. Pasando a un ciclo de doble fosforilación como pieza clave, y con la quinasa activa responsable de la doble modificación secuestrada por su contraparte inactiva, analizamos cómo emergen oscilaciones de diferente índole. La amplitud y frecuencia cambiaron según la diferencia de escalas temporales entre los niveles, como se esperaba, y la competencia por la quinasa activa entre el primer nivel (quinasa inactiva) y el segundo (sustrato modificado) determinó un espectro de comportamientos periódicos especialmente interesante. El ciclo de *feedback* negativo implícito en el secuestro no solo llevó al sistema de biestabilidad a oscilaciones. Su jerarquía ante la biestabilidad subyacente, y, por tanto, los ciclos de *feedback* positivos implícitos, establecía qué tipo de respuesta periódica emergía. Los diferentes grados de complejidad en el primer nivel (activación/inactivación directa vs. ciclo de modificación covalente) presentaron ciertas diferencias en respuesta dentro de los sets de parámetros elegidos, pero compartiendo el panorama general de oscilaciones, biestabilidad y excitabilidad, así como la forma de pasar de una respuesta a otra. Un sistema de dos variables, el activador-inhibidor, mostró una dinámica similar aun cuando su descripción era significativamente más fácil que la de las cascadas de dos niveles, con múltiples modificaciones y *feedbacks* implícitos.

En el Capítulo 3, el enfoque en modificaciones simples, parámetros claves y sistemas con diferentes grados de complejidad continuó al aplicarse el método de pseudo-nulclinas. Este método geométrico tuvo resultados consistentes e informativos en dos sistemas, uno de los cuales avanzó el estudio de la cascada MAPK. El sistema 2 + 2 fue el primero de esta Tesis con dos módulos capaces de biestabilidad, extendiendo el protagonismo de este comportamiento en el trabajo, al mismo tiempo que permitía poner a prueba el método presentado. Tanto para el 2 + 2 como para el *motif* de ciclo celular analizado, cambios en el parámetro de *input* provocaban el desplazamiento de las pseudo-nulclinas. Mientras que

una modificación al sistema de ciclo celular, junto con una nueva elección en los valores de parámetros, enriqueció el perfil de bifurcaciones y reforzó la utilidad del método.

La cascada MAPK de tres niveles fue finalmente analizada en el Capítulo 4, con su capacidad oscilatoria tomada como base para otro comportamiento: *bursting*. Para este modelo y uno modificado de Goodwin, fue posible obtener *bursting* mediante un sencillo ciclo de *feedback* negativo explícito. Elementos típicos de sistemas oscilatorios fueron aprovechados para lograr una respuesta más compleja. El balance de los nuevos parámetros fue clave para que el *output* no tuviera, por ejemplo, oscilaciones sostenidas. El comportamiento del subsistema (la cascada MAPK) puede ser recuperado fuera de los rangos de parámetros para *bursting*, de manera similar a la biestabilidad emergente en las cascadas de dos niveles si la jerarquía de los *feedbacks* positivos era mayor a la del *feedback* negativo.

Translocación, secuestro, y un ciclo de *feedback* negativo explícito, fueron las modificaciones a ciclos de fosforilación/desfosforilación que fueron estudiadas en esta Tesis. Un sistema biestable por compartimentalización con un solo *feedback* positivo relevante, un activador-inhibidor, un *motif* de ciclo celular, y finalmente, un modelo modificado de Goodwin, los casos de menor complejidad en cada Capítulo, demostrando la variedad de sistemas con los mismos patrones de comportamiento.

Hemos mencionado la posibilidad de aplicar el método de pseudo-nulclinas a la cascada MAPK. Tomar al subsistema 1 + 2 como el primer módulo y el ciclo de doble fosforilación del tercer nivel como segundo módulo podría ser una posible ruta para seguir. La dificultad radicaría en el procedimiento a tomar en ese primer módulo. Extender el método a tres niveles podría ser un buen complemento para el análisis de *bursting* realizado. A su vez, cualquier otro sistema con más de dos módulos sería candidato con un método de pseudo-nulclinas extendido.

Mientras que nos hemos concentrado en *bursting* de tres niveles, existe la posibilidad de investigar dicha respuesta en cascadas de dos niveles como el modelo SK, 1 + 2 o 2 + 2. La pregunta sería: ¿qué grado de *delay* es necesario? Una opción es aplicar variables intermedias en el simple ciclo de *feedback* negativo que propusimos, como lo hecho en el caso sin coexistencia entre estados estables. Otra manera es ajustar los parámetros de los dos niveles, con el cuidado de no anular la biestabilidad subyacente y, por lo tanto, las oscilaciones requeridas como base para *bursting*. Si un sistema de dos niveles muestra *bursting* como un simple lazo negativo, la dinámica de tres niveles puede ser aún más compleja.

Otra posible ruta en futuros estudios es la estimulación periódica de un sistema biestable para inducir oscilaciones. Puede tratarse de un sistema que no tiene la capacidad de respuesta periódica, como el ciclo de doble fosforilación aislado, o de un caso donde la configuración en el espacio de parámetros es tal que las oscilaciones no son posibles. Un *input* periódico alrededor del ciclo de histéresis lograría el salto en el tipo de dinámica.

El análisis realizado en esta Tesis ha develado, a través de múltiples ejemplos, cómo obtener una gran variedad de comportamientos en sistemas de señalización celular a partir de estructuras oscilatorias y biestables, y puede extenderse a otros sistemas que incluyan esos tipos de respuesta. El área de investigación en la que se enmarca este trabajo es amplia, y nuestro enfoque puede ser de utilidad para develar nuevas y complejas funciones biológicas.

Apéndice

Apéndice: Capítulo 1

Adimensionalización

Sistema adimensional de EDOs para un ciclo de fosforilación/desfosforilación en dos compartimientos con translocación entre los mismos.

$$\begin{aligned}
 \frac{de}{d\tau} &= (b_2 + 1)x - b_1es - s_6e + s_5e^c, \\
 \frac{dx}{d\tau} &= -(b_2 + 1)x + b_1es - s_2x + s_1x^c, \\
 \frac{ds}{d\tau} &= b_2c_1x - b_1c_1es + b_5c_2y - s_8s + s_7s^c, \\
 \frac{ds^*}{d\tau} &= c_1x - b_3c_2fs^* + b_4c_2y - s_4s^* + s_3s^{c*}, \\
 \frac{df}{d\tau} &= -b_3fs^* + (b_4 + b_5)y, \\
 \frac{dy}{d\tau} &= b_3fs^* - (b_4 + b_5)y, \\
 \frac{de^c}{d\tau} &= (b_7 + b_8)x^c - b_6e^cs^c + s_6e - s_5e^c, \\
 \frac{dx^c}{d\tau} &= -(b_7 + b_8)x^c + b_6e^cs^c + s_2x - s_1x^c, \\
 \frac{ds^c}{d\tau} &= b_7c_1x^c - b_6c_1e^cs^c + b_{11}c_3y^c + s_8s - s_7s^c, \\
 \frac{ds^{c*}}{d\tau} &= b_8c_1x^c - b_9c_3f^cs^{c*} + b_{10}c_3y^c + s_4s^* - s_3s^{c*}, \\
 \frac{df^c}{d\tau} &= -b_9f^cs^{c*} + (b_{10} + b_{11})y^c, \\
 \frac{dy^c}{d\tau} &= b_9f^cs^{c*} - (b_{10} + b_{11})y^c
 \end{aligned} \tag{1}$$

Donde $\tau = k_{cat,E}t$ y hemos definido las concentraciones adimensionales como:

$$\begin{aligned}
 e &= \frac{[E]}{E_{tot}}, & e^c &= \frac{[E^c]}{E_{tot}}, & x &= \frac{[X]}{E_{tot}}, & x^c &= \frac{[X^c]}{E_{tot}}, \\
 f &= \frac{[F]}{F_{tot}}, & f^c &= \frac{[F^c]}{F_{tot}}, & y &= \frac{[Y]}{F_{tot}}, & y^c &= \frac{[Y^c]}{F_{tot}}, \\
 s &= \frac{[S]}{S_{tot}}, & s^c &= \frac{[S^c]}{S_{tot}}, & s^* &= \frac{[S^*]}{S_{tot}}, & s^{c*} &= \frac{[S^{c*}]}{S_{tot}},
 \end{aligned} \tag{2}$$

Las constantes de velocidad adimensionales son:

$$\begin{aligned}
 b_1 &= \frac{k_{on,E}S_{tot}}{k_{cat,E}}, & b_2 &= \frac{k_{off,E}}{k_{cat,E}}, & b_3 &= \frac{k_{on,F}S_{tot}}{k_{cat,E}}, & b_4 &= \frac{k_{off,F}}{k_{cat,E}}, \\
 b_5 &= \frac{k_{cat,F}}{k_{cat,E}}, & b_6 &= \frac{k_{on,E}^cS_{tot}}{k_{cat,E}}, & b_7 &= \frac{k_{off,E}^c}{k_{cat,E}}, & b_8 &= \frac{k_{cat,E}^c}{k_{cat,E}},
 \end{aligned}$$

$$b_9 = \frac{k_{on,F}^c S_{tot}}{k_{cat,E}}, \quad b_{10} = \frac{k_{off,F}^c}{k_{cat,E}}, \quad b_{11} = \frac{k_{cat,F}^c}{k_{cat,E}}, \quad (3)$$

Las tasas de translocación adimensionales:

$$\begin{aligned} s_1 &= \frac{k_{in,X}}{k_{cat,E}}, & s_2 &= \frac{k_{out,X}}{k_{cat,E}}, & s_3 &= \frac{k_{in,S^*}}{k_{cat,E}}, & s_4 &= \frac{k_{out,S^*}}{k_{cat,E}}, \\ s_5 &= \frac{k_{in,E}}{k_{cat,E}}, & s_6 &= \frac{k_{out,E}}{k_{cat,E}}, & s_7 &= \frac{k_{in,S}}{k_{cat,E}}, & s_8 &= \frac{k_{out,S}}{k_{cat,E}}, \end{aligned} \quad (4)$$

Finalmente, las concentraciones relativas totales:

$$c_1 = \frac{E_{tot}}{S_{tot}}, \quad c_2 = \frac{F_{tot}}{S_{tot}}, \quad c_3 = \frac{F_{tot}^c}{S_{tot}}. \quad (5)$$

Las ecuaciones de conservación son:

$$\begin{aligned} e + x + e^c + x^c &= 1, \\ f + y &= 1, \\ f^c + y^c &= 1, \\ s + s^* + s^c + s^{c*} + (x + x^c) \frac{E_{tot}}{S_{tot}} + y \frac{F_{tot}}{S_{tot}} + y^c \frac{F_{tot}^c}{S_{tot}} &= 1, \end{aligned} \quad (6)$$

Sistema de EDOs adimensional para el modelo más compacto que conserva la biestabilidad dada por compartimentalización.

$$\begin{aligned} \frac{de^c}{d\tau} &= (b_1 + 1)x^c - b_2 e^c s^c - s_3 e^c + s_4 e, \\ \frac{ds^c}{d\tau} &= b_1 c_1 x^c - b_2 c_1 e^c s^c + s_1 s, \\ \frac{dx^c}{d\tau} &= -(b_1 + 1)x^c + b_2 e^c s^c, \\ \frac{ds^{c*}}{d\tau} &= c_1 x^c - s_2 s^{c*}, \\ \frac{ds}{d\tau} &= -b_3 s e + b_4 s^* - s_1 s, \\ \frac{de}{d\tau} &= s_3 e^c - s_4 e, \\ \frac{ds^*}{d\tau} &= b_3 s e - b_4 s^* + s_2 s^{c*}, \end{aligned} \quad (7)$$

Donde $\tau = k_{cat,E}^c t$ y hemos definido las concentraciones adimensionales como:

$$e = \frac{[E]}{E_{tot}}, \quad e^c = \frac{[E^c]}{E_{tot}}, \quad x^c = \frac{[X^c]}{E_{tot}}, \quad f = \frac{[F]}{F_{tot}}, \quad f^c = \frac{[F^c]}{F_{tot}^c},$$

$$s = \frac{[S]}{S_{tot}}, \quad s^c = \frac{[S^c]}{S_{tot}}, \quad s^* = \frac{[S^*]}{S_{tot}}, \quad s^{c*} = \frac{[S^{c*}]}{S_{tot}}, \quad (8)$$

Las constantes de velocidad adimensionales como:

$$b_1 = \frac{k_{off,E}^c}{k_{cat,E}^c}, \quad b_2 = \frac{k_{on,E}^c S_{tot}}{k_{cat,E}^c}, \quad b_3 = \frac{k_{phos} E_{tot}}{k_{cat,E}^c}, \quad b_4 = \frac{k_{dephos} F_{tot}}{k_{cat,E}^c}, \quad (10)$$

Las tasas de translocación adimensionales:

$$s_1 = \frac{k_{out,S}}{k_{cat,E}^c}, \quad s_2 = \frac{k_{in,S^*}}{k_{cat,E}^c}, \quad s_3 = \frac{k_{in,E}}{k_{cat,E}^c}, \quad s_4 = \frac{k_{out,E}}{k_{cat,E}^c}, \quad (11)$$

Y la concentración relativa total:

$$c_1 = \frac{E_{tot}}{S_{tot}}. \quad (12)$$

Así, las ecuaciones de conservación resultan en:

$$e + e^c + x^c = 1,$$

$$s + s^* + s^c + s^{c*} + c_1 x^c = 1. \quad (13)$$

Nuevamente consideramos a c_1 and s^* como el estímulo y la respuestas, respectivamente.

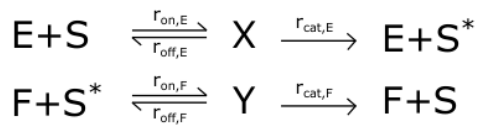
Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1.1 Listado de sets de parámetros con soluciones biestables

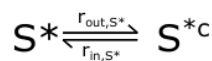
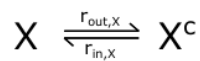
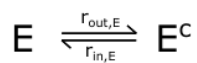
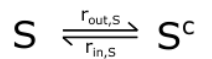
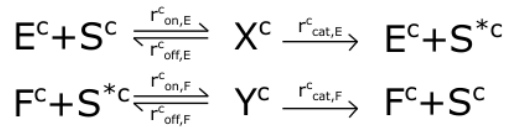
Param.	Sets de parámetros								
b_1	680.43	281070	7113.8	1107.8	8473.8	988.89	681.98	260580	6.5458
b_2	0.3249	73.103	0.2188	0.1193	0.2188	0.3249	0.1222	73.103	0.0344
b_3	258.43	8123.8	35.288	10.986	29.89	375.58	45.712	9295.7	47.557
b_4	0.1543	0.0835	0.0896	0.1061	0.0637	0.1543	0.0580	0.0835	0.0076
b_5	0.4203	0.1255	0.4093	0.3677	0.2910	0.4203	0.3549	0.1255	0.1679
b_6	1124.4	304720	9136.9	2071.8	10884	1104	646.48	571520	1.4695
b_7	1.1791	0.0102	29.146	0.2930	29.146	1.1791	0.6835	0.0102	0.5496
b_8	0.0465	0.0102	3.3155	6.6683	3.3155	0.0465	0.0175	0.0102	0.3473
b_9	280.02	12067	2.9970	6.0117	2.7276	274.96	26.045	13808	27.653
b_{10}	0.3249	0.3104	0.1014	0.0282	0.0935	0.3249	0.1931	0.3104	0.0840
b_{11}	0.4401	0.8438	0.6253	0.7791	0.5767	0.4401	0.5926	0.8438	1.1794
s_1	0.1390	1.6072	2.0783	0.9761	2.0783	0.1390	0.0956	1.6072	1.2595
s_2	2.0367	1.5823	2.2798	0.5239	2.2798	2.0367	1.1889	1.5823	0.5344
s_3	3.4041	391.83	0.0943	0.0941	0.0781	3.4041	0.4537	485.85	0.1565
s_4	2.6916	1065.1	1.0374	2.1180	1.0374	3.9839	1.0987	1320.7	0.6336
s_5	6.3703	34639	325.12	55.696	325.12	6.3703	2.9486	42950	0.0023
s_6	3.9165	94159	334.03	58.244	334.03	3.9165	1.4730	94593	0.6107
s_7	98.275	0.0296	18.408	9.2737	18.408	98.275	66.448	0.0486	0.1794
s_8	68.447	7.3271	7.9152	1.4499	7.9152	101.31	68.569	7.3271	0.0038
c_2	0.2007	0.1910	0.4460	0.2770	0.5265	0.2044	0.2304	0.2070	0.3143
c_3	0.1104	0.1396	0.4750	0.9450	0.4323	0.1124	0.1234	0.1513	0.0857

Ocho puntos biestables para el sistema fueron encontrados usando CRNToolbox (columnas 2-9), lo que nos permitió restringir los intervalos de muestreo para cada valor. El set de parámetros de la última columna fue encontrado por Harrington et al. [22].

1. Núcleo



Citoplasma



8 variables independientes

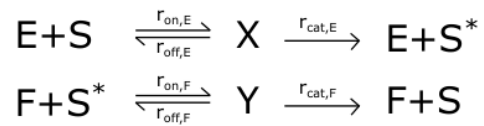
21 parámetros libres:

~ 11 constantes de reacción bioquímicas.

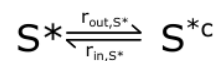
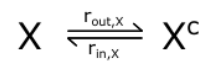
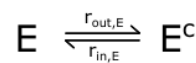
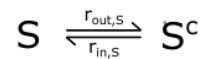
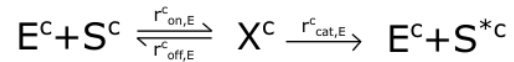
~ 8 tasas de translocación.

~ 2 concentraciones totales.

2. Núcleo



Citoplasma



7 variables independientes

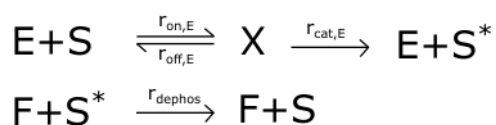
17 parámetros libres:

~ 8 constantes de reacción bioquímicas.

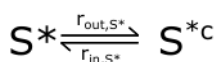
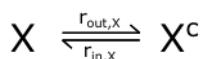
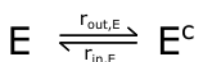
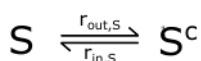
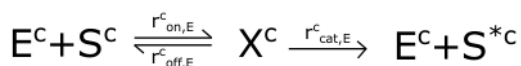
~ 8 tasas de translocación.

~ 1 concentración total.

3. Núcleo

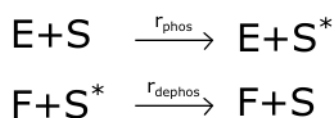


Citoplasma

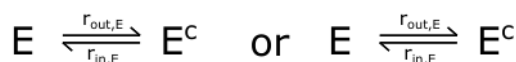
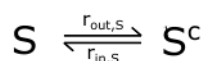
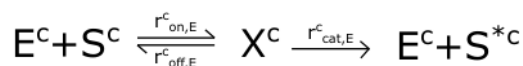


6 variables independientes
15 parámetros libres:
 ~ 6 constantes de reacción bioquímicas.
 ~ 8 tasas de translocación.
 ~ 1 concentración total.

4. Núcleo



Citoplasma



5 variables independientes
10 u 8 parámetros libres:
 ~ 4 constantes de reacción bioquímicas.
 ~ 6 or 4 tasas de translocación.

Tabla(s) Suplementaria(s) 1.2

Las reacciones en el modelo original (1° columna, 1° fila) fueron simplificadas de manera secuencial para obtener un modelo compacto que conserve la biestabilidad dada por espacialidad (4° columna). Se muestran las simplificaciones en cada paso, y el número resultante de variables y parámetros.

Figuras Suplementarias

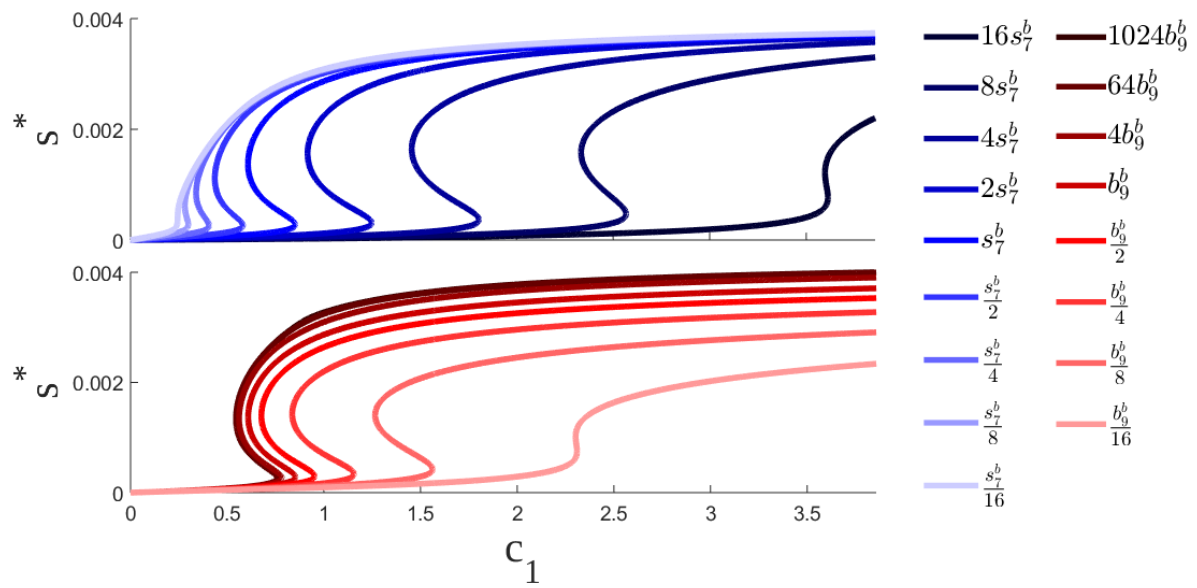
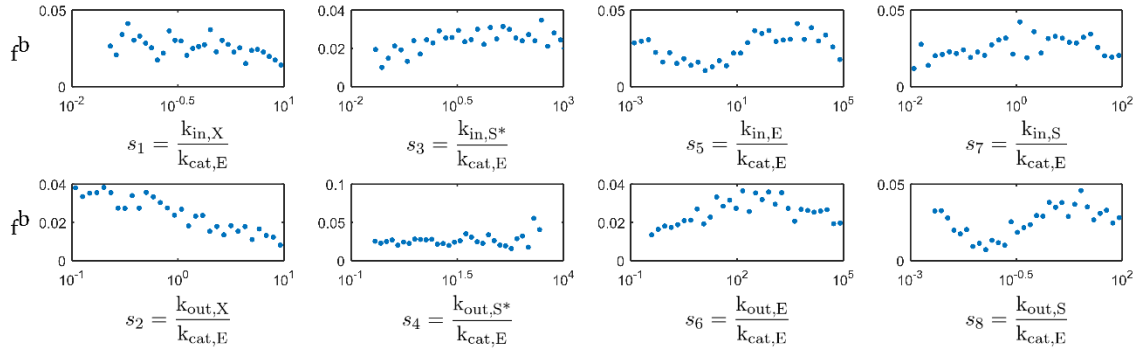


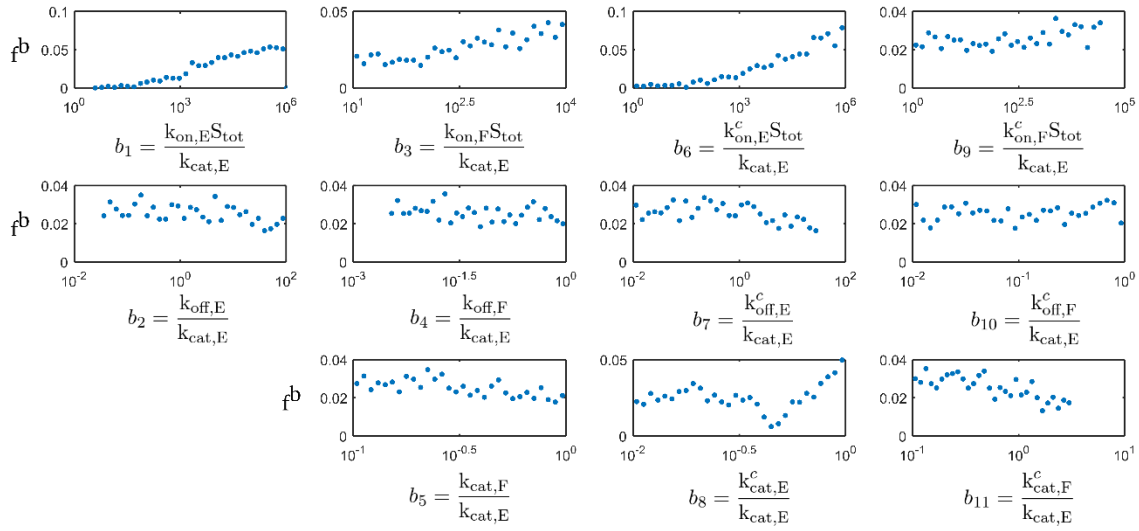
Figura S1.1

Diagramas de bifurcación generados luego de variar los parámetros adimensionales s_7 and b_9 individualmente con respecto a sus valores originales en el trabajo de Harrington et al. [22]. La biestabilidad se preserva luego de variaciones de uno o más órdenes de magnitud para la mayoría de los parámetros. Resultados obtenido con MatCont.

Parámetros de translocación



Parámetros de reacción



Concentraciones totales

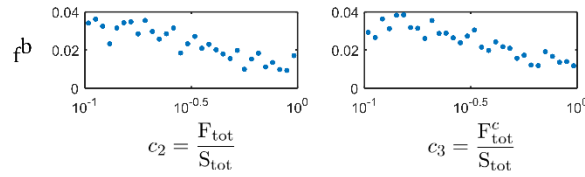


Figura S1.2

Gráficos de fracción biestable para cada parámetro. Primero, el comportamiento del sistema en el espacio de parámetros adimensionales fue estudiado aplicando el método *coming up and going down* sobre aproximadamente 10^5 sets de parámetros muestreados con LHS. Luego, el rango de muestreo para cada parámetro se separó en bins logarítmicos, y se contaron tanto la cantidad total de casos en los que el parámetro tomaba un valor dentro del bin i -ésimo (m_i), y cuáles de esos valores correspondían a casos donde el sistema era biestable (n_i). Finalmente, la fracción biestable $f^b = n_i/m_i$ se graficó para cada bin.

	$[10^{-3}10^{-2}]$	$[10^{-2}10^{-1}]$	$[10^{-1}10^0]$	$[10^010^1]$	$[10^110^2]$	$[10^210^3]$	$[10^310^4]$	$[10^410^5]$	$[10^510^6]$
b_1									
b_2									
b_3									
b_4									
b_5									
b_6									
b_7									
b_8									
b_9									
b_{10}									
b_{11}									
s_1									
s_2									
s_3									
s_4									
s_5									
s_6									
s_7									
s_8									
c_2									
c_3									

Figura S1.3

Resultados del test de enriquecimiento para los rangos de muestreo en la Fig. 1.3b. Las celdas rojas representan clases enriquecidas para cada parámetro; las azules, empobrecidas ($1 - p_i < 10^{-4}$). Celdas grises, ninguno de los dos casos enumerados. Celdas blancas, clases vacías.

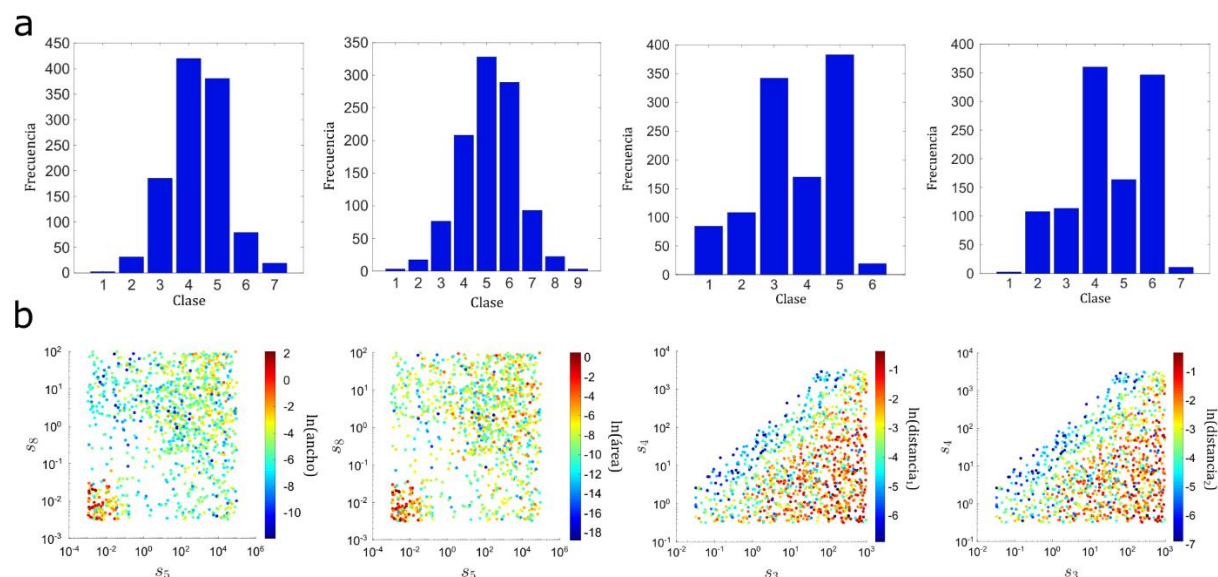


Figura S1.4

Caracterización de la región biestables para los casos biestables con curvas de tipo “S”. De izquierda a derecha, resultados para: el ancho del ciclo de histéresis; el área del ciclo; la distancia entre ramas en Stim_{on} ; la diferencia entre el output en Stim_{off} -rama superior- y el output en Stim_{on} -rama inferior-. **a:** Distribución de valores para cada propiedad, en clase logarítmicas (como es explica en Métodos). **b:**

Gráficos tipo *scatter* para los dos parámetros con el mayor valor absoluto del z-valor (ver Fig. 1.4b), con un *colormap* siguiendo el logaritmo natural de la propiedad analizada.

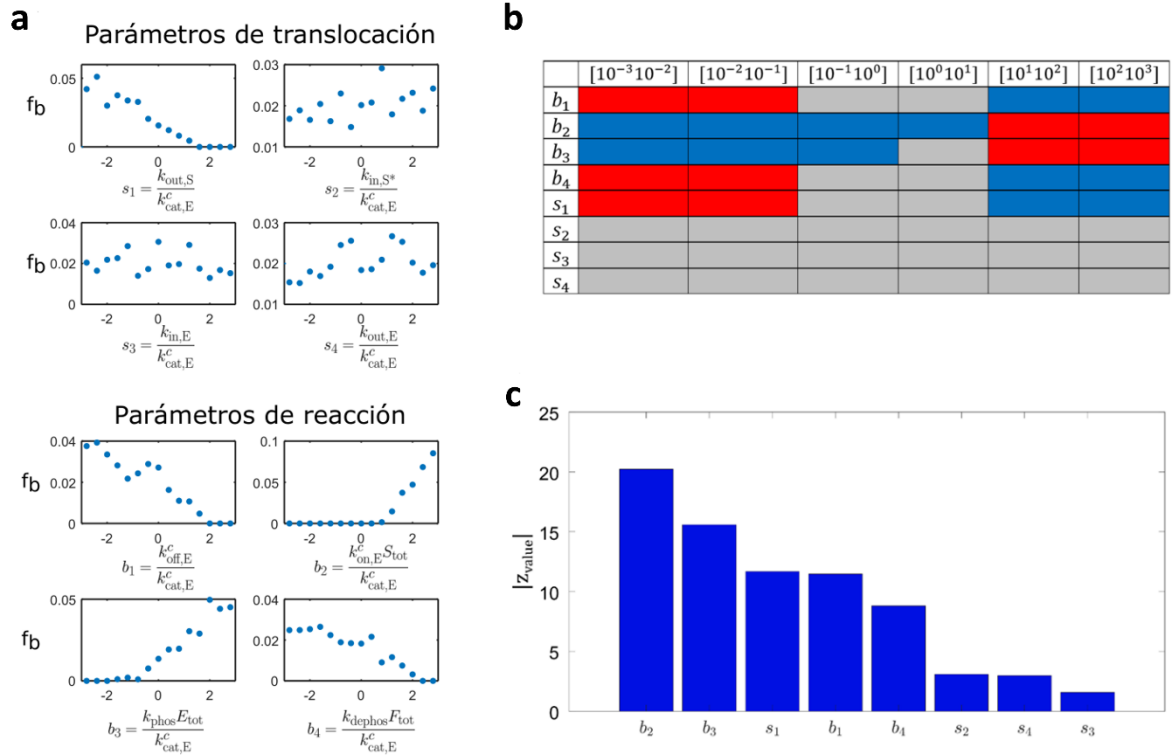


Figura S1.5

Análisis del sistema compacto con biestabilidad dada por la espacialidad. **a:** Gráficos de fracción biestable para cada parámetro del sistema compacto. El eje x en cada gráfico representa el logaritmo en base 10 de los parámetros adimensionales. **b:** Resultados del test de enriquecimiento para cada parámetro. Las celdas rojas representan clases enriquecidas para cada parámetro; las azules, empobrecidas. Celdas grises, ninguno de los dos casos enumerados. Celdas blancas, clases vacías. **c:** Gráfico de barras representando los valores del test U de Mann-Whitney, donde los parámetros se ordenan según el valor absoluto del z-valor.

Apéndice: Capítulo 2

Figuras Suplementarias

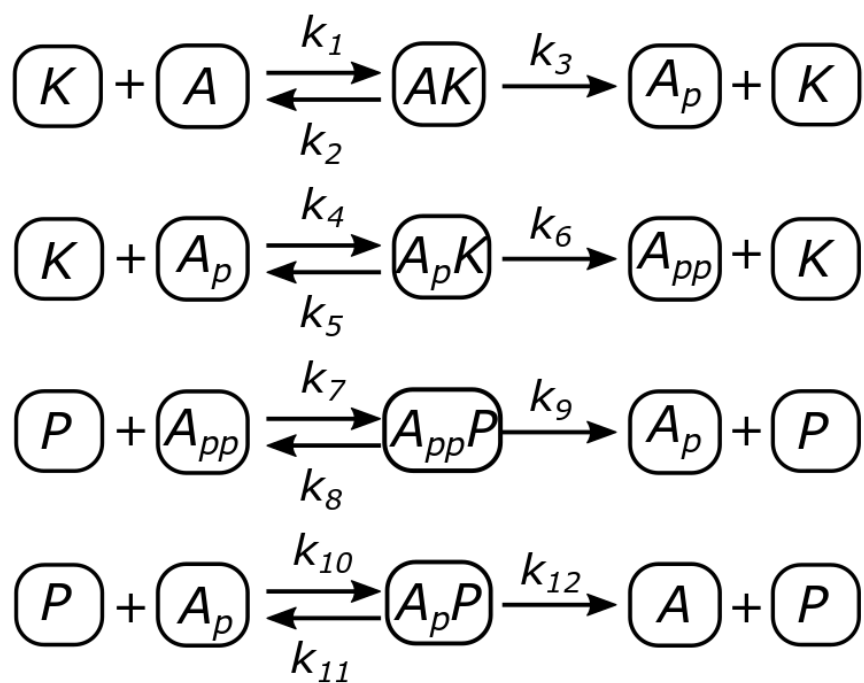


Figura S2.1

Esquema de las reacciones en el ciclo de doble fosforilación. Estas reacciones ocurren tanto en el modelo SK como 1 + 2.

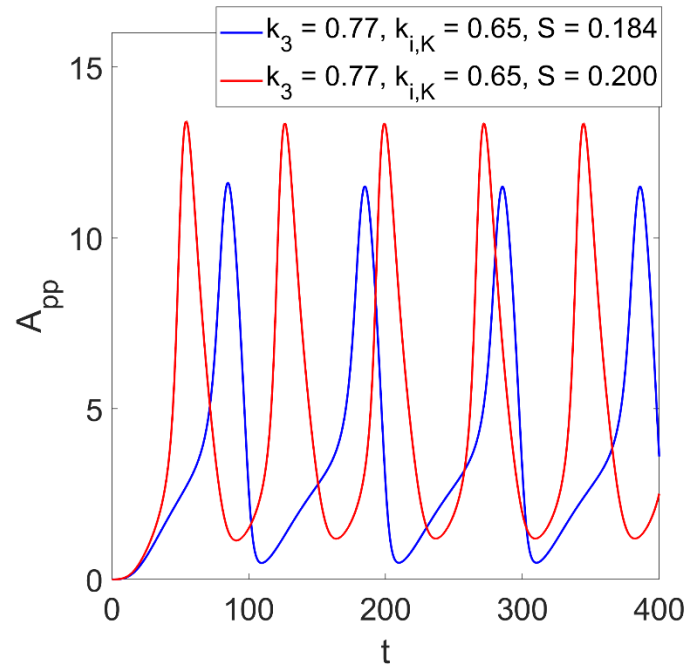


Figura S2.2

Series temporales para el modelo SK, en $k_3 = 0.77$ y para dos valores distintos del parámetro de input S . Mientras que para $S = 0.200$ el output tiene una forma relativamente simétrica, el caso para menor *input* y más cercano a la bifurcación SHom es asimétrico. Esto muestra una manera alternativa de obtener diferentes oscilaciones, no solo cambiando un parámetro como k_3 , sino también explotando las diferentes bifurcaciones presentes en el sistema donde se lleva a cabo un escaneo del *input*.

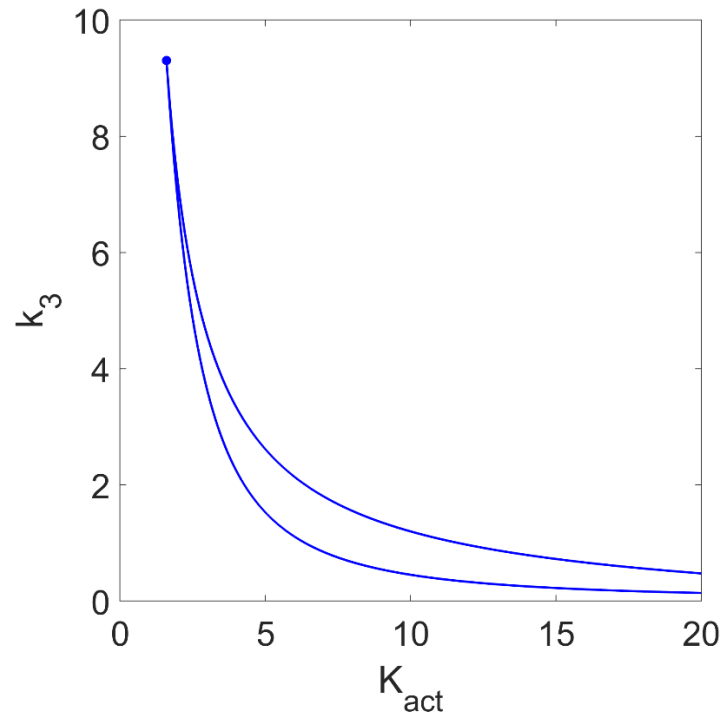


Figura S2.3

Diagrama de bifurcaciones 2D en el ciclo DP barriendo k_3 and K_{act} . Todos los puntos en las curvas son SN. El extremo es un Cusp Point (en aproximadamente $k_3 = 9.305$). La región definida es biestable. Todos los otros parámetros toman los mismos valores que los usados en los modelos SK y 1 + 2. ($k_1 = 8$, $k_6 = 50$, $A_{tot} = 40$, $P_{tot} = 17$, todas las otras $k = 1$). Para valores mayores de k_3 que el CP, los modelos SK y 1 + 2 no mostrarán oscilaciones.

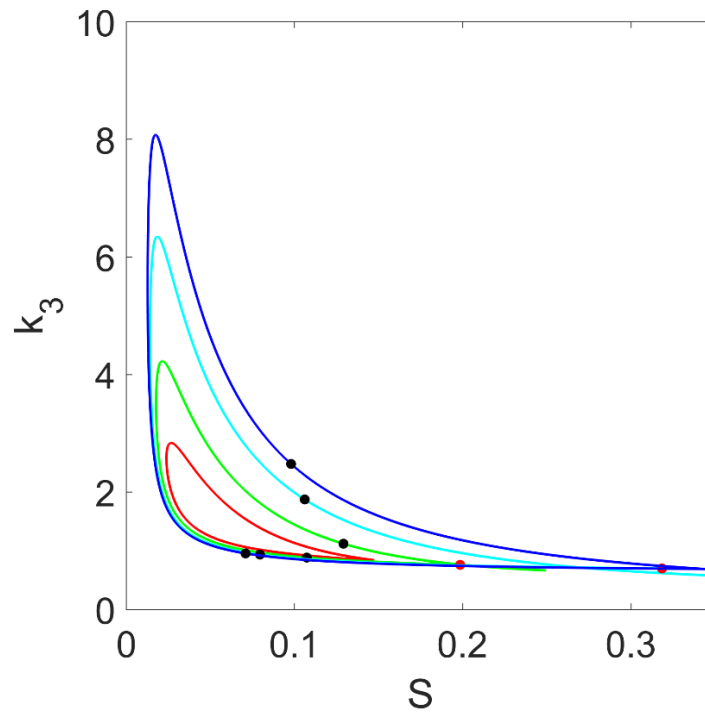


Figura S2.4

Diagrama de bifurcaciones para el modelo SK, escaneando k_3 y S . Solo se muestran curvas de bifurcaciones Hopf. Los casos $k_{a,K} = k_{i,K}$ mostrados son: 1 (en rojo), 0.65 (en verde), 0.29 (en cian), 0.10 (en azul). GH en negro, BT en rojo. A medida que la separación de escalas temporales crece, la región oscilatoria aumenta. En particular, el rango oscilatorio de k_3 aumenta. Al comparar con la Fig. S2.3, es posible ver que el extremo superior de la región oscilatoria se acerca cada vez más al CP encontrado en el ciclo DP, pero nunca lo supera. Aumentar la separación de escalas temporales le permite al modelo SK aprovechar en mayor medida la biestabilidad subyacente, al tiempo que es limitado a valores por debajo del CP. A su vez, cuando $k_{a,K} = k_{i,K}$ es mayor, solo se encuentran bifurcaciones de Hopf. Para el caso de menor separación de escalas temporales (curva roja), tampoco hay bifurcaciones GH y todos los puntos sobre la curva corresponden a bifurcaciones supercríticas.

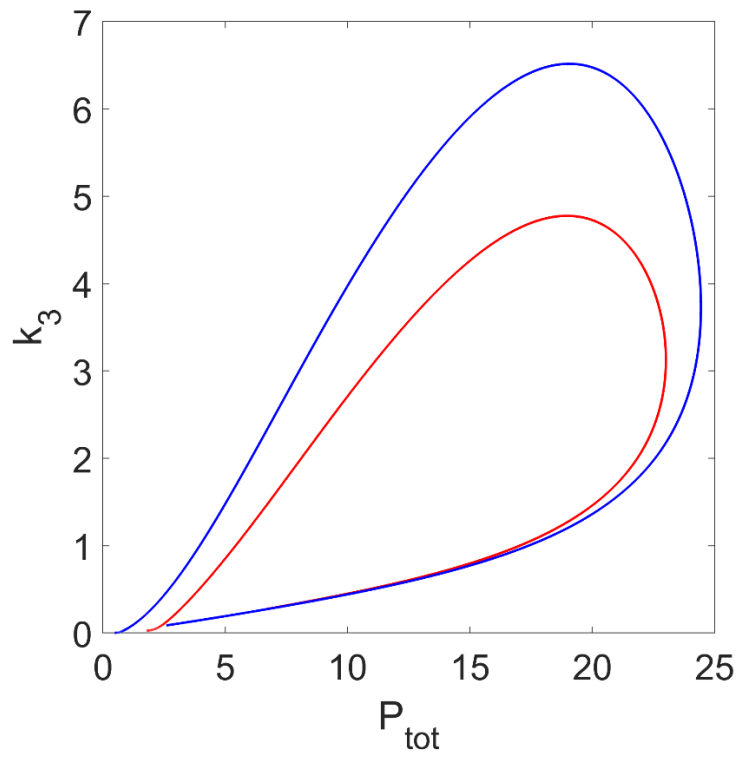


Figura S2.5

Diagrama de bifurcaciones 2D para el modelo 1 + 2. Solo se muestran curvas de Hopf. La curva roja corresponde a todas las constantes de velocidad en el primer valor con valor igual a 1. La curva azul, igual a 0.1. Esto es análogo al estudio realizado en el modelo SK cuando se cambiaba la separación de escalas temporales a través de las tasas de activación e inactivación indirectas. Nuevamente, la región oscilatoria se expande cuando se incrementa la separación de escalas.

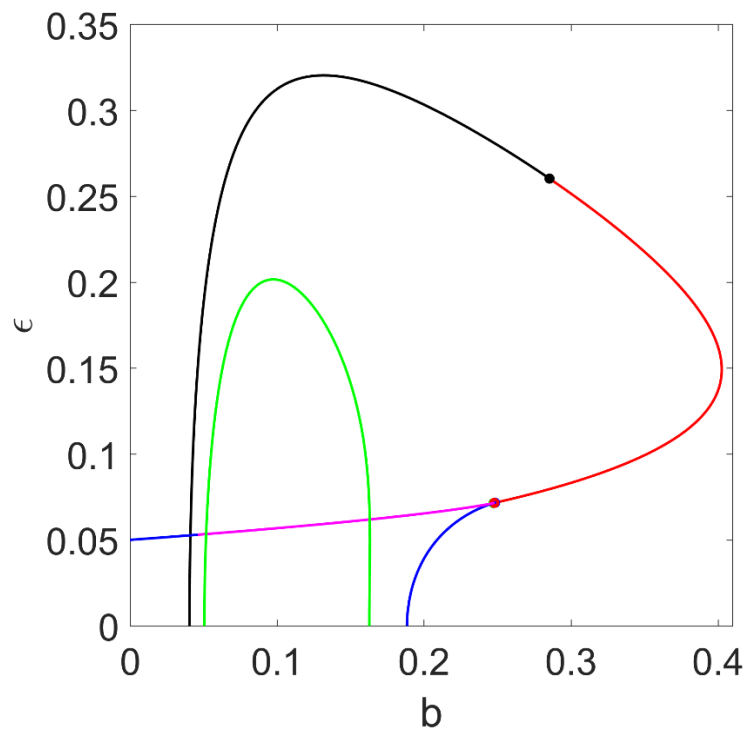


Figura S2.6

Diagrama de bifurcaciones 2D para el modelo activado-inhibidor. La curva verde corresponde a bifurcaciones de Hopf en $\tau = 1$. El resto de las curvas son igual a las mostradas en Resultados, con $\tau = 10$. Cuando la separación de escalas temporales es menor ($\tau = 1$), solo se encuentran bifurcaciones de Hopf, como fue el caso del modelo SK (Fig. S2.4, curva roja).

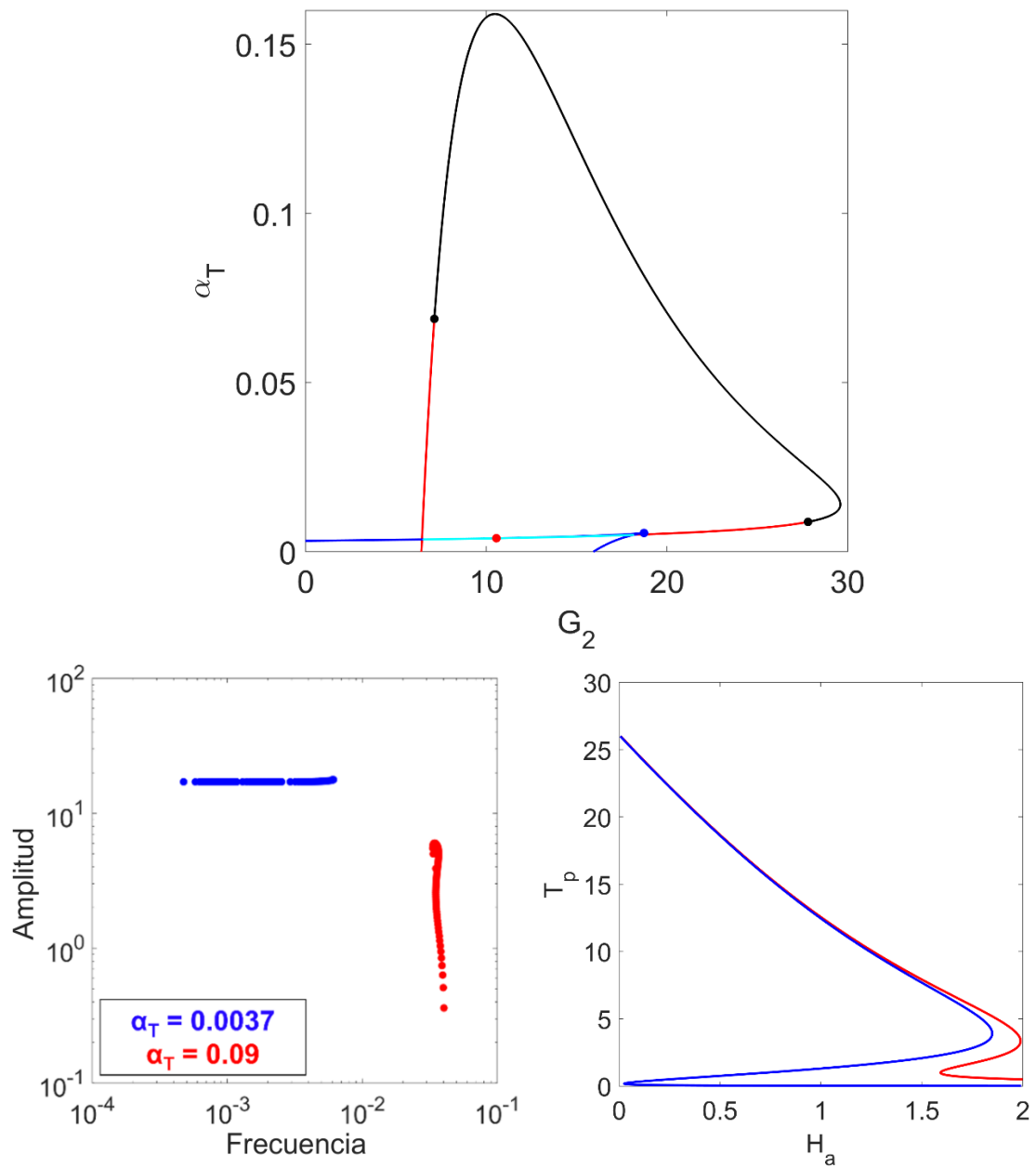


Figura S2.7

Resultados para el modelo de Tigges et al. [73]. Arriba: Diagrama de bifurcaciones para α_T (capaz de controlar la biestabilidad subyacente) versus G_2 (parámetro de *input*). En negro, Hopf supercríticas; en rojo, subcríticas; en azul, SN; en cian, SHom. GH en negro, CP en azul, BT en rojo. Parámetros fijos cuyos valores fueron cambiados respecto del set de referencia del trabajo: $G_1 = 10$, $k_{DTP} = 0.02426$. El diagrama de bifurcaciones muestra características similares a las mostradas en Resultados, con bifurcaciones de Hopf supercríticas para valores altos de α_T y tanto SN como SHom para valores bajos. Abajo, izquierda: curvas amplitud vs. frecuencia para $\alpha_T = 0.0037$ (en azul) y 0.09 (en rojo, valor de referencia), barriendo el *input* G_2 . Claro contraste en las formas de las curvas, yendo de frecuencia fija y amplitud sintonizable en 0.09 al comportamiento opuesto en 0.0037. El barrido es relativamente preciso a medida que el *input* se acerca a la SHom. Abajo, derecha: curvas biestables subyacentes para los dos casos del panel anterior, con un rango biestable marcadamente más amplio en $\alpha_T = 0.0037$.

Cálculo del grafo de interacción de la Fig. 2.8.

En esta sección mostramos como la dinámica del modelo de Suwanmajo-Krishnan (SK) puede reducirse a una descripción de solo 3 variables, mediante la aproximación cuasi-estacionaria. Hacemos lo mismo para el modelo 1 + 2. Finalmente, mostramos que el grafo de interacciones subyacente de cada uno de estos modelos reducidos puede ser descrito por dos ciclos de *feedback* interconectados, uno positivo y otro negativo.

Modelo SK

Partiendo del sistema de ecuaciones para el modelo SK, con 10 ecuaciones y 3 cantidades conservadas (quinasa total K_{tot} , fosfatasa total P_{tot} , proteína o sustrato total A_{tot}), el espacio de fases es de 7 dimensiones.

El sistema se puede separar en 2 módulos: 1) el ciclo DP; 2) el módulo de activación/inactivación de la quinasa.

Al usar la aproximación cuasi-estacionaria para los complejos enzima-sustrato, la concentración de estos complejos se toman en sus valores de equilibrio [94]. Hay 4 complejos intermedios, con lo que el sistema puede reducirse de 7 dimensiones a solo 3.

El módulo DP puede entonces ser descrito por dos variables independientes que elegimos como A y A_{pp} . La especie fosforilada una vez A_p puede deducirse de la conservación de A_{tot} .

El módulo de activación puede ser representado por la *quinasa activa total*, que es: $K_{tot} - [K_0] = [K] + [AK] + [A_p K]$. La llamamos K_a . Entonces, a partir de ahora $K_a = [K] + [AK] + [A_p K]$. Luego, al sumar $\frac{d}{dt}([K] + [AK] + [A_p K])$, la mayoría de los términos se cancelan entre sí, encontrando:

$$\dot{K}_a = -k_{i,K}[K] + k_{a,K}S_1[K_0] \quad (1)$$

En esta ecuación se puede reemplazar $[K_0]$ por $K_{tot} - K_a$. Por otro lado, usando la descripción detallada dada en el trabajo de Suwanmajo y Krishnan ([54], sección A.2 de su Apéndice) se obtiene:

$$K_a = [K] + [AK] + [A_p K] = [K] + c_1[A][K] + c_2[A_p][K] \quad (2)$$

Esta ecuación permite reemplazar $[K]$ en función de K_a , A y A_p en la ec. (1). En la ec. (2), los parámetros c_1 y c_2 son definidos por Suwanmajo y Krishnan como $c_1 = k_1/(k_2 + k_3)$ y $c_2 = k_4/(k_5 + k_6)$. Corresponden a las tradicionales constantes de Michaelis-Menten, invertidas. Usaremos estas notaciones y definimos también los otros coeficientes $c_3 = k_7/(k_8 + k_9)$ y $c_4 = k_{10}/(k_{11} + k_{12})$.

Resumiendo, las variables independientes elegidas son: (K_a, A, A_{pp}) , donde K_a es la quinasa total activa como ya definimos. Luego, usando la expresión para el estado estacionario de los complejos, las ecuaciones diferenciales para estas variables son:

$$\begin{aligned} \dot{K}_a &= k_{a,K}S_1K_{tot} - \left(k_{a,K}S_1 + \frac{k_{i,K}}{1 + c_1A + c_2A_p} \right) K_a \\ \dot{A} &= k_{12}P_{tot} \frac{c_4A_p}{1 + c_4A_p + c_3A_{pp}} - k_3K_a \frac{c_1A}{1 + c_1A + c_2A_p} \\ \dot{A_{pp}} &= k_6K_a \frac{c_2A_p}{1 + c_1A + c_2A_p} - k_9P_{tot} \frac{c_3A_{pp}}{1 + c_4A_p + c_3A_{pp}} \end{aligned}$$

Donde A_p es la solución de la ecuación de conservación de A_{tot} :

$$A_{tot} = A + A_p + A_{pp} + K_a \frac{c_1 A + c_2 A_p}{1 + c_1 A + c_2 A_p} + P_{tot} \frac{c_4 A_p + c_3 A_{pp}}{1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp}}$$

Para simplificar las notaciones, definimos dos funciones $f_1(K_a, A, A_p) = K_a \frac{c_1 A + c_2 A_p}{1 + c_1 A + c_2 A_p}$ y $f_3(A_p, A_{pp}) = P_{tot} \frac{c_4 A_p + c_3 A_{pp}}{1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp}}$, reescribiendo la ecuación para A_{tot} como:

$$A_{tot} = A + A_p + A_{pp} + f_1(K_a, A, A_p) + f_3(A_p, A_{pp}).$$

Modelo 1 + 2

El modelo 1 + 2, de 14 variables y 5 cantidades conservadas (a las 3 conservaciones del modelo SK se agregan las de la quinasa input y fosfatasa en el primer nivel), tiene 9 variables independientes. En [13], la existencia de oscilaciones sostenidas en este sistema fue estudiada en un modelo reducido a 3 ecuaciones, mediante la aproximación cuasi-estacionaria para los complejos intermedios. Usaremos ese mismo marco en lo que sigue, considerando las mismas variables que antes, (K_a, A, A_{pp}) . Con esto, la dinámica del modelo 1 + 2 queda establecida por el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} \dot{K}_a &= a_3 E_{1tot} \frac{c_0 K_0}{1 + c_0 K_0} - a_6 E_{2tot} \frac{c'_0 K_a}{1 + c_1 A + c_2 A_p + c'_0 K_a} \\ \dot{A} &= k_{12} P_{tot} \frac{c_4 A_p}{1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp}} - k_3 K_a \frac{c_1 A}{1 + c_1 A + c_2 A_p} \\ \dot{A}_{pp} &= k_6 K_a \frac{c_2 A_p}{1 + c_1 A + c_2 A_p} - k_9 P_{tot} \frac{c_3 A_{pp}}{1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp}} \end{aligned}$$

Donde c_0 y c'_0 son las inversas de las constantes de Michaelis-Menten para el ciclo de modificación covalente en el primer nivel. E_{2tot} es la fosfatasa total para el primer ciclo, con E_{1tot} el input, la quinasa total para el primer ciclo. En las ecuaciones diferenciales anteriores, K_0 y A_p se deducen de las variables independientes K_a , A y A_{pp} gracias a las conservaciones. K_0 se obtiene de resolver una nueva conservación para la quinasa total en el primer nivel del modelo 1 + 2, que se puede escribir como:

$$K_{tot} = K_0 + K_a + E_{1tot} \frac{c_0 K_0}{1 + c_0 K_0} + E_{2tot} \frac{c'_0 K_a}{1 + c_1 A + c_2 A_p + c'_0 K_a}$$

Grafos de interacción de los modelos reducidos

Un red bioquímica descrita por ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas puede ser asociada a un llamado grafo de interacciones. Los nodos del grafo son definidos por las especies bioquímicas, por ejemplo, $(x_1, \dots, x_m)$. Luego, según el signo de $\sigma_{ij} = \text{signo} \left(\frac{\partial \dot{x}_i}{\partial x_j} \right)$, las variables x_i y x_j están conectadas por una flecha que va de x_j a x_i (si $\sigma_{ij} = 0$, no hay flecha). Así, se caracteriza la influencia instantánea de la variable x_j sobre la variable x_i en el grafo. Si $\sigma_{ij} > 0$, la tasa de cambio de x_i aumenta con una perturbación positiva de x_j , y disminuye si la perturbación de x_j es negativa. Entonces, un extremo positivo de la flecha de x_j a x_i informa que la variable x_j ejerce una interacción positiva sobre x_i , o una interacción negativa si el signo de σ_{ij} es negativo. A su vez, un circuito cerrado en el grafo de interacciones revela la presencia de un ciclo de *feedback* dentro del sistema, cuyo signo es el producto de los signos de interacción sobre dicho circuito. En muchas redes biológicas, si bien la matriz Jacobiana depende de x , su signo es constante en el espacio de fases [95]. En este caso, es valioso describir

cualitativamente la red bioquímica por su grafo de interacciones, ya que provee información de interés sobre los posibles comportamientos del sistema dinámico. Sabemos que la existencia de un ciclo de *feedback* positivo en el grafo de interacciones es una condición necesaria para multiestabilidad [4]. Por otro lado, la existencia de un ciclo límite requiere un *feedback* negativo [40].

Aplicando estos conceptos al modelo reducido para el modelo SK, obtenemos primero el signo de la interacción que A_{pp} ejerce en K_a :

$$\begin{aligned}\frac{\partial \dot{K}_a}{\partial A_{pp}} &= -\frac{\partial}{\partial A_{pp}} \left[\frac{k_{i,K}}{1 + c_1 A + c_2 A_p} \right] \\ &= \frac{c_2 k_{i,K}}{(1 + c_1 A + c_2 A_p)^2} \frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}}\end{aligned}$$

Donde $\frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}}$ puede establecerse al computar el diferencial de la ecuación de conservación para A_{tot} :

$$\frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}} = -\frac{\left(1 + \frac{\partial f_3}{\partial A_{pp}}\right)}{\left(1 + \frac{\partial f_1}{\partial A_p} + \frac{\partial f_3}{\partial A_p}\right)} < 0$$

El signo negativo del resultado es asegurado por el signo positivo de $\frac{\partial f_1}{\partial A_p}$, $\frac{\partial f_3}{\partial A_p}$ y $\frac{\partial f_3}{\partial A_{pp}}$. Entonces, podemos decir que la variable A_{pp} ejerce una interacción negativa sobre K_a , ya que $\frac{\partial \dot{K}_a}{\partial A_{pp}} < 0$.

Evaluemos ahora la influencia de K_a sobre A :

$$\begin{aligned}\frac{\partial \dot{A}}{\partial K_a} &= \left(c_4 k_{12} P_{tot} \frac{1 + c_3 A_{pp}}{(1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp})^2} + c_2 k_3 K_a \frac{c_1 A}{(1 + c_1 A + c_2 A_p)^2} \right) \frac{\partial A_p}{\partial K_a} \\ &\quad - k_3 \frac{c_1 A}{1 + c_1 A + c_2 A_p}\end{aligned}$$

Donde

$$\frac{\partial A_p}{\partial K_a} = -\frac{\frac{\partial f_1}{\partial K_a}}{\left(1 + \frac{\partial f_1}{\partial A_p} + \frac{\partial f_3}{\partial A_p}\right)} < 0$$

Esta última expresión es siempre negativa porque $\frac{\partial f_1}{\partial A_p}$, $\frac{\partial f_3}{\partial A_p}$ y $\frac{\partial f_1}{\partial K_a}$ son positivas. Por lo tanto, hay una interacción negativa de K_a sobre A .

Computamos las interacciones mutuas entre A y A_{pp} , dadas por:

$$\begin{aligned}\frac{\partial \dot{A}_{pp}}{\partial A} &= -k_6 K_a \frac{c_1 c_2 A_p}{(1 + c_1 A + c_2 A_p)^2} \\ &\quad + \left(c_2 k_6 K_a \frac{1 + c_1 A}{(1 + c_1 A + c_2 A_p)^2} + k_9 P_{tot} \frac{c_3 c_4 A_{pp}}{(1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp})^2} \right) \frac{\partial A_p}{\partial A}\end{aligned}$$

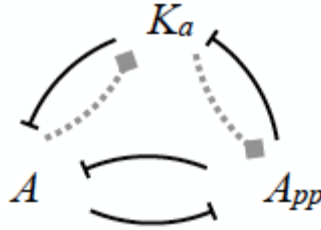
$$\frac{\partial \dot{A}}{\partial A_{pp}} = -k_{12}P_{tot} \frac{c_3 c_4 A_p}{(1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp})^2} + \left(c_4 k_{12} P_{tot} \frac{1 + c_3 A_{pp}}{(1 + c_4 A_p + c_3 A_{pp})^2} + k_3 K_a \frac{c_1 c_2 A}{(1 + c_1 A + c_2 A_p)^2} \right) \frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}}$$

Estas dos interacciones son negativas porque

$$\frac{\partial A_p}{\partial A} = - \frac{\left(1 + \frac{\partial f_1}{\partial A}\right)}{\left(1 + \frac{\partial f_1}{\partial A_p} + \frac{\partial f_3}{\partial A_p}\right)} < 0$$

Y ya sabemos que $\frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}} < 0$.

Este mismo procedimiento muestra que las interacciones $A \rightarrow K_a$ y $K_a \rightarrow A_{pp}$ no tienen un signo constante, pueden ser positivas o negativas. Con todo esto, llegamos a un grafo con dos ciclos de *feedback*: uno positivo entre A y A_{pp} , esencial para la biestabilidad en el ciclo de doble fosforilación; uno negativo en el circuito $K_a - A - A_{pp} - K_a$, necesario para obtener oscilaciones sostenidas en el motif de señalización SK.



Red de feedbacks entre las variables K_a , A y A_{pp} en el motif reducido del modelo SK.

Como podía esperarse, se puede obtener un grafo de interacciones con la misma estructura en el modelo 1 + 2. Ambos modelos difieren en solo una ecuación, la de K_a . Por lo tanto, solo un término de interacción debe ser computado, $\frac{\partial K_a}{\partial A_{pp}}$, que debería ser negativo.

$$\frac{\partial \dot{K}_a}{\partial A_{pp}} = a_3 E_{1tot} \frac{c_0}{(1 + c_0 K_0)^2} \frac{\partial K_0}{\partial A_{pp}} + a_6 E_{2tot} \frac{c_2 c'_0 K_a}{(1 + c_1 A + c_2 A_p + c'_0 K_a)^2} \frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}}$$

El factor $\frac{\partial K_0}{\partial A_{pp}}$ puede obtenerse del diferencial para la ecuación de conservación de K_{tot} :

$$\frac{\partial K_0}{\partial A_{pp}} = E_{2tot} \frac{c_2 c'_0 K_a}{(1 + c_1 A + c_2 A_p + c'_0 K_a)(1 + E_{1tot} c_0 / [1 + c_0 K_0]^2)} \frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}}$$

Con lo cual, el signo de $\frac{\partial K_a}{\partial A_{pp}}$ es el mismo que el de $\frac{\partial A_p}{\partial A_{pp}} < 0$, como ya se mostró más arriba.

Así, se obtiene el mismo grafo para ambos modelos, con dos *feedbacks* interconectados, uno positivo y otro negativo, cuya fortaleza relativa es modulada por los parámetros bioquímicos. Como se explicó en el texto principal, el parámetro k_3 aumenta la fortaleza del feedback negativo y debilita el feedback positivo, llevando a una transición de oscilaciones de tipo-1 a tipo-2. En conclusión, el tipo de oscilaciones que pueden emerger en la red depende del balance entre estos dos *feedbacks*.

Apéndice: Capítulo 3

Descripción general del método de pseudo-nulclinas

Como presentamos en el texto principal, la idea del método es descomponer el sistema en 2 módulos, asumiendo que la interconexión entre ambos es descrita por 2 funciones unidimensionales. Es decir, si las variables de los módulos están descritas respectivamente por dos sets de variables reales, $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ and $y = (y_1, y_2, \dots, y_m)$, las ecuaciones del modelo pueden ser escritas como:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, \alpha(y))$$

$$\frac{dy}{dt} = g(y, \beta(x))$$

(I)

Donde $\alpha(y)$ and $\beta(x)$ son dos funciones de valores reales. Tal sistema puede interpretarse como un primer módulo, descrito por las ecuaciones $\frac{dx}{dt} = f(x, a)$, donde a es un parámetro de *input*, interconectado con un segundo módulo cuyas ecuaciones son $\frac{dy}{dt} = g(y, b)$, con b el correspondiente parámetro de *input*. La interconexión proviene de reemplazar el *input* a del primer módulo por la función $\alpha(y)$, *output* del segundo módulo, y el *input* b del segundo módulo por $\beta(x)$, *output* del primer módulo.

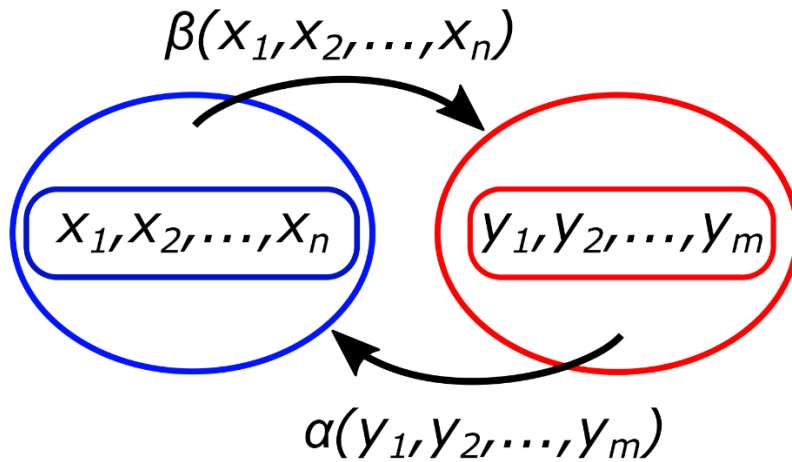


Diagrama del esquema general de dos módulos.

Así, un estado estacionario (x^*, y^*) del sistema (I) es una solución del sistema de ecuaciones:

$$f(x, a) = 0 \text{ y } a = \alpha(y)$$

$$g(y, b) = 0 \text{ y } b = \beta(x)$$

Si suponemos que las soluciones de este sistema de ecuaciones pueden ser escritas como sigue:

$$x = X(a)$$

$$y = Y(b)$$

(II)

Entonces, se define el estado estacionario *input/output* del primer módulo como la función $a \mapsto B(a) = \beta(X(a))$, y de la misma manera el estado estacionario *input/output* del segundo módulo como el mapa $b \mapsto A(b) = \alpha(Y(b))$. Cuando los dos módulos están acoplados, el valor del estado estacionario (a^*, b^*) queda determinado por las dos ecuaciones:

$$a^* = A(b^*)$$

$$b^* = B(a^*)$$

Por lo tanto, en el plano de coordenadas (a, b) , los estados estacionarios (a^*, b^*) estarán en las intersecciones de las dos curvas C_1 y C_2 cuyos grafos están dados respectivamente por las parametrizaciones $(A(b), b)$ y $(a, B(a))$.

A su vez, si (a^*, b^*) pertenece a la intersección de las dos curvas C_1 y C_2 , entonces $a^* = A(b^*)$ y $b^* = B(a^*)$. Usando las funciones X e Y definidas en (II), tenemos que:

$$f(X(a^*), a^*) = 0 \text{ y } a^* = \alpha(Y(b^*))$$

$$g(Y(b^*), b^*) = 0 \text{ y } b^* = \beta(X(a^*))$$

Entonces, $X(a^*)$ e $Y(b^*)$ constituyen un estado estacionario de los módulos acoplados ya que satisfacen el sistema de ecuaciones:

$$f(X(a^*), \alpha(Y(b^*))) = 0$$

$$g(Y(b^*), \beta(X(a^*))) = 0$$

En conclusión, las intersecciones de las pseudo-nulclinas C_1 y C_2 están en una correspondencia uno a uno con los estados estacionarios de los módulos acoplados.

Tangencia y bifurcación

En esta sección del Apéndice, probamos que, si un estado estacionario del sistema corresponde a una bifurcación *Limit Point*, entonces las pseudo-nulclinas C_1 y C_2 serán tangentes en la intersección.

Usando lo presentado en el texto principal, la hipótesis de partida es que los estados estacionarios del sistema son soluciones de las ecuaciones:

$$f(x, y_1) = 0$$

$$g(y, x_1) = 0$$

Para fijar ideas, x y f son n -dimensionales, con y, g m -dimensionales. También, asumimos que una dada solución de este sistema de $n+m$ ecuaciones puede ser escrita como $X(y_1) - x = 0$, $Y(x_1) - y = 0$. Consideramos que estas dos ecuaciones son el cero de la función única $H(x, y) = 0$, donde H es una función de $n+m$ dimensiones.

Ahora, dado un estado estacionario (x^*, y^*) , el mismo corresponde a una bifurcación *Limit Point* si la derivada $DH(x, y)$ no es invertible. De otra manera, por el teorema de la función implícita, la solución (x^*, y^*) tiene una continuación única, y no hay bifurcación *Limit Point*. $DH(x, y)$ no es invertible si y solo si el determinante es nulo. Entonces, computemos el determinante:

$$DH(x^*, y^*) = \begin{pmatrix} -1 & 0 & \dots & 0 & X'_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & -1 & \dots & 0 & X'_2 & 0 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & \dots & 0 & -1 & X'_n & 0 & 0 & 0 \\ Y'_1 & 0 & \dots & 0 & -1 & 0 & \dots & 0 \\ Y'_2 & 0 & \dots & 0 & 0 & -1 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ Y'_m & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 & \dots & -1 \end{pmatrix}$$

El resultado puede descomponerse en dos términos $A + B$. El primero, A , es igual al elemento DH_{11} (igual a -1) multiplicado por el menor correspondiente. Pero este menor es el determinante de una matriz triangular superior que solo tiene elementos -1 en la diagonal. Con lo que el resultado es $A = (-1)^{n+m}$.

El segundo término, B , puede computarse como $DH_{1,n+1}$ (igual a X'_1) multiplicado por el cofactor $(-1)^n$ por el menor correspondiente, que es el determinante de la siguiente matriz:

$$\det \begin{pmatrix} 0 & -1 & \dots & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & \dots & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ Y'_1 & 0 & \dots & 0 & 0 & \dots & 0 \\ Y'_2 & 0 & \dots & 0 & -1 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ Y'_m & 0 & \dots & 0 & 0 & \dots & -1 \end{pmatrix} = Y'_1 (-1)^{n-1} (-1)^{n+m-4}$$

Este resultado puede obtenerse removiendo la fila y la columna con el elemento Y'_1 (con un cofactor $(-1)^{n-1}$), dejando una matriz diagonal de elementos iguales a -1 , de dimensión $n+m-4$.

Por lo tanto, cancelar el determinante de DH es equivalente a escribir:

$$(1 - X'_1 Y'_1) (-1)^{n+m} = 0$$

Por otro lado, por construcción las pseudo-nulclinas C_1 y C_2 están parametrizadas por $(X_1(y_1), y_1)$ y $(x_1, Y_1(x_1))$. Entonces, en una dada intersección (x_1^*, y_1^*) las componentes de sus vectores tangentes se pueden computar respectivamente como $(X'_1, 1)$ y $(1, Y'_1)$. Por lo tanto, cancelar el siguiente determinante da una condición para el alineamiento de esos vectores tangentes, y así, de la tangencia de las pseudo-nulclinas en su intersección:

$$\det \begin{pmatrix} X'_1 & 1 \\ 1 & Y'_1 \end{pmatrix} = X'_1 Y'_1 - 1 = 0$$

Modelo de ciclo celular de Tsai et al. (2014)

Valores de parámetros para el modelo de Tsai et al. [46], tomados de su trabajo:

$$k_{\text{synth}} = 1.5 \text{ nM/min}$$

$$k_{\text{dest}} = 0.4$$

$$\text{ec50}_{\text{cdc25}} = 30 \text{ nM}$$

$$n_{\text{cdc25}} = 11$$

$$\text{ec50}_{\text{wee1}} = 35 \text{ nM}$$

$$n_{\text{wee1}} = 3.5$$

$$k_{\text{cdk1on}} = 0.0354$$

$$k_{\text{cdk1off}} = 0.0354$$

$$p = 5$$

$$\text{ec50}_{\text{plx}} = 60 \text{ nM}$$

$$\text{ec50}_{\text{apc}} = 0.5$$

$$n_{\text{apc}} = 4$$

$$n_{\text{plx}} = 5$$

$$k_{\text{plxon}} = 1.5$$

$$k_{\text{plxoff}} = 0.125$$

$$k_{\text{apcon}} = 1.5$$

$$k_{\text{apcoff}} = 0.15$$

$$\text{plx}_{\text{tot}} = 1$$

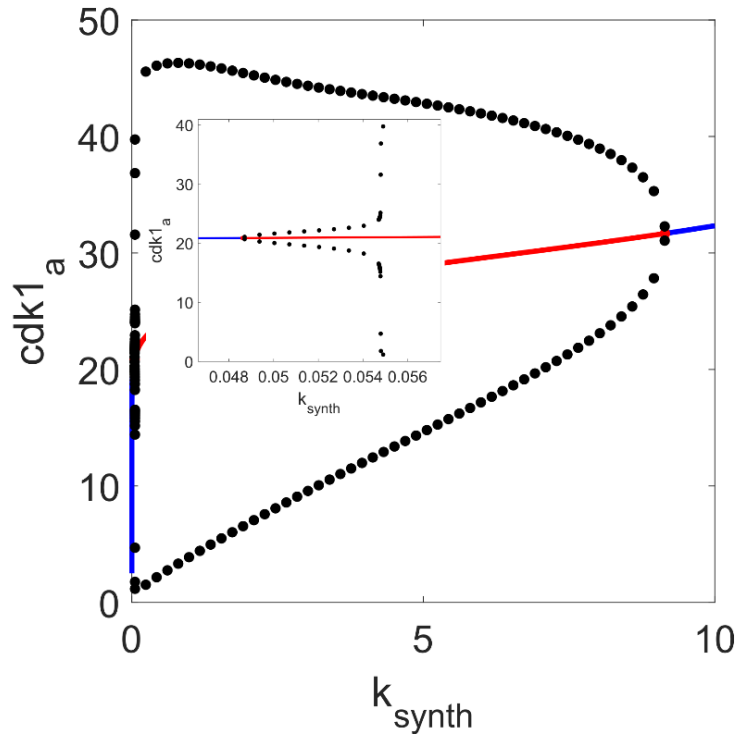


Figura S3.1

Diagrama de bifurcaciones 1D para el modelo de Tsai et al. con k_{synth} como el parámetro, y $Cdk1_a$ como el output, usando los valores de parámetros del trabajo de 2014 [46]. Estados estacionarios estables en azul, inestables en rojo, máximos y mínimos de los ciclos límite en círculos negros. Ambas bifurcaciones son supercríticas de Hopf. Cerca de la bifurcación de la izquierda, la amplitud aumenta rápidamente luego de un rango pequeños del parámetro, como se observa en el panel insertado.

Modelo 2 + 2

Hay 17 ecuaciones diferenciales para el sistema 2 + 2:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_2[AK] - k_1[A][K] + k_{12}[A_pP],$$

$$\frac{d[AK]}{dt} = k_1[A][K] - (k_2 + k_3)[AK],$$

$$\frac{d[A_p]}{dt} = k_3[AK] - k_4[A_p][K] + k_5[A_pK] + k_9[A_{pp}P] + k_{11}[A_pP] - k_{10}[A_p][P],$$

$$\frac{d[A_pK]}{dt} = k_4[A_p][K] - (k_5 + k_6)[A_pK],$$

$$\frac{d[A_{pp}]}{dt} = k_6[A_pK] + k_8[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P],$$

$$\frac{d[A_{pp}P]}{dt} = k_7[A_{pp}][P] - (k_8 + k_9)[A_{pp}P],$$

$$\frac{d[A_pP]}{dt} = k_{10}[A_p][P] - (k_{11} + k_{12})[A_pP],$$

$$\frac{d[P]}{dt} = (k_8 + k_9)[A_{pp}P] - k_7[A_{pp}][P] + (k_{11} + k_{12})[A_pP] - k_{10}[A_p][P]$$

$$\frac{d[K_0]}{dt} = l_2[K_0E_1] - l_1[K_0][E_1] + l_{12}[K_1E_2],$$

$$\frac{d[K_0E_1]}{dt} = l_1[K_0][E_1] - (l_2 + l_3)[K_0E_1],$$

$$\frac{d[K_1]}{dt} = l_3[K_0E_1] - l_4[K_1][E_1] + l_5[K_1E_1] + l_9[KE_2] + l_{11}[K_1E_2] - l_{10}[K_1][E_2],$$

$$\frac{d[K_1E_1]}{dt} = l_4[K_1][E_1] - (l_5 + l_6)[K_1E_1],$$

$$\begin{aligned} \frac{d[K]}{dt} = & (k_2 + k_3)[AK] - k_1[A][K] + (k_5 + k_6)[A_pK] - k_4[A_p][K] + l_6[K_1E_1] - l_7[K][E_2] \\ & + l_8[KE_2], \end{aligned}$$

$$\frac{d[KE_2]}{dt} = l_7[K][E_2] - (l_8 + l_9)[KE_2],$$

$$\frac{d[K_1E_2]}{dt} = l_{10}[K_1][E_2] - (l_{11} + l_{12})[K_1E_2],$$

$$\frac{d[E_2]}{dt} = (l_8 + l_9)[KE_2] - l_7[K][E_2] + (l_{11} + l_{12})[K_1E_2] - l_{10}[K_1][E_2],$$

$$\frac{d[E_1]}{dt} = (l_2 + l_3)[K_0E_1] - l_1[K_0][E_1] + (l_5 + l_6)[K_1E_1] - l_4[K_1][E_1]$$

Las 5 cantidades conservadas son:

$$E_{1tot} = [E_1] + [K_0E_1] + [K_1E_1]$$

$$E_{2tot} = [E_2] + [KE_2] + [K_1E_2]$$

$$K_{tot} = [K] + [AK] + [A_p K] + [K_0] + [K_0 E_1] + [K_1] + [K_1 E_1] + [KE_2] + [K_1 E_2]$$

$$A_{tot} = [A] + [AK] + [A_p] + [A_p K] + [A_{pp}] + [A_{pp} P] + [A_p P]$$

$$P_{tot} = [P] + [A_p P] + [A_{pp} P]$$

Definimos X tal que $\frac{dX}{dt} = \frac{d[K]}{dt} + \frac{d[AK]}{dt} + \frac{d[A_p K]}{dt}$. Los últimos dos términos son cero, siguiendo las aproximación cuasi-estacionaria. Tomando la ecuación diferencial para K , se puede reescribir como:

$$\frac{d[K]}{dt} = -\frac{d[AK]}{dt} - \frac{d[A_p K]}{dt} + l_6[K_1 E_1] - l_7[K][E_2] + l_8[KE_2] + l_9[KE_2] - l_9[KE_2]$$

Los últimos dos términos son auxiliares. La sección $-l_7[K][E_2] + l_8[KE_2] + l_9[KE_2]$ es igual a $-\frac{d[KE_2]}{dt}$ (cuasi-estacionario). Todo junto, obtenemos para X :

$$\frac{dX}{dt} = l_6[K_1 E_1] - l_9[KE_2]$$

En la aproximación cuasi-estacionaria, las ecuaciones diferenciales para los complejos intermedios del primer nivel son iguales a cero, lo que lleva a:

$$[K_0 E_1] = d_1 [K_0][E_1],$$

$$[K_1 E_1] = d_2 [K_1][E_1],$$

$$[KE_2] = d_3 [K][E_2],$$

$$[K_1 E_2] = d_4 [K_1][E_2].$$

Donde $d_1 = \frac{l_1}{l_2 + l_3}$, $d_2 = \frac{l_4}{l_5 + l_6}$, $d_3 = \frac{l_7}{l_8 + l_9}$ y $d_4 = \frac{l_{10}}{l_{11} + l_{12}}$. De la conservación de las enzimas del primer nivel (E_{1tot} y E_{2tot}), se puede escribir:

$$[E_1] = \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]}.$$

$$[E_2] = \frac{E_{2tot}}{1 + d_3 [K] + d_4 [K_1]}.$$

La ecuación diferencial para X es ahora:

$$\frac{dX}{dt} = l_6 d_2 [K_1] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]} - l_9 d_3 [K] \frac{E_{2tot}}{1 + d_3 [K] + d_4 [K_1]}$$

Para los complejos intermedios del segundo nivel y aplicando cuasi-estacionario, tenemos $[AK] = c_1 [A][K]$ y $[A_p K] = c_2 [A_p][K]$. Así:

$$[K] = \frac{X}{1 + c_1 [A] + c_2 [A_p]}$$

Llamamos $Z = c_1[A] + c_2[A_p]$, que es la función de acople de las variables del segundo nivel.

Esto nos permite reemplazar K en la ecuación para X :

$$\frac{dX}{dt} = l_6 d_2 [K_1] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]} - l_9 d_3 X \frac{E_{2tot}}{(1 + Z)(1 + d_4 [K_1]) + d_3 X}$$

Aplicamos un procedimiento similar a $\frac{d[K_0]}{dt} = l_2 [K_0 E_1] - l_1 [K_0] [E_1] + l_{12} [K_1 E_2]$, donde sumar $+l_3 [K_0 E_1] - l_3 [K_0 E_1]$ lleva a $-\frac{d[K_0 E_1]}{dt}$, que es cero. Así:

$$\begin{aligned} \frac{d[K_0]}{dt} &= l_{12} [K_1 E_2] - l_3 [K_0 E_1] \\ &= l_{12} d_4 [K_1] \frac{E_{2tot}}{1 + d_3 \frac{X}{1 + Z} + d_4 [K_1]} - l_3 d_1 [K_0] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]}. \end{aligned}$$

Se aplicaron pasos similares al segundo nivel, llegando a dos ecuaciones diferenciales para A y A_{pp} .

Resumiendo:

$$Z = c_1[A] + c_2[A_p]$$

$$[K] = \frac{X}{1 + Z}$$

Las cuatro ecuaciones diferenciales:

$$\frac{d[K_0]}{dt} = l_{12} d_4 [K_1] \frac{E_{2tot}}{1 + d_3 \frac{X}{1 + Z} + d_4 [K_1]} - l_3 d_1 [K_0] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]}$$

$$\frac{dX}{dt} = l_6 d_2 [K_1] \frac{E_{1tot}}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]} - l_9 d_3 X \frac{E_{2tot}}{(1 + Z)(1 + d_4 [K_1]) + d_3 X}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{12} c_4 [A_p] \frac{P_{tot}}{1 + c_3 [A_{pp}] + c_4 [A_p]} - k_3 c_1 [A] \frac{X}{1 + Z}$$

$$\frac{d[A_{pp}]}{dt} = k_6 c_2 [A_p] \frac{X}{1 + Z} - k_9 c_3 [A_{pp}] \frac{P_{tot}}{1 + c_3 [A_{pp}] + c_4 [A_p]}$$

Las dos ecuaciones de conservación:

$$K_{tot} = [K_0] + [K_1] + X + E_{1tot} \frac{d_1 [K_0] + d_2 [K_1]}{1 + d_1 [K_0] + d_2 [K_1]} + E_{2tot} \frac{d_3 [K] + d_4 [K_1]}{1 + d_3 [K] + d_4 [K_1]}$$

$$A_{tot} = [A] + [A_p] + [A_{pp}] + X \frac{c_1 [A] + c_2 [A_p]}{1 + c_1 [A] + c_2 [A_p]} + P_{tot} \frac{c_3 [A_{pp}] + c_4 [A_p]}{1 + c_3 [A_{pp}] + c_4 [A_p]}$$

Valores de parámetros para el modelo 2 + 2

En el primer nivel, cada constante de velocidad es igual a 1 excepto: $l_1 = 8$, $l_6 = 50$.

En el segundo nivel, cada constante de velocidad es igual a 1 excepto: $k_1 = 8$, $k_3 = 0.1$, $k_6 = 50$.

Las cantidades conservadas son $E_{2tot} = 1$, $K_{tot} = 17$, $A_{tot} = 40$, $P_{tot} = 2.8$.

El input E_{1tot} es cambiado e informado en cada resultado.

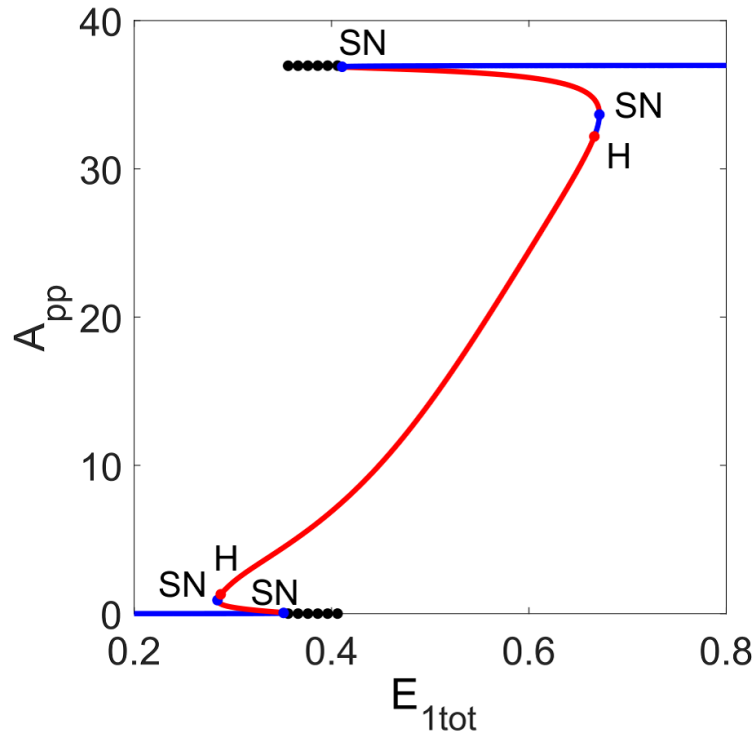


Figura S3.2

Diagrama de bifurcaciones 1D para el modelo 2 + 2 con la cantidad total E_{1tot} como el parámetro, y el sustrato doblemente fosforilado como el *output*. Estados estacionarios estables en azul, inestables en rojo, máximos y mínimos de los ciclos límite en círculos negros. Bifurcaciones *Saddle-Node* (SN) en puntos azules. Rangos muy pequeños de input con oscilaciones son obtenidos a partir de las bifurcaciones de Hopf (H), que no tomamos en cuenta en nuestros resultados.

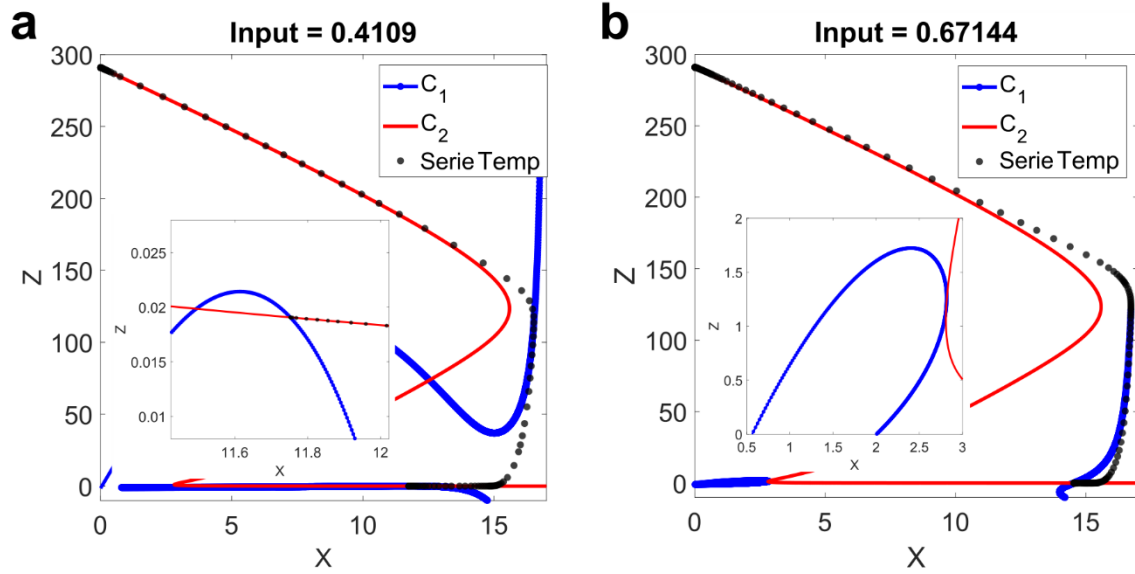


Figura S3.3

Pseudo-nulclinas C_1 (en azul) y C_2 (en rojo) para dos valores distintos de input, con sus correspondientes series temporales (en negro). **a:** Input = 0.4109, tres intersecciones, con la serie temporal que termina para el menor valor de Z (el mayor de A_{pp}). **b:** Input = 0.67144, una tangencia tiene lugar entre las curvas, para la última bifurcación SN del sistema completo.

Apéndice: Capítulo 4

Figuras Suplementarias

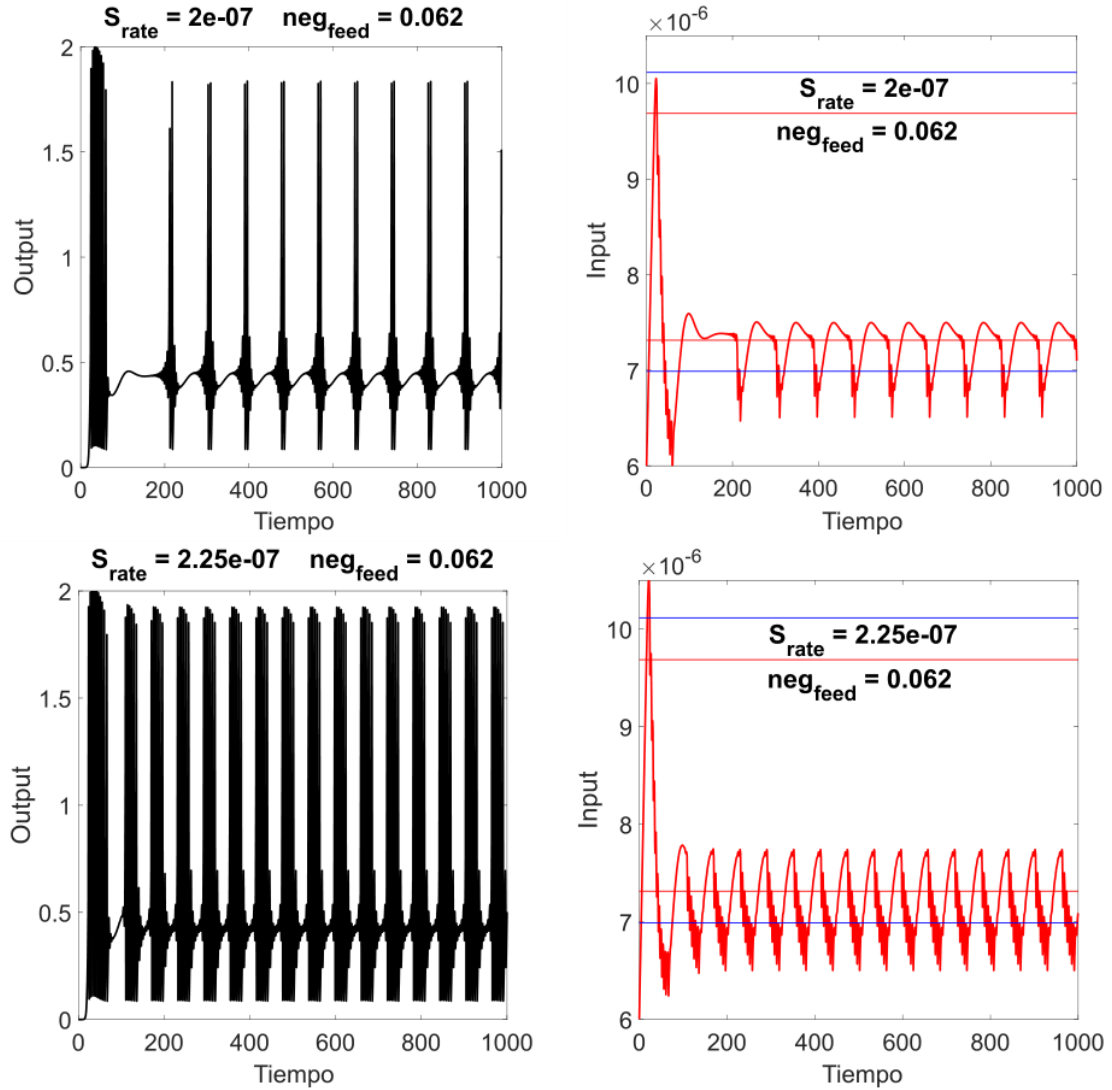


Figura S4.1

Bursting sostenido en la cascada MAPK alrededor de la bifurcación de Hopf en la izquierda de la Fig. 4.1b, fijando neg_{feed} y aumentando S_{rate} . Arriba a la izquierda: *bursting* sostenido en el *output*; arriba a la derecha: la serie correspondiente del *input*, cruzando la Hopf (línea roja) y LPC (línea azul). Abajo izquierda y derecha: *bursting* sostenido en el *output* luego de aumentar la tasa de producción, y la serie del *input*, mostrando el efecto opuesto al aumento en el parámetro de *feedback* negativo: mayor cantidad de picos por *burst*.

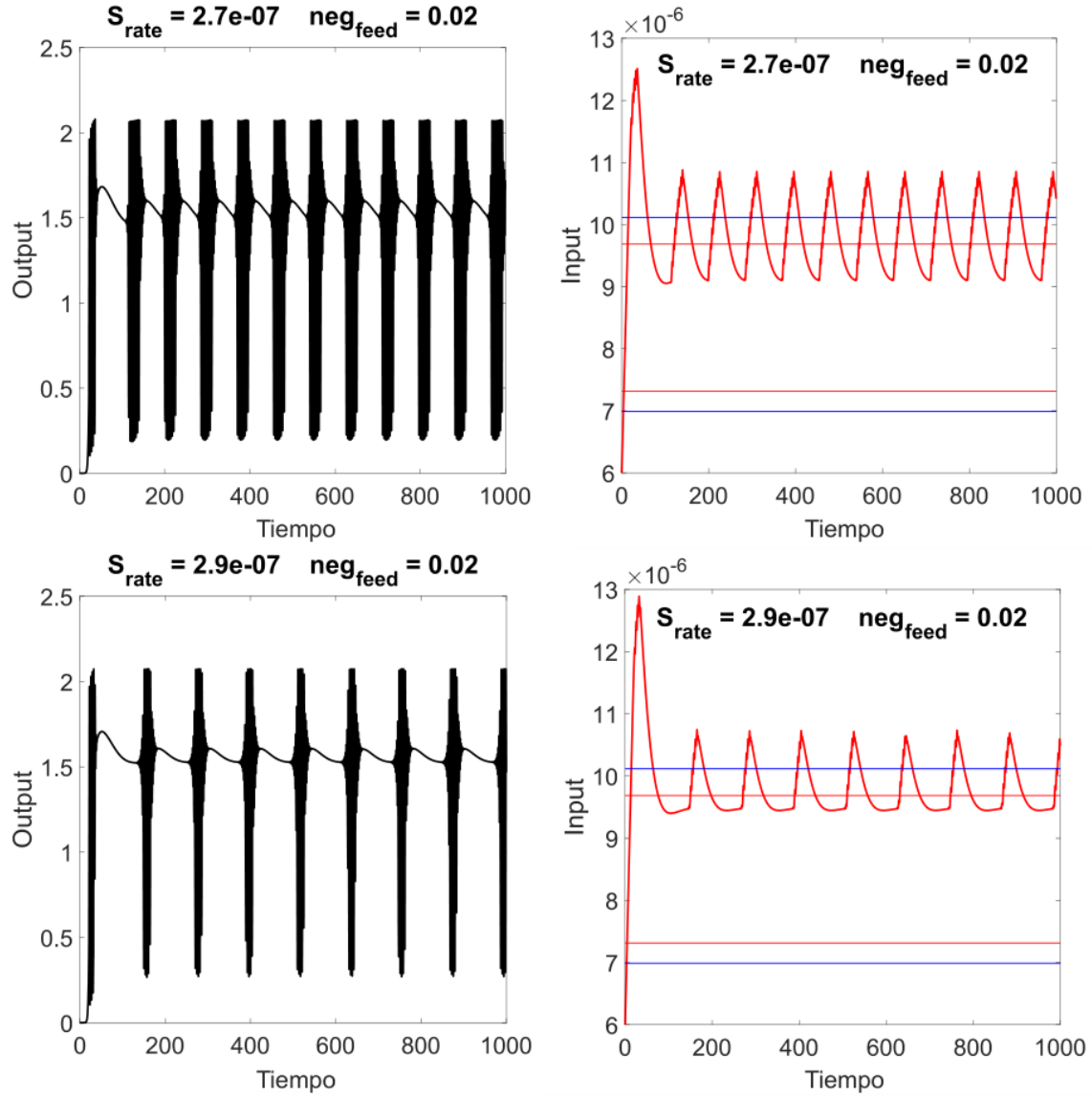


Figura S4.2

Bursting sostenido en la cascada MAPK alrededor de la bifurcación de Hopf en la derecha de la Fig. 4.1b. Arriba a la izquierda: *bursting* sostenido en el *output*; arriba a la derecha: la serie correspondiente del *input*, cruzando la Hopf (línea roja) y LPC (línea azul). Abajo izquierda y derecha: *bursting* sostenido en el *output* luego de aumentar la tasa de producción, y la serie del *input*, mostrando el efecto opuesto al aumento del mismo parámetro alrededor de la bifurcación de la izquierda: menor cantidad de picos por *burst*.

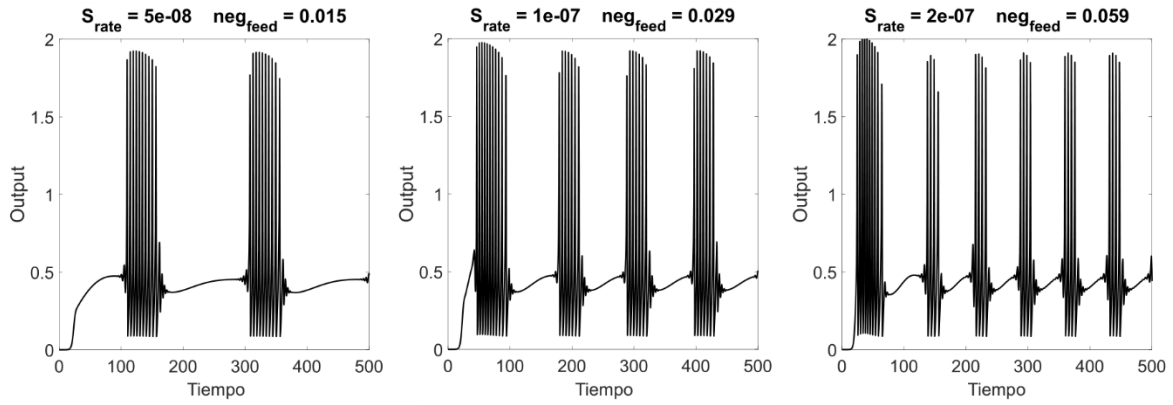


Figura S4.3

Balance en los valores de parámetros mantiene el *output* en *bursting* y cambia la frecuencia del comportamiento, alrededor de la bifurcación de la izquierda de la Fig. 4.1b. De izquierda a derecha, los valores de parámetros en la ecuación del *input* crecen, y también aumenta la frecuencia. Notar el valor de output durante la fase silenciosa: menor que para la figura correspondiente alrededor de la bifurcación a la derecha (Fig. 4.2), consistente con el estado estacionario de menor valor en el diagrama de bifurcaciones unidimensional.

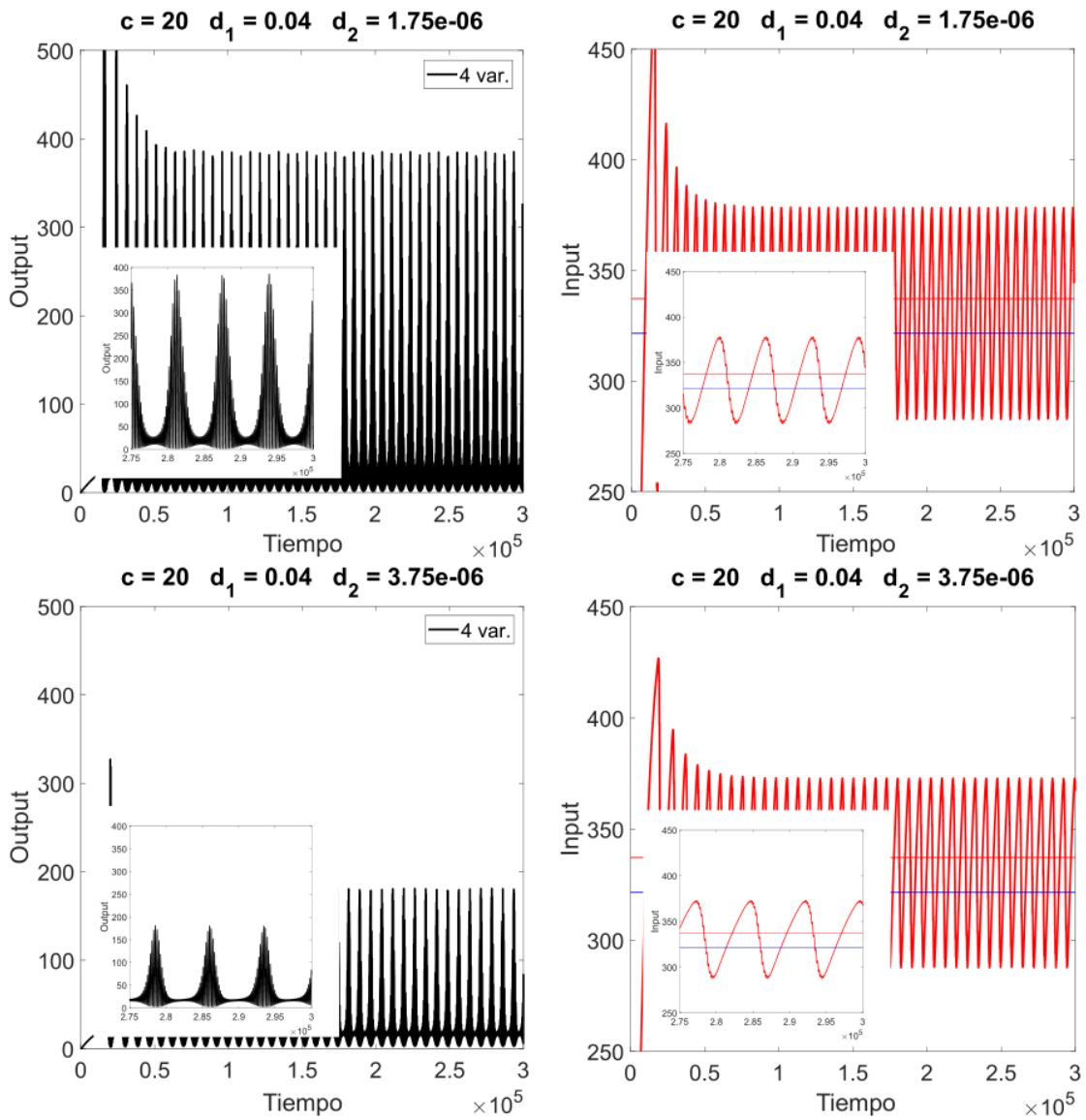


Figura S4.4

Bursting en una versión modificada de la cascada Goodwin, comparando diferentes valores para d_2 . Arriba, izquierda y derecha: *bursting* sostenido en el *output*, obtenido para un par de valores de los parámetros en la ecuación del *input*, y la correspondiente serie temporal para el *input*, que cual cruza la bifurcación de Hopf (línea roja horizontal) y LPC (línea azul). Abajo, izquierda y derecha: *bursting* sostenido en el *output* luego de aumentar el parámetro de *feedback* negativo, y la serie del *input*, mostrando un cambio similar en el número de picos por *burst* y duración de la fase silenciosa cuando se compara con los resultados luego de disminuir la tasa de producción del *input*.

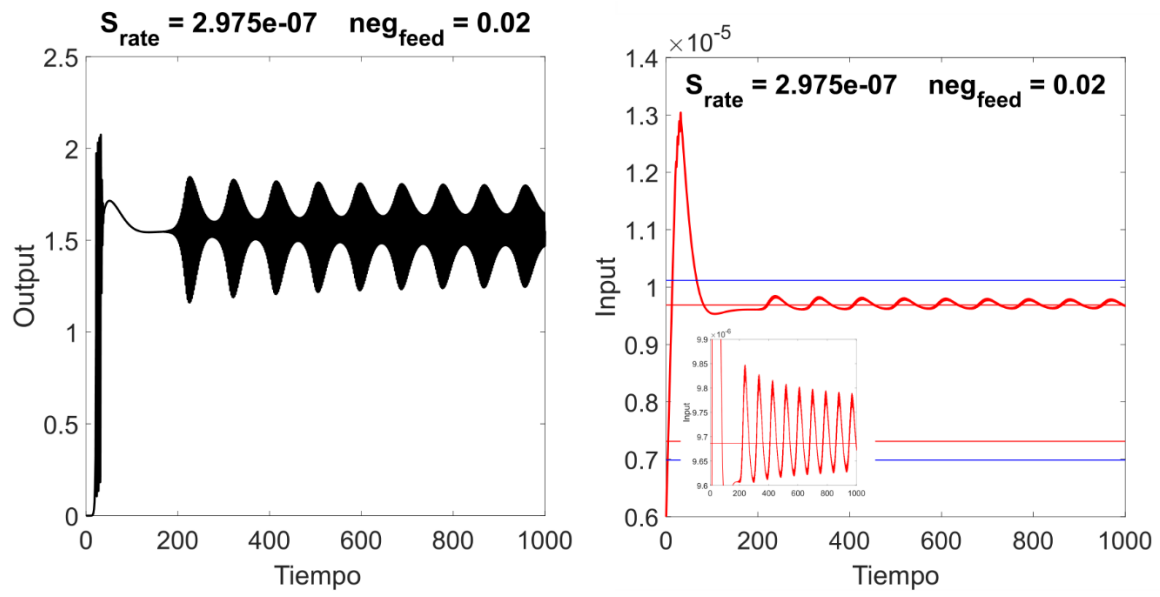


Figura S4.5

Comportamiento de *bursting* en la cascada MAPK, para un set de parámetros donde el sistema está cerca de oscilaciones sostenidas. Notar la amplitud considerablemente menor del *output*, comparado con resultados previos en el modelo MAPK.

Referencias

- [1] G. Dupont, L. Combettes, G. S. Bird, and J. W. Putney, "Calcium Oscillations," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 3, pp. a004226–a004226, Mar. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004226.
- [2] K. Eckel-Mahan and P. Sassone-Corsi, "Metabolism and the circadian clock converge," *Physiol Rev*, 2013, doi: 10.1152/physrev.00016.2012.
- [3] T. Y. C. Tsai, S. C. Yoon, W. Ma, J. R. Pomeroy, C. Tang, and J. E. Ferrell, "Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops," *Science (1979)*, vol. 321, no. 5885, pp. 126–129, 2008, doi: 10.1126/science.1156951.
- [4] C. Soulé, "Graphic Requirements for Multistationarity," *ComPlexUs*, vol. 1, no. 3, pp. 123–133, 2003, doi: 10.1159/000076100.
- [5] E. Feliu and C. Wiuf, "Finding the positive feedback loops underlying multi-stationarity.," *BMC Syst Biol*, vol. 9, no. 1, p. 22, 2015, doi: 10.1186/s12918-015-0164-0.
- [6] E. M. Izhikevich, *Dynamical Systems in Neuroscience*. The MIT Press, 2006. doi: 10.7551/mitpress/2526.001.0001.
- [7] A. Doncic *et al.*, "Compartmentalization of a Bistable Switch Enables Memory to Cross a Feedback-Driven Transition," *Cell*, vol. 160, no. 6, pp. 1182–1195, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.02.032.
- [8] B. Novák and J. J. Tyson, "Design principles of biochemical oscillators," 2008. doi: 10.1038/nrm2530.
- [9] L. Qiao, R. B. Nachbar, I. G. Kevrekidis, and S. Y. Shvartsman, "Bistability and Oscillations in the Huang-Ferrell Model of MAPK Signaling," *PLoS Comput Biol*, vol. 3, no. 9, pp. 1819–1826, 2007, doi: 10.1371/journal.pcbi.0030184.
- [10] N. I. Markevich, J. B. Hoek, and B. N. Kholodenko, "Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades," *Journal of Cell Biology*, vol. 164, no. 3, pp. 353–359, 2004, doi: 10.1083/jcb.200308060.
- [11] E. Feliu and C. Wiuf, "Enzyme-sharing as a cause of multi-stationarity in signalling systems," *J R Soc Interface*, vol. 9, no. 71, pp. 1224–1232, 2012, doi: 10.1098/rsif.2011.0664.
- [12] C. Y. F. Huang and J. E. Ferrell, "Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 19, pp. 10078–10083, 1996, doi: 10.1073/pnas.93.19.10078.
- [13] J. A. Sepulchre and A. C. Ventura, "Intrinsic Feedbacks in MAPK Signaling Cascades Lead to Bistability and Oscillations," *Acta Biotheor*, vol. 61, no. 1, pp. 59–78, 2013, doi: 10.1007/s10441-013-9177-5.
- [14] M. Kochańczyk *et al.*, "Relaxation oscillations and hierarchy of feedbacks in MAPK signaling," *Sci Rep*, vol. 7, no. January, p. 38244, 2017, doi: 10.1038/srep38244.
- [15] T. S. Lewis, P. S. Shapiro, and N. G. Ahn, "Signal transduction through MAP kinase cascades," *Adv Cancer Res*, vol. 74, 1998, doi: 10.1016/s0065-230x(08)60765-4.

- [16] A. von Kriegsheim *et al.*, “Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome,” *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 12, pp. 1458–1464, Dec. 2009, doi: 10.1038/ncb1994.
- [17] H. J. Schaeffer and M. J. Weber, “Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers,” *Mol Cell Biol*, vol. 19, no. 4, 1999, doi: 10.1128/mcb.19.4.2435.
- [18] B. C. Goodwin, “Oscillatory behavior in enzymatic control processes,” *Adv Enzyme Regul*, vol. 3, no. C, pp. 425–438, 1965, doi: 10.1016/0065-2571(65)90067-1.
- [19] J. E. Ferrell, “How regulated protein translocation can produce switch-like responses,” *Trends Biochem Sci*, vol. 23, no. 12, pp. 461–465, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0968-0004(98)01316-4.
- [20] A. Stanoev *et al.*, “Interdependence between EGFR and Phosphatases Spatially Established by Vesicular Dynamics Generates a Growth Factor Sensing and Responding Network,” *Cell Syst*, vol. 7, no. 3, pp. 295–309.e11, 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.06.006.
- [21] A. Goldbeter and D. E. Koshland, “An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78, no. 11, pp. 6840–6844, 1981, doi: 10.1073/pnas.78.11.6840.
- [22] H. A. Harrington, E. Feliu, C. Wiuf, and M. P. H. Stumpf, “Cellular compartments cause multistability and allow cells to process more information,” *Biophys J*, vol. 104, no. 8, pp. 1824–1831, 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2013.02.028.
- [23] J. E. Ferrell *et al.*, “Simple, realistic models of complex biological processes: Positive feedback and bistability in a cell fate switch and a cell cycle oscillator,” 2009. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.068.
- [24] J. E. Ferrell and S. H. Ha, “Ultrasensitivity part III: Cascades, bistable switches, and oscillators,” *Trends Biochem Sci*, vol. 39, no. 12, pp. 612–618, 2014, doi: 10.1016/j.tibs.2014.10.002.
- [25] F. Jacob and J. Monod, “Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins,” 1961. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80072-7.
- [26] M. A. Savageau, “Design principles for elementary gene circuits: Elements, methods, and examples,” *Chaos*, vol. 11, no. 1, pp. 142–159, 2001, doi: 10.1063/1.1349892.
- [27] S. Marino, I. B. Hogue, C. J. Ray, and D. E. Kirschner, “A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology,” *J Theor Biol*, vol. 254, no. 1, pp. 178–196, 2008, doi: 10.1016/j.jtbi.2008.04.011.
- [28] K. Baum, A. Z. Politi, B. Kofahl, R. Steuer, and J. Wolf, “Feedback, Mass Conservation and Reaction Kinetics Impact the Robustness of Cellular Oscillations,” *PLoS Comput Biol*, vol. 12, no. 12, p. e1005298, 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005298.
- [29] D. Görlich and U. Kutay, “Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm,” *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 15, no. 1, pp. 607–660, 1999, doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.607.

- [30] C. Pantea, H. Koepl, and G. Craciun, “Global injectivity and multiple equilibria in uni- and bi-molecular reaction networks,” *Discrete Continuous Dyn Syst Ser B*, vol. 17, no. 6, pp. 2153–2170, May 2012, doi: 10.3934/dcdsb.2012.17.2153.
- [31] C. Chen, J. Cui, H. Lu, R. Wang, S. Zhang, and P. Shen, “Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision,” *Biophys J*, vol. 92, no. 12, pp. 4304–4315, 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.099606.
- [32] M. D. McKay, R. J. Beckman, and W. J. Conover, “Comparison of Three Methods for Selecting Values of Input Variables in the Analysis of Output from a Computer Code,” *Technometrics*, vol. 21, no. 2, pp. 239–245, 1979, doi: 10.1080/00401706.1979.10489755.
- [33] H. Martín, M. Flández, C. Nombela, and M. Molina, “Protein phosphatases in MAPK signalling: We keep learning from yeast,” *Mol Microbiol*, vol. 58, no. 1, pp. 6–16, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04822.x.
- [34] A. W. T. Chiang, W. C. Liu, P. Charusanti, and M. J. Hwang, “Understanding system dynamics of an adaptive enzyme network from globally profiled kinetic parameters,” *BMC Syst Biol*, vol. 8, no. 1, 2014, doi: 10.1186/1752-0509-8-4.
- [35] F. Wilcoxon, “Individual comparisons of grouped data by ranking methods.,” *J Econ Entomol*, vol. 39, p. 269, 1946, doi: 10.1093/jee/39.2.269.
- [36] A. Dhooge, W. Govaerts, and Y. A. Kuznetsov, “MATCONT: A MATLAB package for numerical bifurcation analysis of ODEs,” *ACM Transactions on Mathematical Software*, vol. 29, no. 2, pp. 141–164, 2003, doi: 10.1145/779359.779362.
- [37] J. Rombouts and L. Gelens, “Synchronizing an oscillatory medium: The speed of pacemaker-generated waves,” *Phys Rev Res*, vol. 2, no. 4, p. 043038, 2020, doi: 10.1103/PhysRevResearch.2.043038.
- [38] J. J. Tyson, “Biochemical Oscillations,” in *Computational Cell Biology. Interdisciplinary Applied Mathematics*, C. P. Fall, E. S. Marland, J. M. Wagner, and J. J. Tyson, Eds., New York, NY: Springer, 2002, pp. 230–260. doi: 10.1007/978-0-387-22459-6_9.
- [39] U. Alon, *An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits*. Chapman & Hall, 2006.
- [40] J. L. Gouzé, “Positive and negative circuits in dynamical systems,” *J Biol Syst*, vol. 6, no. 1, pp. 11–15, 1998, doi: 10.1142/S0218339098000054.
- [41] M. C. Mackey and L. Glass, “Oscillation and chaos in physiological control systems,” *Science (1979)*, vol. 197, no. 4300, pp. 287–289, 1977, doi: 10.1126/science.267326.
- [42] X. J. Tian, X. P. Zhang, F. Liu, and W. Wang, “Interlinking positive and negative feedback loops creates a tunable motif in gene regulatory networks,” *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 80, no. 1, p. 011926, 2009, doi: 10.1103/PhysRevE.80.011926.
- [43] A. Bel, A. Torresi, and H. G. Rotstein, “Inhibition-based relaxation oscillations emerge in resonator networks,” *Math Model Nat Phenom*, vol. 14, no. 4, p. 405, 2019, doi: 10.1051/mmnp/2019019.

- [44] L. Ribar and R. Sepulchre, “Neuromorphic Control: Designing Multiscale Mixed-Feedback Systems,” *IEEE Control Syst*, vol. 41, no. 6, pp. 34–63, 2021, doi: 10.1109/MCS.2021.3107560.
- [45] L. S. Wang, N. X. Li, J. J. Chen, X. P. Zhang, F. Liu, and W. Wang, “Modulation of dynamic modes by interplay between positive and negative feedback loops in gene regulatory networks,” *Phys Rev E*, vol. 97, no. 4, p. 042412, 2018, doi: 10.1103/PhysRevE.97.042412.
- [46] T. Y. C. Tsai, J. A. Theriot, and J. E. Ferrell, “Changes in Oscillatory Dynamics in the Cell Cycle of Early *Xenopus laevis* Embryos,” *PLoS Biol*, vol. 12, no. 2, p. e1001788, 2014, doi: 10.1371/journal.pbio.1001788.
- [47] G. Mönke *et al.*, “Excitability in the p53 network mediates robust signaling with tunable activation thresholds in single cells,” *Sci Rep*, vol. 7, p. 46571, 2017, doi: 10.1038/srep46571.
- [48] K. B. Wee, U. Surana, and B. D. Aguda, “Oscillations of the p53-Akt network: Implications on cell survival and death,” *PLoS One*, vol. 4, no. 2, p. e4407, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004407.
- [49] B. Pfeuty and K. Kaneko, “The combination of positive and negative feedback loops confers exquisite flexibility to biochemical switches,” *Phys Biol*, vol. 6, no. 4, p. 046013, 2009, doi: 10.1088/1478-3975/6/4/046013.
- [50] B. Ananthasubramaniam and H. Herzel, “Positive feedback promotes oscillations in negative feedback loops,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e104761, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0104761.
- [51] A. L. Hodgkin, “The local electric changes associated with repetitive action in a non-medullated axon,” *J Physiol*, vol. 107, no. 2, pp. 165–181, 1948, doi: 10.1113/jphysiol.1948.sp004260.
- [52] J. Rinzel and G. B. Ermentrout, “Analysis of neural excitability and oscillations,” in *Methods in Neuronal Modeling: From Ions to Networks*, C. Koch and I. Segev, Eds., MIT Press, 1998, pp. 251–292. [Online]. Available: <http://mitpress.mit.edu/books/methods-neuronal-modeling>
- [53] P. Liu, I. G. Kevrekidis, and S. Y. Shvartsman, “Substrate-dependent control of ERK phosphorylation can lead to oscillations,” *Biophys J*, vol. 101, no. 11, pp. 2572–2581, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.025.
- [54] T. Suwanmajo and J. Krishnan, “Exploring the intrinsic behaviour of multisite phosphorylation systems as part of signalling pathways,” *J R Soc Interface*, vol. 15, no. 143, p. 20180109, 2018, doi: 10.1098/rsif.2018.0109.
- [55] R. Guantes and J. F. Poyatos, “Dynamical principles of two-component genetic oscillators,” *PLoS Comput Biol*, vol. 2, no. 3, pp. 188–197, 2006, doi: 10.1371/journal.pcbi.0020030.
- [56] A. C. Ventura, J. A. Sepulchre, and S. D. Merajver, “A hidden feedback in signaling cascades is revealed,” *PLoS Comput Biol*, vol. 4, no. 3, p. e1000041, 2008, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000041.

- [57] S. H. Strogatz, *Nonlinear Dynamics and Chaos*. Chapman & Hall, 2018. doi: 10.1201/9780429492563.
- [58] J. A. Sepulchre and A. C. Ventura, “Intrinsic Feedbacks in MAPK Signaling Cascades Lead to Bistability and Oscillations,” *Acta Biotheor*, vol. 61, no. 1, pp. 59–78, 2013, doi: 10.1007/s10441-013-9177-5.
- [59] A. Sensse and M. Eiswirth, “Feedback loops for chaos in activator-inhibitor systems,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 122, no. 4, p. 044516, 2005, doi: 10.1063/1.1840511.
- [60] S. Krishna, S. Semsey, and M. H. Jensen, “Frustrated bistability as a means to engineer oscillations in biological systems,” *Phys Biol*, vol. 6, no. 3, p. 036009, 2009, doi: 10.1088/1478-3975/6/3/036009.
- [61] T. M. Varusai, W. Kolch, B. N. Kholodenko, and L. K. Nguyen, “Protein-protein interactions generate hidden feedback and feed-forward loops to trigger bistable switches, oscillations and biphasic dose-responses,” *Mol Biosyst*, vol. 11, no. 10, pp. 2750–2762, 2015, doi: 10.1039/c5mb00385g.
- [62] D. Del Vecchio, A. J. Ninfa, and E. D. Sontag, “Modular cell biology: Retroactivity and insulation,” *Mol Syst Biol*, vol. 4, no. 161, p. 161, 2008, doi: 10.1038/msb4100204.
- [63] N. Blüthgen, F. J. Bruggeman, S. Legewie, H. Herzel, H. V. Westerhoff, and B. N. Kholodenko, “Effects of sequestration on signal transduction cascades,” *FEBS Journal*, vol. 273, no. 5, pp. 895–906, 2006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05105.x.
- [64] G. Menon and J. Krishnan, “Bridging the gap between modules in isolation and as part of networks: A systems framework for elucidating interaction and regulation of signalling modules,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 145, no. 3, p. 035103, 2016, doi: 10.1063/1.4953914.
- [65] P. Jiang, A. C. Ventura, E. D. Sontag, S. D. Merajver, A. J. Ninfa, and D. Del Vecchio, “Load-induced modulation of signal transduction networks,” *Sci Signal*, vol. 4, no. 194, p. ra67, 2011, doi: 10.1126/scisignal.2002152.
- [66] M. L. Wynn, A. C. Ventura, J. A. Sepulchre, H. J. García, and S. D. Merajver, “Kinase inhibitors can produce off-target effects and activate linked pathways by retroactivity,” *BMC Syst Biol*, vol. 5, no. 1, p. 156, 2011, doi: 10.1186/1752-0509-5-156.
- [67] C. Bosia *et al.*, “RNAs competing for microRNAs mutually influence their fluctuations in a highly non-linear microRNA-dependent manner in single cells,” *Genome Biol*, vol. 18, no. 1, p. 37, 2017, doi: 10.1186/s13059-017-1162-x.
- [68] R. Karmakar, “Two different modes of oscillation in a gene transcription regulatory network with interlinked positive and negative feedback loops,” *International Journal of Modern Physics C*, vol. 27, no. 5, p. 1650056, 2016, doi: 10.1142/S012918311650056X.
- [69] L. K. Nguyen, A. Degasperi, P. Cotter, and B. N. Kholodenko, “DYVIPAC: An integrated analysis and visualisation framework to probe multi-dimensional biological networks,” *Sci Rep*, vol. 5, p. 12569, 2015, doi: 10.1038/srep12569.
- [70] J. E. Ferrell, *Systems Biology of Cell Signaling: Recurring Themes and Quantitative Models*. Boca Raton: Garland Science, 2021. doi: 10.1201/9781003124269.

- [71] L. K. Nguyen, J. Muñoz-García, H. Maccario, A. Ciechanover, W. Kolch, and B. N. Kholodenko, “Switches, excitable responses and oscillations in the ring1B/Bmi1 ubiquitination system,” *PLoS Comput Biol*, vol. 7, no. 12, p. e1002317, 2011, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002317.
- [72] L. K. Nguyen, Q. Zhao, T. M. Varusai, and B. N. Kholodenko, “Ubiquitin chain specific auto-ubiquitination triggers sustained oscillation, bistable switches and excitable firing,” *IET Syst Biol*, vol. 8, no. 6, pp. 282–292, 2014, doi: 10.1049/iet-syb.2014.0024.
- [73] M. Tigges, N. Déneraud, D. Greber, J. Stelling, and M. Fussenegger, “A synthetic low-frequency mammalian oscillator,” *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. 8, pp. 2702–2711, 2010, doi: 10.1093/nar/gkq121.
- [74] D. Tenenbaum, J. I. Marrone, H. E. Grecco, and A. C. Ventura, “Robustness in spatially driven bistability in signaling systems,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 5591, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62412-1.
- [75] R. Perez-Carrasco, C. P. Barnes, Y. Schaerli, M. Isalan, J. Briscoe, and K. M. Page, “Combining a Toggle Switch and a Repressilator within the AC-DC Circuit Generates Distinct Dynamical Behaviors,” *Cell Syst*, vol. 6, no. 4, pp. 521–530.e3, 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.02.008.
- [76] M. Jin, F. Tavella, S. Wang, and Q. Yang, “In vitro cell cycle oscillations exhibit a robust and hysteretic response to changes in cytoplasmic density,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 119, no. 6, p. e2109547119, 2022, doi: 10.1073/pnas.2109547119.
- [77] R. FitzHugh, “Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane,” *Biophys J*, vol. 1, no. 6, 1961, doi: 10.1016/S0006-3495(61)86902-6.
- [78] J. J. Tyson and B. Novák, “Time-keeping and decision-making in the cell cycle,” 2022. doi: 10.1098/rsfs.2021.0075.
- [79] D. Angeli, J. E. Ferrell, and E. D. Sontag, “Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 7, 2004, doi: 10.1073/pnas.0308265100.
- [80] J. de Boeck, J. Rombouts, and L. Gelens, “A modular approach for modeling the cell cycle based on functional response curves,” *PLoS Comput Biol*, vol. 17, no. 8, 2021, doi: 10.1371/journal.pcbi.1009008.
- [81] P. Parra-Rivas, D. Ruiz-Reynés, and L. Gelens, “Cell cycle oscillations driven by two interlinked bistable switches,” *Mol Biol Cell*, vol. 34, no. 6, 2023, doi: 10.1091/mbc.E22-11-0527.
- [82] P. Kraikivski, K. C. Chen, T. Laomettachit, T. M. Murali, and J. J. Tyson, “From START to FINISH: Computational analysis of cell cycle control in budding yeast,” *NPJ Syst Biol Appl*, vol. 1, 2015, doi: 10.1038/npjbsa.2015.16.
- [83] J. G. Albeck, G. B. Mills, and J. S. Brugge, “Frequency-Modulated Pulses of ERK Activity Transmit Quantitative Proliferation Signals,” *Mol Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 249–261, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.002.

- [84] T. Mitra, S. N. Menon, and S. Sinha, “Emergent memory in cell signaling: Persistent adaptive dynamics in cascades can arise from the diversity of relaxation time-scales,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 13230, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31626-9.
- [85] E. M. Izhikevich, “Neural excitability, spiking and bursting,” *International Journal of Bifurcation and Chaos*, vol. 10, no. 06, pp. 1171–1266, Jun. 2000, doi: 10.1142/S0218127400000840.
- [86] M. Desroches, J. Rinzel, and S. Rodrigues, “Classification of bursting patterns: A tale of two ducks,” *PLoS Comput Biol*, vol. 18, no. 2, p. e1009752, Feb. 2022, doi: 10.1371/journal.pcbi.1009752.
- [87] R. D. Bliss, P. R. Painter, and A. G. Marr, “Role of feedback inhibition in stabilizing the classical operon,” *J Theor Biol*, vol. 97, no. 2, pp. 177–193, Jul. 1982, doi: 10.1016/0022-5193(82)90098-4.
- [88] X. Han, F. Xia, P. Ji, Q. Bi, and J. Kurths, “Hopf-bifurcation-delay-induced bursting patterns in a modified circuit system,” *Commun Nonlinear Sci Numer Simul*, vol. 36, pp. 517–527, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.cnsns.2016.01.001.
- [89] A. Chowdhury, M. G. Clerc, S. Barbay, I. Robert-Philip, and R. Braive, “Weak signal enhancement by nonlinear resonance control in a forced nano-electromechanical resonator,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 2400, May 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15827-3.
- [90] Y. Roongthumskul, L. Fredrickson-Hemsing, A. Kao, and D. Bozovic, “Multiple-Timescale Dynamics Underlying Spontaneous Oscillations of Saccular Hair Bundles,” *Biophys J*, vol. 101, no. 3, pp. 603–610, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.06.027.
- [91] S. Schuster, B. Knoke, and M. Marhl, “Differential regulation of proteins by bursting calcium oscillations—a theoretical study,” *Biosystems*, vol. 81, no. 1, pp. 49–63, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.biosystems.2005.02.004.
- [92] A. Cournac and J.-A. Sepulchre, “Simple molecular networks that respond optimally to time-periodic stimulation,” *BMC Syst Biol*, vol. 3, no. 1, p. 29, Dec. 2009, doi: 10.1186/1752-0509-3-29.
- [93] U. Alon, “Network motifs: theory and experimental approaches,” *Nat Rev Genet*, vol. 8, no. 6, pp. 450–461, Jun. 2007, doi: 10.1038/nrg2102.
- [94] A. Cornish-Bowden, ““Chapter 2 - Introduction to enzyme kinetics,”” in *Fundamentals of enzyme kinetics*, ed. Butterworth-Heinemann, 1979, pp. 16–38.
- [95] R. Thomas and R. D’Ari, *Biological Feedback*. Boca Raton: CRC Press, 1990. doi: 10.1201/9781003574842.