

LIC. EN C. RAFAEL VERDUZCO VÁZQUEZ

MODELOS SEMICONTINUOS DE REDES DE
SEÑALIZACIÓN EN EL ESPERMATOZOIDE DE
ERIZO DE MAR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

MODELOS SEMICONTINUOS DE REDES DE SEÑALIZACIÓN EN
EL ESPERMATOZOIDE DE ERIZO DE MAR

TESIS, QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
MODELACIÓN COMPUTACIONAL Y CÓMPUTO CIENTÍFICO
PRESENTA

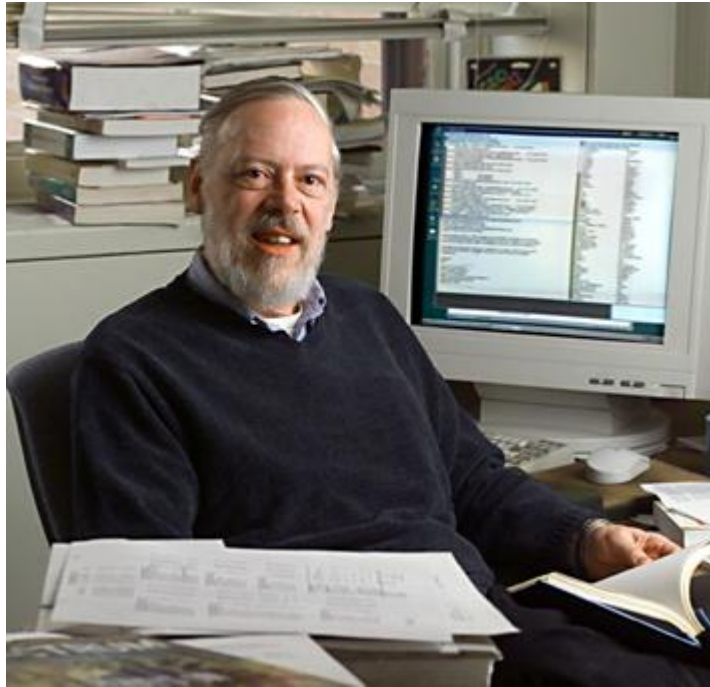
LIC. EN C. RAFAEL VERDUZCO VÁZQUEZ

ASESOR
DR. GUSTAVO MARTÍNEZ MEKLER

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2012

Lic. en C. Rafael Verduzco Vázquez: *Modelos semicontinuos de redes de señalización en el espermatozoide de erizo de mar*, Febrero 2012



Dedicado a la memoria de Dennis Ritchie
1941 – 2011

RESUMEN

En los organismos sexuales, la fecundación es un proceso fundamental para la preservación de la vida. En este evento es necesario que el espermatozoide nade en busca del óvulo. Uno de los organismos modelo que se ha utilizado para estudiar este proceso es el erizo de mar, que produce una gran cantidad de espermatozoides en cada eyaculación y cuyo proceso de fecundación es externo.

En este organismo modelo, varios resultados experimentales han relacionado distintos patrones de nado con una vía de señalización bioquímica que, al ser excitada por una molécula llamada speract que es liberada por el óvulo, induce un proceso de polarización y depolarización de la membrana celular del flagelo del espermatozoide. Este proceso de polarización y depolarización se debe a la entrada y salida de iones a través de distintos canales iónicos situados en la membrana. A través de un marcador fluorescente, es posible medir experimentalmente la concentración intracelular de uno de estos iones, el calcio.

En su estado nativo, el espermatozoide nada en modo circular. En la cercanía del óvulo, el espermatozoide se ve expuesto a un gradiente de speract, lo cual activa la vía de señalización antes mencionada. Como consecuencia de esta activación, el espermatozoide hace un giro brusco, seguido de un pequeño período en el que parece nadar de manera recta para luego intentar recuperar su nado circular. Cada molécula de speract que logra pegarse al receptor específico en la membrana del flagelo induce nuevamente esta vía, por lo cual se puede observar una alternancia de giros bruscos y nado recto.

En una especie de erizo, este proceso parece ser guiado conforme el espermatozoide nada hacia el lugar donde la concentración de speract es mayor, es decir, en dirección hacia el óvulo. En este sentido se puede decir que el speract funciona como un quimioatractor para el espermatozoide. Sin embargo, en otra especie de erizo el espermatozoide presenta los giros bruscos causados por el speract, pero no parece ser atraído hacia el óvulo. Si bien diferentes resultados experimentales han sido de utilidad para establecer cuáles componentes bioquímicos toman parte en la vía de señalización y por ende de la maquinaria de control de motilidad del espermatozoide, aún quedan preguntas por responder con respecto al papel que juega cada uno de dichos componentes en la dinámica de la vía de señalización.

En este sistema biológico, probar diferentes estados y condiciones de manera experimental requiere de metodologías muy elaboradas. Sin embargo, también es posible utilizar distintas clases de modelos computacionales, con los cuales se simule una gran cantidad de condiciones y estados.

Se pueden crear distintos tipos de modelos dinámicos de acuerdo a diferentes criterios y formalismos, que van desde aquellos en los que no se considera el espacio, el tiempo y estado de los componentes del sistema son descritos de manera discreta; a aquellos en los que espacio, tiempo y estado son variables continuas. Así mismo, hay modelos que incorporan variables estocásticas para describir el comportamiento del sistema a través del tiempo. Cada formalismo requiere de una cantidad y calidad distinta de datos.

Entre los modelos que requieren una menor cantidad de datos se encuentran las redes lógicas, donde tiempo y estado son discretos, y cada componente del sistema actualiza su valor en el tiempo de acuerdo a una regla de evolución discreta. A pesar de su simplicidad, estos modelos han demostrado una gran capacidad de recuperar de manera cualitativa el comportamiento de un sistema, a la par que son capaces de generar predicciones nuevas que sugieran comportamientos susceptibles de ser verificados de manera experimental.

En particular, el artículo de Espinal et al. [11] presenta un modelo discreto en tiempo y estado para la vía de señalización antes mencionada. Este modelo logró reproducir observaciones experimentales a la par de sugerir la existencia de comportamientos que no se habían estudiado anteriormente, y que fueron corroborados al realizar experimentos bajo las condiciones señaladas por la nueva predicción.

A pesar del éxito obtenido por este modelo, el tipo de comparaciones que pueden hacerse con las mediciones experimentales se mantiene a un nivel cualitativo. Para poder realizar comparaciones cuantitativas, se requiere que tiempo, estado o ambos sean variables continuas. Una manera de resolver este problema es construir un modelo consistente en un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias EDOs que reproduzcan, al igual que el modelo discreto, las observaciones experimentales. Sin embargo, los modelos basados en EDOs requieren de un conocimiento más detallado de las interacciones, así como de las concentraciones de los distintos componentes de una vía de señalización. En particular para esta vía de señalización, muchas de estas cantidades no son conocidas, y medirlas experimentalmente es un proceso complicado y en muchas ocasiones costoso.

Una alternativa es retomar el modelo discreto y transformarlo al formalismo de las ecuaciones de Glass. Este tipo de ecuaciones son de tipo diferencial lineal por pedazos, es decir, la dinámica del sistema se divide en intervalos de tiempo muy pequeños, y se definen sendas ecuaciones diferenciales lineales. La forma específica que toma la ecuación diferencial depende del valor de la función discreta sobre la cual se construyó dicha ecuación.

Las ecuaciones de Glass permiten hacer una comparación más directa con mediciones y condiciones experimentales. A pesar de que su formulación es muy sencilla, requieren de la estimación de un conjunto de parámetros, relacionados con el tiempo característico de reac-

ción de cada componente y parámetros de umbral. Estos umbrales permiten discretizar mediante funciones escalón las variables de estado continuas, de modo que puedan ser evaluadas adecuadamente por las funciones discretas y pueda obtenerse una forma concreta de ecuación diferencial en cada intervalo de tiempo.

Elegir adecuadamente un conjunto de parámetros tales que reproduzcan las mediciones experimentales de calcio y concuerden con el conocimiento biológico de los distintos componentes de la vía de señalización, no es un problema trivial. Sin embargo, la estimación de parámetros puede ser expresada como un problema de optimización, en la que se busque minimizar la diferencia entre dos trayectorias a lo largo del tiempo.

El hecho de plantear un problema de optimización requiere del uso de estrategias de exploración del espacio de soluciones de la función objetivo, especialmente cuando no se tiene una idea clara de los gradientes de la función objetivo. Algunas estrategias de exploración incluyen búsqueda aleatoria, algoritmos genéticos y evolución diferencial. Estos dos últimos son estrategias evolutivas que han demostrado su utilidad en una gran variedad de situaciones para las cuales el paisaje de la función objetivo no es necesariamente diferenciable y en general para cuando este no es conocido ampliamente.

Como una primera aproximación al problema de transformar un sistema discreto en uno semicontinuo, se consideró un modelo de red Booleana de tres nodos que se transformó en un sistema de ecuaciones de Glass sincronizado. Una de las soluciones fue considerada como señal experimental y se puso en marcha la estimación de los parámetros que generaron dicha señal. En este caso se pudieron recuperar los parámetros que generaron dicha señal.

En el caso del modelo para la red de señalización, se usó la noción de distancia para comparar las mediciones experimentales de calcio con la dinámica de Glass del nodo que representa al calcio, y se presentan los resultados obtenidos.

Esta tesis se organiza como sigue: en el capítulo 1 se discute brevemente el fenómeno biológico que se quiere entender a través de modelación computacional. Posteriormente se discuten un modelo de red Booleana de tres nodos que se usó para ganar entendimiento de cómo transformar un modelo discreto en uno semicontinuo, así como del modelo de la vía de señalización basado en funciones discretas. El capítulo 2 presenta una discusión de los alcances y limitaciones del modelo discreto a manera de motivación y justificación para el desarrollo de este trabajo; posteriormente introduce el formalismo de ecuaciones de Glass; plantea el problema de la estimación de parámetros como un problema de optimización, describiendo las nociones de distancia usadas para comparar la dinámica de calcio de Glass con mediciones experimentales; finalmente aborda brevemente el procedimiento seguido para poner en marcha la búsqueda de parámetros. 3 presenta

los resultados de la búsqueda de parámetros. Posteriormente se presentan conclusiones y trabajo a futuro en [4](#). Finalmente se presenta la bibliografía consultada para este proyecto.

*[C has] the power of assembly language,
and the convenience of... assembly language.*

— dmr, Dennis Ritchie.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos, yadda yadda.

Este trabajo contó con una beca de maestría por parte de CONACYT con número 241439. Además, se contó con el apoyo del proyecto PAPIIT IN-109210 de la DGAPA-UNAM.

ÍNDICE GENERAL

1	ANTECEDENTES	1
1.1	Antecedentes biológicos	1
1.2	Antecedentes de modelos discretos	4
1.2.1	Modelo discreto de tres nodos	5
1.2.2	Modelo discreto de la vía de señalización inducida por speract	6
2	MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1	Alcances del modelo discreto	11
2.2	Limitaciones del modelo discreto	11
2.3	Ecuaciones de Glass	12
2.3.1	Construcción de las ecuaciones de Glass	12
2.3.2	Ventajas y desventajas	13
2.4	Estimación de parámetros	13
2.4.1	Funciones objetivo	14
2.5	Estrategias de exploración	15
2.5.1	Tipos de exploración	15
2.6	Justificación del presente trabajo	18
3	RESULTADOS	19
3.1	Búsqueda de parámetros	19
3.1.1	Modelo de tres nodos	20
3.1.2	Modelo de la red de señalización	22
4	DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	27
4.1	Discusión	27
4.2	Conclusiones	28
4.3	Perspectivas y trabajo futuro	29
A	APÉNDICE	31
	BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Medición experimental de calcio intracelular . . .	2
Figura 2	Red de señalización	3
Figura 3	Modelo Booleano de 3 nodos	5
Figura 4	Modelo Discreto de la red de señalización	7
Figura 5	Applet del Modelo Discreto	9
Figura 6	El bloqueo del canal HVA retrasa el inicio de las oscilaciones de calcio	10
Figura 7	Dinámica original $Ca^{2+}ATPase$	21
Figura 8	Dinámicas original y estimada $Ca^{2+}ATPase$. . .	22
Figura 9	Dinámica del nodo de Ca^{2+} del modelo y medi- ción experimental de Ca^{2+}	24
Figura 10	Dinámica de Ca^{2+} , V y otros componentes del modelo, y medición experimental de Ca^{2+}	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tabla de regulación de cGMP	23
---------	---------------------------------------	----

ÍNDICE DE LISTADOS DE CÓDIGO

A.1	Modelo discreto de la vía de señalización. Implementa- ción en C	31
-----	---	----

ANTECEDENTES

En este capítulo se discute brevemente el fenómeno biológico que se quiere entender a través de modelación computacional. Posteriormente se discuten un modelo de red Booleana de tres nodos que se usó para ganar entendimiento de cómo transformar un modelo discreto en uno semicontinuo, así como del modelo de la vía de señalización basado en funciones discretas. Este último modelo es un antecedente directo del semicontinuo desarrollado en este trabajo.

1.1 ANTECEDENTES BIOLÓGICOS

La fertilización es un proceso crucial para la transmisión de la vida, que requiere el encuentro y fusión de los gametos. Para que este encuentro tenga lugar, el espermatozoide debe valerse de una intrincada maquinaria en su flagelo que le permita nadar en busca del óvulo. En algunas especies, el óvulo secreta una sustancia quimioatrayente que guía al espermatozoide hacia él. En el caso particular del erizo de mar, esta sustancia es un decapeptido llamado *speract*, Suzuki [47], Hansbrough and Garbers [24], el cual se une a un receptor específico en la membrana del flagelo del espermatozoide. La unión de *speract* con su receptor activa una red de señalización que produce oscilaciones en la concentración interna de algunos iones, de los cuales el principal es el calcio Darszon et al. [9].

La vía de señalización inducida por *speract* provoca la apertura de distintos canales que hiperpolarizan la membrana, es decir, que disminuyen drásticamente la polaridad de la membrana Kaupp et al. [31]. A su vez, esta hiperpolarización cancela la desactivación de canales regulados por voltaje, que al abrirse despolarizan la membrana Strücker et al. [45], Granados-Gonzalez et al. [20]. La despolarización se refiere al proceso de regresar la polaridad de la membrana a sus niveles basales. El proceso repetido de hiper y despolarización se ha relacionado con cambios transitorios en la concentración de calcio intracelular que a su vez han sido relacionados con cambios en la curvatura del flagelo del espermatozoide que resultan en modificaciones abruptas de su trayectoria Darszon et al. [9]. Estos cambios de trayectoria son una parte esencial para la motilidad y reorientación del espermatozoide. De ahí la importancia de entender los mecanismos bioquímicos que la generan.

Las oscilaciones de CALCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$ se caracterizan por presentar un incremento sostenido (*tónico*) y fluctuaciones superimpuestas (*supratónico*), tal como se muestra en la figura 1. Se cuenta con mediciones experimentales de la vía de señalización que son obtenidas al añadir un marcador fluorescente al calcio. Al estimularse la vía mediante la adición de speract al medio, es posible observar dichos incrementos tónico y supratónico en la concentración de calcio. Los datos fueron obtenidos por Adán Guerrero en el laboratorio del Dr. Alberto Darszon. Darszon et al. [9] y Wood et al. [54] presentan una descripción más detallada del tipo de técnicas experimentales usadas para la obtención de estos datos.

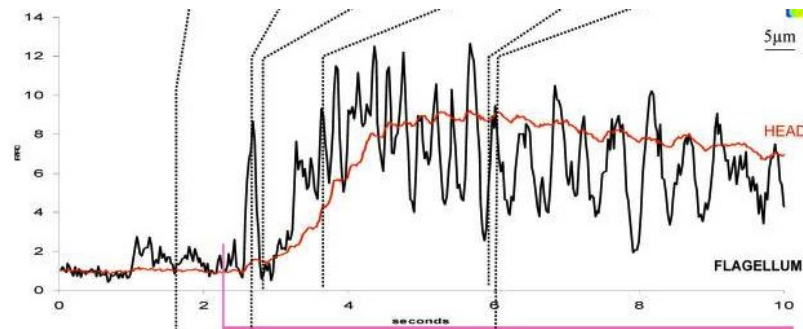


Figura 1: Medición experimental de fluorescencia de calcio intracelular en espermatozoides. Las oscilaciones tónicas corresponden al incremento sostenido en la concentración de calcio, y tienen una forma sigmoide. Este tipo de oscilaciones se presentan tanto en la cabeza como en el flagelo del espermatozoide. En la figura, la serie en rojo corresponde a la concentración de calcio en la cabeza, mientras que los datos en color negro corresponden a la concentración de calcio en el flagelo. Las oscilaciones supratónicas se observan solamente en el flagelo y se distinguen por ser las fluctuaciones que parecen "montarse" sobre la curva con forma sigmoide. La barra de color rojo en la parte inferior, que inicia poco después de la marca de los 2 segundos muestra el momento en el que el speract comienza a estimular la vía de señalización y el tiempo en la que ésta se mantiene activa. Figura modificada tomada de Wood et al. [52].

Vistos a detalle, los eventos de la vía de señalización que se muestra en la figura 2, inician con la unión de speract a su RECEPTOR (SR) Darszon et al. [9], que interacciona con una GUANILATO CICLASA (GC) Garbers [16] que produce GUANOSÍN MONOFOSFATO (GMP) CÍCLICO (*cGMP*). El aumento en la concentración de *cGMP* abre el canal (KCNG) Galindo et al. [15], que es un CANAL DE POTASIO (K^+) REGULADO POR *cGMP*. La apertura de (KCNG) resulta en la hiperpolarización del POTENCIAL DE MEMBRANA (*V*) Strünker et al. [45]. Como consecuencia de la hiperpolarización suceden cuatro eventos importantes:

1. se activa un INTERCAMBIADOR Na^+/Ca^{2+} (NCE) que disminuye los niveles de CALCIO INTRACELULAR $[Ca^{2+}]_i$ Nishigaki et al. [38]

2. se activa un INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ (*NHE*) que incrementa el pH INTRACELULAR (pH_i) [Lee and Garbers \[34\]](#), [Wang et al. \[49\]](#), [Su and Vacquier \[46\]](#), [Rodríguez and Darszon \[42\]](#)
3. se activa un CANAL ACTIVADO POR HIPERPOLARIZACIÓN Y REGULADO POR NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS (*HCN*) [Nishigaki et al. \[38\]](#), [Rodríguez and Darszon \[42\]](#), [Gauss et al. \[17\]](#), [Galindo et al. \[14\]](#)
4. finalmente, la sustracción de la inactivación del CANAL DE CALCIO DEPENDIENTE DE ALTO VOLTAJE (*HVA*) y el CANAL DE CALCIO DEPENDIENTE DE BAJO VOLTAJE (*LVA*) [Strünker et al. \[45\]](#), [Granados-Gonzalez et al. \[20\]](#), [Wood et al. \[52\]](#), [Wood et al. \[53\]](#), [Darszon et al. \[8\]](#), [Perez-Reyes \[40\]](#)

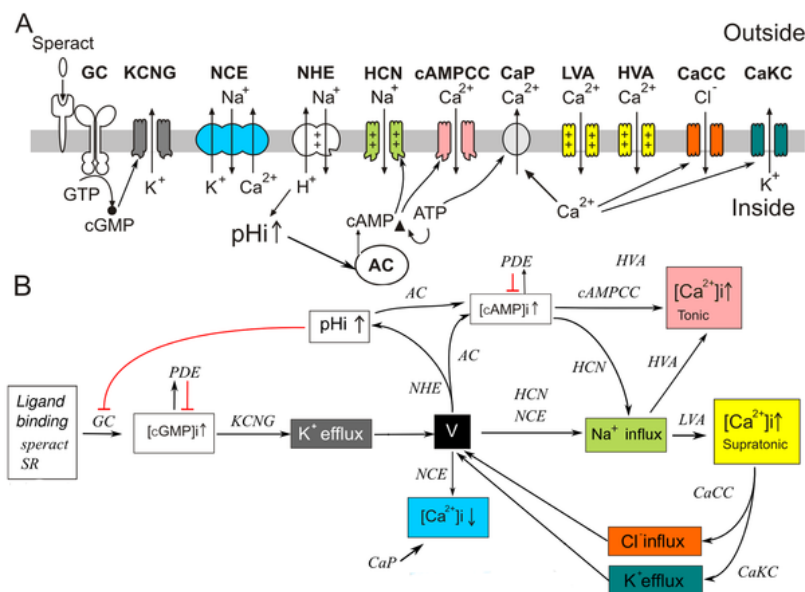


Figura 2: Red de señalización [Espinal et al. \[11\]](#). A) Componentes principales involucrados en la vía de señalización de speract. La unión de speract a su receptor en la membrana del flagelo dispara la cascada que produce cambios en $[Ca^{2+}]_i$ de dos maneras: un incremento sostenido (tónico) y fluctuaciones superimpuestas (supratónico). B) Eventos producidos por la vía de señalización.

El incremento del pH_i disminuye la actividad de GC a la vez que activa una ADENILATO CICLASA SOLUBLE (*sAC*), con la consecuente producción de ADENOSÍN MONOFOSFATO CÍCLICO (*cAMP*), [Nishigaki et al. \[38\]](#), [Cook and Babcock \[7\]](#), [Beltrán et al. \[3\]](#). Este último estimula un CANAL DE CALCIO DEPENDIENTE DE *cAMP* (*cAMPCC*) y el canal *HCN* previamente activado, lo cual tiende a repolarizar el potencial de membrana [Strünker et al. \[45\]](#), [Kaupp et al. \[30\]](#), [Nishigaki et al. \[38\]](#), [Rodríguez and Darszon \[42\]](#), [Gauss et al. \[17\]](#). Esta repolarización abre los canales *HVA* y *LVA* causando una despolarización y un incremento del $[Ca^{2+}]_i$, [Strünker et al. \[45\]](#), [Granados-Gonzalez et al. \[20\]](#), [Kaupp et al. \[30\]](#), [Böhmer et al. \[4\]](#), [Wood et al. \[52\]](#), [Nishigaki](#)

et al. [38], Wood et al. [53]. Finalmente, la vía de señalización se inicia de nuevo, posiblemente a través de un CANAL DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE Cl^- (CaCC) y un CANAL DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE K^+ (CaKC) Wood et al. [52], Wood et al. [54], Greenwood and Leblanc [21], que se abren cuando la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ es alta. Los mecanismos pasivos y constantes de extrusión de Ca^{2+} , tales como BOMBAS DE CALCIO (CaP) y NCE, mantienen los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ Nishigaki et al. [38], Su and Vacquier [46], Rodríguez and Darszon [42], Okunade et al. [39]. El mecanismo anteriormente descrito es repetido cíclicamente, generando un tren de oscilaciones de Ca^{2+} que produce una secuencia repetitiva de cambios de dirección en el espermatozoide Guerrero et al., [22], Guerrero et al. [23], Böhmer et al. [4], Wood et al. [53], Wood et al. [54]. En un experimento típico, como el mostrado en la figura 1, la vía se mantiene activa un promedio de 10 segundos Wood et al. [52].

1.2 ANTECEDENTES DE MODELOS DISCRETOS

Propuestos originalmente por Stuart Kauffman Kauffman [29], los modelos de red Boolena (o más generalmente, modelos discretos) son discretos en tiempo y estado, donde cada componente de una vía de señalización bioquímica o red regulatoria genética se considera como un nodo. La red está formada por estos nodos y un conjunto de aristas, que representan el tipo de interacción existente entre cada par de nodos. Estas interacciones pueden ser de activación o de inhibición.

En cada paso de tiempo t un nodo de la red puede encontrarse en un estado 0 ó 1. El 0 representa actividad basal o inactividad, mientras que el 1 representa actividad o expresión. En general, se pueden establecer distintos niveles de expresión o actividad si se considera que los nodos puedan tomar valores discretos, i.e. 0, 1, -1, 2, etc.

El sistema evoluciona a través del tiempo mediante una regla de evolución. Cada nodo i de la red tiene asociada una de estas reglas de evolución, que depende de k nodos reguladores de i , es decir, aquellos nodos que tienen una arista incidente en el nodo i . Si denotamos el estado del nodo i en el tiempo t con $\sigma_i(t)$, tenemos el mapeo discreto

$$\sigma_i(t+1) = F_i[\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t)] \quad (1.1)$$

Iterando esta regla de evolución para cada nodo de la red se obtiene una descripción por pulsos de la dinámica del sistema. Cada pulso puede ser considerado como el promedio discretizado de la variable de estado de cada nodo de la red durante un intervalo de tiempo dado. Si bien el $(t+1)$ en la función de evolución se refiere a un tiempo de máquina o tiempo de simulación, es posible hacer comparaciones entre este tiempo de máquina y el tiempo de los experimentos.

Uno de los aspectos fundamentales de este tipo de modelos discretos es que cualquier configuración inicial posible de estados del siste-

ma llega a un conjunto de configuraciones que se repiten a lo largo del tiempo tras iterar un cierto número de veces la reglas de evolución de la red. Estas configuraciones repetidas pueden ser puntuales, es decir, la misma configuración se repite *ad eternum*; o bien cíclicas, es decir, el sistema vuelve a la misma configuración después de un cierto número de pasos de tiempo. En ambos casos, el conjunto de los estados que se repiten una y otra vez, se conoce como atractor. El conjunto de todas las configuraciones iniciales que tras iterar la regla de evolución del sistema alcanzan un atractor, se conoce como cuenca de atracción. Las configuraciones que se encuentran entre una condición inicial y un atractor, se conocen como transitorios [Bornholdt \[5\]](#).

Este tipo de modelos han sido utilizados para modelar redes de regulación genética dando una descripción cualitativa del sistema, como se muestra en [Espinosa-Soto et al. \[12\]](#), [Albert and Othmer \[1\]](#). Además, recientemente se han usado para modelar vías de señalización [Morris et al. \[37\]](#).

[Huang et al. \[27\]](#) muestran que los atractores dinámicos corresponden a patrones estables de expresión genética que determinan estados funcionales estables de una célula. En el caso del modelo de la red de señalización que se estudia en este trabajo, los atractores de la red determinan las oscilaciones estables de calcio que posibilitan la relocalización de los espermatozoides a través de las alteraciones que el calcio induce a la curvatura del flagelo.

1.2.1 Modelo discreto de tres nodos

Con el objetivo de explorar y ganar entendimiento acerca de cómo transformar modelos discretos en modelos de Glass, se utilizó una red Booleana de tres nodos que había sido estudiada previamente por [Saadatpour et al.](#) En ese trabajo se caracteriza por completo el comportamiento de dicha red discreta. Este modelo discreto es mostrado en la figura 3.

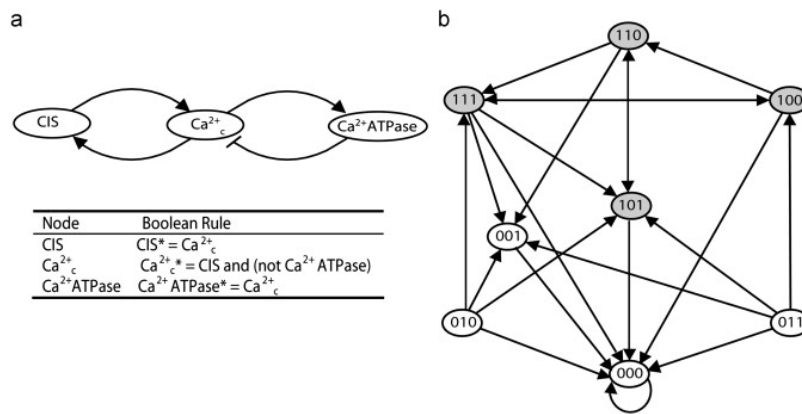


Figura 3: Modelo Booleano de 3 nodos de [Saadatpour et al. \[43\]](#). a) Reglas Lógicas. b) Estados posibles de la red.

Si bien este modelo no está relacionado con la red de señalización discutida en esta tesis, el hecho de contar con pocos nodos sirvió como un buen punto de partida para transformar un modelo Booleano en uno de ecuaciones de Glass.

1.2.2 *Modelo discreto de la vía de señalización inducida por speract*

Espinal et al. [11] presentan un modelo discreto en tiempo y estado para la vía de señalización inducida por speract en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar. En ese trabajo, dieciocho de los veintidos nodos toman valores de estado 0 ó 1, mientras que los cuatro nodos restantes tienen un valor de estado ternario, es decir, cada uno de estos nodos puede encontrarse en el estado 0, 1 ó 2. Esta extensión a tres valores posibles es necesaria para capturar los estados posibles en los que se puede encontrar un componente de la red, véase la figura 4.

En el trabajo citado, se determina que este modelo llega a dos configuraciones cíclicas o atractores, uno de período cuatro y otro de período ocho. Estos atractores se relacionaron con las mediciones experimentales de fluorescencia de calcio en el flagelo del espermatozoide. El 80% de las configuraciones iniciales posibles convergen al atractor de período cuatro. El período cuatro de este atractor corresponde a una oscilación del tren de oscilaciones que se observa en las mediciones experimentales como la de la figura 1 Espinal et al. [11].

Un paso fundamental al proponer un modelo para un sistema biológico consiste en comparar los resultados de dicho modelo con comportamientos que se hayan observado previamente mediante técnicas experimentales. A este proceso se le conoce como validación del modelo. El modelo presentado en Espinal et al. [11] corrobora en un nivel cualitativo comportamientos observados experimentalmente, por ejemplo:

- En ausencia de speract, todas las condiciones iniciales alcanzan las condiciones basales tras un pequeño transitorio. De esta manera se confirma el papel que juega el speract para disparar las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$.
- Si el nodo correspondiente a la permeabilidad de potasio (dK) se elimina, las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ se suprimen. Este comportamiento se ha observado experimentalmente en Babcock et al. [2].

Una de las ventajas de construir modelos dinámicos de vías de señalización es facilitar la simulación de una gran cantidad de condiciones experimentales, con la intención de realizar predicciones que sugieran experimentos nuevos.

El modelo de la vía de señalización de speract predijo dos comportamientos que no se habían observado experimentalmente. En particular, uno de ellos consiste en que al suprimir el canal *HVA*, aumen-

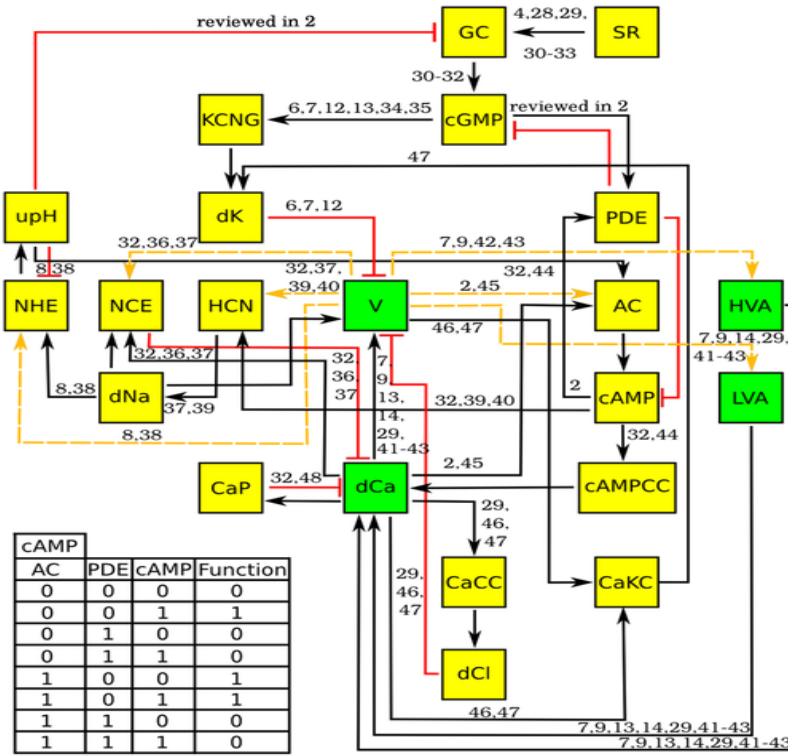


Figura 4: Modelo Discreto de la red de señalización Espinal et al. [11]. Los cuadros amarillos y verdes indican nodos binarios y ternarios, respectivamente. Las flechas negras indican activación, las líneas rojas inhibición y las flechas amarillas pueden representar activación o inhibición, dependiendo del valor del nodo de voltaje (V). Los números sobre las flechas corresponden a las referencias con las que Espinal et al. [11] construyeron la red y sustentan cada interacción. A manera de ejemplo, la función reguladora o tabla de verdad del nodo de $cAMP$ se muestra en la esquina inferior izquierda. Las primeras 3 columnas en esta tabla contienen todos los valores posibles de activación de los reguladores de $cAMP$, (AC , PDE , $cAMP$); la cuarta columna muestra los valores para la función que corresponden a cada combinación de los reguladores.

ta el tiempo para que la concentración de calcio alcance los valores de alta intensidad que provoca la unión del speract a su receptor. Esta condición fue el comportamiento observado en promedio para 10^5 condiciones iniciales diferentes. A raíz de este resultado del modelo se realizaron experimentos añadiendo $10nm$ de *verapamil*, un inhibidor del canal HVA . El bloqueo de este canal produce un retraso en la aparición de la primera fluctuación de $[Ca^{2+}]_i$ en el flagelo del espermatozoide, lo cual valida a un nivel cualitativo la predicción hecha por el modelo. Este resultado se muestra en la figura 6

Como se puede observar en el apartado B de la figura 6, el tiempo medio para la aparición de la primera oscilación de calcio tras la adición de speract al medio es de alrededor de $500ms$ en presencia de *verapamil*, en contraste con los $350ms$ del tipo silvestre.

Por lo tanto, el modelo discreto divide una oscilación de calcio en cuatro subintervalos discretos en el tiempo. El valor discreto de un nodo cualquiera de la red en un subintervalo de tiempo, puede interpretarse como el promedio de los valores continuos que tomó ese nodo en el subintervalo: si dicho valor promedio fue mayor que un umbral, el estado discreto en todo el subintervalo es 1, y 0 en caso contrario. Lo que se quiere poner de manifiesto con esta observación es que las comparaciones entre un modelo discreto y las mediciones experimentales son a un nivel cualitativo y con una resolución temporal lo suficientemente grande como para contener en un paso de tiempo discreto varios cambios de estado continuo. Un modelo discreto es capaz de decir cómo cambia un sistema en una escala de tiempo más grande que aquella en la que suceden los eventos microscópicos del sistema. De ahí la necesidad de contar con otro tipo de descripciones del sistema que permitan hacer comparaciones entre modelo y experimentos en escalas de tiempo más pequeñas. Además, es deseable que dichas descripciones permitan hacer una comparación más precisa entre los valores de las variables de estado y las mediciones experimentales, por ejemplo, donde las variables de estado del modelo sean continuas.

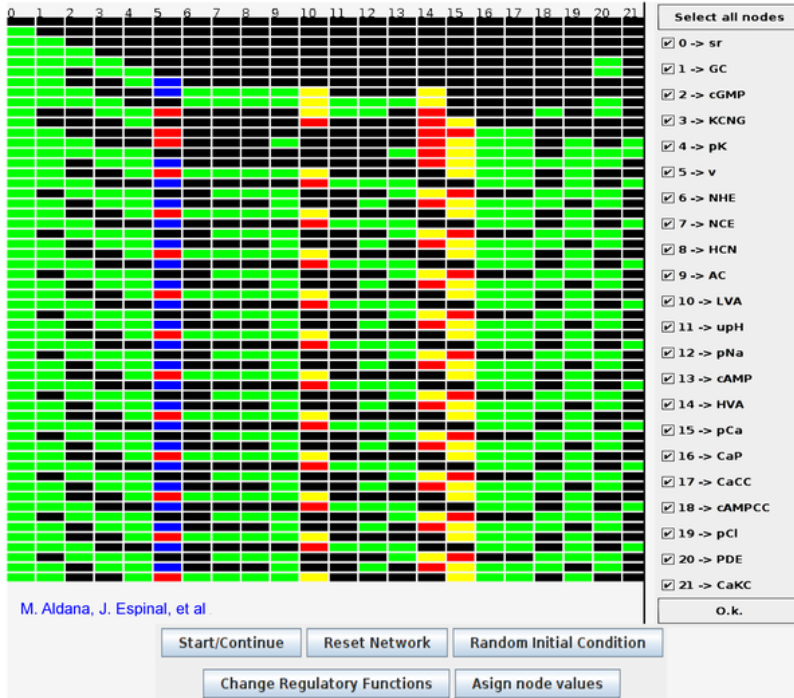


Figura 5: Applet del Modelo Discreto de la red de señalización [Espinal et al. \[11\]](#). Serie temporal de los patrones de activación de la red de señalización bajo diferentes condiciones. En cada caso, los nodos están en el eje horizontal y el tiempo en el eje vertical. Para los nodos binarios, el negro representa el estado *apagado*, verde *encendido*. Los nodos 10 y 14, correspondientes al *HVA* y *LVA*, el negro es un estado inactivo, el amarillo corresponde a un canal cerrado y el rojo a un canal abierto. El nodo 5, correspondiente al potencial de membrana V es negro para un potencial en reposo, azul para la hiperpolarización y rojo para la repolarización. El nodo 15 (dCa), correspondiente al Ca^{2+} es amarillo para indicar el incremento tónico, rojo para el incremento supratónico y negro para indicar estado basal. Como puede observarse, tras un transitorio la red llega a un atractor de período 4. Se muestra el comportamiento del espécimen silvestre (wt). El applet fue desarrollado por el Dr. Maximino Aldana y se encuentra disponible en <http://www.fis.unam.mx/research/seaurchin/discrete/>. Este applet permite explorar de manera interactiva distintas condiciones iniciales, cambiar las reglas lógicas así como observar el comportamiento de la red en ausencia de algunos nodos.

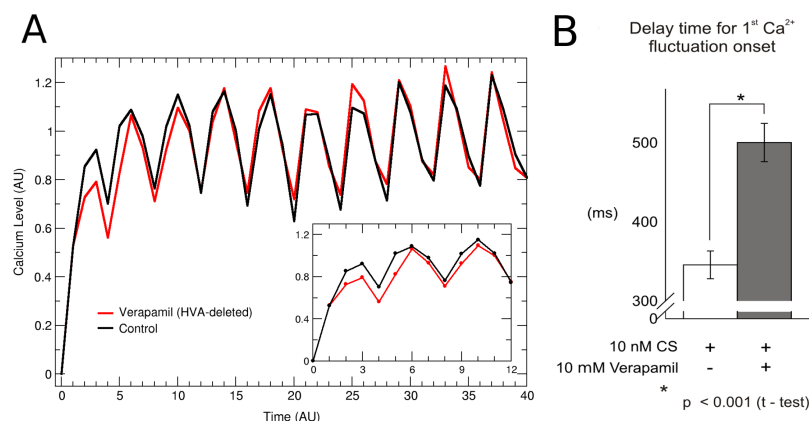


Figura 6: El bloqueo del canal HVA retrasa el inicio de las oscilaciones de calcio. A) Evolución temporal del nivel promedio de calcio tomado a cada paso de tiempo durante 10^5 condiciones iniciales con *HVA* (curva negra) y sin *HVA* (curva roja), usando unidades arbitrarias. Nótese que cuando el canal *HVA* está presente el incremento en los niveles de calcio comienza más rápidamente que cuando se suprime el canal *HVA*, es decir, en los primeros pasos de tiempo, la curva negra se incrementa antes que la curva roja. B) Los experimentos realizados muestran que el verapamil, sustancia que inhibe al canal *HVA*, prolonga el tiempo entre la estimulación de speract y el establecimiento de la primera fluctuación de calcio. Espinal et al. [11].

MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo comienza con una discusión de los alcances y limitaciones del modelo discreto a manera de motivación y justificación para el desarrollo de este trabajo. Posteriormente introduce el formalismo de ecuaciones de Glass; plantea el problema de la estimación de parámetros como un problema de optimización, describiendo las nociones de distancia usadas para comparar la dinámica de calcio de Glass con mediciones experimentales; finalmente aborda brevemente el procedimiento seguido para poner en marcha la búsqueda de parámetros.

2.1 ALCANCES DEL MODELO DISCRETO

La utilidad del modelo discreto presentado en el capítulo anterior, radica en que a través de una aproximación de grano grueso es posible hacer comparaciones entre modelo y experimentos en intervalos de tiempo relativamente *grandes*, en el sentido que una oscilación se corresponde con cuatro unidades de tiempo de simulación.

Resulta interesante que aún a este nivel grueso de resolución temporal y de estado, fue posible corroborar la validez del modelo mediante la comparación con comportamientos observados experimentalmente con antelación, además de predecir comportamientos no observados previamente, para los cuales se diseñaron experimentos específicos que corroboraron dicha predicción.

2.2 LIMITACIONES DEL MODELO DISCRETO

Una de las limitaciones de dicho modelo consiste en que el sistema es sincronizado, es decir, todos los nodos actualizan su estado con el mismo esquema temporal. Esta actualización sincronizada es particularmente válida en tanto que el estado del nodo es un promedio en un intervalo de tiempo cuya duración es mayor que el tiempo en el que se dan las reacciones bioquímicas de la red. Al mismo tiempo que proporciona validez a una aproximación sincronizada, el describir al sistema en intervalos de actualización largos es también una desventaja, puesto que solo es posible realizar comparaciones con experimentos a nivel cualitativo dadas las diferencias de escala temporal entre experimento y modelo. Finalmente, la discretización de las variables de estado es

adecuada para tener una idea general –no particular– de la dinámica del sistema.

2.3 ECUACIONES DE GLASS

Una opción de modelación intermedia entre los modelos discretos y los basados en las EDOs son los de dinámica semicontinua. Entre este tipo de modelos se encuentran las ecuaciones lineales por pedazos que fueron esbozadas por Glass en [Glass and Kauffman \[18\]](#), consistentes en definir una derivada cuya forma específica depende del valor de un mapeo discreto en un intervalo de tiempo pequeño.

2.3.1 Construcción de las ecuaciones de Glass

Consideremos de nuevo el mapeo discreto [1.1](#), presentado en el capítulo [1](#). Es posible escribirlo también como

$$\sigma_i(t + \tau_i) = F_i[\sigma_{i_1}(t), \sigma_{i_2}(t), \dots, \sigma_{i_k}(t)] \quad (2.1)$$

donde $\tau_i = 1$. Si $\tau_i \rightarrow 0$, haciendo un desarrollo en serie de Taylor de $\sigma_i(t + \tau_i)$ hasta la derivada de primer orden, para posteriormente despejar esa derivada se obtiene

$$\frac{d\sigma_i(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_i} [\sigma_i(t + \tau_i) - \sigma_i(t)] \quad (2.2)$$

y sustituyendo $\sigma_i(t + \tau_i)$ por

$$F_i[H(\sigma_{i_1}(t), \theta_{i_1}), H(\sigma_{i_2}(t), \theta_{i_2}), \dots, H(\sigma_{i_k}(t), \theta_{i_k})] \quad (2.3)$$

obtenemos

$$\frac{d\sigma_i(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_i} (F_i[H(\sigma_{i_1}(t), \theta_{i_1}), H(\sigma_{i_2}(t), \theta_{i_2}), \dots, H(\sigma_{i_k}(t), \theta_{i_k})] - \sigma_i(t)) \quad (2.4)$$

donde $\frac{1}{\tau_i}$ es el inverso del tamaño del intervalo donde se hace el desarrollo en serie de Taylor y $H(\sigma_{i_1}, \theta_{i_1})$ es una función escalón que discretiza los valores de estado del nodo i_1 usando un valor de umbral θ_{i_1} . Esta discretización es necesaria puesto que la variable de estado es ahora una variable continua, al igual que el tiempo. Todos los F_i

son los mapeos del modelo discreto a partir del cual se construyeron las ecuaciones de Glass.

Mediante este procedimiento, es posible contar con una descripción semicontinua de la dinámica del sistema, en tanto que la derivada de cada nodo no es única sino que depende del valor de la función discreta en cada intervalo de tamaño τ_i . A este tipo de ecuaciones se les conoce también como *Piecewise Linear Differential Equations*, o Ecuaciones Diferenciales Lineales por Pedazos.

2.3.2 Ventajas y desventajas

El beneficio directo de usar este formalismo es contar con un refinamiento de la descripción proporcionada por el modelo discreto, a la par que se construye este refinamiento a partir del modelo existente. Dado que el modelo discreto es construido a partir de observaciones y conocimiento biológico, las ecuaciones de Glass no son un formalismo *ad hoc* que reproduce el comportamiento de un sistema a través de arbitrariamente ajustar trayectorias, sino que se basan en un conjunto de observaciones y conocimiento previo.

El costo por usar este formalismo radica en la estimación de los valores de umbral para cada nodo de la red. En el caso de que se quiera un modelo sincronizado, los tiempos característicos, que denotamos como $\alpha_i = \frac{1}{\tau_i}$ pueden establecerse todos iguales. En particular, el modelo discreto en tiempo se recupera al establecer el tiempo característico en $\tau_i = 1, \forall i$.

2.4 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

Al plantear un modelo semicontinuo basado en ecuaciones de Glass es necesario hacer estimación de parámetros. Estos parámetros son los umbrales de activación de cada nodo, además de los inversos del tamaño de cada uno de los intervalos de tiempo.

Los parámetros deben elegirse de modo que la dinámica del sistema y de los nodos en particular sea coherente desde un punto de vista biológico. En el caso de la vía de señalización, objeto de estudio de esta tesis, los parámetros a encontrar fueron aquellos tales que reprodujeran el comportamiento del calcio intracelular observado experimentalmente. Se tomó en consideración solamente la similitud en la dinámica de calcio del sistema debido a que éste es el único tipo de dato experimental que cuenta con mediciones largas. Un ejemplo de estas mediciones se muestra en la figura 1.

En este sentido, el problema de construir un modelo semicontinuo usando ecuaciones de Glass se reduce, después de escribir las ecuaciones, en un problema de estimación de parámetros. En tanto problema de optimización, es necesario definir una función objetivo que mini-

mizar (o maximizar) y contar con una estrategia de exploración del espacio de parámetros.

De manera formal, sea $f(p)$ la función de costo a minimizar (o función de adaptación a maximizar), donde $f : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ y p es un vector de números reales. El valor de la función $f(p)$ indica la adaptación o costo del vector p . Típicamente, en muchos problemas el gradiente de f es desconocido. El objetivo consiste en encontrar un $m \in \mathbb{R}^n$ tal que $f(m) \leq f(p)$, $\forall p \in \mathbb{R}^n$. En el caso de maximización, basta con definir la función $h = -f$. En este trabajo se optó por la minimización de funciones objetivo.

2.4.1 Funciones objetivo

Es necesario establecer una noción de distancia para determinar si la serie temporal proveniente de los experimentos de fluorescencia de calcio corresponde con la trayectoria del nodo de calcio del modelo de ecuaciones semicontinuas.

Existen varias maneras de comparar series de tiempo, desde técnicas generales y ampliamente usadas como el *Error Cuadrático Medio* (MSE) [50], el *Coefficiente de Correlación de Pearson* [51], hasta aquéllas que fueron diseñadas con el objetivo de establecer la similitud entre series de tiempo surgidas de procesos biológicos, como el *Índice de Pendiente o Slope Index* (SI) Cho et al. [6].

2.4.1.1 Error Cuadrático Medio (MSE)

El MSE [50] es el cuadrado del valor esperado de la diferencia entre las observaciones y la respuesta, trayectoria o dinámica predicha por un modelo. Al ser minimizado, es posible discriminar entre distintos modelos, estableciendo cuál de entre un conjunto de modelos ajusta mejor, es decir, explica mejor los datos. El MSE está dado por $E[(\hat{\theta} - \theta)^2]$.

2.4.1.2 Coeficiente de correlación de Pearson

El Coeficiente de Correlación de Pearson [51] es una medida de la correlación (dependencia lineal) entre dos variables aleatorias X y Y , denotado por $r \in [-1, 1]$, está dado por

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (2.5)$$

donde \bar{X} y \bar{Y} son los promedios de X y Y , respectivamente, y X_i y Y_i denotan la i ésima medición experimental de X y Y , respectivamente.

2.4.1.3 Índice de Pendiente (SI)

Propuesto por [Cho et al. \[6\]](#), el índice de pendiente entre dos series de tiempo X y Y consiste en ponderar la suma de los signos de las derivadas entre los puntos de ambas series. Está dado por

$$SI(X, Y) = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^{k-1} \text{signo} \left(\frac{X_{i+1} - X_i}{Y_{i+1} - Y_i} \right) \quad (2.6)$$

De manera similar al coeficiente de correlación de Pearson, $SI(X, Y) \in [-1, 1]$.

2.5 ESTRATEGIAS DE EXPLORACIÓN

Una vez que se tiene definida una función objetivo o función de costo que permita evaluar las distintas soluciones factibles al problema, es necesario contar con una estrategia de búsqueda o exploración que permita explorar el espacio de soluciones factibles. Además, es deseable que la estrategia de búsqueda explore de manera inteligente el espacio de soluciones, es decir, que evite que la búsqueda quede atrapada en puntos extremos locales y que por ende sea imposible encontrar los puntos extremos globales.

2.5.1 Tipos de exploración

Además de la búsqueda al azar, existen dos estrategias generales para resolver problemas de optimización: aquéllas basadas en la diferenciabilidad de la función de costo, y aquéllas basadas en el uso de criterios heurísticos. Un ejemplo clásico de un método basado en diferenciabilidad es el de Gradiente Conjugado, [Press et al. \[41\]](#). Entre los métodos populares basados en criterios heurísticos se encuentran el RECOCIDO SIMULADO, [Kirkpatrick et al. \[33\]](#), y los ALGORITMOS GENÉTICOS, [Goldberg \[19\]](#).

Los métodos basados en diferenciabilidad suelen usarse cuando se conoce con un buen nivel de detalle el espacio de soluciones, y en ese caso permiten encontrar los puntos extremos globales fácilmente. Sin embargo, una mala elección del punto inicial de búsqueda puede resultar en que estos algoritmos de optimización queden atrapados en un punto extremo local. Hacer malas elecciones del punto inicial de búsqueda suele ser común cuando no se conoce muy a fondo el espacio de soluciones. Por ello, estos métodos son útiles para refinar soluciones, es decir, para aumentar la precisión de una solución una vez que se cree que se está cerca de un punto extremo global, o al menos, cerca de un punto cuyo valor es cercano al punto extremo global.

Por otro lado, los métodos de búsqueda basados en criterios heurísticos explotan propiedades del problema que no necesariamente están relacionadas con la diferenciabilidad. Además, se ha observado que

son más resistentes a quedar atrapados en puntos extremos locales, Moles et al. [36], Storn and Price [44], debido a que incluyen un subprocedimiento que permite variar de una u otra forma las soluciones propuestas, independientemente de si esta solución mejora o no el costo de la función objetivo. Por lo tanto, estos métodos no son tan sensibles a una mala elección del punto o puntos iniciales de búsqueda, y no es necesario conocer la forma específica del espacio de soluciones.

En este trabajo, las estrategias de exploración utilizadas fueron BÚSQUEDA ALEATORIA, ALGORITMOS GENÉTICOS y EVOLUCIÓN DIFERENCIAL, cada uno de los cuales se describe a continuación.

2.5.1.1 *Búsqueda Aleatoria*

La búsqueda aleatoria es la más simple de las estrategias de búsqueda. Consiste en elegir al azar una solución, evaluarla y, si y solo si su costo es mejor que el mejor costo hasta el momento, guardar la solución como la mejor hasta el momento; en caso contrario no se guarda la solución ni se actualiza el valor del mejor costo. En ambos casos, si no se ha llegado a una precisión determinada para la función de costo o bien se ha alcanzado un número máximo de iteraciones, la búsqueda finaliza; en caso contrario, se elige otra solución al azar y se repite el proceso.

2.5.1.2 *Algoritmos Genéticos*

Inspirados en el trabajo de Holland [26] y tratados de manera un poco más rigurosa por Goldberg [19], los algoritmos genéticos son una estrategia de búsqueda que simula el proceso de evolución natural a través de los procesos de cruce, mutación y selección.

El algoritmo inicia con un conjunto de agentes denominados población, donde cada agente tiene un *genoma*, es decir, una representación codificada de una solución al problema de optimización. Posteriormente se selecciona a algunos individuos de la población para procrear a la siguiente generación. La selección se realiza mediante diferentes esquemas, aunque en términos generales se suele favorecer a aquellos individuos que tengan un mejor costo. Los individuos no seleccionados no sobreviven. De entre aquellos que sí han sido seleccionados, se eligen pares de agentes y estos combinan su genoma de acuerdo a algún esquema para crear un tercer agente. Este proceso de cruce se realiza hasta completar una cantidad preestablecida de miembros de la nueva generación. Con cierta probabilidad, por lo general baja, algunos individuos de la nueva población sufrirán una mutación en su genoma. El proceso de selección, cruce y mutación continúa hasta que se ha alcanzado cierta precisión en el costo de la solución o bien se ha alcanzado un número determinado de iteraciones.

Tradicionalmente el genoma y los operadores de los algoritmos genéticos son discretos. Dado que los parámetros que se requirió estimar

en este trabajo toman valores continuos, se usó una variante de los algoritmos genéticos tradicionales, adaptados a trabajar con variables continuas encontrado en Haupt and Haupt [25], en donde el genoma de un agente se codifica como un vector de valores continuos y los operadores de cruce y mutación pueden ser aplicados a este tipo de variables.

2.5.1.3 Evolución Diferencial

Storn and Price [44] observaron que algunos métodos heurísticos existentes no eran tan robustos y no convergían tan rápidamente al ser aplicados a problemas de optimización que involucraran variables continuas. A raíz de esto, desarrollaron un método específicamente pensado para este tipo de problemas.

El método consiste en una población de soluciones candidato, llamadas agentes. Cada agente se mueve a través del espacio de búsqueda combinando las posiciones de los agentes existentes en la población. Si la nueva posición del agente representa una mejora, esta nueva posición se acepta y pasa a formar parte de la población; en caso contrario, la nueva posición se rechaza. El proceso se repite y se espera que una solución satisfactoria se descubrirá eventualmente.

Sea $x \in \mathbb{R}^n$ un agente en la población de tamaño $NP > 3$; sea $F \in [0, 2]$, conocido como peso diferencial; sea también $CR \in [0, 1]$, la probabilidad de cruce. El algoritmo de evolución diferencial consiste en:

1. Inicializar cada agente x con una posición aleatoria en el espacio de búsqueda.
2. Hasta que un criterio de búsqueda sea satisfecho, repetir:
 - a) Escoger al azar tres agentes distintos entre sí a, b, c .
 - b) Escoger un índice al azar $R \in 1, \dots, n$ donde n es la dimensionalidad del problema
 - c) Calcular la posible nueva posición del agente, dada por $y = [y_1, \dots, y_n]$ iterando sobre cada $i \in 1, \dots, n$ como sigue:
 - 1) Elegir al azar de manera uniforme $r \in (0, 1)$
 - 2) Si $i = R$ o $r_i < CR$, hacer $y_i = a_i + F(b_i - c_i)$. En caso contrario $y_i = x_i$
 - d) Si $f(y) < f(x)$, entonces $x = y$
3. Elegir el agente con el menor costo o máxima adaptación y regresarlo como la mejor solución candidato encontrada.

La elección de F , CR y NP puede tener un impacto significativo en el desempeño de la optimización. Storn and Price [44], y Liu and Lampinen [35] proporcionan valores iniciales para estos parámetros que parecen ser un buen punto de partida en general.

2.6 JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

Dado que las mediciones experimentales arrojan datos continuos tomados con una frecuencia bastante mayor que la descripción del modelo discreto, la comparación entre dicho modelo y las mediciones experimentales se puede hacer hasta un nivel de detalle limitado. Sería deseable contar con un modelo que pudiera dar una descripción continua en tiempo y estado, además de incorporar asincronía, es decir, que cada componente o nodo de la red actualice su estado de acuerdo a su propio tiempo característico de reacción. Para este fin bien podría plantearse un modelo basado en EDOs. Sin embargo, para hacerlo sería necesario conocer un conjunto de parámetros relacionados directamente con magnitudes físicas y bioquímicas, a saber: las concentraciones de cada componente de la vía de señalización; las tasas de asociación y disociación de cada complejo bioquímico, y finalmente, la cooperatividad de las reacciones bioquímicas, es decir, la cantidad de moléculas necesarias de un compuesto para que este reaccione con otro. Sin embargo, por lo general estos parámetros no son conocidos en su totalidad y su estimación experimental es costosa, complicada desde el punto de vista de diseño y ejecución del experimento, o ambas. Si bien se puede hacer la estimación de algunos de estos parámetros a través de modelos computacionales y de optimización, se requiere de cierto conocimiento previo del sistema para poder llevar a cabo la estimación de manera más dirigida y reducir el espacio de búsqueda.

En el caso particular de esta red de señalización, no todos estos parámetros e información son conocidos, por lo que como primera aproximación se desarrolló el modelo discreto antes mencionado. Un modelo basado en las ecuaciones de Glass constituye un refinamiento a la descripción del sistema proporcionada por el modelo discreto.

RESULTADOS

3.1 BÚSQUEDA DE PARÁMETROS

La búsqueda de parámetros para los modelos de ecuaciones de Glass se realizó usando diferentes combinaciones de funciones objetivo y estrategias de búsqueda. La implementación de las rutinas se realizó en lenguaje C [32] bajo el estándar iso c99 publicado por ISO [28] usando el compilador CLANG [48]. Adicionalmente, se usaron los módulos de estadística, métodos de solución de ecuaciones diferenciales ordinarias, vectores y matrices, y generación de números aleatorios de la biblioteca de funciones para cómputo científico GNU SCIENTIFIC LIBRARY (GSL) v.1.15 [13].

Para la solución de ecuaciones diferenciales se utilizó el método de Euler Press et al. [41]. También se utilizaron el método de Runge-Kutta 4,5 Press et al. [41], [13]; y el método de paso adaptativo de Adams-Bashforth [13]. Estos dos últimos métodos son menos sensibles a errores que el método de Euler original.

El método de Euler se implementó directamente, mientras que para el caso del método de Runge-Kutta 4,5 y del método de Adams-Bashforth se utilizó la implementación de la GNU SCIENTIFIC LIBRARY (GSL) v.1.15. La generación de números aleatorios se realizó usando la implementación de la GNU SCIENTIFIC LIBRARY (GSL) v.1.15 del algoritmo RANLXS2.

Como esquema general, los programas de inferencia de parámetros consistían en proponer soluciones candidato y evaluarlas, repitiendo el proceso hasta cumplir con un criterio de paro. Una solución candidato consiste en un conjunto de parámetros propuestos de acuerdo a una estrategia de exploración del espacio de búsqueda y las trayectorias solución del problema de condiciones iniciales del sistema de ecuaciones de Glass correspondiente a dichos parámetros. La evaluación de candidatos consistió en comparar la señal original o medición experimental con la dinámica de Glass del nodo correspondiente a dicha señal o medición experimental.

3.1.1 *Modelo de tres nodos*

Para el modelo discreto de tres nodos, dado por:

$$CIS(t + \tau) = Ca^{2+}(t) \quad (3.1)$$

$$Ca^{2+}(t + \tau) = CIS(t) * (Ca^{2+}ATPase(t) + 1) \% 2 \quad (3.2)$$

$$Ca^{2+}ATPase(t + \tau) = Ca^{2+}(t) \quad (3.3)$$

se implementó un modelo semicontinuo con las siguientes ecuaciones de Glass:

$$\frac{dCIS}{dt} = \alpha_{CIS} [F_{CIS}(\widehat{Ca^{2+}}) - CIS] \quad (3.4)$$

$$\frac{dCa^{2+}}{dt} = \alpha_{Ca^{2+}} [F_{Ca^{2+}}(\widehat{CIS}, \widehat{Ca^{2+}ATPase}) - Ca^{2+}] \quad (3.5)$$

$$\frac{dCa^{2+}ATPase}{dt} = \alpha_{Ca^{2+}ATPase} [F_{Ca^{2+}ATPase}(\widehat{Ca^{2+}}) - Ca^{2+}ATPase] \quad (3.6)$$

donde

$$\widehat{CIS} = H(CIS - \theta_{CIS})$$

$$\widehat{Ca^{2+}} = H(Ca^{2+} - \theta_{Ca^{2+}})$$

$$\widehat{Ca^{2+}ATPase} = H(Ca^{2+}ATPase - \theta_{Ca^{2+}ATPase})$$

corresponden a los valores discretizados de las variables continuas CIS , Ca^{2+} y $Ca^{2+}ATPase$, respectivamente. Es necesario discretizar el valor de estas variables pues hay que recordar que F_{CIS} , $F_{Ca^{2+}}$ y $F_{Ca^{2+}ATPase}$ son funciones cuyos argumentos son valores discretos.

Como caso de ejemplo de estimación de parámetros en un problema de transformación de un modelo discreto a un modelo semicontinuo, se resolvió mediante el método de Euler el sistema de ecuaciones de Glass de la red de 3 nodos con parámetros $\alpha_{CIS} = \alpha_{Ca^{2+}} =$

$\alpha_{Ca^{2+}ATPase} = 1$, umbrales de activación $\theta_{CIS} = 0.3$, $\theta_{Ca^{2+}} = 0.7$ y $\theta_{Ca^{2+}ATPase} = 0.8$, y $CIS = 1$, $Ca^{2+} = 0$, $Ca^{2+}ATPase = 0$ como condiciones iniciales. El objetivo consistió en encontrar mediante un procedimiento de búsqueda el conjunto de parámetros tales que la dinámica de Glass correspondiente al $Ca^{2+}ATPase$ fuera lo más similar posible a la solución conocida para los parámetros antes mencionados. Esta solución conocida se tomó como una señal artificial, que se muestra en la figura 7.

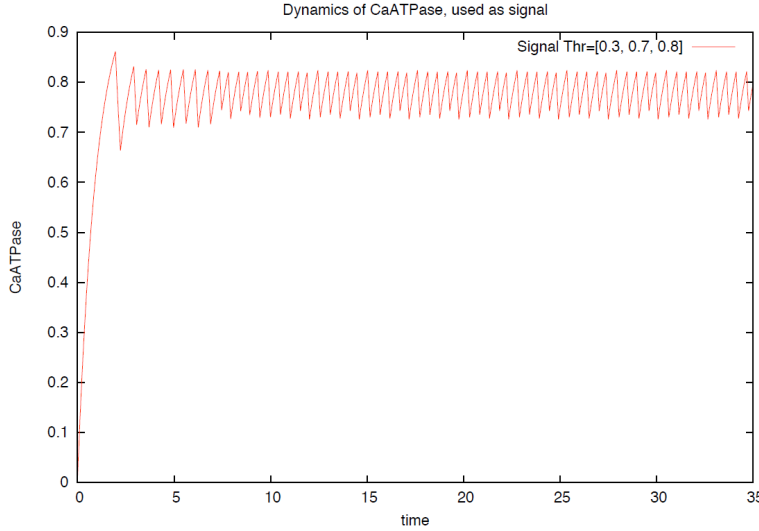


Figura 7: Dinámica original de $Ca^{2+}ATPase$ de las ecuaciones de Glass con parámetros $\alpha_{CIS} = \alpha_{Ca^{2+}} = \alpha_{Ca^{2+}ATPase} = 1$, umbrales de activación $\theta_{CIS} = 0.3$, $\theta_{Ca^{2+}} = 0.7$ y $\theta_{Ca^{2+}ATPase} = 0.8$, y $CIS = 1$, $Ca^{2+} = 0$, $Ca^{2+}ATPase = 0$ como condiciones iniciales.

Se eligió búsqueda aleatoria como estrategia de exploración del espacio de búsqueda, mientras que la función objetivo consistió en minimizar $f_{SI}(X, Y) = 1 - SI(X, Y)$ con X la señal original y Y los datos de la dinámica de Glass del nodo $Ca^{2+}ATPase$ de cada uno de los candidatos propuestos por el algoritmo de búsqueda.

En este caso, fue posible recuperar el valor de los tres parámetros en varias ejecuciones del programa de búsqueda. La figura 8 muestra la dinámica original y el resultado obtenido con dos ejecuciones distintas del programa de búsqueda.

Se probó realizar la estimación de parámetros para el mismo sistema usando una versión de algoritmos genéticos adaptada a problemas con variables continuas con los parámetros recomendados por omission, tal como se refiere en Haupt and Haupt [25]. En este caso fue posible recuperar el valor del parámetro de umbral para $Ca^{2+}ATPase$, si bien con una precisión menor.

Cabe mencionar que a pesar de que este caso de ejemplo no está relacionado en un sentido bioquímico con la red de señalización de speract, sí lo está en términos de ser un modelo discreto que se quiere

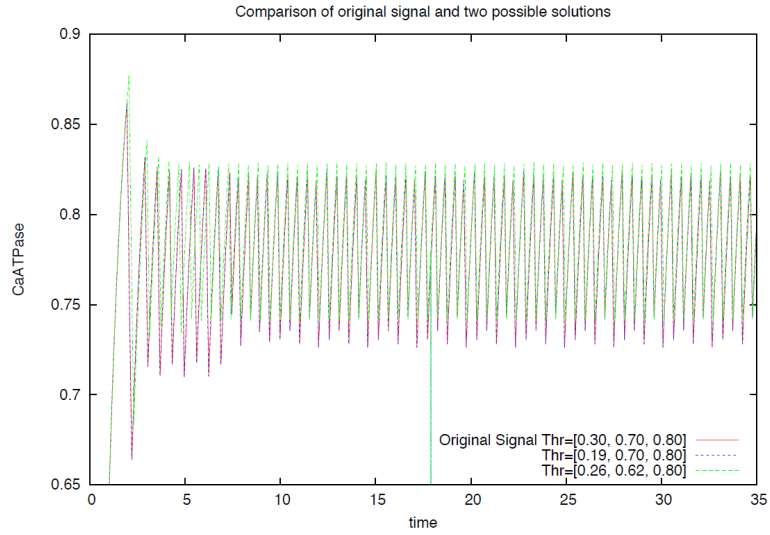


Figura 8: Dinámicas original y estimada de $Ca^{2+}ATPase$ de la red de 3 nodos. En rojo la señal original, verde y azul representan dos distintas ejecuciones del programa de búsqueda.

reescribir como semicontinuo. Además, para la estimación de parámetros se usó un solo tipo de señal o “medición experimental” contra la cual comparar la dinámica de cada uno de los candidatos, situación que se presentó también en la red de señalización, donde solo se cuenta con un único tipo de mediciones para tiempos largos. La experiencia ganada con este caso de ejemplo sirvió como base para abordar la estimación de parámetros del modelo semicontinuo de la vía de señalización de speract.

3.1.2 Modelo de la red de señalización

El modelo semicontinuo de la vía de señalización de speract se implementó planteando ecuaciones de Glass cuyo valor depende de un conjunto de funciones discretas, estas últimas basadas en el modelo de Espinal et al. [11]. La implementación en lenguaje C de dichas funciones discretas se muestran en el apéndice A. A modo de ejemplo, puede considerarse la ecuación de Glass para cGMP. La tabla de verdad de la función discreta se muestra en la tabla 1, y la ecuación de Glass correspondiente en la ecuación 3.7.

Y la ecuación de Glass correspondiente es:

$$\frac{dcGMP}{dt} = \alpha_{cGMP} [F_{cGMP}(\widehat{GC}, \widehat{PDE}, \widehat{cGMP}) - cGMP] \quad (3.7)$$

donde

$$\widehat{GC} = H(GC - \theta_{GC})$$

$$\widehat{PDE} = H(PDE - \theta_{PDE})$$

y

$$\widehat{cGMP} = H(cGMP - \theta_{cGMP})$$

son los valores discretizados de las variables continuas GC , PDE y $cGMP$, respectivamente.

El problema de estimación de parámetros en este caso consiste en ajustar el valor de 26 parámetros de umbral θ_i (22 para los nodos binarios y 4 extras para los nodos que tienen un valor terciario), en el caso de un sistema sincronizado donde todos los parámetros $\alpha_i = x$, $x \in [0, T_{max}]$, donde T_{max} es el tiempo característico más grande del sistema.

Un problema similar, si bien más complicado, es permitir que cada α_i tome un valor distinto de los demás α_i , es decir, un problema asíncrono. El problema asíncrono añade la necesidad de estimar 22 parámetros extra, uno para cada componente del sistema.

Como una primera aproximación al problema, se consideró el problema sincronizado, estableciendo $\alpha_i = 1.0 \forall i$, de modo que solo se debió estimar el valor de los 26 parámetros de umbral. Las condiciones iniciales se fijaron tales que el valor inicial para el potencial de membrana $V = 1.0$, los canales $HVA = LVA = 1.0$, $dCA = 0.9$ y el resto con valor 0.2. Al discretizar estos valores, se tiene una condición inicial muy similar a la del organismo silvestre según el modelo discreto antecedente de este trabajo.

En vista de que aun para el problema sincronizado el espacio de parámetros es mayor que el del problema de 3 nodos presentado en la sección anterior, y de que los algoritmos genéticos no presentaron una mejora con respecto a la búsqueda aleatoria en el mismo problema, se buscó otro método de exploración del espacio de búsqueda. A este respecto, [Moles et al. \[36\]](#) muestran que para problemas de estimación de parámetros en redes de señalización bioquímica los métodos con

GC(T)	PDE(T)	CGMP(T)	CGMP(T+1)
0	0	0	0
0	0	1	1
0	1	0	0
0	1	1	0
1	0	0	1
1	0	1	1
1	1	0	0
1	1	1	0

Tabla 1: Tabla de regulación de cGMP

mejores resultados son aquellos basados en estrategias evolutivas. En especial algunos como Evolución Diferencial resultan aún mejores que los algoritmos genéticos.

Para la búsqueda de parámetros de la vía de señalización de *speract* se usó entonces Evolución Diferencial como estrategia de búsqueda (y evaluación de candidatos), usando los parámetros recomendados en la literatura [Storn and Price \[44\]](#). Para comparar la dinámica del nodo de Ca^{2+} , (denotado en el modelo como dCa) de cada modelo planteado con las mediciones experimentales de fluorescencia de Ca^{2+} , se buscó minimizar $f_{Pearson}(X, Y) = 1 - r_{X,Y}$, donde X son los datos experimentales y Y son los datos de la dinámica del nodo de calcio del modelo.

Los sistemas de ecuaciones de Glass se resolvieron mediante el método de Euler. Para algunas dinámicas elegidas por el algoritmo de Evolución Diferencial, se verificó la solución usando el método de Adams-Bashforth. No se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de uno y otro métodos.

Se logró ajustar la dinámica del nodo de Ca^{2+} de acuerdo a mediciones experimentales, como se muestra en la figura 9.

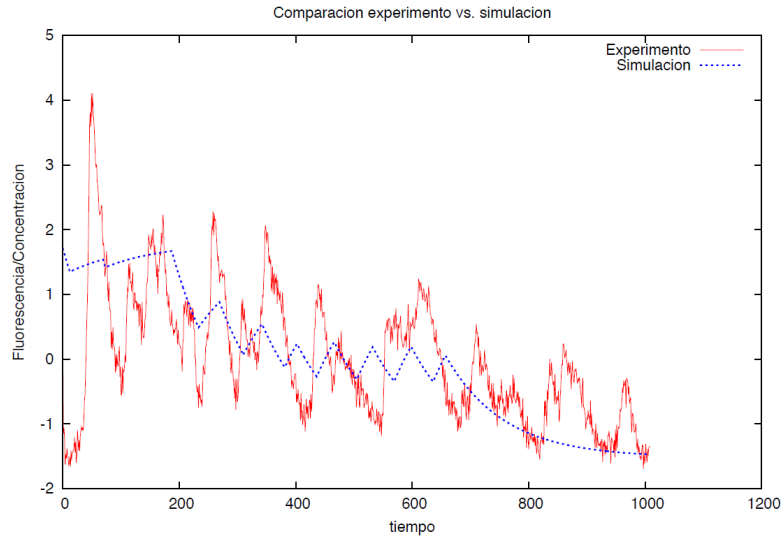


Figura 9: Dinámica del nodo de Ca^{2+} del modelo y medición experimental de Ca^{2+} . En rojo la medición experimental, en azul el ajuste usando la función objetivo basada en la correlación de Pearson. Para efectos de comparación, las series se normalizaron de manera que tuvieran promedio 0 y varianza 1.

A pesar de lo alentador de este resultado, el comportamiento dinámico de otros nodos aún necesita mayor revisión. Por ejemplo, el nodo correspondiente al potencial de membrana V debería de disminuir su valor al inicio de la dinámica para luego aumentarlo. Sin embargo, el potencial aumenta al principio y disminuye posteriormente. Este comportamiento es imposible en la realidad, ya que al haber un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ el potencial debería disminuir. Véase la figura 10.

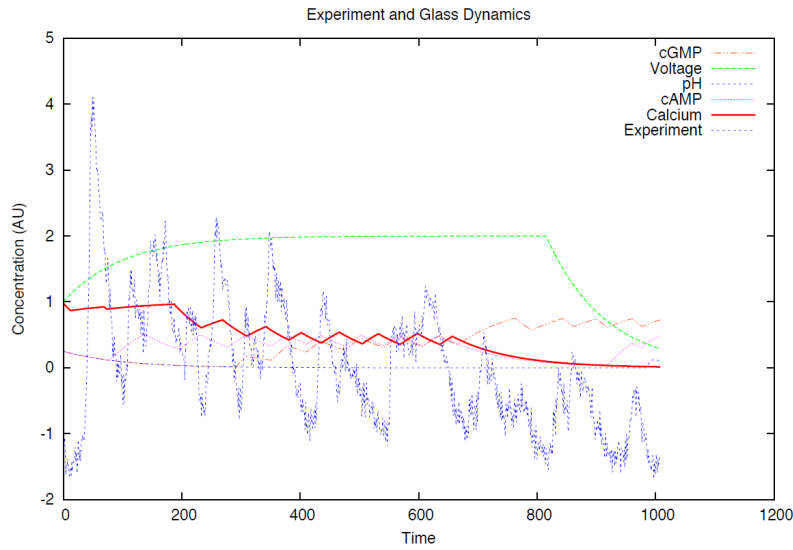


Figura 10: Dinámica del nodo de Ca^{2+} , V y otros componentes del modelo, y medición experimental de Ca^{2+} . En este caso en azul punteado se muestra la medición experimental, en rojo el nodo de Ca^{2+} del modelo y en verde el nodo que representa al potencial de membrana en el modelo. Nótese que se trata de una ejecución del algoritmo de búsqueda distinta a la de la figura 9. Para efectos de comparación, las series se normalizaron de manera que tuvieran promedio 0 y varianza 1.

Varias ejecuciones del algoritmo de evolución diferencial, diferentes parámetros para el mismo algoritmo y funciones objetivo distintas, es decir, usando error cuadrático medio mse o el índice de pendiente (si) arrojaron resultados similares.

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este capítulo discute los resultados del trabajo que fueron expuestos en el capítulo anterior. Posteriormente presenta algunas conclusiones, y al final menciona ideas que podrían ser de utilidad para extender y refinar la investigación iniciada en este trabajo.

4.1 DISCUSIÓN

En cuanto al modelo Booleano de tres nodos, es interesante resaltar que la relación *parámetros a estimar/tipos de mediciones* es alta (1/3). Contar con un tipo de medición para un sistema de 3 componentes parece permitir la estimación de parámetros, aún con una estrategia de exploración bastante pobre como la búsqueda aleatoria.

El hecho de que la búsqueda aleatoria se haya comportado mejor que los algoritmos genéticos bien podría deberse a que algunos de los parámetros sugeridos para el algoritmo genérico resultaran inadecuados.

Con lo que respecta al modelo de la vía de señalización de *speract*, la relación *parámetros a estimar/tipos de mediciones* es, al contrario del modelo de 3 nodos, muy baja (1/26). Realizar ajustes de parámetros en este caso es más complicado si no se cuenta con más tipos de mediciones.

Estos resultados pueden deberse a que las funciones objetivo imponen restricciones sobre el comportamiento del nodo de Ca^{2+} , si bien no logran calificar adecuadamente la dinámica de otros nodos y por lo tanto restringirlos a tener un comportamiento fisiológicamente válido. En este sentido, de acuerdo a la metodología presentada es posible encontrar modelos con un comportamiento matemáticamente correcto pero cuya interpretación biológica no es necesariamente válida.

Es necesario contar entonces con una metodología que incorpore más tipos de mediciones experimentales para tiempos largos, use funciones objetivo que califiquen el comportamiento de varios nodos y que imponga restricciones a priori a las soluciones posibles.

En este trabajo no se incorporaron otros tipos de mediciones experimentales para tiempos largos por carecer de ellas. Algunos avances en las técnicas experimentales necesarias para realizar otras mediciones

podrían en un futuro arrojar datos que sea posible incluir en el diseño de otras funciones objetivo.

La imposición a priori de restricciones a las soluciones posibles pueden generalmente es un evento brusco dentro del proceso de búsqueda que no siempre es favorable, ya que puede resultar en la no exploración de ciertas zonas del espacio de búsqueda por efecto de que los agentes sean repelidos de la región donde opera la restricción y por azar sean llevados a otras regiones distintas. La consecuencia directa es el aumento del tiempo de búsqueda.

4.2 CONCLUSIONES

LA TRANSFORMACIÓN DE MODELOS DISCRETOS EN SEMICONTINUOS (ECUACIONES DE GLASS) BASADA EN ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS ES POSIBLE Se mostró que es posible la transformación de modelos discretos en semicontinuos mediante un ejemplo consistente en una pequeña red Booleana sincronizada compuesta por tres nodos. En este caso solo fue necesario estimar tres parámetros y se contó con un solo tipo de medición “experimental” o señal original contra la cual comparar. Para este tipo de problema, la elección de estrategia de búsqueda no tiene mayor consecuencia, ya que es posible obtener resultados satisfactorios aún con la búsqueda aleatoria. El índice de pendiente (s_1) mostró ser una buena medida de comparación entre señales.

LA TRANSFORMACIÓN DE UN MODELO DISCRETO EN SEMICONTINUO PRODUCE BUENOS RESULTADOS EN SISTEMAS DONDE LA RELACIÓN *parámetros a estimar/tipos de mediciones* ES ALTA El modelo Booleano de 3 nodos muestra que el paso de un formalismo de modelación a otro puede ser exitoso cuando se cuenta con datos suficientes contra los cuales comparar el modelo, en relación a la cantidad de parámetros a estimar. Por el contrario, en modelos como el de la vía señalización, en los que la cantidad de parámetros es mucho mayor que los criterios contra los cuales comparar, es difícil encontrar resultados biológicamente relevantes.

SON NECESARIAS METODOLOGÍAS DE ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS MÁS ROBUSTAS Si bien este trabajo no presenta una respuesta definitiva en términos de mostrar una metodología generalizada para la transformación de modelos discretos en semicontinuos, pone de manifiesto la necesidad e importancia de contar con metodologías de estimación de parámetros más robustas, que puedan ser aplicadas a problemas donde se requiere encontrar una gran cantidad de parámetros a partir de pocas mediciones experimentales.

4.3 PERSPECTIVAS Y TRABAJO FUTURO

Este trabajo se desarrolló bajo el supuesto de que la transformación de modelos discretos en semicontinuos podía realizarse mediante el empleo de técnicas de estimación de parámetros, particularmente aquellas basadas en estrategias evolutivas. Las funciones objetivo utilizadas se basan en criterios simples de correlación o minimización de diferencias.

Existe un marco teórico más desarrollado para la solución de problemas inversos, que cuenta con técnicas elaboradas para el problema de discriminación de modelos. Una técnica que puede resultar prometedora para la solución de este tipo de problemas puede ser la REGULARIZACIÓN PROMOTORA DE DISPERSIÓN O SPARSITY ENFORCING REGULARIZATION, [Engl et al. \[10\]](#), en donde se busca hacer uso de criterios estadísticos para la comparación entre mediciones experimentales y modelos.

Otra posibilidad que valdría la pena explorar consiste en modificar el modelo discreto de modo que contenga menos nodos y por lo tanto haya menos parámetros que estimar. Hasta este momento cuál es un buen criterio general de reducción de modelos discretos sigue siendo una pregunta abierta. Sin embargo, se ha explorado la posibilidad de utilizar criterios de robustez de las redes para separar nodos esenciales para mantener la dinámica y función de la red de aquellos nodos que podrían parecer redundantes.

Usando este último criterio, se ha logrado plantear un modelo discreto de la vía de señalización de speract con 11 nodos. Queda abierto el determinar si a partir de este modelo reducido y los datos experimentales con que se cuenta hasta el momento, es posible ajustar el comportamiento de un modelo semicontinuo de manera que la interpretación biológica del modelo sea más completa que lo alcanzado hasta el momento.

A

APÉNDICE

Listado de Código A.1: Modelo discreto de la vía de señalización. Implementación en C

```
#include "discreteFunction.h"
```

```
int  
voltage [72][2] = {  
    {0, 1},  
    {1, 1},  
    {2, 2},  
    {3, 2},  
    {4, 2},  
    {5, 2},  
    {9, 2},  
    {10, 2},  
    {11, 2},  
    {12, 2},  
    {13, 2},  
    {14, 2},  
    {18, 2},  
    {19, 2},  
    {20, 2},  
    {21, 2},  
    {22, 2},  
    {23, 2},  
    {27, 0},  
    {28, 0},  
    {29, 0},  
    {30, 1},  
    {31, 2},  
    {32, 1},  
    {36, 2},  
    {37, 2},  
    {38, 1},  
    {39, 2},  
    {40, 2},  
    {41, 1},  
    {45, 2},  
    {46, 1},  
}
```

```

        {47, 1},
        {48, 2},
        {49, 2},
        {50, 1},
        {81, 0},
        {82, 0},
        {83, 0},
        {84, 2},
        {85, 1},
        {86, 1},
        {90, 2},
        {91, 2},
        {92, 0},
        {93, 2},
        {94, 2},
        {95, 1},
        {99, 2},
        {100, 2},
        {101, 0},
        {102, 2},
        {103, 2},
        {104, 1},
        {108, 0},
        {109, 0},
        {110, 0},
        {111, 0},
        {112, 0},
        {113, 0},
        {117, 2},
        {118, 0},
        {119, 0},
        {120, 1},
        {121, 1},
        {122, 1},
        {126, 1},
        {127, 0},
        {128, 0},
        {129, 1},
        {130, 1},
        {131, 1}
};

int
calcium [432][2] =
{
    {0, 0},
    {1, 0},
    {2, 0},
    {3, 0},
    {4, 0},
    {5, 0},
    {9, 0},

```

{ 10 ,	0 } ,
{ 11 ,	0 } ,
{ 12 ,	0 } ,
{ 13 ,	0 } ,
{ 14 ,	0 } ,
{ 27 ,	0 } ,
{ 28 ,	0 } ,
{ 29 ,	0 } ,
{ 30 ,	0 } ,
{ 31 ,	0 } ,
{ 32 ,	0 } ,
{ 36 ,	0 } ,
{ 37 ,	0 } ,
{ 38 ,	0 } ,
{ 39 ,	0 } ,
{ 40 ,	0 } ,
{ 41 ,	0 } ,
{ 81 ,	0 } ,
{ 82 ,	0 } ,
{ 83 ,	0 } ,
{ 84 ,	0 } ,
{ 85 ,	0 } ,
{ 86 ,	0 } ,
{ 90 ,	0 } ,
{ 91 ,	0 } ,
{ 92 ,	0 } ,
{ 93 ,	0 } ,
{ 94 ,	0 } ,
{ 95 ,	0 } ,
{ 108 ,	0 } ,
{ 109 ,	0 } ,
{ 110 ,	0 } ,
{ 111 ,	0 } ,
{ 112 ,	0 } ,
{ 113 ,	0 } ,
{ 117 ,	0 } ,
{ 118 ,	0 } ,
{ 119 ,	0 } ,
{ 120 ,	0 } ,
{ 121 ,	0 } ,
{ 122 ,	0 } ,
{ 162 ,	0 } ,
{ 163 ,	0 } ,
{ 164 ,	0 } ,
{ 165 ,	0 } ,
{ 166 ,	0 } ,
{ 167 ,	0 } ,
{ 171 ,	0 } ,
{ 172 ,	0 } ,
{ 173 ,	0 } ,
{ 174 ,	0 } ,
{ 175 ,	0 } ,

{176,	0},
{189,	0},
{190,	0},
{191,	0},
{192,	0},
{193,	0},
{194,	0},
{198,	0},
{199,	0},
{200,	0},
{201,	0},
{202,	0},
{203,	0},
{243,	0},
{244,	0},
{245,	1},
{246,	0},
{247,	0},
{248,	1},
{252,	0},
{253,	0},
{254,	1},
{255,	0},
{256,	0},
{257,	0},
{270,	1},
{271,	1},
{272,	1},
{273,	1},
{274,	1},
{275,	1},
{279,	1},
{280,	1},
{281,	1},
{282,	0},
{283,	0},
{284,	1},
{324,	0},
{325,	0},
{326,	1},
{327,	0},
{328,	0},
{329,	1},
{333,	0},
{334,	0},
{335,	1},
{336,	0},
{337,	0},
{338,	0},
{351,	1},
{352,	1},
{353,	1},

{354,	1},
{355,	1},
{356,	1},
{360,	1},
{361,	1},
{362,	1},
{363,	0},
{364,	0},
{365,	1},
{405,	2},
{406,	2},
{407,	2},
{408,	2},
{409,	2},
{410,	2},
{414,	2},
{415,	2},
{416,	2},
{417,	2},
{418,	2},
{419,	2},
{432,	2},
{433,	2},
{434,	2},
{435,	2},
{436,	2},
{437,	2},
{441,	2},
{442,	2},
{443,	2},
{444,	2},
{445,	2},
{446,	2},
{729,	0},
{730,	0},
{731,	0},
{732,	0},
{733,	0},
{734,	0},
{738,	0},
{739,	0},
{740,	0},
{741,	0},
{742,	0},
{743,	0},
{756,	0},
{757,	0},
{758,	0},
{759,	0},
{760,	0},
{761,	0},
{765,	0},

{766,	0},
{767,	0},
{768,	0},
{769,	0},
{770,	0},
{810,	0},
{811,	0},
{812,	0},
{813,	0},
{814,	0},
{815,	0},
{819,	0},
{820,	0},
{821,	0},
{822,	0},
{823,	0},
{824,	0},
{837,	0},
{838,	0},
{839,	0},
{840,	0},
{841,	0},
{842,	0},
{846,	0},
{847,	0},
{848,	0},
{849,	0},
{850,	0},
{851,	0},
{891,	0},
{892,	0},
{893,	0},
{894,	0},
{895,	0},
{896,	0},
{900,	0},
{901,	0},
{902,	0},
{903,	0},
{904,	0},
{905,	0},
{918,	0},
{919,	0},
{920,	0},
{921,	0},
{922,	0},
{923,	0},
{927,	0},
{928,	0},
{929,	0},
{930,	0},
{931,	0},

{932,	0},
{972,	1},
{973,	1},
{974,	1},
{975,	0},
{976,	0},
{977,	1},
{981,	0},
{982,	0},
{983,	1},
{984,	0},
{985,	0},
{986,	0},
{999,	1},
{1000,	1},
{1001,	1},
{1002,	1},
{1003,	1},
{1004,	1},
{1008,	1},
{1009,	1},
{1010,	1},
{1011,	0},
{1012,	0},
{1013,	1},
{1053,	1},
{1054,	1},
{1055,	1},
{1056,	0},
{1057,	0},
{1058,	1},
{1062,	0},
{1063,	0},
{1064,	1},
{1065,	0},
{1066,	0},
{1067,	0},
{1080,	1},
{1081,	1},
{1082,	1},
{1083,	1},
{1084,	1},
{1085,	1},
{1089,	1},
{1090,	1},
{1091,	1},
{1092,	0},
{1093,	0},
{1094,	1},
{1134,	2},
{1135,	2},
{1136,	2},

{1137, 2},
{1138, 2},
{1139, 2},
{1143, 2},
{1144, 2},
{1145, 2},
{1146, 2},
{1147, 2},
{1148, 2},
{1161, 2},
{1162, 2},
{1163, 2},
{1164, 2},
{1165, 2},
{1166, 2},
{1170, 2},
{1171, 2},
{1172, 2},
{1173, 2},
{1174, 2},
{1175, 2},
{1458, 0},
{1459, 0},
{1460, 0},
{1461, 0},
{1462, 0},
{1463, 0},
{1467, 0},
{1468, 0},
{1469, 0},
{1470, 0},
{1471, 0},
{1472, 0},
{1485, 0},
{1486, 0},
{1487, 0},
{1488, 0},
{1489, 0},
{1490, 0},
{1494, 0},
{1495, 0},
{1496, 0},
{1497, 0},
{1498, 0},
{1499, 0},
{1539, 0},
{1540, 0},
{1541, 0},
{1542, 0},
{1543, 0},
{1544, 0},
{1548, 0},

```

{1549, 0},
{1550, 0},
{1551, 0},
{1552, 0},
{1553, 0},
{1566, 0},
{1567, 0},
{1568, 0},
{1569, 0},
{1570, 0},
{1571, 0},
{1575, 0},
{1576, 0},
{1577, 0},
{1578, 0},
{1579, 0},
{1580, 0},
{1620, 0},
{1621, 0},
{1622, 0},
{1623, 0},
{1624, 0},
{1625, 0},
{1629, 0},
{1630, 0},
{1631, 0},
{1632, 0},
{1633, 0},
{1634, 0},
{1647, 0},
{1648, 0},
{1649, 0},
{1650, 0},
{1651, 0},
{1652, 0},
{1656, 0},
{1657, 0},
{1658, 0},
{1659, 0},
{1660, 0},
{1661, 0},
{1701, 1},
{1702, 1},
{1703, 1},
{1704, 1},
{1705, 1},
{1706, 1},
{1710, 1},
{1711, 1},
{1712, 1},
{1713, 1},
{1714, 1},

```

{1715, 1},
{1728, 2},
{1729, 2},
{1730, 1},
{1731, 1},
{1732, 1},
{1733, 1},
{1737, 1},
{1738, 1},
{1739, 1},
{1740, 1},
{1741, 1},
{1742, 1},
{1782, 1},
{1783, 1},
{1784, 1},
{1785, 1},
{1786, 1},
{1787, 1},
{1791, 1},
{1792, 1},
{1793, 1},
{1794, 1},
{1795, 1},
{1796, 1},
{1809, 1},
{1810, 1},
{1811, 1},
{1812, 1},
{1813, 1},
{1814, 1},
{1818, 1},
{1819, 1},
{1820, 1},
{1821, 1},
{1822, 1},
{1823, 1},
{1863, 2},
{1864, 2},
{1865, 2},
{1866, 2},
{1867, 2},
{1868, 2},
{1872, 1},
{1873, 1},
{1874, 1},
{1875, 1},
{1876, 1},
{1877, 1},
{1890, 1},
{1891, 1},
{1892, 1},

```

        {1893, 1},
        {1894, 1},
        {1895, 1},
        {1899, 1},
        {1900, 1},
        {1901, 1},
        {1902, 1},
        {1903, 1},
        {1904, 1}
    };

int compareints (const void * a, const void * b)
{
    return ( *(int*)a - *(int*)b );
}

int discreteModel (const int i, const int * st)
{
    // Nodo 26_CaKC es st[19]
    // Nodo 22_PDE es st[21]
    int rvalue = 0;
    int *pItem;
    int key;
    switch (i) {
        case 0: //sr
            rvalue = 1;
            break;
        case 1: //GC
            rvalue = ( (st[0]==1) && (st
                [11]==0) ) ? 1 : 0;
            break;
        case 2: //cGMP
            rvalue = ( (st[1]==0 && st
                [21]==0 && st[2]==1) || (st
                [1]==1 && st[21]==0 && st
                [2]==0) || (st[1]==1 && st
                [21]==0 && st[2]==1) ) ? 1 :
                0;
            break;
        case 3: //KCNG
            rvalue = (st[2]==1) ? 1 : 0;
            break;
        case 4: //pK
            rvalue = (st[3]==0 && st
                [19]==0) ? 0 : 1;
            break;
        case 5: //v
            // Transform the key form
            ternary to decimal
            representation. Use that key
            to lookup in the table
    }
}

```

```

key = (st[4]*81) + (st[20]*27)
      + (st[15]*9) + (st[12]*3) +
      st[5];
pItem = (int*) bsearch (&key,
      voltage, 72, sizeof (int *),
      compareints);
if (pItem!=NULL)
    rvalue = *(pItem+1);
else {
    fprintf(stderr, "Bad
      regulator
      configuration at
      node index %d at
      function %s, file %s
      , line %d\nAborting
      ...\n", i, __func__,
      __FILE__, __LINE__
    );
    fprintf(stderr, "
      Offending
      configuration is = %
      d, %d, %d, %d, %d\n
      ", st[4], st[20], st
      [15], st[12], st[5]
    );
}
break;
case 6: //NHE
    rvalue = (st[5]==0 && st
      [11]==0) ? 1 : 0;
    break;
case 7: //NCE
    rvalue = ( (st[5]==0 && st
      [15]==0) || (st[5]==0 && st
      [15]==1) || (st[5]==0 && st
      [15]==2) ) ? 1 : 0;
    break;
case 8: //HCN
    rvalue = ( (st[5]==0 && st
      [13]==0) || (st[5]==0 && st
      [13]==1) ) ? 1 : 0;
    break;
case 9: //AC
    rvalue = ((st[5]==1 && st
      [11]==0 && st[15]==0) || (st
      [5]==1 && st[11]==0 && st
      [15]==1) ||
      (st[5]==1 &&
      st[11]==1
      && st
      [15]==0)
      || (st

```



```

[5]==2 &&
st[11]==0
&& st
[15]==0)
||
(st[5]==2 &&
st[11]==0
&& st
[15]==1)
|| (st
[5]==2 &&
st[11]==1
&& st
[15]==0)
||
(st[5]==2 &&
st[11]==1
&& st
[15]==1) )
? 0 : 1;

break;
case 10: //LVA
if ((st[5]==0 && st[10]==0) ||
(st[5]==0 && st[10]==1) || (
st[5]==1 && st[10]==1) ){
rvalue = 1;
}else if (st[5]==2 && st
[10]==1) {
rvalue = 2;
}else {
rvalue = 0;
}
break;
case 11: //uPH
rvalue = (st[6]==0) ? 0 : 1;
break;
case 12: //pNa
rvalue = (st[8]==0) ? 0 : 1;
break;
case 13: //cAMP
rvalue = ( (st[9]==0 && st
[21]==0 && st[13]==1) || (st
[9]==1 && st[21]==0 && st
[13]==0) || (st[9]==1 && st
[21]==0 && st[13]==1) ) ? 1
: 0;
break;
case 14: //HVA
if ( (st[5]==0 && st[14]==0) ||
(st[5]==0 && st[14]==1) ) {
rvalue = 1;

```

```

    }else if ((st[5]==0 && st
               [14]==2) || (st[5]==1 && st
               [14]==0) || (st[5]==2 && st
               [14]==0)) {
        rvalue = 0;
    }else {
        rvalue = 2;
    }
    break;
case 15: //pCa
    key = (st[15]*729) + (st
        [0]*243) + (st[10]*81) + (st
        [18]*27) + (st[7]*9) + (st
        [16]*3) + st[14];
    pItem = (int*) bsearch (&key,
        calcium, 432, sizeof (int *)
        , compareints);
    if (pItem!=NULL)
        rvalue = *(pItem+1);
    else
        fprintf(stderr, "Bad
            regulator
            configuration at
            node index %d at
            function %s, file %s
            , line %d\nAborting
            ...\n", i, __func__,
            __FILE__, __LINE__)
            ;
    break;
case 16: //CaP
    rvalue = (st[15]==0) ? 0 : 1;
    break;
case 17: //CaCC
    rvalue = (st[15]==0) ? 0 : 1;
    break;
case 18: //cAMPCC
    rvalue = (st[13]==0) ? 0 : 1;
    break;
case 19: //CaKC
    rvalue = ( (st[15]==1 && st
        [5]==2) || (st[15]==2 && st
        [5]==2) ) ? 1 : 0;
    break;
case 20: //pCl
    rvalue = (st[17]==0) ? 0 : 1;
    break;
case 21: //PDE
    rvalue = (st[2]==0 && st
        [13]==0) ? 0 : 1;
    break;
default:

```

```
        fprintf(stderr, "Bad node index  
        %d at function %s, file %s,  
        line %d\nAborting...\n", i,  
        __func__, __FILE__, __LINE  
        __);  
        break;  
    }  
    return rvalue;
```

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Réka Albert and Hans G Othmer. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Theoretical Biology*, 223(1):1–18, July 2003. (Citado en la página 5.)
- [2] D F DF Babcock, M M MM Bosma, D E DE Battaglia, and A A Darszon. Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13):6001–6005, July 1992. (Citado en la página 6.)
- [3] C Beltrán, O Zapata, and A Darszon. Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry*, 35(23):7591–7598, June 1996. (Citado en la página 3.)
- [4] Martin M Böhmer, Qui Q Van, Ingo I Weyand, Volker V Hagen, Michael M Beyermann, Midori M Matsumoto, Motonori M Hoshi, Eilo E Hildebrand, and Ulrich Benjamin UB Kaupp. Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *The EMBO Journal*, 24(15):2741–2752, August 2005. (Citado en las páginas 3 y 4.)
- [5] Stefan Bornholdt. Systems biology. Less is more in modeling large genetic networks. *Science (New York, NY)*, 310(5747):449–451, October 2005. (Citado en la página 5.)
- [6] Kwang-Hyun Cho, Jeong-Rae Kim, Songjoon Baek, Hyung-Seok Choi, and Sang-Mok Choo. Inferring biomolecular regulatory networks from phase portraits of time-series expression profiles. *FEBS Lett*, 580(14):3511–3518, Jun 2006. doi: 10.1016/j.febslet.2006.05.035. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.035>. (Citado en las páginas 14 y 15.)
- [7] S P Cook and D F Babcock. Activation of Ca²⁺ permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by speract. *The Journal of biological chemistry*, 268(30):22408–22413, October 1993. (Citado en la página 3.)
- [8] A Darszon, T Nishigaki, C. Wood, and CL Treviño. Calcium Channels and Ca²⁺ Fluctuations in Sperm Physiology. *International review of . . .*, 2005. (Citado en la página 3.)
- [9] Alberto Darszon, Adan Guerrero, Blanca E. Galindo, Takuya Nishigaki, and Christopher D. Wood. Sperm-activating peptides in

- the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *Int J Dev Biol*, 52(5-6):595–606, 2008. doi: 10.1387/ijdb.07255oad. (Citado en las páginas 1 y 2.)
- [10] Heinz W Engl, Christoph Flamm, Philipp Kuegler, James Lu, Stefan Mueller, and Peter Schuster. Inverse problems in systems biology. *Inverse Problems*, 25(12):123014, 2009. URL <http://stacks.iop.org/0266-5611/25/i=12/a=123014>. (Citado en la página 29.)
- [11] Jesus Espinal, Maximino Aldana, Adan Guerrero, Christopher Wood, Alberto Darszon, and Gustavo Martinez-Mekler. Discrete dynamics model for the speract-activated calcium signaling network relevant to sperm motility. *PLoS ONE*, 6(8):e22619, 08 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0022619. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022619>. (Citado en las páginas VIII, 3, 6, 7, 9, 10 y 22.)
- [12] Carlos Espinosa-Soto, Pablo Padilla-Longoria, and Elena R Alvarez-Buylla. A gene regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *THE PLANT CELL*, 16(11):2923–2939, November 2004. (Citado en la página 5.)
- [13] Mark Galassi, James Theiler, Jim Davies, Brian Gough, Reid Priedhorsky, Gerard Jungman, Mike Booth, Jorma Olavi Tahtinen, Thomas Walter, Fabrice Rossi, Carlo Perassi, Szymon Jaroszewicz, Nicolas Darnis, Jason H. Stover, Ivo Alxneit, Tuomo Keskitalo, Lowell Johnson, Patrick Alken, Rhys Ulerich, Pavel Holoborodko, and Pedro Gonnet. *GNU Scientific Library Reference Manual*, 3rd edition edition. URL <http://www.gnu.org/software/gsl/>. (Citado en la página 19.)
- [14] Blanca E BE Galindo, Anna T AT Neill, and Victor D VD Vacquier. A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(1):96–101, August 2005. (Citado en la página 3.)
- [15] Blanca Estela Galindo, José Luis de la Vega-Beltrán, Pedro Labarca, Victor D Vacquier, and Alberto Darszon. Sp-tetraKCNG: A novel cyclic nucleotide gated K(+) channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(3):668–675, March 2007. (Citado en la página 2.)
- [16] D L Garbers. Sea urchin sperm guanylate cyclase. Purification and loss of cooperativity. *The Journal of biological chemistry*, 251(13):4071–4077, July 1976. (Citado en la página 2.)

- [17] R Gauss, R Seifert, and U B Kaupp. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685):583–587, June 1998. (Citado en la página 3.)
- [18] L. Glass and S. A. Kauffman. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical control networks. *J Theor Biol*, 39(1):103–129, Apr 1973. (Citado en la página 12.)
- [19] David E. Goldberg. *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., Boston, MA, USA, 1st edition, 1989. ISBN 0201157675. (Citado en las páginas 15 y 16.)
- [20] G Granados-Gonzalez, I Mendoza-Lujambio, E Rodriguez, B E Galindo, C Beltrán, and A Darszon. Identification of voltage-dependent Ca^{2+} channels in sea urchin sperm. *FEBS Letters*, 579(29):6667–6672, December 2005. (Citado en las páginas 1 y 3.)
- [21] Iain A Greenwood and Normand Leblanc. Overlapping pharmacology of Ca^{2+} -activated Cl^- and K^+ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1):1–5, January 2007. (Citado en la página 4.)
- [22] Adán Guerrero, Takuya Nishigaki, Jorge Carneiro, Yoshiro Tatsu, Christopher D Wood, and Alberto Darszon. Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental biology*, 344(1):52–65, August 2010. (Citado en la página 4.)
- [23] Adán Guerrero, Christopher D Wood, Takuya Nishigaki, Jorge Carneiro, and Alberto Darszon. Tuning sperm chemotaxis. *Biochemical Society Transactions*, 38(5):1270–1274, October 2010. (Citado en la página 4.)
- [24] J R JR Hansbrough and D L DL Garbers. Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 256(3):1447–1452, February 1981. (Citado en la página 1.)
- [25] Randy L. Haupt and Sue Ellen Haupt. *Practical genetic algorithms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 1998. ISBN 047-1188735. (Citado en las páginas 17 y 21.)
- [26] John H. Holland. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. University of Michigan Press, 1975. (Citado en la página 16.)
- [27] Sui Huang, Gabriel Eichler, Yaneer Bar-Yam, and Donald E. Ingber. Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys. Rev. Lett.*, 94:128701, Apr 2005. doi: 10.1103/PhysRevLett.94.128701. URL <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.128701>. (Citado en la página 5.)

- [28] ISO. The ANSI C standard (C99). Technical Report WG14 N1124, ISO/IEC, 1999. URL <http://www.open-std.org/JTC1/SC22/WG14/www/docs/n1124.pdf>. (Citado en la página 19.)
- [29] S A Kauffman. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology*, 22(3):437–467, March 1969. (Citado en la página 4.)
- [30] U Benjamin Kaupp, Johannes Solzin, Eilo Hildebrand, Joel E Brown, Annika Helbig, Volker Hagen, Michael Beyermann, Francesco Pampaloni, and Ingo Weyand. The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nature cell biology*, 5(2):109–117, February 2003. (Citado en la página 3.)
- [31] U Benjamin Kaupp, Nachiket D Kashikar, and Ingo Weyand. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual review of physiology*, 70: 93–117, 2008. (Citado en la página 1.)
- [32] Brian W. Kernighan. *The C Programming Language*. Prentice Hall Professional Technical Reference, 2nd edition, 1988. ISBN 0131103709. (Citado en la página 19.)
- [33] S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, and M. P. Vecchi. Optimization by simulated annealing. *Science*, 220(4598):671–680, 1983. doi: 10.1126/science.220.4598.671. URL <http://www.sciencemag.org/content/220/4598/671.abstract>. (Citado en la página 15.)
- [34] H C Lee and D L Garbers. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *The Journal of biological chemistry*, 261(34):16026–16032, December 1986. (Citado en la página 3.)
- [35] J. Liu and J. Lampinen. On setting the control parameter of the differential evolution method. In *Proceedings of the 8th International Conference on Soft Computing (MENDEL)*, pages 62–67, 2002. (Citado en la página 17.)
- [36] Carmen G. Moles, Pedro Mendes, and Julio R. Banga. Parameter estimation in biochemical pathways: A comparison of global optimization methods. *Genome Research*, 13(11):2467–2474, 2003. doi: 10.1101/gr.1262503. URL <http://genome.cshlp.org/content/13/11/2467.abstract>. (Citado en las páginas 16 y 23.)
- [37] Melody K Morris, Julio Saez-Rodriguez, Peter K Sorger, and Douglas A Lauffenburger. Logic-based models for the analysis of cell signaling networks. *Biochemistry*, 49(15):3216–3224, April 2010. (Citado en la página 5.)

- [38] T Nishigaki, CD Wood, Y Tatsu, N Yumoto, T Furuta, D Elias, K Shiba, SA Baba, and A Darszon. A sea urchin egg jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase. *Developmental biology*, 272(2):376–388, 2004. (Citado en las páginas 2, 3 y 4.)
- [39] Gbolahan W Okunade, Marian L Miller, Gail J Pyne, Roy L Sutliff, Kyle T O'Connor, Jonathan C Neumann, Anastasia Andringa, Daniel A Miller, Vikram Prasad, Thomas Doetschman, Richard J Paul, and Gary E Shull. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of biological chemistry*, 279(32):33742–33750, August 2004. (Citado en la página 4.)
- [40] Edward Perez-Reyes. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1): 117–161, January 2003. (Citado en la página 3.)
- [41] William Press, Saul Teukolsky, William Vetterling, and Brian Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2nd edition, 1992. (Citado en las páginas 15 y 19.)
- [42] Esmeralda Rodríguez and Alberto Darszon. Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm. *The Journal of physiology*, 546(Pt 1):89–100, January 2003. (Citado en las páginas 3 y 4.)
- [43] Assieh Saadatpour, Istvan Albert, and Reka Albert. Attractor analysis of asynchronous boolean models of signal transduction networks. *Journal of Theoretical Biology*, 266(4):641 – 656, 2010. ISSN 0022-5193. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.07.022. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519310003796>. (Citado en la página 5.)
- [44] Rainer Storn and Kenneth Price. Differential evolution. a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *Journal of Global Optimization*, 11:341–359, 1997. ISSN 0925-5001. URL <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008202821328>. (Citado en las páginas 16, 17 y 24.)
- [45] Timo T Strünker, Ingo I Weyand, Wolfgang W Bönigk, Qui Q Van, Astrid A Loogen, Joel E JE Brown, Nachiket N Kashikar, Volker V Hagen, Eberhard E Krause, and U Benjamin UB Kaupp. A K^{+} -selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nature cell biology*, 8(10):1149–1154, October 2006. (Citado en las páginas 1, 2 y 3.)

- [46] Yi-Hsien YH Su and Victor D VD Vacquier. A flagellar K(+)-dependent Na(+)/Ca(2+) exchanger keeps Ca(2+) low in sea urchin spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10):6743–6748, May 2002. (Citado en las páginas 3 y 4.)
- [47] N Suzuki. Structure, Function and Biosynthesis of Sperm-Activating Peptides and Fucose Sulfate Glycoconjugate in the Extracellular Coat of Sea-Urchin Eggs. *Zoological Science*, 12(1):13–27, 1995. (Citado en la página 1.)
- [48] The clang Developers and Contributors. clang: a C language family frontend for LLVM. <http://clang.llvm.org/> ; accessed 21-Sept-2011. (Citado en la página 19.)
- [49] Dan Wang, Shelby M King, Timothy A Quill, Lynda K Doolittle, and David L Garbers. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature cell biology*, 5(12):1117–1122, December 2003. (Citado en la página 3.)
- [50] Wikipedia. Mean squared error — wikipedia, the free encyclopedia, 2012. URL http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Mean_squared_error&oldid=47302847. [Online; accessed 31-January-2012]. (Citado en la página 14.)
- [51] Wikipedia. Pearson product-moment correlation coefficient — wikipedia, the free encyclopedia, 2012. URL http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Pearson_product-moment_correlation_coefficient&oldid=472133432. [Online; accessed 31-January-2012]. (Citado en la página 14.)
- [52] Chris D Wood, Alberto Darszon, and Michael Whitaker. Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *Journal of Cell Biology*, 161(1):89–101, April 2003. (Citado en las páginas 2, 3 y 4.)
- [53] Christopher D Wood, Takuya Nishigaki, Toshiaki Furuta, Shoji A Baba, and Alberto Darszon. Real-time analysis of the role of Ca(2+) in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *Journal of Cell Biology*, 169(5):725–731, June 2005. (Citado en las páginas 3 y 4.)
- [54] Christopher D. Wood, Takuya Nishigaki, Yoshiro Tatsu, Noboru Yumoto, Shoji A. Baba, Michael Whitaker, and Alberto Darszon. Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Dev Biol*, 306(2):525–537, Jun 2007. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.036. (Citado en las páginas 2 y 4.)

COLOFÓN

Este documento se produjo con las fuentes Palatino y Euler de Herman Zapf y Bera Mono, una variante de Bitsream Vera modificada por Malte Rosenau y Ulrich Dirr, usando el estilo `classicthesis` de André Miede. El estilo está inspirado en el libro de Robert Bringhurst “*The Elements of Typographic Style*”. `classicthesis` puede obtenerse para \LaTeX y LyX en:

<http://code.google.com/p/classicthesis/>