

80361
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

INSTITUTO DE QUIMICA

MODELO TEORICO PARA LA
TRANSDUCCION DE SEÑALES
CELULARES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

DAVID CAMACHO TR



DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME LAGUNEZ

COORDINACIÓN

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de febrero de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de la Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno Camacho Trujillo David, con número de cuenta 84403265, y número de expediente 3991088, con la tesis titulada: "Modelo teórico para la transcripción de señales celulares.", bajo la dirección de la Dr. Jaime Lagúñez Otero.

Presidente:	Dr. Germinal Cocho Gil
Secretario:	Dr. Jaime Lagúñez Otero
Vocal:	Dr. Edmundo Chávez Cosío
Suplente:	Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko
Suplente:	Dr. Carlos Rosales Ledezma

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de febrero de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos:

Se agradece el apoyo económico otorgado por la Dirección General de Apoyo Académico DGAPA para el trabajo de investigación "Modelo teórico para la transducción de señales celulares" desarrollado por alumno David Camacho Trujillo con número de cuenta 8440326-5 como parte del proyecto IN205800 a cargo del

Dr. Jaime Lagúnez Otero del Instituto de Química.

Mismo que fue supervisado por los Doctores

Edmundo Chávez Cosío

Vladimir Basiuk Ebdokimenko

Quienes conformaron el comité tutorial de este proyecto y me dieron todo su apoyo para la realización del mismo

Atte:

David Camacho Trujillo

TESIS MODELO TEORICO PARA LA TRANSDUCCION DE SEÑALES CELULARES.

Presentada por: David Camacho Trujillo.

Índice:

1. Introducción.
2. Información general.
 - 2.1. La biología molecular de la transducción de señales
 - 2.1.1 Modelos generales.
 - 2.1.1.1 Proteínas G
 - 2.1.1.2 Enzimas ligadas a receptores.
 - 2.1.2. Redes proteicas.
 - 2.1.2.1. Respuestas no lineales. (ejemplos).
 - 2.1.3 Bases fisicoquímicas de la transducción de señales
 - 2.1.3.1. Difusión reacción. (modelos bioquímicos)
 - 2.1.3.2 Reconocimiento proteico y fosforilación (docking)
 - 2.1.3.3 Dominios proteicos. (SH2, SH3, PH)
 - 2.1.4. Recapitulación.
 - 2.2. Plataforma bioinformática de elección. (justificación de SWARM vs. E D , pros y
contras)
 - 2.2.1. Agentes computacionales.

- 3 Materiales y Metodología para implementar un modelo de las MAPK cinasas.
 - 3.1. Materiales.
 - 3.1.1. Parámetros bioquímicos de la ruta de las mapks cinasas
 - 3.2. Equipo, código y bases de datos.
 - 3.3. Implementación del modelo de difusión reacción vía agentes computacionales.
 - 3.3.1. Programación Orientada a objetos
 - 3.3.2. Bases de computación con Swarm.
 - 3.3.3. Implementacion del espacio y la difusion
 - 3.3.4. Implementación de las especies químicas
 - 3 3.4.1 Clase INPUT.
 - 3 3.4.2.Clase MAPKK
 - 3 3.4.3.Clases MAPK y MEK
 - 3.3.5. Implementación de las herramientas de medicion
4. Resultados.
 - 4.1. Resultados cualitativos.
 - 4.1.1. Obtención de curvas estimulo respuesta.
 - 4.2. Resultados semicuantitativos
 - 4.2.1. Modelo homogéneo
 - 4.2.2. Modelo heterogénco
5. Análisis de Resultados.
6. Conclusiones
7. Bibliografía.

1 INTRODUCCIÓN

En el umbral del siglo XXI la gran cantidad de información generada por diversas investigaciones representa una oportunidad de integración conceptual en áreas como la inmunología, neurociencias, materiales inteligentes, etc. Particularmente esta integración es una necesidad en áreas como la biología molecular y la computación, las cuales tienen un crecimiento muy importante. Esto se hace evidente con los sonados resultados de proyectos como el del "genoma humano" (Human Genome Project) y la explosión en la dependencia de las computadoras para casi todas las áreas del quehacer humano.

El impresionante desarrollo de la biología molecular tiene su origen en avances tecnológicos como la utilización de la técnica PCR (polymerase chain reaction), los nuevos secuenciadores genéticos y tecnologías como los microarreglos para lectura de la expresión genética a gran escala ("microarrays"). En sí mismos, estos avances tecnológicos no representan casi ningún avance conceptual para esta área, sin embargo generan una gran cantidad de información en un lapso de tiempo hasta hace poco impensable. De forma tal, para analizar e integrar toda esta información a una estructura conceptual más amplia, ha surgido la necesidad de auxiliarse de herramientas informáticas especializadas, capaces de manejar grandes cantidades de datos en corto tiempo, flexibles, modulares, expansibles y perfeccionables.

Más aún, la modelación computacional y no solo el análisis de estos volúmenes de información de los procesos de la biología molecular, se sitúa en esta coyuntura de la biología, como un área estratégica. Casos particularmente promisorios son la simulación de la comunicación inter- e intracelular y la regulación de la expresión genética, dado que estos procesos al nivel de un organismo multicelular, pueden verse como el procesamiento de información necesario para

coordinar sus funciones superiores. Análogamente, se prestan al estudio a través de modelos informáticos, las patologías que se desprenden de los procesos bioquímicos mencionados y a mediano plazo, el sugerir posibles terapias

La transducción de señales celulares es un tema que ha despertado gran interés en la comunidad bioinformática ya que su *finalidad* de procesar la información que recibe una célula de su entorno es muy sugestiva para tratar de explicar mediante modelos informáticos de esta nueva disciplina. Debido a que los resultados experimentales del sistema de la transducción de señales celulares han demostrado ser caso específicos, y lo que aplica en una línea celular no es válido para otra e incluso para la misma bajo diferentes circunstancias, ha sido claro que este sistema presenta un comportamiento no lineal. Esto ha motivado aún más a la generación de diversos modelos sin que hasta ahora exista ningún consenso al respecto de cómo representar este sistema.

De esta forma existen diversos modelos que intentan explicar fracciones o el comportamiento global del sistema de transducción de señales. En términos generales se pueden dividir estos modelos en dos áreas: los basados en computación numérica y los basados en paradigmas de la inteligencia artificial. Los modelos de computación numérica son una visión tradicional que utiliza modelos matemáticos basados en ecuaciones diferenciales para representar el aspecto cinético de las proteínas citosólicas que intervienen en la transducción de señales. Estos modelos pueden verse como una representación determinista de algunos de los fenómenos físicos de que depende la transducción de señales celulares.

Los modelos basados en paradigmas de la inteligencia artificial han buscado representar el *comportamiento* global del sistema de la transducción de señales celulares y por ende sus

aproximaciones han buscado ser solo descriptivas y generalmente semicuantitativas. Al no estar basadas en los fenómenos físicos, o en otros caso no ser cuantitativas, se antojan poco fiables para la predicción del comportamiento del sistema original bajo diferentes circunstancias. Su aportación descriptiva se ve limitada debido a que las posibles respuestas que puede emitir el sistema no son demasiadas. A saber, la quiescencia, proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis y generación de líneas celulares equivocadas ya sean viables (neoplasias) o inviables.

Se ha propuesto ver a estas posibles respuestas celulares como "atractores" celulares a que puede llegar una célula dada. Bajo esta visión, el o los estímulos externos serían las perturbaciones que impulsarían el cambio de atractor celular. Esta visión no debe verse como determinista, ya que estos atractores celulares comprenden muy amplios e indeterminados conjuntos de estados celulares para cada uno de ellos. Estos conjuntos de estados implican no solo la acción de la señal externa sobre la célula blanco, sino el procesamiento contexto dependiente que hace una célula dada para lograr su *objetivo*, lo cual es característica adicional a la no linealidad, de los sistemas complejos.

Debe tomarse en cuenta que este *objetivo o finalidad* de la transducción de señales no es la de generarle autonomía a la célula, si no por el contrario, el asegurar una correcta adecuación que permita la homeostasis a diferentes niveles de organización, como lo serían los tejidos celulares, los órganos, los sistemas y en última instancia el organismo multicelular a que pertenecen dichas células. Así, la línea entre lo "determinista" de un sistema no lineal y la característica proactiva de un sistema complejo es lo que ha motivado a diversos grupos a buscar representar el comportamiento de la transducción de señales celulares mediante agentes computacionales. Estos últimos son un paradigma informático que surgió como una metodología alternativa para dar solución a sistemas proactivos.

En el presente trabajo como un primer paso, se profundizó en la información sobre las características esenciales del sistema celular a representar. De esta forma se propone una división conceptual para tratar de diferenciar entre los factores de que depende el sistema y los fenómenos que *emergen* de la interacción de estos factores. Así, y con miras a generar un modelo con validez cuantitativa, se tomaron en cuenta los fenómenos fisicoquímicos de que depende la transducción de señales celulares, y los comportamientos bioquímicos que emergen de la interacción, en diferentes niveles de los fenómenos fisicoquímicos.

Con una visión bottom up para la implementación de modelos complejos y la conceptualización anterior se consideró que el siguiente paso sería el cumplir con los denominados fenómenos emergentes observados en cinética enzimática tradicional. Lo cual presentó la ventaja de poder comparar resultados con datos experimentales como con otros modelos de computación numérica y de paradigmas de la inteligencia artificial. Por todo lo anterior se eligió la ruta de las MAPK cinasas que ha sido estudiada bajo diversas perspectivas teóricas como por diversos estudios experimentales.

Para realizar esto, se partió de una representación de la cinética enzimática a través de modelos de difusión reacción, ya que en estos estudios similares se ha concluido que además de ser posible obtener resultados más aproximados a los datos experimentales que los obtenidos por metodologías tradicionales, es posible incrementar la complejidad del modelo con una relativa facilidad, lo cual es acorde con la implementación tipo Bottom Up y los objetivos del presente trabajo

2 INFORMACIÓN GENERAL.

2.1 LA BIOLOGIA MOLECULAR DE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES

Las células en animales superiores se comunican utilizando cientos^{1,17,32} de tipos de *señales bioquímicas*; Proteínas, hormonas, derivados de ácidos grasos, gases en solución como el óxido nítrico y monóxido de carbono e incluso iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} . Estas moléculas contienen gran cantidad de información codificada en su estructura tridimensional y su distribución topológica electrostática^{26,35,36}. La mayoría de estas moléculas son secretadas desde la célula emisora vía exocitosis, y pueden actuar como mediadores locales (señales paracrinas, autócrinas y de sinapsis) o actuar a distancia utilizando el sistema circulatorio, en este caso las células emisoras se llaman endocrinas, y las moléculas secretadas hormonas.

Estas señales pueden actuar en muchos millones de combinaciones posibles^{1,44}. Y una célula dada en un organismo multicelular, debe responder a esta gigantesca cantidad de estímulos en forma selectiva, primero de acuerdo con el conjunto de *receptores* que posee, generalmente proteínas membranales. En segundo lugar de acuerdo con la *maquinaria intracelular* que posee y que la *programa* para integrar e interpretar la información que recibe de su entorno, respondiendo a un conjunto de señales diferenciándose, a otro conjunto proliferando y a otro llevando a cabo una serie de funciones específicas.

En los animales superiores, la mayoría de las células están programadas para depender de un conjunto particular de señales para su supervivencia¹. Esto es, cada grupo de células que conforman un tejido, están restringidas a ciertos "ambientes" dentro del organismo superior, donde deben recibir diferentes señales para su supervivencia

Cuando alguna(s) células son privadas de ese conjunto de señales, activan un programa suicida llamado apoptosis, para evitar mayores daños en el organismo superior.

2.1.1 MODELOS GENERALES DE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.

A continuación se describen brevemente los modelos bioquímicos generales que permitan comprender la conceptualización de la transducción de señales y los análisis posteriores. En el caso de señales solubles en medio acuoso, el punto inicial del sistema de la transducción de señales son los receptores a nivel de la membrana celular. En estos casos, se han propuesto^{1,17,32} dos modelos generales del sistema de la transducción de señales; uno de proteínas G ligadas a los receptores y otro de enzimas ligadas a los receptores.

2.1.1.1 PROTEINAS G LIGADAS A RECEPTORES

En el modelo de las proteínas G ligadas a los receptores, una molécula extracelular o ligando, se une a un receptor que se encuentra embebido en la membrana celular. Generalmente estos receptores pertenecen a los receptores tipo serpentina de siete pasos transmembranales, ya que estructuralmente son una cadena polipeptídica que atraviesa la membrana celular en siete ocasiones que exhiben asas intracelulares y extracelulares. Es en estas asas extracelulares que se lleva a cabo la unión con el ligando. lo cual provoca una serie de cambios conformacionales que le permiten interaccionar con una proteína intermediaria o transdutora llamada proteína G, a través de su región intracelular

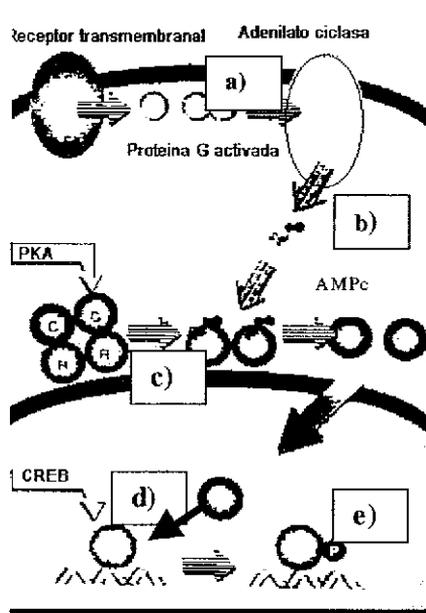
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta proteína G consiste de tres subunidades; α, β, γ y se encuentra constitutivamente unida al dominio intracelular del receptor. Su nombre se debe a su capacidad de unirse a nucleótidos de guanina, y en su conformación inactiva, guanosin difosfato (GDP) se encuentra unido a la subunidad α del trímero. Existen diferentes tipos de subunidades, pero todas las $G\alpha$ hidrolizan GTP y lo cada una lo hace en un tiempo característico. Por lo que los cambios conformacionales del receptor inducen cambios en la subunidad α del trímero disminuyendo su afinidad por el GDP, y así ocasionando su liberación. Como en el citoplasma la concentración del GTP es mucho mayor que la del GDP, rápidamente se une GTP al sitio de unión con nucleótidos vacante, de la subunidad $G\alpha$. Esta unión $G\alpha$ -GTP ocasiona la disociación del trímero en subunidades $G\beta\gamma$ y $G\alpha$ -GTP, y de esta subunidad $G\alpha$ -GTP del receptor. De esta forma la subunidad $G\alpha$ -GTP libre, se asocia a otra enzima, genéricamente llamada efectora activandola.

La enzima efectora usualmente está localizada en la membrana y su activación cambia la concentración intracelular de algún soluto de bajo peso molecular genéricamente llamado *segundo mensajero*. Esta actividad persiste hasta que la subunidad $G\alpha$ hidroliza GTP produciendo GDP. Así, llegado el momento, la subunidad $G\alpha$ -GDP se disocia de la enzima efectora cesando la actividad de la misma y se reasocia con algún dímero $G\beta\gamma$ libre, regenerando un trímero inactivo. Este trímero inactivo es capaz de reasociarse con algún receptor transmembranal tipo serpiente de siete pasos, restableciendo las condiciones iniciales y cerrando un ciclo.

El sistema de la adenilato ciclasa, es una ruta muy común que utiliza este modelo general^{1,17,32}. En este caso la adenilato ciclasa es la enzima efectora que es activada por $G\alpha$ -GTP. Como la adenilato ciclasa cataliza la conversión de ATP-Mg a AMPc, este último actúa como un segundo mensajero. Esto es, el AMPc transmite el mensaje del ligando extracelular (el primer mensajero), al interior de la célula.

El AMPc activa a la protein cinasa A (PKA). En su estado inactivo esta enzima está constituida por dos subunidades reguladoras que mantienen inactivas a dos subunidades catalíticas. Para que las subunidades catalíticas sean liberadas es necesario que se unan dos moléculas de cAMP a cada subunidad reguladora. De tal forma, estas subunidades de la PKA liberadas (ver fig. 1), fosforilan a otras cinasas citoplasmáticas o membranales, cambiando sus actividades produciendo respuestas de corto plazo en el comportamiento de la célula. Adicionalmente a las respuestas de corto plazo, la activación de la PKA puede mediar efectos crónicos cuando una fracción del total de subunidades catalíticas activadas entra en el núcleo y fosforilan factores de transcripción. Esto sucede en la activación de la proteína de unión a CRE (elemento de respuesta para AMPc en ADN) conocida como CREB por sus siglas en inglés, por esta vía, se da la síntesis de nuevas proteínas^{4,32}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 1) En esta figura se puede apreciar la secuencia; a) desde el receptor activado se libera y disocia una proteína G activada b) Una enzima efectora, la adenilato ciclasa, es activada por la subunidad $G\alpha$ -GTP, con lo cual se incrementa la concentración de AMPc en el citoplasma c) El AMPc se une a las subunidades reguladoras (R) de la PKA liberando las subunidades catalíticas (C) D) Una fracción de las subunidades C activadas entra al núcleo y activa vía fosforilación a CREB e) CREB activado se une a su secuencia blanco CRE, en todos los genes que la contengan, activando su transcripción (modificada de "GENES VI" 6ª Edition Oxford University Press)

Otra ruta que utiliza el sistema de las proteínas G acopladas a la señalización, es la del fosfatidil inositol^{1,17}. Análogo a lo descrito para el modelo general, un ligando se une a un receptor tipo serpentin de siete pasos transmembranales y activa a una proteína G. La subunidad liberada $G\alpha$ activa a una enzima efectora Fosfolipasa C beta ($PLC\beta$) a nivel de membrana. Esta enzima cataliza el rompimiento de un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, hacia inositol trifosfato (IP_3) y diacil glicerol; de forma que, esta ruta da como resultado la producción de dos mensajeros intracelulares.

El IP_3 soluble actúa liberando calcio de sus contenedores (en retículo endoplásmico), lo que permite la activación de algunas enzimas y de otros procesos celulares que requieren de calcio. El diacil glicerol, junto con el fosfolípido membranal fosfatidilserina, así como un incremento de calcio intracelular, activan a la enzima proteína cinasa C (PKC), que es dependiente de ambos. Similar a PKA, PKC tiene efectos tanto crónicos como agudos. La PKC fosforila tanto proteínas membranales como citoplasmáticas para llevar a cabo cambios agudos en la actividad celular, y puede también fosforilar factores de transcripción para producir cambios crónicos en las proteínas expresadas en la célula. Aunque ambas PKC y PKA son capaces de fosforilar residuos de serina y de treonina (serin/treonin cinasas), las secuencias de aminoácidos que reconocen en sus sustratos difieren. Por lo que PKA y PKC reconocen y fosforilan diferentes series de sustratos que algunas veces se traslapan ¹⁷

2.1.1.2 ENZIMAS LIGADAS A RECEPTORES.

El modelo de las enzimas ligadas a los receptores es otro modelo^{1,17,32} general de receptores membranales. En este modelo el receptor, la región transmembranal, y la enzima efectora son dominios separados de la misma proteína. Existen muchas variaciones de este modelo y en muchos casos la unión del ligando con el receptor causa la dimerización del mismo, como en los receptores para factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de adhesión plaquetaria (PDGFR). En otros, como el receptor de insulina, los receptores se encuentran dimerizados aún en ausencia del ligando. En ambas situaciones, la unión del ligando con el receptor activa a la región catalítica (efectora) del receptor localizada en la cara intracelular de la membrana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En otras variantes la enzima efectora es una proteína separada de la proteína extracelular de unión al ligando, pero ambas se encuentran fuertemente asociadas en la región intracelular. Los cambios conformacionales que se producen por la unión del ligando-receptor son llevados a cabo en ausencia de proteínas de unión-transducción, tales como las proteínas G descritas anteriormente. Estos cambios activan a la proteína efectora. Y como el efector se encuentra inmovilizado en la cara interna de la membrana celular, es posible que se desarrollen cascadas muy elaboradas como las de las MAPKs (mitogen activated protein kinases) para llevar mensajes desde la superficie celular hasta el núcleo^{4,55}.

La ruta más estudiada que utiliza este modelo de señalización, de enzima unida al receptor, es la de los receptores relacionados con las proteínas cinasas de tirosina. La unión del ligando con la región extracelular del receptor activa la enzima (o su equivalente en el receptor mismo) efectora cinasa de tirosina, en la cara intracelular de la membrana. Esta región efectora con actividad de cinasa de tirosina, se autofosforila y fosforila a otras proteínas sustrato en un residuo de tirosina. Como existe un dominio SH₂ (su nombre proviene de homología con la proteína Src "proto-oncogene tyrosine-protein kinase src") en múltiples proteínas citoplasmáticas como la cinasa de la misma tirosina Src, la proteína de intercambio Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound protein 2) y SOS (Son of Sevenless protein homolog), la proteína activadora de la acción cinasa de Ras (Ras-GAP), la cinasa del fosfatidil inositol (KPI₃), fosfolipasa C gamma (PLC γ) etc, y está especializado en la interacción con tirosina fosforilada, por lo que el receptor autofosforilado sirve como un sitio de unión para proteínas que contengan este dominio SH₂. Esta interacción da como resultado la fosforilación de diversas proteínas que contienen el dominio SH₂, a través de la actividad catalítica del receptor, como cinasa de tirosina.

Adicionalmente, algunas proteínas que contienen este dominio, también son activadas por el receptor sin ser fosforiladas, esto se logra a través de cambios conformacionales debidos a la interacción con el residuo tirosina fosforilado del receptor. Un ejemplo es la proteína adaptadora Grb2, donde los cambios conformacionales que se dan en Grb2 por la interacción de sus dominios SH₂ con el receptor, facilitan su interacción con la proteína de intercambio; SOS. SOS pasa la señal de activación a la oncoproteína monomérica; Ras (ver fig.2). Esta es una proteína débilmente asociada a la membrana que presenta actividad de GTPasa análoga a la de las subunidades α de las proteínas G. La activación de Ras causa que libere GDP y se una a GTP, y se mantenga activa en tanto que no actúe hidrolizando el GTP a GDP

La proteína de intercambio SOS también sirve como un activador de la función hidrolítica de proteínas G (GAP, GTPase-activating protein), tal que SOS no solo actúa activando a Ras transmitiéndole la señal de activación, sino que también actúa acelerando la inactivación de Ras estimulando su acción de hidrólisis de GTP. Ras activado, a su vez activa a la oncoproteína Raf-1, una serin/treonin cinasa conocida como MAPKKK. Raf-1 fosforila y activa a MEK, también conocida como MAPKK, la cual es una cinasa con una actividad dual (serin/ treonin) que activa a la cinasa ERK conocida como MAPK a través de la fosforilación en residuos de treonina y de tirosina. Esta última cinasa, perteneciente a la familia de las MAPKs, es una serin /treonin cinasa que puede fosforilar proteínas citoplasmáticas como la fosfolipasa A₂ (PLA₂) u otras proteínas como S6 (S6 es principal sustrato de las cinasas en los ribosomas eucarióticos), así como factores de transcripción como ATF₂ (activating transcription factor 2) y c-Fos (su nombre se deriva del virus para Osteosarcoma descubierto por Finkel) De tal forma que esta cascada de enzimas transcribe un mensaje a nivel de la unión de un ligando extracelular en un cambio en la actividad biológica intracelular

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

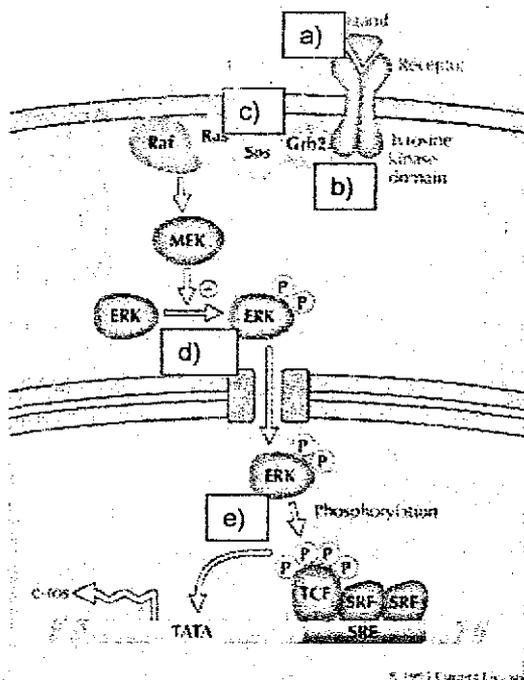


Fig. 2) En esta figura se puede apreciar la activación secuencial empleada por la ruta de la oncoproteína Ras y las cinasas conocidas como MAPKs (cinasas activadas en mitosis). Donde A) un ligando extracelular se une a un receptor B) el receptor se dimeriza, y se autofosforila en su región intracelular, causando la unión con proteínas con el dominio SH2 como la proteína adaptadora Grb2 activándola. C) Grb2 activa a la oncoproteína Ras via la proteína de intercambio SOS. D) se da una cascada de activaciones de las protein cinasas conocidas como MAPKs, Ras activa a Raf, Raf activa a Mek, y Mek activa a Erk. E) La cinasa Erk se introduce al núcleo donde activa via fosforilación, a factores de transcripción que modifican la expresión de ciertos genes. (modificada de [12])

La ruta de transducción de señales de JAK-STAT (Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription) presenta una variación al modelo de la enzima ligado a receptor, en esta ruta la proteína receptor y la enzima efectora no son la misma proteína. El nombre de cinasas JAK se debe a que en cada molécula se encuentran dos dominios catalíticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En esta familia de cinasas (JAK 1,2,3, etc) cada una de ellas se encuentra fuertemente asociada a nivel de membrana con algún receptor específico para alguna citocina. La unión del ligando con el receptor activa la función de cinasa de tirosina de la enzima JAK que se encuentra fuertemente asociada al receptor. Las proteínas STAT se asocian con la JAK autofosforilada a través de sus dominios SH₂ y pasan a ser fosforiladas en residuos de tirosina. Las proteínas STAT fosforiladas en tirosinas se disocian de las JAK, y forman dímeros con otras STAT vía la interacción de sus dominios SH₂ y sus fosfotirosinas. Los dímeros de las STAT se traslocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. Por su parte las proteínas Jak activadas pueden adicionalmente interactuar con la proteína de intercambio Shc, por lo tanto activar la vía de las MAPK's cinasas.

La ruta de la guanilato ciclasa (enzima que cataliza la conversión de GTP a GMPc) también utiliza el modelo general de la enzima ligada al receptor. En este sistema la unión del ligando con la porción extracelular del receptor, inicia la actividad de la enzima efectora, guanilato ciclasa, en la cara citoplasmica de la membrana. La guanilato ciclasa convierte GTP a GMPc y este puede activar enzimas dependientes de él mismo, como las cinasa y fosfodiesterasa dependientes de GMPc. Como sea, el sistema de la guanilato ciclasa introduce otro concepto en la transducción de señales. Adicionalmente a la forma asociada al receptor antes descrita, la guanilato ciclasa existe como una forma citoplasmática soluble, y es capaz de transducir algún mensaje proveniente de moléculas gaseosas disueltas, NO y CO. Ambas moléculas también son liposolubles, de tal forma que difunden a través de la membrana celular de las células blanco, se unen al grupo hemo de la guanilato ciclasa, y la activan. Y así como la forma activada vía unión al receptor membranal, la guanilato ciclasa soluble convierte GTP en GMPc

2.1.2 REDES PROTEICAS.

De los modelos generales descritos anteriormente, se desprende que existen muchas rutas de señalización en cualquier célula y que en varios casos comparten una estructura funcional similar.^{1,17,32} Estas rutas llevan a cabo un procesamiento de información en múltiples etapas y lo descrito en las secciones anteriores es válido para rutas aisladas y sirve para establecer los patrones básicos del proceso de señalización. Sin embargo ahora se sabe que adicionalmente, en la célula existen muchos factores que complican la relativa linealidad de estos modelos. Experimentalmente se han demostrado múltiples entrecruzamientos entre rutas diferentes de transducción de señales y en sus diferentes niveles funcionales o topológicos.

Los modelos multi-pasos parecieran ser complicados e innecesarios para activar a sus correspondientes proteínas G. En el modelo de enzimas ligadas a receptores, para activación de Ras (ver fig. 3) las dos interacciones críticas son las mediadas por los dominios SH₂ de los ligandos con el receptor y la mediada por el dominio SH₃ con el efector SOS. El efecto neto es el gran incremento local en la concentración de SOS en la vecindad de su sustrato, Ras. Esta secuencia de eventos para activar a Ras pareciera ser un método rudimentario, sería mucho más eficiente que el receptor una vez activado, directamente activase a Ras o que SOS tuviese su propio dominio SH₂ y de esta forma se eliminarían intermediarios, en este caso Grb2.

Así, como primer punto para que se den combinaciones protéicas, está la región interna del receptor que contiene múltiples sitios autofosforilados³². Los sitios de fosfotirosinas de los receptores pueden interactuar y aglomerar a diversas proteínas con el dominio SH₂, pero debido a impedimentos estéricos éstas van a competir por la unión de acuerdo con sus afinidades y concentración local. De tal forma que es posible que se den diferentes combinaciones de agregados multiprotéicos

Por otro lado, desde el punto de vista de la eficiencia a nivel genético, uno de los mecanismos empleados para la transducción de señales es la posibilidad de generar combinaciones protéicas, lo cual explica que el número de productos de los genes involucrados en la transducción no sea ilimitado, ya que no existe un gen para cada señal en cada célula. El cúmulo de información actual sugiere que muchos tipos de señales extracelulares son transducidas por un número relativamente reducido de enzimas, incluidas las tirosin cinasas , proteínas G y serin treonin cinasas, y que la especificidad de la señal surge entre otros mecanismos, del ensamblado de los complejos multiproteicos que involucran a estas proteínas.

Al respecto de lo que sucede en la región citoplasmática de diversas líneas celulares eucarióticas, las protein cinasas encargadas de la transducción de la señal, generalmente son serin-treonin- cinasas³², presentan convergencias (ver fig 3). Como en el caso de MEK activada tanto por la protein cinasa Raf como por la cinasa MEKK5 en diferentes organismos como *Schizosaccharomyces pombe* y *cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus*, etc ¹⁰ (Cabe notar que estas estructuras son evolutivamente conservadas entre diferentes especies.) Formalmente Raf y MEKK5 proveen de funciones análogas en rutas paralelas^{4,10}. Así mismo, en la región citoplasmática se presentan divergencias (ver fig 3), un caso es el de la cinasa ERK, que una vez activada es capaz de entrar al núcleo e interactuar para activar a los factores de transcripción como c-Myc y Elk-1.¹⁰

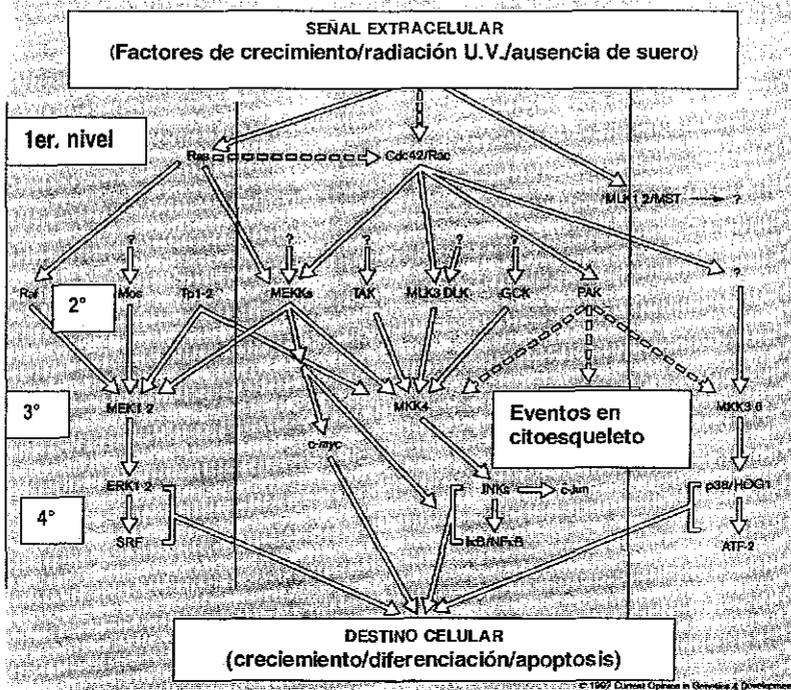


Fig. 4) En esta figura se aprecian verticalmente secuencias de activación de proteínas cinasas en cuatro pasos, y horizontalmente se observa que existen elementos funcionalmente equivalentes a uno de esos pasos en diferentes rutas. Adicionalmente, se observa como existen entrecruzamientos entre las diferentes rutas, lo que da como resultado una Red Protéica de activación (modificada de [10])

Surge así un panorama de rutas paralelas de transducción de la señal con una estructura secuencial similar donde existe una correspondencia funcional entre elementos de una y elementos de otra, y donde existen múltiples interacciones y entrecruzamientos entre las mismas. Por lo que más que una serie de rutas aisladas, existe una *red de proteínas* (ver fig. 4), que puede presentar *retroalimentaciones* (ver figura 3), *orden temporal* de eventos tanto para el ensamblado de complejos multiprotéicos como para la activación secuencial de cinasas citoplásmicas, *estructura espacial* a nivel de topología celular (localizaciones en membrana vía receptores, o en citoesqueleto vía dominios SH3) así como *combinación* de elementos vía formación de diversos agregados multiprotéicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Adicionalmente, hasta ahora poco se sabe de las *cascadas de inactivación* que sin embargo son parte de la dinámica de estas redes.

2.1.2.2 RESPUESTAS NO LINEALES

Apoyando el esquema anterior de múltiples combinaciones, se presentan las siguientes evidencias. Se ha observado que un ligando frecuentemente tiene diferentes efectos en diferentes células blanco y la diferencia en los receptores no es la única explicación para este comportamiento ya que en otros casos, a pesar de contar con el mismo receptor, *una misma molécula tiene efectos disímiles* en diferentes células⁵². Lo cual refleja diferencias en la *maquinaria* interna a la cual los receptores están acoplados. Tal es el caso del neurotransmisor acetilcolina, el cual induce la contracción en las células de músculo esquelético pero decrece la velocidad e intensidad de las contracciones en las células de músculo cardíaco^{1,52}.

Otro caso es donde diferentes hormonas que se unen a sus respectivos receptores, que están acoplados a la *misma maquinaria de procesamiento*, en el mismo tipo celular provocan respuestas muy diferentes, llegando a ser incluso opuestas. Un caso de respuestas disímiles es el que presentan las células PC12, (neuronas de ratón) que cuando son estimuladas por EGF (Epidermal Growth Factor) se induce su *proliferación*, sin embargo cuando se une el ligando NGF (Neurite Growth Factor) a su receptor se induce su *diferenciación*⁵².

Como los mencionados anteriormente, existen varios de estudios experimentales que muestran que la respuesta de una línea celular en ciertas circunstancias es diferente para otra línea celular, o puede ser diferente para la misma célula bajo condiciones distintas.^{4,6,10,12,13,14,18,24,30,48,55}

De tal forma, se ha establecido que el procesamiento de la señal (o señales) que realizan las células en su interior para emitir una respuesta, es especializado para cada línea celular, altamente regulado, seguro (a prueba de errores), y adaptable frente a diferentes ambientes celulares. Por lo anterior, resulta muy difícil hacer correlaciones estímulo - respuesta sencillas, y no debe verse al sistema no solo como una simple serie de activaciones concatenadas.

Por lo tanto, más que analizar casos particulares de transducción de señales en diferentes líneas celulares, se requiere encontrar una respuesta lógica para el comportamiento general de cualquier sistema celular, que se entiende como un sistema complejo *No lineal*. Esto es, en un sistema biunívoco a un estímulo corresponde solo una respuesta, pero en este caso al dominio le corresponden más de un elemento en el codominio. Donde el procesamiento de la información se realiza en paralelo vía diversos mecanismos

^{31,33,34,52}

2.1.3 BASES FISICOQUIMICAS DE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES

Tanto a nivel de señales (ligandos) y receptores como al de los elementos que componen la maquinaria interna de procesamiento, (generalmente proteínas cinasas) las posibilidades de interacción están dictadas por la naturaleza fisicoquímica de estos componentes. Debe existir complementariedad estructural entre las superficies de contacto para poderse acoplar, así como complementariedad electrostática. Ambas complementariedades repercuten en la afinidad y especificidad de la interacción^{22,27,35}. Evolutivamente, se han preferenciado aquellas interacciones que tienden a proveer de ventajas al organismo multicelular, interacciones que por sus consecuencias se les llama *específicas*^{5,49}.

Asimismo, algunas moléculas pueden formar estructuras multimoleculares especializadas^{41,45}, que están "diseñadas" para intervenir en el proceso de la transducción de señales, como lo serían las proteínas receptoras transmembranales y sus ligandos. O bien el conjunto de holoenzima, apoenzima, cofactor, grupo prostético, complejo requerido para la activación de una enzima. Y en general todos los complejos multimoleculares que "adquieren" propiedades nuevas, como la *aditividad*^{38,53,54} que representa la creación de alguna nueva superficie de contacto que permite interactuar con un tercer elemento, el cual no es capaz de interactuar con ninguno de los dos componentes iniciales por separado.

El sistema de transducción de señales tiene muchos grados de libertad. Sin embargo, la transferencia de información se realiza preferencialmente a través de alteraciones químicas como la fosforilación de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de las proteínas^{22,31}. Estas fosforilaciones incrementan la complementariedad tanto topológica como electrostática de las superficies de interacción entre dos proteínas.

Analíticamente, se incrementa la *afinidad* entre estos elementos del sistema de transducción de señales. Lo que en última instancia lleva a la **activación** de las proteínas involucradas en la transmisión y procesamiento de la señal que generalmente son enzimas alostéricas.

Fisicoquímicamente se puede ver la naturaleza del sistema de transducción de señales celulares, como una serie de procesos estocásticos mediados por difusión, de reconocimiento por complementariedad, e interacción con formación de complejos y transformación de las moléculas involucradas vía fosforilación, las cuales contienen y transmiten gran cantidad de información en su estructura tridimensional y topología electrostática. Y están acoplados de tal forma, que globalmente se obtiene una gran precisión

Por otra parte, basándose en la teoría de la información el sistema de la transducción de señales podría sintetizarse de la siguiente forma: Existe una *señal* que conlleva un *mensaje* a través de un *código* fisicoquímico. Esto implica debe existir un *receptor* para la señal en las *células blanco* y un *sistema para interpretar y procesar* tanto el *mensaje codificado* que contiene la señal, como para monitorear e integrar el *estado actual* de la célula para elaborar una *respuesta* adecuada al mensaje recibido.

2.1.3.2 DIFUSION REACCION

Se consideró importante para sustentar los conceptos anteriores, los descritos en los resultados y la metodología empleada, realizar una revisión de algunos aspectos y modelos que se han estudiado y propuesto para representar este mecanismo de interacción molecular, a través del cual se realiza la transmisión de señales.

El límite para la interacción entre dos partículas que siguen una difusión Browniana, calculado por Smoluchowski, es de $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y los ordenes de asociación bimolecular ente dos proteínas están el rango entre $0.5\text{-}5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que resulta un valor muy superior al esperado si se toma en cuenta que la asociación proteica requiere de una alineación entre las dos superficies de contacto con una desviación no mayor a 2 \AA , un simple cálculo geométrico daría un valor seis ordenes de magnitud inferior al límite de Smoluchowski.

Por otro lado, muchas asociaciones proteicas ocurren a velocidades muy inferiores, lo cual sin duda refleja barreras energéticas que se deben vencer para su asociación. Asimismo existen diversos casos de asociación entre dos proteínas con valores muy elevados, como la dimerización de la insulina ($k_2 = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) o la asociación del citocromo c con otros componentes a velocidades cercanas al límite de Smoluchowski ($10^7\text{-}10^9$), lo cual es atribuido a elevadas fuerzas de atracción Coulombicas que favorecen la interacción.

Un trabajo teórico con algunos aspectos de lo anteriormente descrito, fue desarrollado por Donald L. Emark y J.A. Mc.Cammon quienes a su vez, en 1978 basándose en los trabajos de Einstein de 1905 ("Investigations on the Theory of Brownian Movement"), de M.V. Smoluchowbsky en 1915 y 66, de P. Langevin en 1908, de A.D. Fokker en 1913 y 14 y los de M. Plank de 1917 al respecto del movimiento Browniano, desarrollaron modelos matemáticos que describía las trayectorias desarrolladas por partículas esféricas (monómeros, dímeros y trímeros) interactuando con un medio de disolución (fuerzas de fricción que disminuyen la energía cinética de las partículas y fuerzas aleatorias de colisión con las moléculas del solvente) así como fuerzas electrostáticas, gravitacionales y de momentum intrapartículas:

$$r_i = r_i^0 + \sum_j \frac{\partial D_{ij}}{\partial r_j} \Delta t + \sum_j \frac{D_{ij}^0 F_j^0}{kT} \Delta t + R_i(\Delta t) \quad (1)$$

Donde r_i es el vector de posición, t es el tiempo, F_i es la sumatoria de las fuerzas de interacción externas e interpartículas en la dirección i y D_{ij} es el tensor (vector de orden superior) de interacción con el solvente, que en la mayoría de los casos se emplea el desarrollado por Oseen:

$$D_{ij} = \frac{kT}{8\pi\eta r_{ij}} \left(\begin{array}{c} \text{---} \\ I + \frac{r_{ij} r_{ij}}{r_{ij}^2} \\ \text{---} \\ F_{ij} \end{array} \right) \quad (2)$$

Con i, j diferentes partículas, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del solvente.

Estos autores realizaron simulaciones computacionales con estos modelos matemáticos, concluyendo que la interacción con el medio podría influir profundamente en los encuentros intrapartículas, pero que era posible realizar simulaciones de dinámica Browniana sin la necesidad de una descripción detallada de las moléculas de soluto o solvente, bastando con representar a los solutos como cuerpos esféricos rígidos y a los solventes como líquidos viscosos (Newtonianos).

En la misma línea, Nortrup S. presentó en 1984 un extenso trabajo que ha sido muy útil para calcular las constantes de reacción bimolecular basadas en difusión. En este trabajo analizó las probabilidades para que dos partículas con características similares a una enzima y su sustrato colisionasen en forma efectiva. Esto es, dando como resultado que reaccionen. Para esto consideró una distancia (r) de separación entre ambas partículas desde la cual fuese costeable calcular esa probabilidad de colisión efectiva basándose en las probabilidades siguientes:

Probabilidad de colisión entre ambas partículas β basada en la difusión Browniana (1)

Efectividad para una colisión de orientación adecuada pero dependiente la energía cinética α

Probabilidad de una segunda colisión después de una primera no efectiva Δ

Dando como resultado:

$$k = \frac{K_D(b) \left[\frac{\beta}{1 - (1 - \beta)\Omega} \right] \alpha}{1 - (1 - \alpha) \left\{ \Delta + \left[\frac{\beta}{1 - (1 - \beta)\Omega} \right] (1 - \Delta) \right\}} \quad (3)$$

Siendo k la constante de reacción, K_D la constante (probabilística) de encuentro para las dos partículas separadas por el radio ($r = b$), Ω la probabilidad de difusión asociada con el retorno de una partícula que se aleja del radio $r = b$, al mismo.

Calculándose ambas por:

$$k_D(b) = \left(\int_b^{\infty} dr \left[\frac{\exp[U(r)/k_bT]}{4\pi r^2 D(r)} \right] \right)^{-1} \quad (4)$$

$$\Omega = \left(\int_q^{\infty} dr \left[\frac{\exp[U(r)/k_bT]}{4\pi r^2 D(r)} \right] \right) \quad (5)$$

Siendo U la energía potencial promedio de interacción entre las partículas, k_b la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y D el tensor de difusión sin interacciones hidrodinámicas, tal que:

$$D = k_bT / c\pi\eta a_i \quad (6)$$

Siendo η la viscosidad del solvente, c una constante entre 4 y 6, y " a_i " el radio de la partícula

Quedando por calcular (vía simulaciones de movimiento Browniano) a la probabilidad β , para lo cual utilizó una aproximación de la ecuación (1).

$$r_1 = r_1^0 + \frac{2\Delta t}{k_bT} (D_{\alpha}^0 F_1^0 - D_{12}^0 F_1^0) + R_1 - R_2 \quad (7)$$

Donde r_n denota el vector de posición antes y después del desplazamiento Browniano, Δt es el incremento en el tiempo para el que se calcula el desplazamiento, D_{ij} es el tensor de difusión relativa entre las dos partículas y F_n es la fuerza ejercida sobre cada partícula por su contraparte y R_n son vectores de números de distribución Gaussiana que cumplen con:

$$\langle R_i \rangle = 0$$

$$\langle R_i R_j \rangle = 2D_{ij}^0 \Delta t \quad (8)$$

Donde D_{ij}^0 está referido para las condiciones iniciales (r^0). Δt es lo suficientemente pequeño para que los desplazamientos sean suficientemente pequeños para captar la variación de las fuerzas que aplican en función de la separación entre las partículas las fuerzas de interacción. De esta forma R_n representan el desplazamiento estocástico de las partículas debido a colisiones con el medio.

Así mismo utilizó una mejor descripción del tensor de Oseen (2) tal que .

$$D_{ij} = k_b T \left\{ \frac{\delta_{ij}}{4\pi\eta a} I + (1 - \delta_{ij}) \left[\frac{1}{8\pi\eta R} \left(1 + \frac{r_{ij} r_{ij}}{r_{ij}^2} \right) \right] \right\} \quad (9)$$

(Donde δ es el incremento Kronecker) para considerar tanto interacciones hidrodinámicas con el medio, fuerzas asimétricas de interacción coulombica (cuando se requiere de un ángulo de aproximación para que esta fuerza exista) como la rotación asociada a cada partícula.

Con todo lo anterior pudo realizar simulaciones que permitiesen calcular β y por lo tanto, a K bajo diversos escenarios que significaron diferentes niveles de detalle para la descripción del sistema. De esta forma encontró que al incluir las fuerzas de interacción coulombica se incrementaba 7 veces la constante de reacción k , y al incluir la interacción con el medio, disminuía en apenas un 6% (contra un 30% en caso de no incluir interacciones coulombicas). De esta forma, encontró que las interacciones coulombicas junto con el efecto rotacional, prácticamente anulan la anisotropía (orientación de la colisión) requerida para que en un esquema enzima sustrato, tenga lugar la reacción sitio activo - sustrato

Esta metodología continuó siendo útil para calcular constantes de reacción bimolecular y fue utilizada por el mismo para explicar en 1992 los relativamente elevados ordenes de reacción para el caso formación de dímeros o la unión antígeno-anticuerpo, donde es muy importante la correcta orientación de las superficies de interacción entre las proteínas, ya que solo es permitida una desviación de 2Å , y donde un análisis de probabilidad basado en la geometría requerida para la reacción sería más de dos ordenes de magnitud por debajo del experimentalmente observado.

De tal forma, para este caso el autor propuso que el proceso de formación de una interfaz de interacción entre dos proteínas es un proceso que se lleva a cabo en múltiples pasos donde:

- a) La probabilidad para un encuentro inicial entre las mismas depende únicamente de la difusión Browniana, la cual es mediada por la interacción con el disolvente, permitiendo que las dos proteínas caigan en lo que define como una "trampa acuosa" en la vecindad de una respecto de la otra, en donde existe mayor probabilidad de una segunda colisión (Δ y Ω elevadas) a la probabilidad de alejarse mutuamente. Siendo este un efecto puramente difusivo.

b) Acto seguido se llevan a cabo una serie de colisiones entre las dos proteínas, (en promedio 9), que permiten la reorientación de las mismas para que se lleve a cabo su correcto alineamiento y empalme. Este segundo proceso, se ve exponencialmente facilitado en caso de existir fuerzas de Coulombicas que induzcan a una complementariedad electrostática. En caso contrario, lo que se favorece es la probabilidad de que ambas proteínas se alejen quedando fuera del radio de mayor probabilidad de interacción.

Bajo este modelo es capaz de explicar los elevados ordenes de interacciones proteicas ($2 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)

En la metodología antes descrita para calcular a k es muy importante notar que se trata del calculo de diversas variables probabilísticas como $\beta \propto \Delta \Omega$ así como R_n y K_d . Por lo que en última instancia este es un modelo estocástico. Esta aproximación que históricamente ha probado ser muy útil, está basada en la representación de la probabilidad conjunta de los diferentes fenómenos físicos de los cuales depende el proceso global de difusión reacción. Esto ha dejado la puerta abierta a diferentes representaciones del sistema de difusión reacción mediante modelos estocásticos.

Como ejemplo de otros modelos basados en los anteriores, pueden citarse los trabajos de Sangtae y Huber, quienes en 1996 desarrollaron una simplificación de esta metodología como el fijar los ejes de coordenadas en una de las dos partículas, la cual se considera inmóvil, y duplicando la velocidad de difusión para la otra partícula, con lo cual pudieron reproducir los resultados de los modelos de Northrup pero con un ahorro considerable de tiempo de calculo en la simulación

Así mismo, los buenos resultados obtenidos a partir de las simplificaciones incluidas en los modelos analíticos anteriores, dieron pie al desarrollo de modelos basados en aproximaciones estadísticas más que en ecuaciones deterministas. De tal forma, empleando el método Monte Carlo, se fueron desarrollando los trabajos de Saxton (1989,1992,1993 1994) acerca de la difusión de partículas en un medio de dos dimensiones con obstáculos. El trabajo de Dwyer y Bloomfield(1993) acerca de la difusión en medios de alta concentración de DNA y proteínas. Así como el de El-Kareh y colaboradores (1993), quienes también emplearon el Método Monte Carlo para realizar simulaciones de la difusión de anticuerpos a través de un tejido.

Sin embargo, fue en 1995 que Buethner y colaboradores lograron reproducir y analizar un sistema de difusión-reacción empleando el Método de Monte Carlo. En su estudio analizaron las implicaciones de diversas configuraciones topológicas de partículas relativamente grandes y casi inmóviles que reaccionaban con otras partículas con un mucho mayor grado de movilidad (caso que sugieren análogo en la transducción de señales, al de las proteínas G interactuando con proteínas membranales) y considerando los dos diferentes tipos de reacción: las limitadas por la difusión y las limitadas por la reacción (energéticamente)

Para llevar a cabo esto emplearon un espacio cuadrangular con 1000 nodos por lado donde colocaron en diferentes configuraciones estructurales, las partículas grandes e inmóviles. Las partículas pequeñas y difusibles presentaron un movimiento aleatorio en el espacio bidimensional gracias a la utilización del Método de Monte Carlo para generar los números aleatorios que alimentaban una función de desplazamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como aportaciones de este trabajo están el que las reacciones limitadas por la difusión presentan gradientes de concentración y por lo tanto son heterogéneas y que en estos casos se deben tomar en cuenta tanto las características estructurales como cinéticas del sistema. Así mismo, la demostración de que estos modelos estocásticos de simulación reacción en dos dimensiones, son muy útiles para representar fenómenos topológicos que de otra forma son muy difíciles de incluir.

Por otro lado, en 2000 Wurthner presenta un modelo basado en una técnica de inteligencia artificial conocida como *autómatas celulares* para realizar simulaciones de difusión reacción en dos dimensiones, para un sistema de transducción de señales celulares tipo segundo mensajero. El modelo se implementa y se compara con datos experimentales en células Leydig de ratón, obtenidos por su mismo grupo de trabajo.

Para este modelo, la difusión es representada sobre una retícula de 240 por 340 espacios (píxeles). En esta retícula cada espacio puede contener a una entidad química (representada por un píxel), y esta puede difundir y cambiar sus propiedades basándose en una serie de reglas pre codificadas que le permiten a la partícula "percibir su entorno" e ir reaccionando en el transcurso del tiempo. Lo anterior es acorde con el comportamiento clásico de los autómatas celulares. De esta forma, el continuo recuento de las entidades químicas en sus diferentes estados, representa las concentraciones de las diversas especies químicas a través del tiempo.

Por cuestiones de diseño y economía de cálculo, la aplicación y lectura de las reglas se realiza para arreglos cuadrangulares de dos por dos píxeles. El conjunto de posibles arreglos está determinado por el tamaño del arreglo así como por el número de estados que puede tomar cada entidad química (píxel).

Para el caso del modelo desarrollado por Wurthner, el número de combinaciones posibles es de 160 000, ya que el tamaño de los arreglos es de 2×2 pero el número de estados posibles para cada pixel es de 20. Si bien, este número debe dividirse entre todas las combinaciones que representan la misma reacción

El estado de cada arreglo en un instante dado depende del arreglo que le precede una unidad de tiempo anterior. Sin embargo, el arreglo anterior no es él mismo, ya que el modelo realiza desplazamientos oscilatorios del marco de lectura de la retícula sobre la cual se definen los arreglos. Lo anterior es un artificio con la finalidad de evitar que los arreglos dependan de su propio estado anterior, ya que caerían en un comportamiento bi-estacionario. Asimismo, estos desplazamientos oscilatorios del marco de lectura generan el patrón de difusión de las partículas.

Un punto muy importante a resaltar de este modelo es su capacidad de representar estructuras topológicas que influyen en la transmisión de las señales celulares. Lo anterior es obtenido mediante la creación de bloques (ver figura 5) que emulan una sección de la membrana celular con un receptor membranal embebido en la membrana, el cual está asociado a una proteína G en su cara interna, que a su vez se encuentra asociada a una enzima efectora, la adenilato ciclasa, que producirá un segundo mensajero (AMPc, en este caso). Estos bloques se emplean para construir membranas para dos células artificiales.

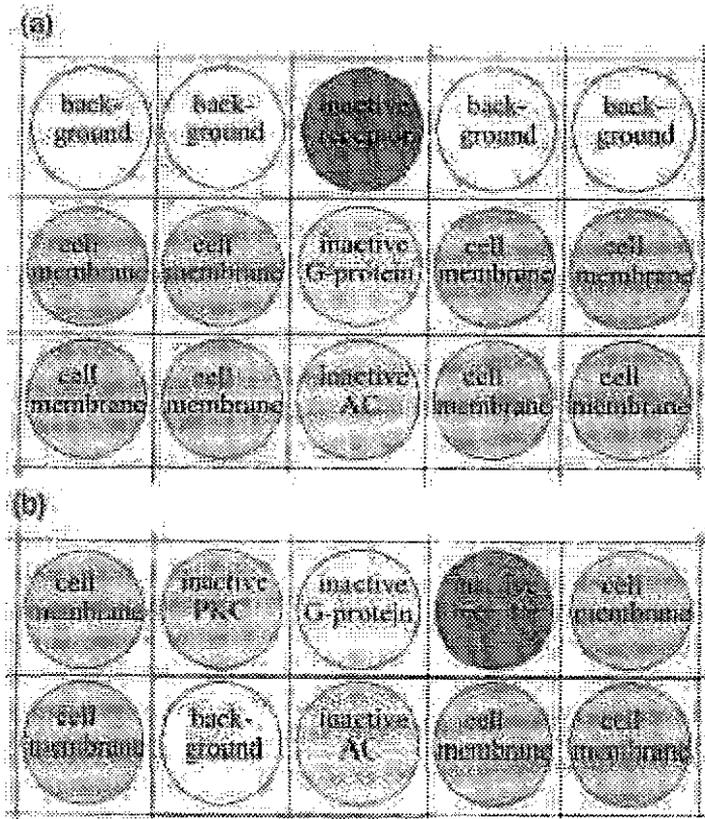


Fig. 5) En esta figura se aprecian dos diferentes bloques de construcción del modelo de Wurthner [59] En a) se aprecia un complejo receptor, proteína G y enzima efectora inactivos y embebidos en una membrana celular. En b) se aprecia un complejo similar pero con una disposición estructural diferente que incluye a la proteína cinasa C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La complejidad del modelo es incrementada con la inclusión de 100 moléculas del estímulo, (hormona gonadotrofina corionica G.C.), en la región extracelular. Adicionalmente, incluye 100 moléculas intracelulares de fosfodiesterasa, (enzima que hidrolisa el AMPc) y 300 moléculas de un inhibidor de la misma. Todo lo anterior resulta en un modelo complejo que incluye estímulo, respuesta (producción de AMPc), control negativo vía hidrólisis del AMPc y control positivo vía inhibición de la hidrólisis. De esta forma obtiene curvas a través del tiempo, de la concentración de AMPc intracelular, análogas a los resultados experimentales obtenidas por su grupo de trabajo. (ver figura 6)

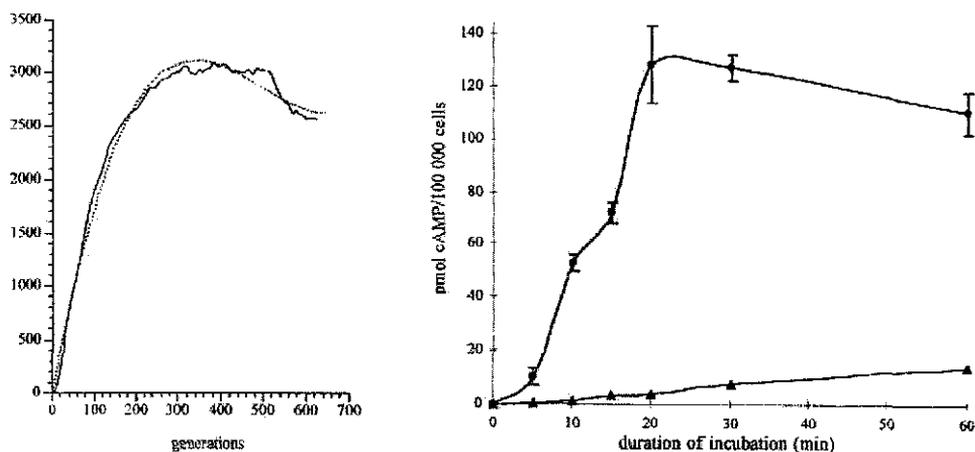


Fig 6) En estas dos imágenes se pueden comparar los resultados obtenidos con el modelo teórico de Wurthner, en el lado izquierdo, con los resultados obtenidos experimentalmente por su grupo, en el lado derecho, para la variación de la concentración de AMPc intracelular después de que las células reciben un estímulo con la hormona gonadotrofina corionica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.3.3 RECONOCIMIENTO PROTEICO Y FOSFORILACION

Acorde con lo descrito en la sección anterior, las velocidades de reacción se ven profundamente influidas por la existencia o ausencia de interacciones Coulombicas entre dos especies químicas reaccionantes. Para el caso de la transducción de señales celulares, ha sido claro que una forma ampliamente utilizada por las células para transmitir información es la fosforilación de residuos de serina treonina o tirosina en regiones expuestas de diversas proteínas. De tal forma, esta adición de grupos fosfato representa un incremento en la afinidad de reconocimiento entre las cinasas que contienen el mencionado dominio SH₂.

2.1.3.4 DOMINIOS SH₂, SH₃

Los dominios SH₂ son módulos proteicos que reconocen secuencias cortas de aminoácidos con alguna fosfotirosina intermedia flanqueada por 3 a 5 residuos de aminoácidos hacia cada extremo, siendo el carboxilo terminal generalmente más largo. Los cambios en esta secuencia son los que confieren diferentes afinidades entre dominios SH₂ y sus ligandos; proteínas citoplasmáticas y región citoplasmática de receptores. Los dominios SH₂ se unen a sus fosfopéptidos con una afinidad relativamente alta (K_d=10-100nM) y con una afinidad 1000 veces menor a fosfopéptidos de secuencias aleatorias, pero básicamente no presentan afinidad por los mismos péptidos si no están fosforilados. Estructuralmente, la región de unión con los fosfopéptidos es una cuenca doble que presenta una división conformada por residuos básicos, en donde se une la fosfotirosina. (Ver fig. 7).

Esta cavidad no muestra una secuencia muy estable solo existe un aminoácido invariable, una arginina que forma puentes de hidrógeno con dos oxígenos del grupo fosfato de la fosfotirosina. La segunda cuenca de unión es aún más variable y es la que permite un reconocimiento específico de los aminoácidos de la región carboxilo terminal que siguen a la fosfotirosina.

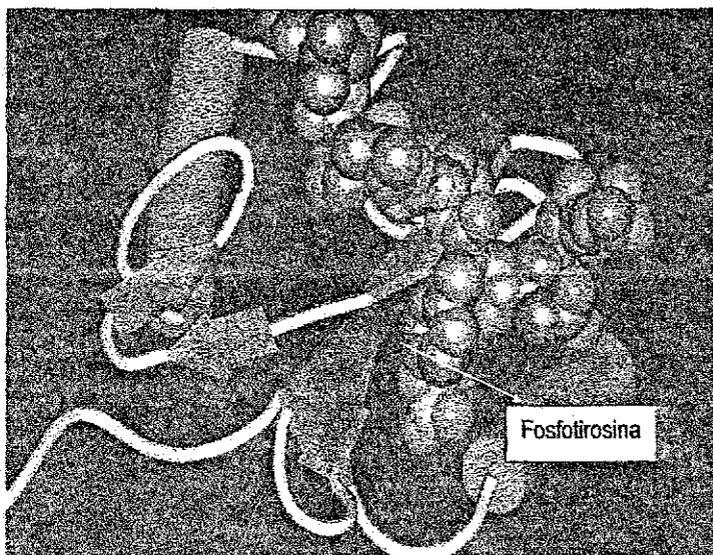


Fig. 7) En esta imagen se aprecia la estructura típica de un dominio SH₂ (representada esquemáticamente), donde se pueden diferenciar dos regiones alfa (tubos rojos) con una región Beta plegada intermedia (flechas en azul), en esta estructura se puede ver claramente que se forman dos "cuenca" donde encaja la secuencia de reconocimiento (representa con modelos de átomos en tres dimensiones), que son los aminoácidos que flanquean a una fosfotirosina.

Esta organización bipartita del sitio de unión de los dominios SH₂ confiere a la fosforilación del residuo de tirosina la función de interruptor para la formación del complejo protéico, diferenciando entre el estado activo y el estado inactivo, por otro lado dependiendo del "contexto" de esa fosfotirosina dictar que dominio SH₂ y por ende que proteína señalizadora ha de unirse con el mismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Así, el reconocimiento de estos residuos de fosfotirosina por las proteínas con dominios SH₂ puede afectarlas en diferentes formas, incluyendo la estimulación directa de su actividad enzimática, la relocalización dentro de la célula o bien su respectiva fosforilación en un residuo de tirosina

Existe otro tipo de dominios denominados SH₃ que aunque menos frecuente que el dominio SH₂ también se encuentran en muchas proteínas involucradas en la señalización. Un dominio SH₃ cercano a la región carboxilo terminal funciona como un modulador negativo de la actividad transformante, mientras que el dominio cercano a la región amino terminal funciona como un modulador positivo etc.

El dominio SH₃ se encuentran en componentes del citoesqueleto, como la α -espectrina y la miosina-1 las cuales están fuertemente relacionadas con el control de la morfología celular. Por lo tanto estos dominios están involucrados en la relocalización intracelular de los elementos que los contienen, por ejemplo en los dominios SH₃ de las proteínas citoplasmáticas Grb2 y PLC- γ 1 dirigen a estas proteínas hacia la membrana citoplasmática interna y hacia las fibras de actina respectivamente.⁴⁵

Las regiones de unión de las proteínas con los dominios SH₃ consisten en péptidos de aproximadamente 10 aminoácidos con mayor contenido de prolina, que interactúan con constantes de disociación de entre 5 y 10 μ M. Estos péptidos que interactúan con los dominios SH₃ adoptan una conformación de hélice tipo II, ricos en prolina con tres aminoácidos por vuelta. Así mismo, estos péptidos ligando presentan en total tres vueltas, dos interactúan con el dominio SH₃ y la tercera estabiliza la hélice PPII (polyproline II) El núcleo de estos ligandos tiende a presentar siete aminoácidos conteniendo la secuencia consenso X-P-p-X-P, donde X tiende a ser un radical alifático y las dos prolina (P) conservadas son cruciales para mantener una alta afinidad

Esos péptidos son pseudo simétricos y tienen la capacidad de interactuar en ambas direcciones, (carboxilo terminal – amino terminal; amino terminal – carboxilo terminal) por ende cada dominio SH₃ tiene distintas preferencias por diferentes péptidos. La especificidad parece provenir de las interacciones entre los residuos no prolínicos del ligando y dos asas variables del dominio SH₃ que están flanqueando a la principal superficie hidrofóbica del mismo dominio. De esta forma, la capacidad de los dominios SH₃ de interactuar en ambas direcciones con sus ligandos amplía considerablemente el rango de ligandos potenciales, y tiene complicaciones biológicas fascinantes; la orientación del ligando va a determinar la organización espacial del complejo resultante, el cual será crítico para el proceso de la transducción de señales⁴⁵.

2.1.4 RECAPITULACION

Con la intención de presentar la elección de la plataforma para la implementación de los modelos, se consideró importante hacer una breve visualización de los principales sub-sistemas y fenómenos de que depende la transducción de señales celulares.

En primer lugar es necesario definir los estados iniciales de que parten los sistemas celulares antes de la transducción de señales. Es evidente que en una línea celular no existen todas las proteínas de todas las rutas de señalización, (de hecho como ya se mencionó, existen protein cinasas tejido-específicas). Así, una línea celular puede describirse en función o quedar definida por la existencia o ausencia de diferentes receptores membranales, la existencia o ausencia de ciertas protein cinasas, etc. Conceptualizando se diría que existen **patrones** de las proteínas que definen una línea celular.

Sin embargo, como estos patrones proteicos no son constantes en el transcurso del ciclo de vida de cualquier célula, es conveniente ir más lejos al momento de definir una línea celular. Así lo que biológicamente es una línea celular, debe interpretarse como el conjunto posibles *estados* que el *sistema* celular puede ocupar durante su ciclo de vida ⁵⁴(matemáticamente se ha definido como el "atractor" celular, ver más adelante). Esto es, el conjunto de las variables (patrones protéicos) que definen al sistema celular en un momento dado, representan un estado celular, y el siguiente estado celular quedará definido por el conjunto de esos parámetros para otro instante del ciclo celular. Por lo tanto, el conjunto de estados que el sistema celular puede ocupar durante su ciclo de vida, define el ciclo de vida de una línea celular.

En segundo lugar (aunque funcionalmente es el último) es necesario definir las posibles respuestas o “salidas” del meta-sistema (la célula) frente a un estímulo o conjunto de estímulos, que pueden separarse en: a) Respuestas de corto plazo, como la producción y secreción de algún metabolito (como hormonas, interleucinas, anticuerpos, leche etc.), permanecer aquiescentes, cambiar su forma etc²⁸. B) Respuestas de largo plazo, como la proliferación celular; diferenciación celular, inducción para la apoptosis, y la diferenciación a hacia células neoplásicas. ^{10,24,28} Tal que las células pasan de un estado (o conjunto de estados que conforman un fenotipo) a otro, a través de un proceso no lineal muy sensible a las condiciones iniciales tanto internas como externas.

Una vez acotados los estados iniciales y las posibles respuestas, cabe restringir los grados de libertad del procesamiento de información que realizan las células o transducción de señales. Como ya se mencionó, existen *focos de emisión* de la señal a través de ciertos elementos, como podrían ser los receptores membranales, pero también los elementos de la familia Ras, que gracias a las *caveolinas* (proteínas de la cara interna de la membrana que forman una estructura conocida como caveolae donde, mediante interacciones débiles pero específicas, se concentran elementos de la familia de las oncoproteínas Ras) aumentan su concentración (**focalizaciones**) en las inmediaciones de los receptores, amplificando y acelerando la emisión de la señal.

Otra forma de modulación o restricción de las posibles combinaciones proteicas para el procesamiento de la señal, es la dependencia de proteínas **adaptadoras** que presentan algunos elementos para poder interactuar con sus proteínas blanco.

Un ejemplo de esto es lo descrito en el modelo de activación de Raf-1, respecto de las proteínas chaperonas (principalmente de la familia de las Heat Shock Protein X) o la familia de proteínas adaptadoras 14-3-3.

Aquí es posible incluir a las proteínas que interactúan a través de sus dominios SH₃ con el citoesqueleto u otras proteínas “*de anclaje*” que se unen a él, y que generan **restricciones en su localización** dando comás de dos ordenes de mciones para las posibles combinaciones proteicas antes discutidas así como el efecto de focalización sobre la concentración antes descrito.

Un parámetro muy importante para explicar diferentes respuestas del sistema celular, es el **nivel de activación** de las poblaciones de proteínas cinasas involucradas en la transducción de señales, esto es, la concentración de las formas activas de estas cinasas. Se ha propuesto que existen “**umbrales de activación**”, a partir de los cuales una proteína (léase población de esas proteínas) activada puede interaccionar, en forma efectiva (persistente), con otra para activarla ⁵⁸ En forma similar, se propone que existen umbrales de activación para la interacción de una proteína (a) con otras dos (b) y (c), esto es, la proteína en cuestión (a) primero interaccionaría con la proteína por la que tuviese mayor afinidad (b), de saturar a esta (población) proteína y aún quedar cierta cantidad de proteínas (a) activadas, podrian interaccionar con la tercera (c) proteína, por la que tendría menor afinidad. Generando así la divergencia de la señal (antes mencionada) que procesa una célula³².

2.2 PLATAFORMA BIOINFORMÁTICA DE ELECCIÓN.

Posterior al análisis y conceptualización del sistema de la transducción de señales celulares, se llegó a la conclusión de que se trata de un sistema complejo con dinámica no lineal. Asimismo, en forma coincidente con otros autores, se propone que la mejor forma de realizar una implementación para representar a este sistema debe ser mediante agentes inteligentes distribuidos en paralelo. En este caso, también en forma coincidente con el trabajo desarrollado por Laurence Clark de la Universidad de Liverpool, se propone el empleo de la plataforma llamada SWARM del Instituto de Santa Fe en Nuevo México E.U.

2.2.1 AGENTES INTELIGENTES

Es una técnica emergente* para abordar los problemas que las técnicas clásicas de la inteligencia artificial no habían podido solucionar. Los agentes, mas que sistemas o modelos, son una *metodología de diseño e implementación de sistemas complejos* con comportamiento discreto. Ésto es, el tiempo no transcurre analógicamente, sino para intervalos discretos. En su concepción original, el agente es considerado como un ente (pequeño programa autónomo) que puede interactuar con su medio recibiendo y enviando información, que recibe ciertas encomiendas y aplica sus habilidades para llevarlas a cabo. Por lo tanto, formalmente se dice que es un *proceso* autónomo, ya que el agente o agentes no existen sino hasta el momento de la ejecución de un programa que los contiene.

Esto es importante por que su comportamiento no es estático como el de un programa, sino que puede modificarse para adaptarse óptimamente a su entorno de acuerdo con su encomienda. Así, bajo estos

* En la teoría de la complejidad, una propiedad emergente es aquella que se sitúa en un nivel de funcionalidad superior a los componentes de un sistema. Esto es, es una característica global del sistema que surge de las interacciones de los elementos del sistema.

principios se aplica una o varias técnicas de solución de problemas para construirlo. Estos agentes se han aplicado en el control de sondas espaciales, para análisis de imágenes, para búsqueda de datos en Internet, en robots autónomos, etc.

Un trabajo teórico que concluye a esta metodología como la adecuada para representar el sistema de transducción de señales es el realizado por Schwab y Pienta⁵³, quienes en 1996 realizan una conceptualización del cáncer como un sistema adaptable complejo, y en 1997⁵⁴ aportan las características de los mencionados sistemas, correlacionándolos con el sistema de la transducción de señales, proponiendo las conveniencias de modelar el sistema bioquímico utilizando sistemas distribuidos *multiagentes*, a los cuales definen como los componentes activos de los sistemas complejos y adaptables. Adicionalmente sugieren el uso de otras metodologías de solución como los citados algoritmos genéticos para auxiliar a su modelo a evolucionar y lograr una mejor funcionalidad. Concluyendo que el sistema de la transducción de señales a nivel unicelular pudiese servir como un subsistema para modelar el proceso de carcinogénesis.

Por otro lado, están los trabajos de Paton en 1993⁴³, quien bajo el enfoque de sistemas multiagentes, llega a la conclusión de que la célula puede ser vista como una red de componentes funcionando en paralelo. De esa forma, el procesamiento de la información (durante la transducción de las señales) estaría distribuido entre cierto número de *agentes* que pueden trabajar independientemente pero con posibilidad de comunicarse entre sí. Por lo tanto es posible modelar cada "nodo" en la red de transducción de señales como un agente local individual, con la habilidad de realizar su respectiva tarea y comunicarse con otros *agentes*.

Recientemente Paton y Fisher (1999)⁴² amplían su propuesta al considerar al sistema de transducción de señales como un proceso estocástico pero auxiliado por efectos de localización de ciertos elementos acorde con las últimas evidencias provenientes del área de investigación experimental. De tal suerte que consideran a las proteínas involucradas, como entidades fuertemente dependientes de su contexto, y consideran que los trabajos de Bray con redes neuronales se encontrarían con serias dificultades para incorporar este nuevo factor de no-homogeneidad espacial (de hecho esto también es complicado para modelarse vía ecuaciones diferenciales), por lo que insiste en la conveniencia de modelar al sistema de manera global vía agentes computacionales. Aclarando que, si bien esta metodología es más adecuada, no necesariamente cada "agente" debe representar una proteína como tal, sino más bien reproducir su comportamiento. Por todo lo anterior y por coincidir con muchos planteamientos de esta aproximación basada en agentes se consideró conveniente el incluir una breve introducción a las bases teóricas que dan sustento a esta nueva aproximación, que más que estar relacionada con una técnica de inteligencia artificial en particular, se relaciona con los planteamientos de los sistemas complejos y la vida artificial.

3 METODOLOGÍA PARA IMPLEMENTAR UN MODELO DE LAS MAPK CINASAS

3.1 CONCEPTUALIZACION.

Como un primer paso y con base en el análisis de la sección anterior, se propone una división conceptual para diferenciar entre los factores que conforman al sistema de la transducción de señales celulares y los fenómenos bioquímicos que *emergen* de la interacción de estos factores. Esto es, para la implementación de un modelo bajo la aproximación descrita como "de adentro hacia afuera", es necesario identificar los fenómenos fisicoquímicos de que depende la transducción de señales celulares y por otra parte, los comportamientos bioquímicos que *emergen* de esos fenómenos fisicoquímicos

Donde:

Parámetros:

- Identidad fisicoquímica de las especies definida por:
 - Dominios catalíticos (cinasas, fosfatasas)
 - Subdominios de reconocimiento (SH₂, SH₃ PH)
- Concentraciones
 - subpoblaciones activas
 - subpoblaciones inactivas de una especie química
- Afinidades variables
 - Según su nivel de activación (generalmente fosforilación)
 - Basadas en los subdominios proteicos de las especies involucradas
 - Diversas, en una sola especie (por interacciones con más de una especie)
- Coeficientes de difusión
 - Alteración por interacción con elementos fijos (membrana o citoesqueleto)
 - Alteración por flujo a través de membranas (restrictivo o selectivo)
 - Alteración aparente por fosforilación (fenómeno inductivo)

Fenómenos emergentes:

- Patrones
 - A nivel de estímulos
 - A nivel de receptores
 - A nivel de factores de transducción activados
 - A nivel de salidas (atractores fenotípicos)
- Amplificación de la señal (incremento de las subpoblaciones activas)
- Umbrales de concentración para:
 - Divergencia de la señal
 - Convergencia de la señal
- Estados biestables de activación/inactivación de una ruta de transducción.
- Retroalimentación
- Allostérico o "Computo individual"
- Fenómenos topológicos (focalizaciones espaciales)

Con base en la conceptualización anterior y una visión *Bottom up* para la implementación de modelos complejos se consideró como el siguiente paso, desarrollar uno capaz de reproducir los fenómenos emergentes observados en cinética enzimática tradicional. Esto, con la finalidad de comparar resultados con datos experimentales así como con otros modelos basados en ecuaciones diferenciales y a futuro con otros basados en paradigmas de la inteligencia artificial. Por lo anterior se eligió la ruta de las MAPK cinasas, la cual ya ha sido estudiada bajo diversas aproximaciones teóricas así como por diversos estudios experimentales.

3.1.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LA RUTA DE LAS MAPKS CINASAS.

Un problema que han tenido que resolver diferentes estudios teóricos de la transducción de señales celulares, es la obtención de datos para alimentar a los modelos propuestos durante las simulaciones. En la mayoría de los casos esto se ha resuelto parcialmente, asumiendo valores o rangos de los mismos, para datos desconocidos. Otra estrategia ha sido el proveer a los modelos con datos de diferentes sistemas biológicos. Asumiendo estas consideraciones, ha sido posible implementar los modelos, realizar simulaciones y ajustar parámetros para alcanzar correspondencias cuantitativas o cualitativas con los resultados experimentales

En este caso, el esquema general del sistema de las MAPK cinasas, así como los datos para la implementación del modelo desarrollado, se basaron en los empleados por el trabajo de Ferrel J.E. (ver figura #)

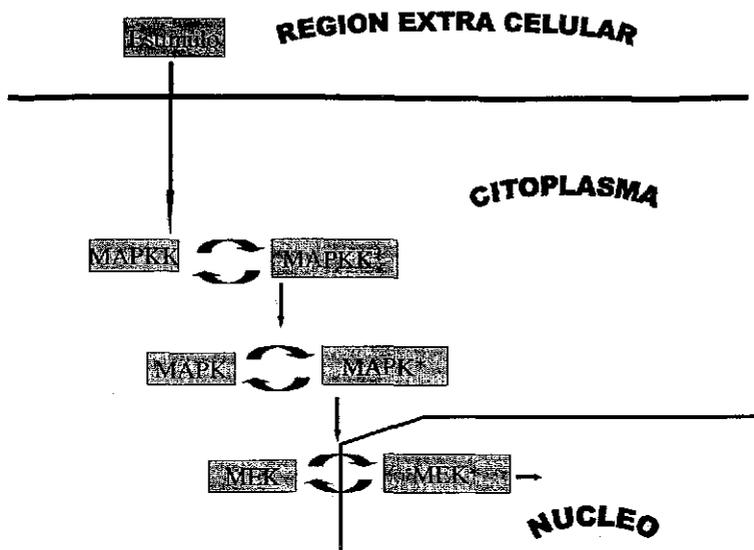


Fig 8) Aquí se presenta modificado el esquema de Ferrel para la activación secuencial de las MAPKS cinasas, que corresponde con lo descrito para los modelos generales de enzimas ligadas a receptores descritos en el capítulo anterior

Los datos correspondientes a este modelo son los siguientes:

Enzima	Concentración en reposo	en Rango	Rango de Km
Estimulo:	-	0.01- 0.81nM	60-1500 nM (300nM)
MAPKK:	3nM	0.6-15nM	60-1500 nM (300nM)
Fosfatasa de MAPKK:	0.3nM	0.06-1.5nM	60-1500 nM (300nM)
MAPK:	1.2 μM	0.24-6μM	60-1500 nM (300nM)
Fosfatasa de MAPK:	0.12μM	0.06-1.5nM	60-1500 nM (300nM)
MEK:	1.2 μM	0.24-6μM	60-1500 nM (300nM)
Fosfatasa de MEK:	0.12μM	24-600nM	60-1500 nM (300nM)

Tabla 1) Datos obtenidos del trabajo de Ferrel para una activación secuencial de la ruta general de enzimas ligadas a receptores, MAPKS cinasas. En este trabajo los valores de Km para cada una de las reacciones fueron supuestos y fijados en 300nM inicialmente. Adicionalmente cada valor fue movido en el rango de 60-15000nM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como el objetivo de la presente tesis es demostrar que el modelo incremental es viable, el primer paso es reproducir el comportamiento cinético pero con base en un comportamiento inspirado en los modelos de difusión reacción, por lo que fue necesario transformar los datos anteriores, tomando como referencia el número total de moléculas para cada paso enzimático. Así para:

Rango de diámetros celulares (mamíferos) = 10 – 30 μm

Rango de diámetros nucleares(mamíferos) = 3 – 10 μm

Tal que:

Volumen celular promedio = 4188.79 μm^3

Volumen promedio de organelos = 904.77 μm^3

Volumen citoplasmático promedio = 3284.01 $\mu\text{m}^3 = 3.28 \times 10^{-12}$ L

Estas suposiciones pretenden solo obtener el orden de magnitud aproximado para los valores anteriores, de tal forma que se incluyó el volumen citoplasmático ocupado por otros organelos como mitocondrias, citoesqueleto retículo endoplásmico y demás proteínas disueltas dentro del denominado como volumen promedio de organelos. Así tenemos que:

1nM X volumen citoplasmático promedio (3.28×10^{-12} L) = 1975 partículas

(1 nmol = 6.022×10^{14} partículas)

De acuerdo con el parámetro anterior, se modificó la tabla 1 para obtener los datos con los que se alimentaría al modelo en las simulaciones cuantitativas. De esta forma se obtuvo la última columna de la tabla 2.

Enzima	Concentración más usual *	Rango	Numero de partículas */célula	Número de partículas para simulación	Km para simulación
Estimulo:	0.81(máxima)	0.01-0.81nM	1600	8 -> 10	(300nM)
MAPKK:	3nM	0.6-15nM	5925	30 -> 50	(300nM)
Fosfatasa de MAPKK:	0.3nM	0.06-1.5nM	593	30	(300nM)
MAPK:	1.2 μM	0.24-6μM	2370000	11850 -> 10000	(300nM)
Fosfatasa de MAPK:	0.12μM	0.06-1.5nM	237000	11850	(300nM)
MEK:	1.2 μM	0.24-6μM	2370000	11850 -> 10000	(300nM)
Fosfatasa de MEK:	0.12μM	24-600nM	237000	11850	(300nM)

Tabla 2) Aquí es importante resaltar que se buscó respetar los órdenes de magnitud de las diferentes especies, así como la proporción de los Km respecto de sus respectivos sustratos-enzimas, que para el caso del modelo de difusión reacción aquí presentado está relacionado con la probabilidad de reacción asociada a una colisión entre las enzimas que relaciona una Km

De esta forma, se representó una región del total del citoplasma en donde se llevan a cabo las reacciones del esquema de trabajo, guardando siempre una correspondencia proporcional con los valores originales.

3.2 EQUIPO, CODIGO Y BASES DE DATOS

El equipo empleado fue:

- Computadora personal (PC) con procesador (Pentium III) de 1.4 GHz, 256Mb de memoria RAM, disco duro de 40Gb, conectada en red Ethernet a Internet.
- La plataforma computacional SWARM, empleada para el modelo basado en agentes fue desarrollada en el Instituto Santa Fe en Nuevo México, EU para implementación de sistemas complejos
- Para consultar diversas fuentes de información se hizo uso de Internet y el acceso institucional de la UNAM a diversas revistas internacionales del área, desde donde se pudieron obtener los datos necesarios para la implementación de los modelos

3.3 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO DE DIFUSIÓN REACCIÓN VÍA AGENTES COMPUTACIONALES.

Un segundo paso en el proceso de la implementación del modelo para el sistema de la transducción de señales, fue la elección de la plataforma sobre la cual se desarrollaría el modelo. Este proceso de elección y su respectiva justificación ya se desarrollo en el capitulo anterior, pero existen justificaciones más extensas en los trabajos de las referencias; Clark Lawrence, Camacho. Por lo que aquí solo se describirán brevemente algunas características de esta plataforma, para posteriormente describir la implementación paso a paso del modelo de transducción de señales para la ruta de las MAPK cinasas.

3.3.1 PROGRAMACION ORIENTADA A OBJETOS

En este punto se considera importante definir algunos términos que son útiles para comprender la implementación del modelo que están relacionados con la llamada programación orientada a objetos, la cual es ampliamente utilizada por la plataforma SWARM.

La idea básica de este paradigma para construir código es el crear pequeños programas independientes, capaces de simular un objeto del mundo *real*. Para esto se considera que un objeto del mundo real esta compuesto por un conjunto de atributos físicos y un conjunto de comportamientos:

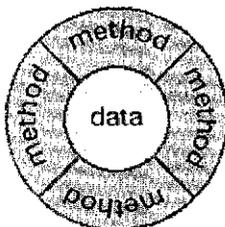


Fig 9. Aquí se representa a un *objeto virtual* el cual consiste de un conjunto de datos internos que no son accesibles salvo para aquellos objetos que él lo permita, así como una serie de comportamientos (también llamados *métodos*) a través de los cuales el objeto interacciona con los demás objetos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen tres características básicas de los lenguajes orientados a objetos; la *herencia*, el *polimorfismo* y el *encapsulamiento*. En realidad los objetos se encuentran definidos por *clases de objetos*, y es apartar de estas clases que se pueden crear las *instancias* (objetos) de las mismas. La herencia se refiere a que a partir de una clase se puede crear una subclase que hereda todos los *métodos* de la *superclase* así como el tipo de variables que debe contener. El polimorfismo se refiere a que dentro de una misma clase pueden existir múltiples objetos idénticos pero encontrarse cada uno de ellos en un estado diferente. Esto es, el estado de un objeto queda definido por el conjunto de valores que toman sus variables y estos pueden ser diferentes. Por último el encapsulamiento se refiere a que cada objeto mantiene restringido el acceso a su información.

3.3.2 BASES DE COMPUTACION CON SWARM

La idea principal de Swarm es la de proveer de una ejecución contextual dentro de la cual un gran número de objetos pueda "vivir cada uno su propia vida" e interactuar con otros de una forma distribuida y concurrente. Esta plataforma evita que el usuario tenga que adquirir la pericia en las ciencias de la computación que es necesaria para implementar sistemas de agentes autónomos masivamente distribuidos, permitiendo que el investigador se concentre en su área de estudio.

En el contexto del sistema de simulación Swarm, un esbozo genérico de un procedimiento experimental toma la siguiente forma:

- 1) Se crea un universo artificial con espacio, tiempo, y los objetos que pueden ser colocados en forma razonable, en ciertos "puntos" en la estructura global de espacio y tiempo dentro de

ese universo, y permitir a estos objetos determinar su propio comportamiento acorde con sus propias reglas y su estado interno en concierto con muestreo del estado del mundo (usualmente solo escasamente).

- 2) Se crea un número de objetos que sirve para observar, grabar, y analizar datos provenientes del comportamiento de los objetos implementados en el universo artificial en el paso 1.
- 3) Se realizan simulaciones del universo, moviendo tanto los objetos de la simulación como los de observación a través del tiempo bajo cierto modelo explícito de concurrencia.
- 4) Se interactúa con el experimento a través de los datos producidos por la instrumentación de los objetos para realizar una serie de corridas controladas del modelo.
- 5) Dependiendo de que es observado en el estadio 4), alterar el experimento o el aparato instrumental y regresar al punto 3.

3.3.3 IMPLEMENTACION DEL ESPACIO Y LA DIFUSION

Una de las características de la programación orientada a objetos y por consiguiente de la plataforma SWARM, es la capacidad para reutilizar código. Por lo que la implementación del espacio de dos dimensiones sobre el que se simularía la difusión se emplearon algunas librerías desarrolladas por McMullin en su proyecto "SCL: An Artificial Chemistry in Swarm". En este proyecto cada entidad química es una partícula con la capacidad de desplazarse en forma aleatoria sobre una retícula de dos dimensiones.

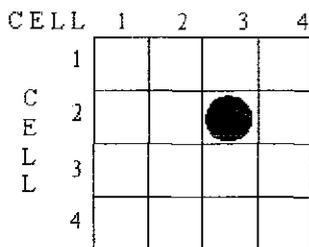


Fig 10 En esta figura se aprecia el espacio de dos dimensiones sobre el que existen las partículas. Aquí se puede apreciar que existe un entorno de ocho celdas para cada partícula

A partir de este momento, cada que se presenta la dependencia de un comportamiento en una función probabilística, el modelo emplea un *generador de números aleatorios* incluido en la implementación desarrollada por McMullin. Así por ejemplo, el desplazamiento se lleva a cabo de la siguiente forma:

- a) En un *instante* dado, la partícula verifica que no tiene algún impedimento para desplazarse y de no tenerlo, elige aleatoriamente una celda de las ocho de su entorno inmediato
- b) La partícula verifica que su vecino puede desplazarse, y de ser así multiplica uno de sus atributos que es su *probabilidad de desplazarse* (atributo configurable dentro del rango de 0-1) por la de su vecino, si este producto es superior a un umbral se aprueba el movimiento entre ambas partículas.
- c) El movimiento se realiza por un intercambio de posiciones entre ambas partículas. Esto asegura que nunca dos partículas ocupen el mismo espacio al mismo tiempo. Por lo tanto, en este modelo el medio acuoso estaría representado por otra *clase* de partículas, así no existe el "vacío" sino que las partículas se desplazan sobre un medio. Lo anterior representa una ventaja para implementar diversas condiciones de interacción con el medio
- d) Por último, ambas partículas registran su movimiento y se quedan impedidas para, en ese instante, volverse a mover. El punto a resaltar aquí es que el tiempo durante las simulaciones transcurre de forma discreta. De esta forma, el procesador asigna una pequeña fracción de tiempo a cada uno de los *procesos* de todos y cada uno de los objetos, agentes sub SWARMS, etc del modelo para que realicen todos sus cálculos y por esto se dice que el modelo trabaja en forma distribuida. También es importante notar que para cada intervalo de tiempo (*step* en el código) el modelo de forma global adquiere un nuevo *estado*.

3.3.4 IMPLEMENTACION DE LAS ESPECIES QUIMICAS.

Hasta el punto anterior se emplearon y modificaron las librerías existentes para crear la clase genérica de *PARTICULAS*. La cual implementa la capacidad de moverse de cualquier instancia que pertenezca a esta clase o cualquier subclase de la misma, la posibilidad de modificar el factor de movilidad de las mismas, y atributos como el color con que se desplazara en la pantalla a cada clase de partículas. Ahora se describirá el comportamiento incluido en cada una de las subclases de partículas para representar a las diferentes especies químicas; un ligando-receptor (estímulo en la sección que reproduce cualitativamente los resultados de Ferrel y receptor-ligando en la sección que incluye una estructura topológica) y tres proteínas cinasas MAPKK, MAPK y MEK.

3.3.4.1 CLASE INPUT

Adicional a los atributos de su superclase *PARTICULAS*, como su factor de movilidad y color, esta clase de partículas presenta la capacidad de *activarse* e *inactivarse* en forma independiente. Esto es una característica muy importante en el caso en que representa a un receptor membranar que puede tomar ambos estados; el activado o el inactivado. Para ambos casos la activación e inactivación esta en función de un factor probabilístico, que esta implementado como una variable configurable, de tal forma que es posible obtener diversos porcentajes de activación del total de esta especie química, lo cual resulta muy útil para obtener curvas estímulo respuesta.

3.3.4.2 CLASE MAPKK

Esta clase contiene varias modificaciones importantes sobre los métodos (comportamientos) empleados por su superclase Partículas de t como su activación es totalmente dependiente del contexto, por lo tanto, cada una de las partículas puede fijar ambas variables, su estado de activación y su factor de movilidad de acuerdo con lo siguiente:

- a) Para cada intervalo de tiempo, la partícula *percibe* el total de su entorno, *i.e.* las ocho celdas adyacentes a si misma
- b) Asumiendo que al inicio de una simulación el estado de activación de las partículas es negativo, salvo para el estímulo proporcionado (clase INPUT) se pueden presentar las siguientes alternativas
 1. Si en su entorno encuentra una partícula de la clase INPUT y se encuentra activada, entonces procederá al calculo para su estado de activación y se asignará un valor máximo a su variable para el factor de movilidad.
 2. Si en su entorno se encuentra una partícula de la clase INPUT y esta se encuentra inactivada, entonces modificará su factor de movilidad cercano a cero y mantendrá su estado de activación negativo (esto se implementó y utilizo en la segunda fase de simulaciones)
- c) La partícula en cuestión, una vez que ha actualizado los valores de sus variables procederá a calcular y realizar en su caso, su activación así como su desplazamiento
 - 1 Para su activación, la partícula obtiene el valor que le asigna el generador de números aleatorios de acuerdo con su probabilidad de activación, lo compara con un umbral y decide que la colisión es productiva o no, activándose o no.

Todo lo anterior reditúa en un comportamiento elaborado, donde se realizan tomas de decisiones, por lo que se habla de que esta clase de partículas esta representada por agentes inteligentes distribuidos en paralelo. Cabe notar la capacidad de estas partículas para discernir entre el estado de activación de las partículas con que interactúa y no solo su clase a la que pertenecen. Esto último se desarrolló en una segunda fase de implementación para acercar el modelo a representar fenómenos topológicos del tipo focalizaciones, antes mencionados.

3.3.4.3 CLASES MAPK y MEK

Ambas clases presentan atributos originales derivados de la superclase PARTICULAS así como sus modificaciones propias, lo anterior se debe a que la localización de estas enzimas corresponde al campo de química en solución homogénea, por lo que no es necesario implementar modificaciones al comportamiento incluido en la superclase respecto de su movilidad. Sin embargo, para que se lleve a cabo la activación de cada una de ellas cada partícula debe de percibir su entorno y de encontrar su enzima activadora en estado activo, ella misma será activada (consecuencia de la fosforilación) de acuerdo con el esquema de activación de FERREL, MAPKK-> MAPK -> MEK.

3.3.5 IMPLEMENTACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS DE MEDICION.

De acuerdo con lo descrito en el punto dos de la sección 3.3.2 fue necesario crear las herramientas que pudiesen cuantificar el comportamiento del modelo y cada uno de sus componentes. De tal forma que se elaboró un método de graficación que en tiempo real cuantificaran la cantidad de partículas de cada clase que se encontraban activadas (grafica análoga a las de concentración vs. tiempo), así como otra gráfica con calculo en tiempo real de la fracción de cada población de especies químicas activadas a cada instante

Asimismo se crearon las interfases con que el usuario pudiese configurar los diferentes parámetros de cada clase como:

Factor de movilidad. Se asigna inicialmente como general para cada clase, sin embargo como ya se mencionó puede variar para cada individuo de una clase.

Probabilidad de activación, un variable configurable que está en última instancia relacionada con la *afinidad* desde el punto de vista de la cinética enzimática tradicional o con la probabilidad asociada a toda colisión entre dos sustratos de que la misma sea productiva, en los esquemas de difusión reacción descritos en el capítulo anterior.

Probabilidad de inactivación. Para el caso del modelo desarrollado, esta variable es la que sustituye a el proceso de inactivación debido a colisiones con las enzimas fosfatasas, las cuales no son representadas aquí. Esta limitante se consideró incluirla como tal debido a que los primeros resultados obtenidos demostraron que era posible obtener los resultados cualitativos esperados, representando un gran ahorro en el calculo que el procesador realiza al disminuir considerablemente el número de partículas (agentes).

La interfaz mencionada permite modificar estos parámetros en cualquier instante sin tener la necesidad de recompilar la aplicación. Para esto se volvieron a modificar las clases implementadas en el modelo desarrollado por McMullin de acuerdo con las necesidades del modelo aquí presentado. De esta forma que también es posible agregar o quitar aleatoriamente elementos de alguna u otra clase de partículas en cualquier instante

4. RESULTADOS

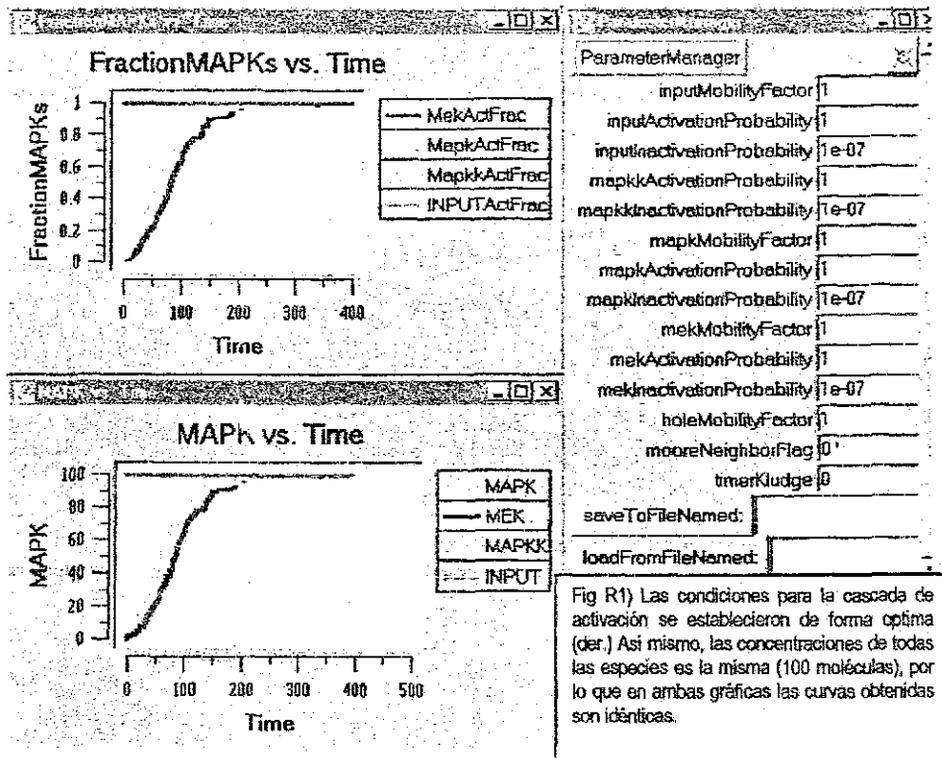
Como ya se mencionó, un paso en la implementación del modelo desarrollado fue el validar su utilidad tratando de reproducir resultados obtenidos por modelos que emplearon técnicas tradicionales para la simulación de la cinética enzimática en solución homogénea, como lo es el modelo de Ferrel⁵⁸ basado en ecuaciones diferenciales. Sin embargo, antes de intentar reproducir los resultados del modelo de referencia fue necesario establecer la forma de modificar los parámetros, de tal manera que se obtuviesen las equivalencias. Lo anterior se debe a las diferencias en la forma de representar el comportamiento de la cinética enzimática del sistema de transducción de señales celulares, ya que por un lado el modelo de referencia utiliza valores de K_m y por mi modelo emplea un conjunto de valores probabilísticos de interacción (probabilidad de encuentros, probabilidad de activación).

Otra diferencia importante entre ambos modelos fue la exclusión explícita de las protein fosfatasas, de las cuales solo se representó su actividad a través de un factor de inactivación para cada especie química de acuerdo con lo descrito en el capítulo anterior. Esta simplificación obedeció principalmente a las limitaciones del equipo de cómputo para realizar simulaciones con un número elevado de procesos paralelos. Aquí debe recordarse que cada enzima es representada en su comportamiento a través de un agente computacional, descrita arriba. En cualquier caso, se buscó que este factor probabilístico de inactivación guardase la misma proporción que mostraban en el modelo de referencia los valores de las protein fosfatasas para las diferentes especies químicas. Se presume que la variación asociada a esta consideración fuese de tipo sistemática y no aleatoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación se presentan parte de la serie de simulaciones cualitativas iniciales, realizadas con la finalidad de encontrar las equivalencias de implementación entre ambos modelos. Asimismo se buscó observar el comportamiento del modelo en forma global para compararlo con el tipo de curvas que experimentalmente se obtienen. De esta forma, los resultados presentados en esta sección son explícitamente de carácter cualitativo.

4.1 RESULTADOS CUALITATIVOS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la imagen anterior se pueden observar diferentes interfaces gráficas con que cuenta el experimentador. En la esquina superior izquierda es posible observar la gráfica que representa la fracción activada de cada especie a través del tiempo. En esa gráfica es posible observar y comparar el comportamiento de cada población química independientemente de su concentración. Por otro lado, en la esquina inferior izquierda es posible observar la gráfica del número total de partículas activadas de cada especie en un instante dado.

Como el espacio virtual en donde tienen lugar las interacciones entre partículas es constante, es posible hacer el análogo entre estos valores graficados y sus equivalentes curvas de concentración contra tiempo de gráficas experimentales

En la gráfica del lado derecho es posible observar una de las interfaces gráficas con que cuenta el modelo para la modificación de parámetros. Estos parámetros (Factor de movilidad, Factor de Activación y Factor de inactivación) deben ser establecidos al inicio de cada simulación, sin embargo es posible suspender la misma y en cualquier momento realizar modificaciones. Lo anterior es un análogo a las simulaciones que *in vitro* o *in vivo*, requieren de una preparación previa antes de poder estudiar el comportamiento del modelo a una modificación, o perturbación específica

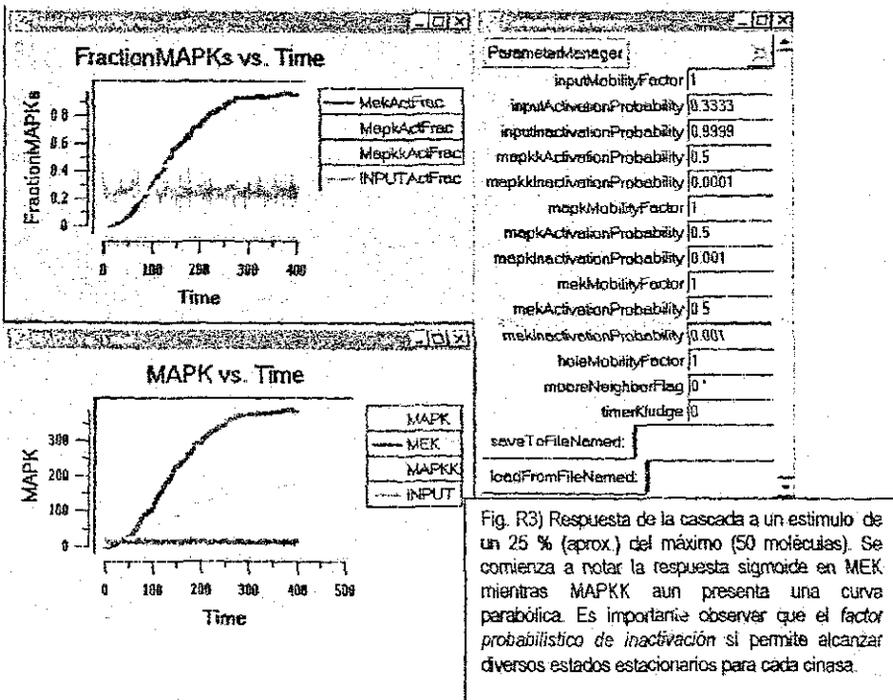
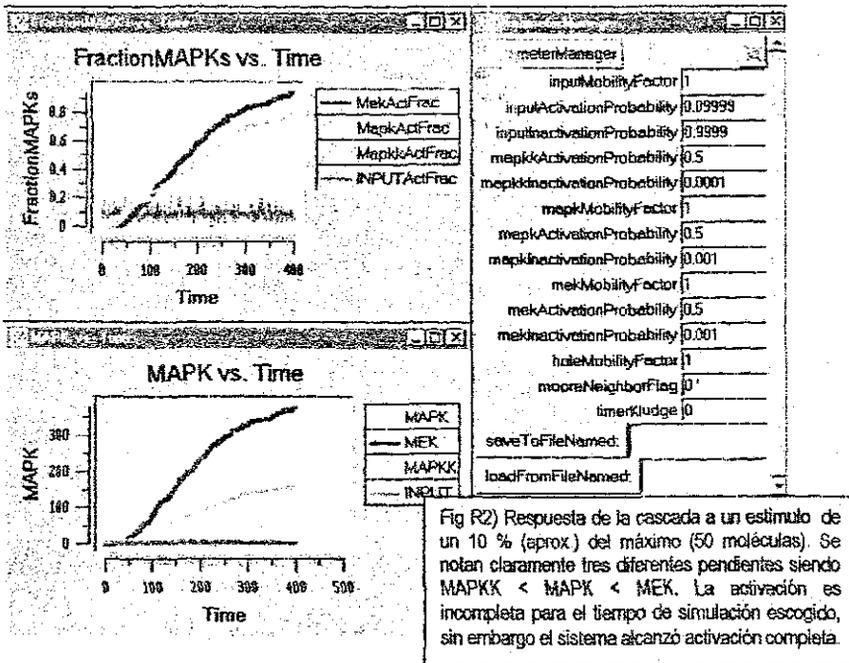
Con estas gráficas es posible observar y comparar el comportamiento que presentan las diferentes cinasas como resultado de tener una activación en cadena. Esto es, la cinasa MAPKK presenta una curva parabólica de tipo Michaelis Menten. Mientras que la última cinasa en la cascada MEK, presenta una curva sigmoide, como las encontradas en las enzimas alostéricas. Lo anterior es definido como comportamiento ultrasensible y es la principal aportación del trabajo de Ferrel, por lo tanto era uno de los resultados cualitativos más importantes a reproducir por el modelo

Para los resultados de la simulación anterior, los parámetros empleados buscan establecer condiciones óptimas para la activación de la cascada, por lo tanto los factores de movilidad y de activación de cada una de las cinasas fueron máximos ($p = 1$) y el factor probabilístico de inactivación se fijó como mínimo. Lo anterior se debe a que la finalidad para esta simulación era solamente observar el comportamiento ultrasensible bajo condiciones de máxima actividad

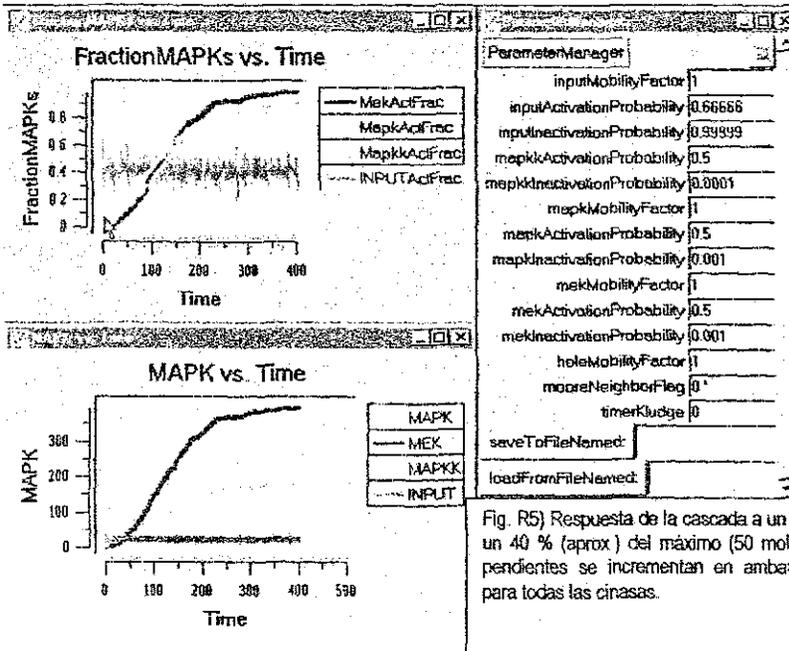
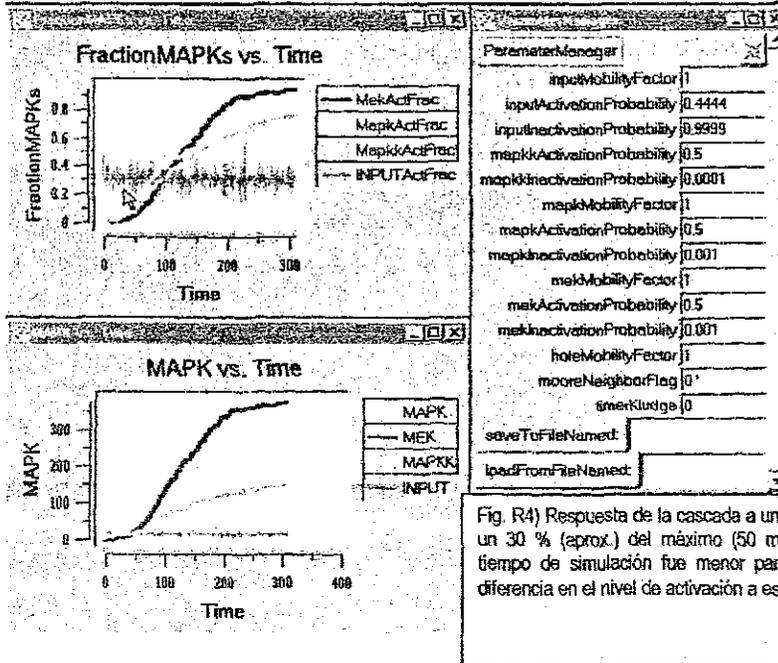
4.1.1 OBTENCIÓN DE CURVAS ESTIMULO RESPUESTA

A continuación se presentan una serie de imágenes con el formato de dos gráficas y sus respectivos parámetros de simulación, donde se variaron los valores del estímulo buscando obtener control sobre este parámetro para obtener curvas de tipo estímulo-respuesta. Por otro lado se modificaron las concentraciones de simulación de las cinasas con la finalidad de observar la amplificación de la cascada. Como regla general, se empleó el doble de concentración para cada cinasa respecto de su precedente en la cascada de activación. Sin embargo para todos los casos los parámetros de movilidad e inactivación fueron las mismas entre las diferentes cinasas.

	INPUT	MAPKK	MAPK	MEK
num. Partículas	50	100	200	400
Factor de movilidad	1	1	1	1
Factor de activación	Variable (10-90%) 50->100%	0.5	0.5	0.5
Factor de inactivación	Variable (10-90%) 50->100%	0.0001	0.001	0.001



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



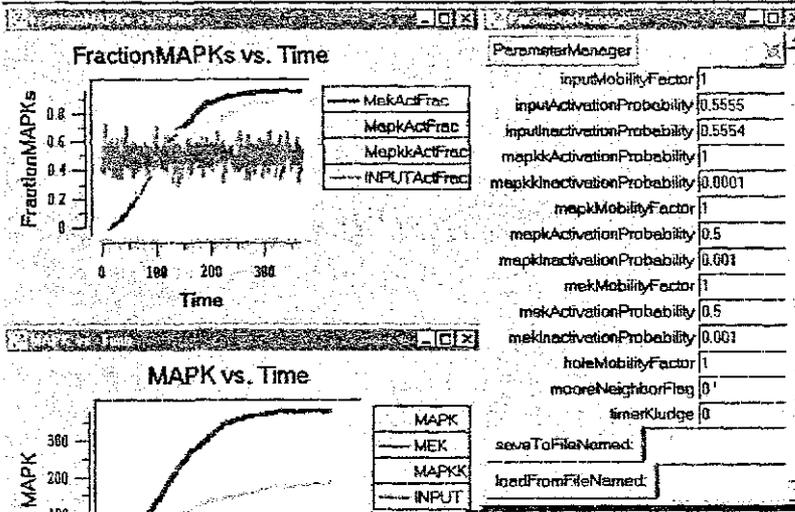


Fig R6) Respuesta de la cascada a un estímulo de un 50 % (aprox.) del máximo (50 moléculas). Se observa que MEK tiene un período refractario respecto de la activación de MAPKK.

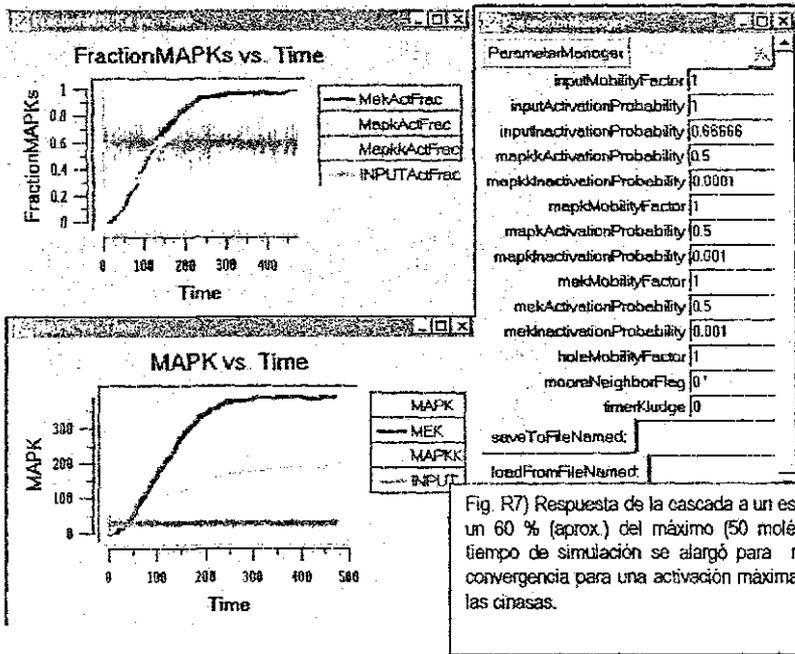


Fig R7) Respuesta de la cascada a un estímulo de un 60 % (aprox.) del máximo (50 moléculas). El tiempo de simulación se alargó para mostrar la convergencia para una activación máxima de todas las cascadas.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

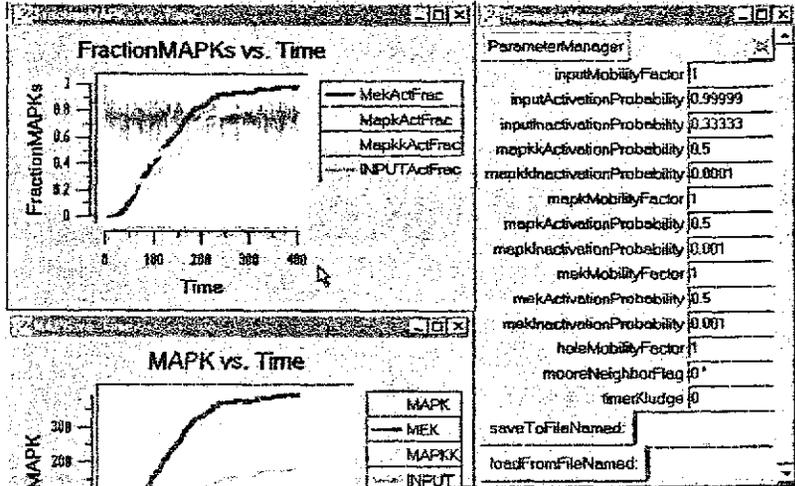


Fig. R8) Respuesta de la cascada a un estímulo de un 75 % (aprox.) del máximo (50 moléculas). Se nota la respuesta sigmoidea en MEK y su periodo refractario, mientras MAPKK aún presenta una curva parabólica.

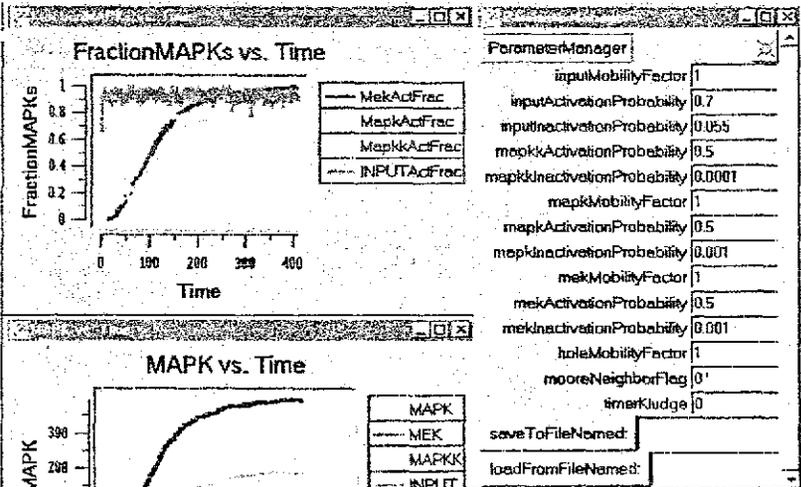


Fig. R9) Respuesta de la cascada a un estímulo de un 90 % (aprox.) del máximo (50 moléculas). Se notan máximas pendientes en las curvas de todas las casinas y sus diferentes comportamientos.

4.2 RESULTADOS SEMICUANTITATIVOS.

4.2.1 MODELO HOMOGÉNEO

Una vez que fue posible obtener cualitativamente el comportamiento ultrasensible, así como un relativo control para el estímulo, se procedió a reproducir los resultados del modelo de referencia. Para realizar lo anterior se emplearon los valores de equivalencias de concentración a número de partículas, calculados en la tabla 2 del capítulo anterior, aquí reproducida:

Enzima	Concentración más usual *	Rango	Numero de partículas *célula	Número de partículas para simulación	Km para simulación
Estimulo:	0.81(máxima)	0.01-0.81nM	1600	8 -> 10	(300nM)
MAPKK:	3nM	0.6-15nM	5925	30 -> 50	(300nM)
Fosfatasa de MAPKK:	0.3nM	0.06-1.5nM	593	3	(300nM)
MAPK:	1.2 μM	0.24-6μM	2370000	11850 -> 10000	(300nM)
Fosfatasa de MAPK:	0.12μM	0.06-1.5nM	237000	1185	(300nM)
MEK:	1.2 μM	0.24-6μM	2370000	11850 -> 10000	(300nM)
Fosfatasa de MEK:	0.12μM	24-600nM	237000	1185	(300nM)

Tabla 2) En esta tabla se buscó respetar los ordenes de magnitud de las diferentes especies, así como la proporción de los Km respecto de sus respectivos sustratos-enzimas, que para el caso del modelo de difusión reacción aquí presentado está relacionado con la probabilidad de reacción asociada a una colisión entre las enzimas que relaciona una Km

Sin embargo, las simulaciones se realizaron con los parámetros empleados en la serie de simulaciones anteriores para representar el comportamiento de cada protein cinasa.

Esto es, en lo referente a los valores de los factores probabilísticos de inactivación, sus valores absolutos son arbitrarios y lo que se preservó es la proporción que guardan las concentraciones de las respectivas fosfatasa.

Así mismo se preservaron las proporciones de los valores de Km respecto de los valores probabilísticos de movilidad y activación. Por supuesto esta primera aproximación carece de significado biológico pero solo se realizó así por fines de comparación. Los primeros resultados obtenidos son los siguientes:

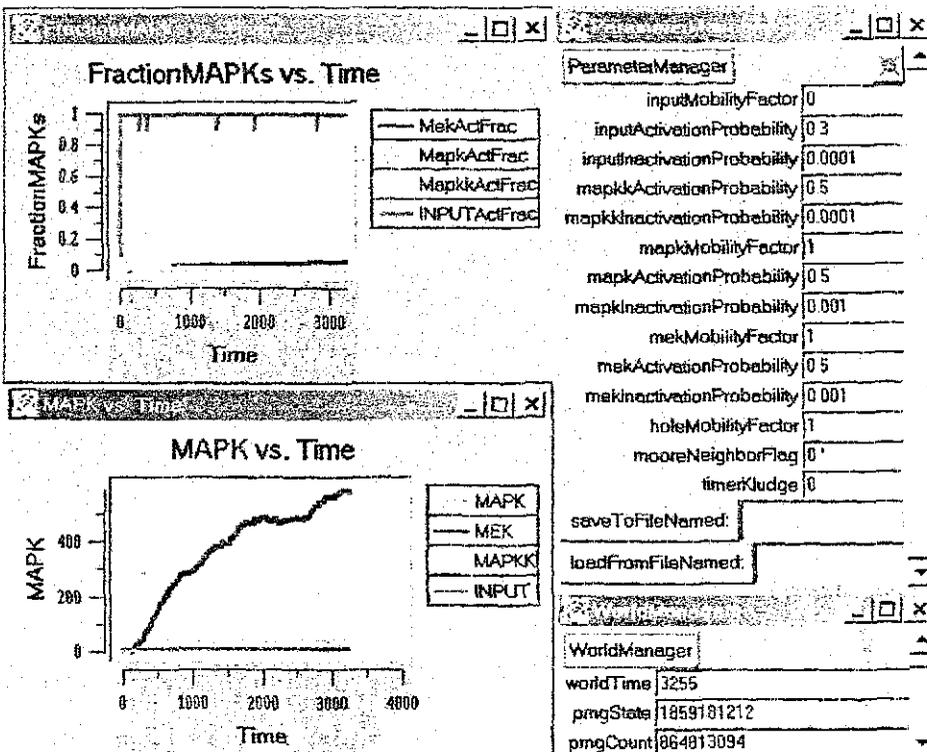


Figura R 10) En esta imagen se aprecian la dinámica del modelo semicuantitativo después de 3255 unidades de tiempo transcurrido (2h de tiempo real de simulación). Es importante notar que el valor de movilidad del estímulo es cero, ya que se propone que representa a un receptor activado desde el cual se comienza a propagar la señal de activación. Así mismo, es importante notar que los valores para su probabilidad de inactivación son muy bajos ya que se busca estudiar el comportamiento del modelo bajo el 100% de estímulo.

Debido a que las concentraciones son más altas que en la serie de simulaciones anteriores, en esta nueva serie de simulaciones el orden de magnitud de los intervalos de tiempo es proporcionalmente superior. Sin embargo en la imagen anterior (R9), a pesar de ello el modelo no alcanza a llegar a un estado estacionario, por lo que se consideró necesario continuar con la simulación y observar el comportamiento de la misma antes de evaluar los resultados de la activación de la cascada de las proteínas cinasas. Por lo que a continuación se presenta la serie de imágenes que corresponden los diferentes intervalos de tiempo de la misma simulación.

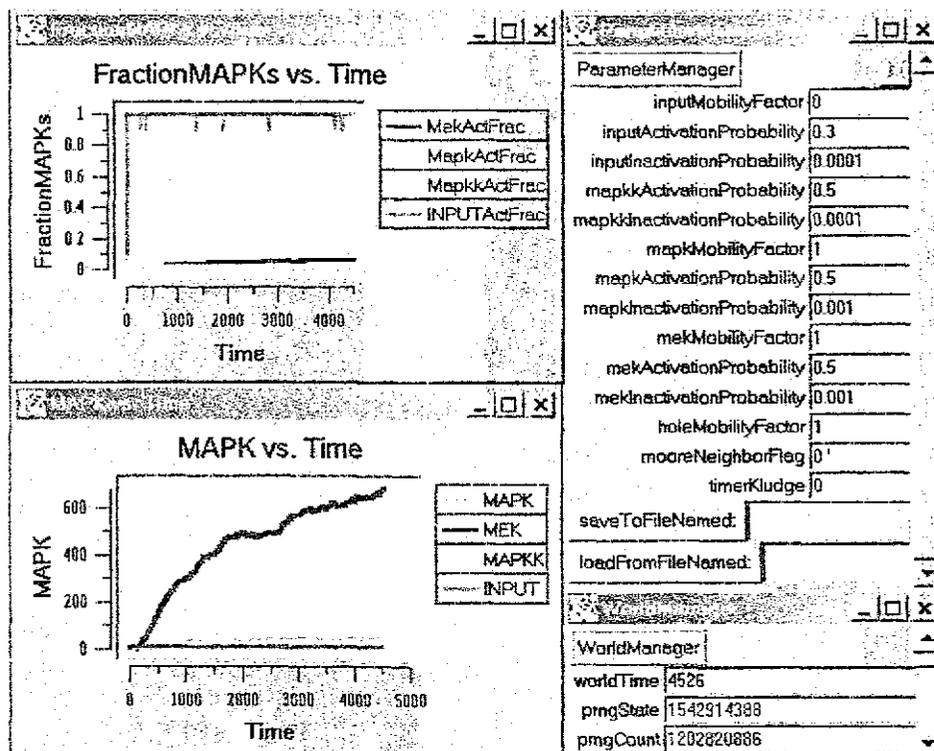


Figura R 11) En esta imagen se aprecia la dinámica del modelo semicuantitativo después de 4526 unidades de tiempo transcurrido (una hora adicional de tiempo real aproximadamente). En la misma se aprecia una tendencia clara de todas las cinasas para su activación bajo patrones diferentes definidos para cada una de ellas.

En este punto de la simulación (3 horas aprox.) se observan (en el recuadro de la esquina superior derecha, el cual representa a la fracción de activación de cada una de las cinasas) tendencias claras y relativamente estables para la activación de todas las cinasas. Sin embargo las pendientes de las mismas sugieren que la activación de la cascada de proteína cinasas consumirá un tiempo considerablemente mayor. Es importante aclarar que en el recuadro de la esquina inferior izquierda, donde se observan las concentraciones de cada una de las especies activadas, las grandes diferencias entre los valores de concentración de las mismas hacen que sea muy difícil apreciar las líneas que corresponden al estímulo (INPUT, en la imagen) y ala primer cinasa en orden de activación (MAPK).

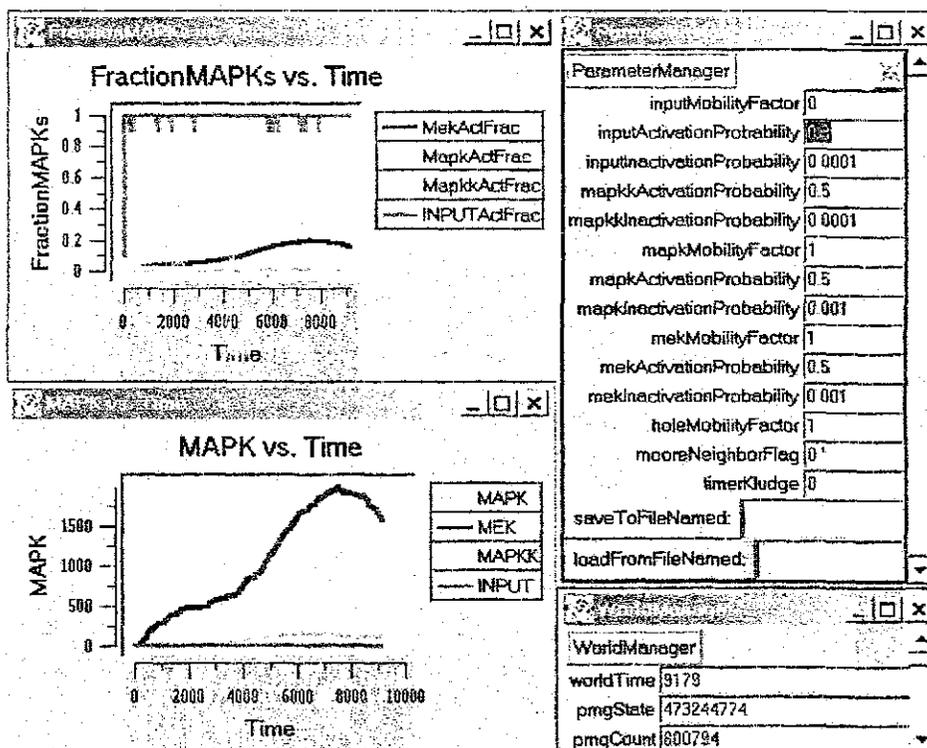


Fig R 12) Después de aproximadamente 4.5 horas de simulación, en este conjunto de imágenes se observan los siguientes cambios importantes en la cinética del modelo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura anterior existe mucha información por analizar, sin embargo por ahora solo se destacará lo siguiente:

- a) El estímulo (Input en color verde) se mantiene relativamente constante y en un máximo respecto de sus valores de concentración. Esto es, aproximadamente todas las moléculas del estímulo se encuentran activadas.
- b) La proteína cinasa MAPKK (color amarillo) presenta cambios en su velocidad de activación, mismos que solo se aprecian en el recuadro de fracción de activación. Presentando un incremento en el intervalo entre las 4000 y las 6000 unidades de tiempo, un decremento entre las 6000 y 7000 unidades y una aparente estabilización posterior a este intervalo.
- c) Es posible apreciar el comportamiento de la proteína cinasa MAPK (en color naranja) en ambos recuadros de la izquierda. En el recuadro inferior su comportamiento se aprecia muy similar a lo descrito para la cinasa MAPKK pero con un corrimiento hacia la derecha respecto del tiempo, al parecer como un reflejo tardío del comportamiento de la cinasa que la activa. Por otro lado, en el recuadro superior izquierdo, su comportamiento aparente es de una ligera pendiente pero casi constante, con un breve máximo alrededor de las 7000 unidades.
- d) Por último, el comportamiento de la última cinasa en la cascada, MEK, (la cual en última instancia determina si existe o no activación de la cascada en su conjunto) es por demás interesante

En ambos recuadros de la izquierda se puede observar un comportamiento regular hasta las 4000 unidades de tiempo, donde en el superior se observa una ligera pendiente positiva que refleja la curva parabólica que sigue el número de moléculas activadas de la especie, y que pareciera llegar a un equilibrio alrededor de las 500 moléculas. Sin embargo, a partir de este punto se observa un notable incremento en las pendientes de ambas curvas para el intervalo de tiempo entre las 4000 y las 7000 unidades. Los cuales son fácilmente atribuibles como respuestas ultrasensibles a los incrementos en las activaciones de las cinasas precedentes. Lo anterior se observa comparando la curva de la fracción activada de la cinasa MAPKK contra la de MEK en el recuadro superior, y las curvas de activación total entre MEK y la cinasa MAPK en el recuadro inferior. Por último se observa una importante caída en la activación de la cascada a partir de las 7000 unidades, el cual también refleja el comportamiento ultrasensible del sistema

Debido a que el modelo no llegó a un equilibrio hasta este punto la simulación se continuó monitoreando y a continuación se presentan los cambios más significativos encontrados

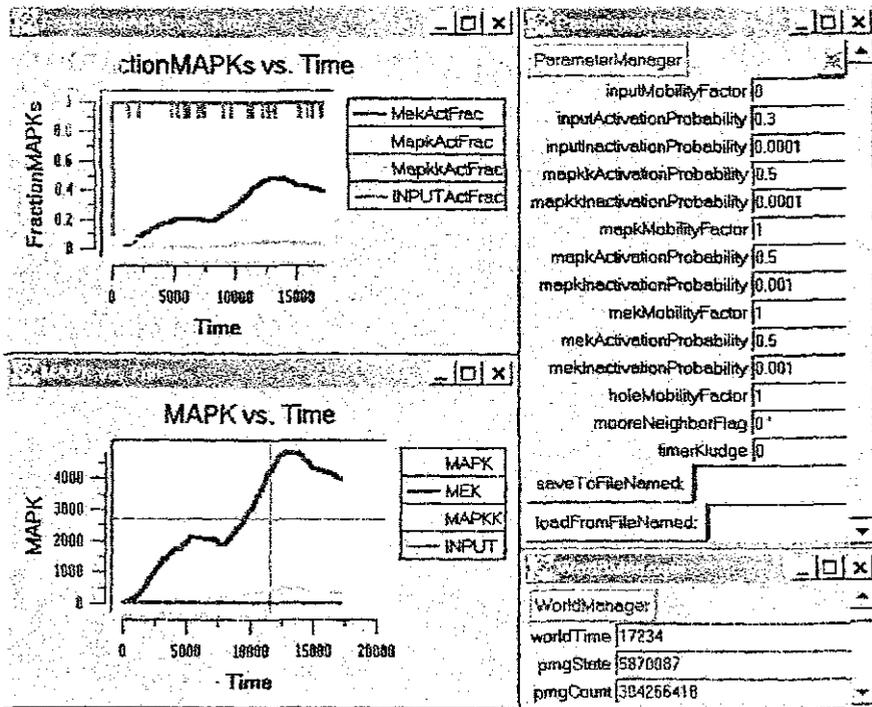


Fig. R 13) En esta figura se muestra la continuación de la dinámica de activación del modelo semicuantitativo durante aproximadamente 9 horas y hasta el tiempo virtual de 17234 unidades.

El comportamiento del modelo hasta este punto podría parecer muy complicado para describir, sin embargo es posible simplificarlo si se observa que existe un patrón, este podría describirse como incrementos por fluctuaciones regulares. Estas fluctuaciones parecen sugerir una activación escalonada hasta ahora no reportada, que bien podría estar relacionada con la periodicidad que existe en todos los programas que generan números en forma aleatoria, y son empleados exhaustivamente, como en este caso. Por lo que se determinó continuar con la simulación para comprobar o rechazar esta hipótesis, más que para asociar los resultados con una actividad bioquímica particular. De tal forma se obtuvieron las siguientes gráficas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

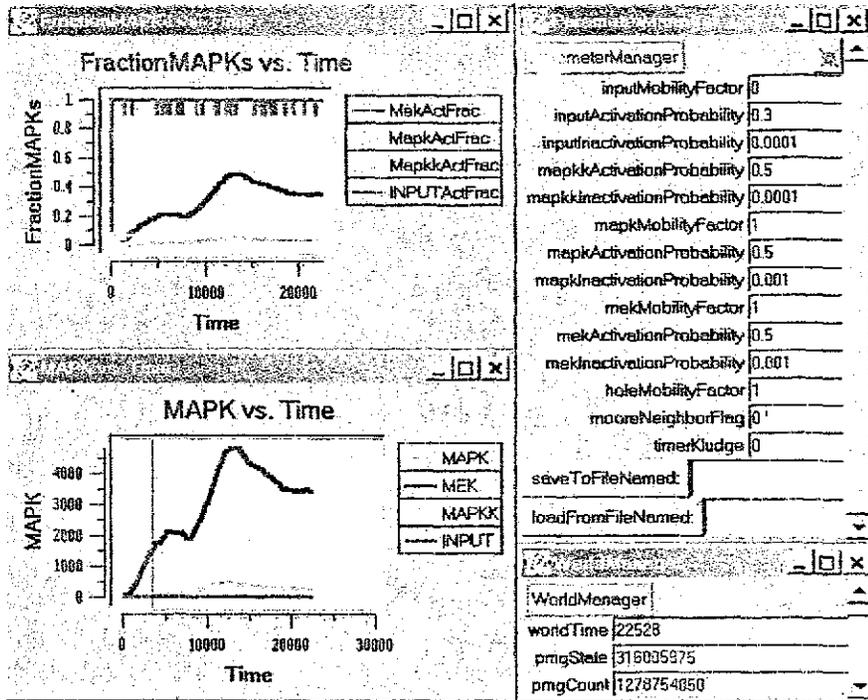


Fig. R 14) En esta figura se muestra la continuación de la dinámica de activación del modelo semicuantitativo durante aproximadamente 16 horas y hasta el tiempo virtual de 22528 unidades

En el conjunto de gráficas de la figura 14, es posible observar que el modelo, al parecer llega a un estado estacionario a partir de las 19 000 unidades de tiempo aproximadamente y que se mantiene estable hasta las 22 500 unidades. Esta estabilización parece ser atribuible a que el modelo realmente encuentra un equilibrio entre la activación e inactivación para cada una de las especies que representan la cascada de activación. De esta forma es posible sugerir que el comportamiento de activación escalonada observada, corresponde a la dinámica ultrasensible del sistema, lo cual como ya se mencionó era una de las características emergentes a reproducir por el mismo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También, es muy importante notar que el resultado final de la simulación, es una activación parcial de la cascada de las MAPK cinasas, donde la última cinasa MEK, alcanza un estado estacionario alrededor de un 40% de su actividad. Asimismo, es muy importante notar que el intervalo de tiempo de la simulación es muy grande y que el comportamiento, si bien refleja la característica de ultra sensibilidad propia del sistema, no corresponde con datos experimentales hasta ahora reportados, (sin que tampoco sea posible negar la existencia de este comportamiento, ya que los datos experimentales son muy dispersos y bien podría perderse este comportamiento en los mismos), por lo que se consideró necesario corregir posibles errores en los parámetros del modelo. De esta forma, se realizaron simulaciones bajo las condiciones óptimas de activación para el esquema de concentraciones sugeridos en el trabajo de Ferrel.

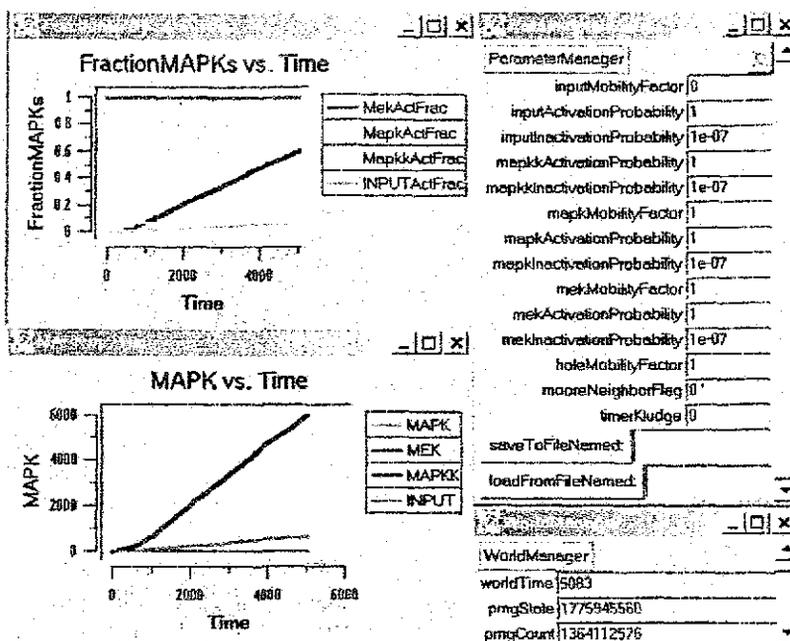


Fig. R 15) En esta imagen se aprecia la dinámica del modelo semicuantitativo bajo condiciones óptimas de activación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es posible observar en el conjunto de gráficas de la figura R15, que si los factores de activaciones de cada una de las cinasas se llevan a un máximo y los factores de inactivación de las mismas se llevan a un mínimo, entonces el comportamiento del modelo es el esperado para un sistema de difusión reacción sin equilibrio de inactivación. De esta forma el modelo irremediamente se activa (no se muestra, en la figura R15 solo se aprecia una activación de un 60% de MEK para un intervalo equivalente a 5000 unidades de tiempo) y solo se pueden apreciar las diferentes pendientes de activación, producto de las diferentes concentraciones de las especies y el comportamiento de amplificación de la señal descrito en la parte teórica. Gracias a esta simulación se consideró que el modelo de difusión reacción aquí presentado si es adecuado, pero que deberían existir divergencias con el modelo basado en ecuaciones diferenciales de tal forma que se pudiesen obtener los resultados esperados.

Por todo lo anterior se pensó en incrementar la complejidad del modelo desarrollado hasta este punto, de tal forma que fuese posible aproximar aún más el comportamiento del mismo con lo descrito en la literatura.

4.2.2 MODELO HETEROGÉNEO

Una de las características más importantes de los sistemas de transducción de señales es la organización espacial que presentan. Como ya se describió en la sección de la información general, esta organización espacial no es representada por los modelos deterministas basados en ecuaciones diferenciales. Así mismo su representación por los modelos estocásticos analizados como el desarrollado por Wurthner⁶⁹ ha demostrado ser una importante aportación de estos modelos. Por lo tanto, se decidió representar en alguna medida, una parte de esta organización espacial. Para lograr esto se tomó en cuenta que para el sistema de transducción de señales aquí desarrollado, la principal organización espacial es la que se lleva a cabo a nivel de membrana celular. Donde los receptores se encuentran limitados a una difusión en dos dimensiones y generalmente asociados a otros elementos del sistema de transducción de señales celulares (Ver Fig. 2. de la información general)

La creación de estas estructuras se llevó a cabo en forma auto organizativa, esto es, se modificó el comportamiento de los agentes de la especie MAPKK de tal forma que se adhiriesen (ver figura 13R) a los agentes que representaban a la especie estímulo (INPUT) cuando estas moléculas se encuentran inactivadas (ver metodología). Pero en el momento en que el estímulo se activase, las moléculas asociadas al mismo son activadas y liberadas para su difusión

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es importante destacar que por razones de simplificación del modelo se supuso que el receptor asociado a la membrana citoplasmática fuese inmóvil y que se representaría el estímulo como los complejos receptor-ligando en su conjunto. Así este complejo ligando-receptor incrementaría sus complejidad al agregarse en forma reversible la primer protein cinasa de la cascada: MAPKK.

Lo cual generaría un complejo similar a los observados en los receptores de siete pasos membranales, en cuya proximidad se encuentra ligera y reversiblemente asociada a la membrana citoplasmática la enzima RAS, a través de unas estructuras conocidas como caveolae las cuales están formadas por las proteínas membranales caveolinas y que se encuentran en la proximidad los receptores que activan a RAS. Todo lo anterior es acorde con lo descrito en la información general y representa un incremento en las características antes descritas como fenómenos emergentes de tipo topológico.

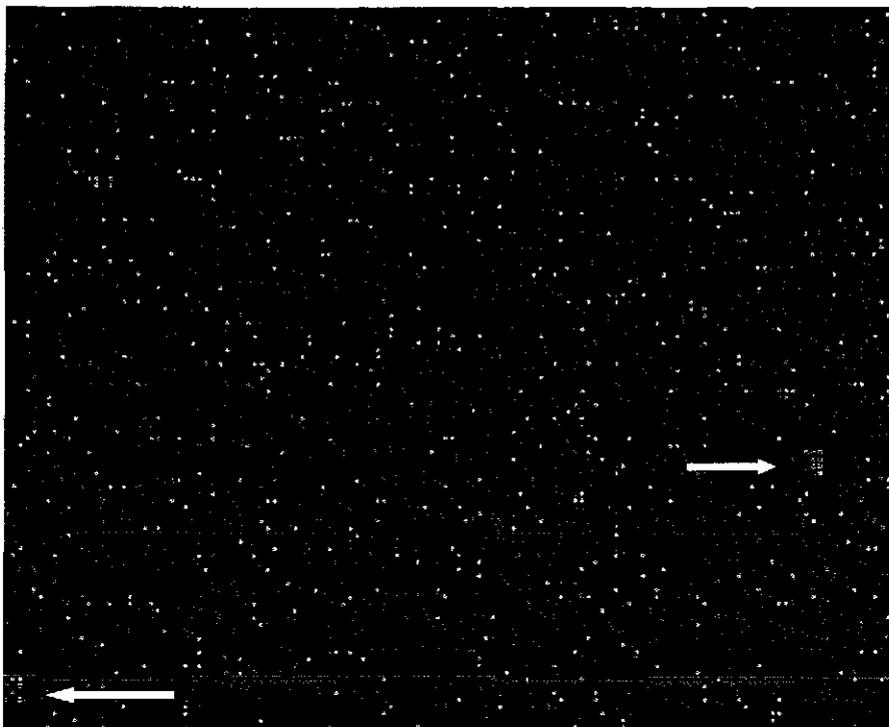


Fig. R 16) En esta figura es posible apreciar una fracción del espacio bidimensional sobre el cual se llevan a cabo los procesos de formación de complejos ligando receptor cinasa MAPKK, activación del mismo, difusión, reacción e inactivación. Siendo las especies químicas representadas por los agentes en color rojo para el complejo ligando receptor (o estímulo), los cuadros naranjas representan a la especie MAPKK, cuyo color cambia al encontrarse activados para azul turquesa. Así mismo, las especies MAPK es representada por los círculos verdes y la especie MEK por los círculos azules. En esta imagen se han señalado con flechas dos complejos de asociación, que se formaron en forma espontánea, entre el complejo ligando receptor (en color rojo) y las cinasas MAPKK en color naranja.

Por razones de tiempo de cómputo, las estructuras autoorganizadas en una simulación inicial, fueron guardadas para ser empleadas por las simulación de la transducción de señales. Por lo tanto en los conjuntos de gráficas que se mostrarán a continuación, el tiempo cero de simulación corresponde al momento en que se lleva a cabo lo que se propone como el complejo ligando receptor, y cinasa MAPKK.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

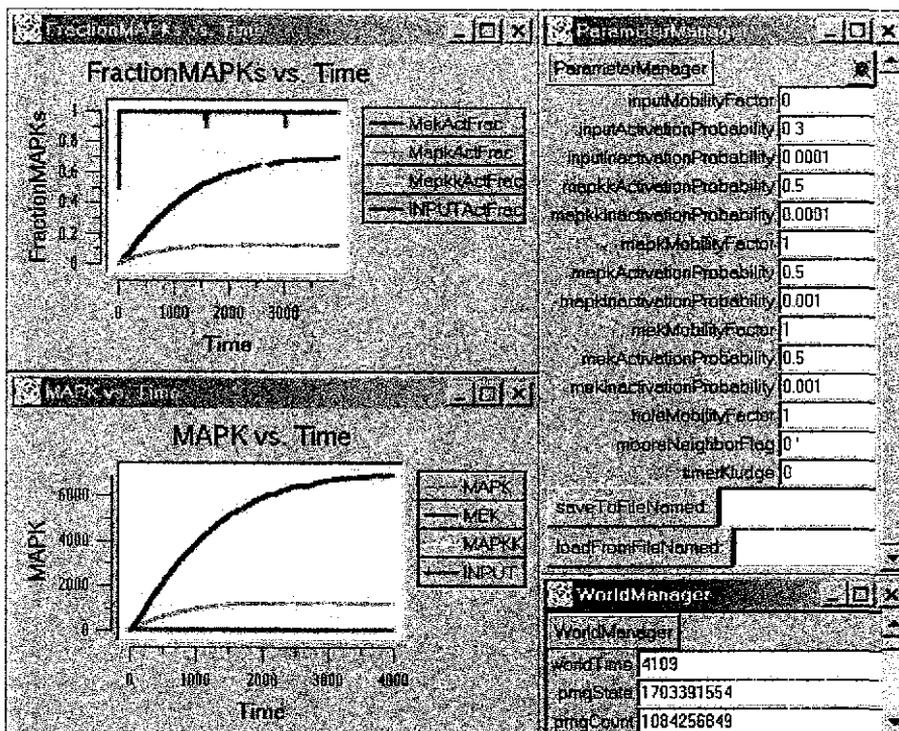


Fig. R 17) En este conjunto de gráficos se observa un comportamiento regular para la activación de la cascada de transducción de señales a través de una activación de 75% de MEK. Para lo cual se emplearon los valores establecidos como normales de acuerdo con el esquema de activación de Ferrel y colaboradores.

En el conjunto de gráficas R17, cabe notar que no se disparó la actividad de la totalidad de los complejos receptor ligando (INPUT) desde el principio, y que este alcanzó un máximo de activación a partir del tiempo 50 aproximadamente y se mantuvo constante el resto de la simulación. Asimismo, es importante resaltar que la cinasa MAPKK alcanza un máximo alrededor de las 50 unidades de tiempo y que a partir de ese momento busca su equilibrio con alrededor de un 60% de moléculas activadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Por otro lado, la cinasa MAPK presenta unas curvas de activación bastante uniformes que se estabilizan en alrededor de las 1400 unidades de tiempo. El máximo que alcanza esta cinasa es de tan solo poco más de un 10% (1000 moléculas), y sin embargo esto es suficiente para amplificar la señal activando a MEK hasta en un 70% del total de sus moléculas (10000 moléculas totales de las cuales se activan 7000 aprox) para el final del tiempo de simulación observado.

De esta forma, este primer resultado contrasta drásticamente con lo observado para las simulaciones de difusión reacción que corresponden a solución homogénea. En este caso, se observa que a) si se lleva a cabo la activación de la cascada de las MAPK cinasas, b) alcanzando la última cinasa MEK, una activación del 70% en c) un intervalo de tiempo que corresponde al orden de magnitud esperado en las primeras series de simulaciones. (4000 unidades de tiempo, aproximadamente 2 horas de tiempo real de simulación).

Así mismo se observa d) un comportamiento bastante uniforme para las cinasas cuya concentración es elevada, MEK y MAPK. e) que el modelo tiende a un equilibrio estable en este intervalo de tiempo f) que se lleva a cabo una amplificación de la señal (esto se observa con los números reales de las cinasas activadas en el recuadro inferior izquierdo), g) que el comportamiento es ultrasensible, lo cual se observa contrastando los números de concentraciones de las especies químicas en el recuadro inferior izquierdo y las fracciones activadas de las mismas, en el recuadro superior izquierdo.

5 ANALISIS DE RESULTADOS

Como ya se menciona en la sección 4.1 de los resultados, en esta sección se buscaba representar la cinética enzimática en solución homogénea. Esto pretendía ser el primer paso para validar el modelo basado en agentes distribuidos en paralelo y se deseaban obtener diversas curvas de activación enzimática. Estas curvas debiesen presentar diferentes pendientes debido a que su comportamiento no solo seguiría una cinética de Michaelis-Menten, sino que también deberían reproducir el comportamiento de enzimas alostéricas.

En la serie de figuras R2 a R9 es posible ver que las diversas enzimas presentan diferentes pendientes como resultado de la variación en el estímulo. Esto es, por un lado cada especie química presenta una pendiente mayor en tanto que el estímulo es mayor, lo cual se puede apreciar por comparación entre cada una de las figuras de R2 a R9. Por otro lado, en cada una de las simulaciones, la pendiente de la última cinasa de la cascada (MEK), es superior que las demás (MAPK y MAPKK) debido a que su velocidad de activación es mayor por efecto de la amplificación de la señal. Esto es normalmente asociado a un comportamiento alostérico en una sola enzima, sin embargo aquí este comportamiento de cooperatividad se presenta a través de la cascada en su conjunto.

De echo es posible relacionar el comportamiento anterior con el descrito por Ferrel en su trabajo como comportamiento ultrasensible. Este comportamiento ultrasensible Ferrel lo describe como la propiedad que tiene el modelo para emitir respuestas muy distantes entre si, como respuesta a cambios relativamente pequeños en el estímulo. Lo anterior Ferrel propone que puede verse como un funcionamiento tipo interruptor a nivel del sistema. Esto es, que en el sistema de la transducción de señales celulares existen umbrales que deben sobrepasarse para que un estímulo pueda generar una respuesta positiva. Visto de otra forma, que el sistema es robusto ante posible ruido aleatorio.

Lo anterior puede resultar difícil de visualizar en el modelo presentado debido a que en el trabajo de Ferrel se observa que en cierta región hace falta un pequeño incremento en el estímulo para pasar de una fracción de activación muy baja (considerada como una *no activación*) a una alta fracción de activación (activación positiva de la cascada) en la misma grafica y en este trabajo estos resultados no son presentados así. Esto es, Ferrel elabora graficas de estímulo respuesta a partir de un conjunto de resultados como los presentados en la serie R2 a R9 y en este caso no se elaboro ninguna grafica al respecto. Lo anterior obedece a que se prefirió únicamente proporcionar los gráficos obtenidos con el modelo desarrollado ya que esta serie de simulaciones carece de significado biológico. Para comprobar este comportamiento, se sugiere comparar la primera de las figuras de la serie (R2) y la ultima (R9).

Adicionalmente, en esa serie de figuras se buscaba el obtener cierto control sobre el estímulo suministrado al sistema. Por lo que otro de los resultados obtenidos, y quizás no menos importante; es el control relativo que se obtuvo respecto de los parámetros del modelo. Lo anterior se logro a través de modificar los parámetros de la probabilidad de activación e in activación de toda la población de la especie INPUT en su conjunto.

Una vez realizado esto, se observó que dicho estímulo oscilaba en un rango relativamente estrecho alrededor de un cierto porcentaje, lo cual era el objetivo de la manipulación de sus parámetros.

Por desgracia se observó que ese control en la fracción de estímulo que se encontraría activa, presentaba oscilaciones demasiado amplias respecto del valor deseado en tanto menor fuese el número de moléculas de la especie química INPUT. Esto último, por desgracia fue el caso de las simulaciones semicuantitativas de la sección 4.2 que buscaron seguir los valores del modelo de Ferrel donde este valor fue de tan solo 10 moléculas. Por lo que cualquier fluctuación en el número de moléculas activadas o inactivadas en un instante dado, representaba una fluctuación muy alta en la fracción del total activado.

Por otro lado, en la sección 4.2.1 se presentaron algunos de los múltiples conjuntos de simulaciones que bajo diferentes parámetros se realizaron. Lo anterior con la finalidad de rastrear el comportamiento del modelo bajo diferentes circunstancias. Sin embargo aquí se expusieron los resultados (figuras R10 a R14) cuyos parámetros guardaban una mejor relación con los valores de simulación del modelo de Ferrel por fines de comparación, ya que además se consideró que no se encontraron patrones muy diferentes entre sí, que requiriesen de una discusión adicional.

De tal forma y debido a las diferencias obtenidas en la sección (4.2.1) respecto del modelo de referencia, también se consideró válido cuestionar algunos puntos del esquema de trabajo del modelo de referencia. Un punto crítico de ese modelo, es la falta de claridad en lo que se está considerando como el "estímulo" (especie INPUT en el modelo aquí presentado).

Esto es claro si se trata de una hormona extracelular, en cuyo caso los valores de concentración del orden de nanomolar son lógicos, o como en el modelo aquí desarrollado, de una porción de complejos ligando-receptor que se suponen activados.

Por otro lado y quizás más importante está el echo de que en todo caso, en ese modelo se está involucrando elementos membranales (complejos receptor-ligando) que no obedecen a lo que se conoce como cinética en solución homogénea, ya que como se ve en este estudio la formación de estructuras topológicas es determinante para el comportamiento del modelo

En este mismo sentido, otro punto inquietante fueron los ya mencionados valores de las concentraciones de las cinasas, ya que en otros estudios las concentraciones de las primeras cinasas corriente arriba son muy superiores a los empleados por Ferrel. Todo lo anterior es por supuesto comprensible, ya que en esta área existen muy pocos datos experimentales de la cinética enzimática de fosforilación del sistema de transducción de señales celulares (Ferrel, comunicación personal) Por lo tanto, cabe señalar que el comportamiento del modelo basado en agentes sí valida su capacidad para representar cinéticas enzimáticas en solución homogénea por medio de la difusión-reacción, como se demuestra en las figuras R 2 a 9 y R15 Pero es importante señalar que el sistema presenta fenómenos topológicos que deben ser incluidos.

Por último, en la sección 4.2.2 se observa como los resultados cambian drásticamente en cuanto el modelo incluye fenómenos de focalización topológica. Lo anterior acerca al modelo aún más a la realidad y se obtiene un resultado alentador respecto de la capacidad de representar una cinética enzimática que incluya fenómenos de organización espacial en un tiempo razonable.

Todo esto se desprende de las curvas obtenidas en la figura R17, donde se obtiene una activación del modelo en un tiempo relativamente corto, tanto de simulación como real. A pesar de estos promisorios resultados, el desarrollo de este modelo se presenta hasta este punto, debido a que se deberá esperar mejores datos experimentales que puedan incorporarse al modelo.

6 CONCLUSIONES

A continuación se mencionan las conclusiones que se desprenden del trabajo anterior:

Como ya se describió en la información general, este estudio comprueba que es posible representar cinéticas enzimáticas de solución homogénea con simulaciones de difusión reacción de partículas.

El sistema de la transducción de señales requiere de una profunda conceptualización de sus características para poder representarlo adecuadamente, y se considera que no es suficiente la representación de la cinética enzimática en solución homogénea, si no que deben incluirse fenómenos de organización espacial para su correcta representación

A través de un modelo de agentes distribuidos en paralelo es posible realizar las simulaciones de difusión reacción y comportamientos mucho más elaborados como la autoorganización de estructuras espaciales, que son la base de los fenómenos topológicos. En este sentido, si bien la utilización de los sistemas masivos de agentes requieren de una inversión importante en tiempo máquina, su desempeño es muy superior a los modelos basados en ecuaciones diferenciales cuando se desea representar comportamientos más complejos que cinéticas en solución homogénea. Adicionalmente el empleo de sistemas multiagentes distribuidos en paralelo, ahorra mucho tiempo de implementación cuando se desea incrementar la complejidad del modelo.

En este mismo sentido, la aproximación Botton Up que emplea agentes computacionales distribuidos en paralelo se eligió para modelar el sistema de la transducción de señales celulares demostró ser muy útil, ya que en forma sencilla se puede incrementar la complejidad del modelo tanto como los datos lo permitan, lo cual deja abierta la puerta al futuro del presente trabajo.

7 Bibliografía

1. Alberts B., Bray D., Watson J., Lewis J, Martin R (1994) "Molecular Biology of the Cell" 3ª Edición. Garland. Publishing, Inc. Pags. 721-785
2. Arkin Adam (1999) "Genetic Regulation at the Nanomolar Scale" Trends in Genetics. 15:2 65-69.
3. Bhatia P, Wang Z, Friedberg E (1996) "DNA repair and transcription." Current Opinion in Genetics & Development 1996, 6: 146-150.
4. Bing S. Karin M. (1996) "Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression." Current Opinion in Immunology 1996 8: 402-411
5. Bolin J.T. "All in the family: Structural and evolutionary relationships among three modular proteins with diverse functions and variable assembly" (1998) Protein Science. 7:1661-1670.
6. Bourne H R., Williams L. T., (1994) "Cell regulation." Current Opinion in Cell Biology 1994, 6: 161-162.
7. Bray,D. (1990) "Intracellular signalling as a parallel distributed process" Journal of Theoretical Biology 143, 215-231.
8. Bray,D. (1995) "Protein molecules as computational elements in living cells". Nature, 376, 307-312.
9. Bray,D. Lay,S. (1994) "Computer simulated evolution of a network of cell signalling molecules". Biophysical Journal, 66, 4, 972-977.
10. Broach J. R., Levine A. (1997) "Oncogenes and cell proliferation." Current Opinion in Genetics & Development 7: 1-6
11. Buettner M H, Riley M R. "Monte Carlo Simulation of Diffusion and Reaction in Two-Dimensional Cell Structures". (1995) Biophysical Journal. 68:1716-1726.
12. Cahill M.A., Janknecht R., Nordheim A., (1996) "Signalling pathways:Jack of all cascades." Current Biology 1996, 6: 16-19
13. Cantley L. C , (1997) "Cell regulation" Current Opinion in Cell Biology 9: 131-133
14. Cobb M.H. (1996) "MAP Kinase Signaling Pathways" Promega Notes Magazine 59: 37
15. Davidson E.H , Chiou-Hwa Y (1998) "Genomic Cis-Regulatory Logic: Experimental and Computational Analysis of Sea Urchin Gene". Science 279: 1896-1902.
16. Decroly O , Goldbeter, A (1982) "Birhythmicity, chaos, and other patterns of temporal self-organization in a multiply regulated biochemical system " Proceedings of the Natural Academy of Science. USA 79: 6917-6921.
17. Eyster Kathleen M. (1998) "Introduction to Signal Transduction" Biochemical Pharmacology, 55: 1927-1938.
18. Fanger G R, Gerwins P, Widmann C, Jarpe M B, Johnson G. L, (1997) "MEKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?" Current Opinion in Genetics & Development 1997 7: 67-74.
19. Force T (1994) "Enzymatic Characteristics of the c-Raf-1 protein kinase" Proceedings of the Natural Academy of Science USA 91, 1270-1274.
20. Hasson O. (1997) "Towards a General theory of Biological Signaling" Journal of Theoretical Biology 185, 139-156

21. Heinrich R., Schuster S. (1998) "The modeling of metabolic systems. Structure, control and optimality" *Biosystems* 47: 61-77.
22. Helms J., McCammon A (1997) "Kinase conformations: A computational study of the effect of ligand binding" *Protein Science* (1997) 6: 2336-2343.
23. Hofestädt Ralf, Julio Collado (1999) "Modeling and simulation of gene regulation and metabolic pathways" *Biosystems* 49 79-82.
24. Hunter T. (1997) "Oncoproteins Networks" *Cell*. 88: 333-346.
25. Igamberdiev A. U. (1998) "Time reflectivity and information processing in living systems: a sketch for unified information paradigm in biology" *Biosystems*. 46 95-101.
26. Janin J. "Quantifying Biological Specificity: The Statistical Mechanics of Molecular Recognition" (1996) *Proteins: Structure Functions and Genetics*. 25:438-445.
27. Jones S., Thorton J. "Principles of protein-protein interactions".(1996) *Proceedings of the Natural Academy of Science. USA*. 93: 13-20 .
28. Junius K. (1994) "Cloning, expression, and spectroscopic studies of the Jun leucine zipper domain" *European Journal of Biochemistry* 219:3 877-86
29. Karin M. (1997) "AP-1 Function and regulation" *Current Opinion in Cell Biology* 9: 240-246
30. Katz M. E., McCormick F. (1996) "Signal transduction from multiple Ras effectors." *Current Opinion in Genetics & Development* 1997, 7: 75-79.
31. Kholodenko N. B., (1997) "Quantification of information transfer via cellular signal transduction pathways" *Federation of European Biochemical Societies Letters* 4141 430-434.
32. Lewin B. (1998) "GENES VI" 6ª Edición Oxford University Press. Pags. 1053-1145
33. Liberman E.A. (1998) "Biological information and laws of nature" *Biosystems*: 46 103-106.
34. Marijúan P.C. (1995) "Enzymes, artificial cells and the nature of biological information" *Biosystems*: 35 167-170.
35. Mc.Coy A.J. "Electrostatic Complementarity at Protein/Protein Surfaces". (1997) *Journal of Molecular Biology*. 268:570-584.
36. McCammon J A. "Theory of biomolecular recognition" . (1998) *Current Opinion on Structural Biology*. 8:245-249
37. Morrison D. Cutler E R. (1997) " The complexity of Raf-1 regulation" *Current Opinion in Cell Biology* 9: 174-179.
38. Nadel L. Stain Daniel L. (1995) "1993 Lectures in complex Systems" Addison Wesley Pags. 143-230.
39. Neel B , Tonks N. (1997) "Protein tyrosine phosphatases in signal transduction" *Current Opinion in Cell Biology* 9: 193-204.
40. Northrup S, Erickson H.P. "Kinetics of protein-protein-association explained by Brownian dynamics computer simlato" (1992) *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* 89:3338-3342
41. Parsons J. T., Parsons J. S (1997) " Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways" *Current Opinion in Cell Biology* 9: 187-192
42. Paton R.C. (1999) "Intracellular signaling proteins as "smart" agents in parallel distributed process" *Biosystems* 50:159-171.
43. Paton Ray C. (1993) "Some computational models at the cellular level" *Biosystems* 29:2-3 63-75
44. Pawson T. (1995) " Protein modules and signalling networks" *Nature* 373: 573-579.
45. Pawson T., Schott J D (1997) "Signaling Trough Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins"

Science 278: 2075-2080.

46. Ranish J.A., Steven H. (1996) "Transcription: basal factors and activation " Current Opinion in Genetics & Development 1996, 6: 151-158.
47. Ravi I, Upinder B. S. "Emergent properties of Networks of Biological Signaling Pathways" (1999) Science 283 15 January 381-387
48. Robinson M.J., Cobb M.H. (1997) " Mitogen-activated protein kinase pathways" Current Opinion in Cell Biology 9: 180-186.
49. Root-Bernstein R., Dillon F. "Molecular Complementarity I: the Complementarity Theory of the Origin and Evolution of Life" (1997) Journal of Theoretical Biology. 188:447-479
50. Saltiel A., Sawer T. (1996) "Targeting Signal Transduction in the discovery of antiproliferative Drugs" Chemistry and Biology 3: 887-893
51. Schalkoff R.J. (1990) "Artificial Intelligence: an Engineering Approach" Mc-Graw-Hill, Inc. Pags 1-33
52. Schamel W.W.A, Dick T.P. (1996) " Signal Transduction: Specificity of Growth Factors Explained by Parallel Distributed Processing" Medical Hypothesis 47: 249-255.
53. Schwab E.D., Pienta K.J. (1996) "Cancer as a Complex Adaptative System" Medical Hypotheses. 47: 235-241.
54. Schwab E.D., Pienta K.J. (1997) "Modeling signal transduction in normal and cancer cells using complex adaptative systems". Medical Hypotheses. 48: 111-123.
55. Treisman R. (1996) "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." Current Opinion in Cell Biology 1996 8: 205-215.
56. Vasconcelos J. (1998) "Paradigmas de la inteligencia artificial". Comunicación personal.
57. Vermeulen W., Hoeijmakers J, Egly J.M (1996) "TFIIH: a key component in multiple DNA transactions." Current Opinion in Genetics & Development 1996, 6: 26-33.
58. Ying C., Ferrell J., (1996) "Ultrasensitivity in the in the mitogen-activated protein kinase cascade". Proceedings of the Natural Academy of Science. U.S.A 93: 10078-10083.
59. Wurthner J. (2000) "A celular automaton model of cellular signal transduction" Computers in Biology and Medicine 30, 1-21