



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Análisis de la interacción entre las vías de
señalización mediadas por AKT y MAPK/ERK
en el metabolismo de la glucosa**

Autor:

D. Marcos Sacristán Moraleda

Tutores:

D. José Ramón López López

D.^a Ana M. Portillo de la Fuente

Valladolid, 2023

TÍTULO: Análisis de la interacción entre las vías de señalización mediadas por AKT y MAPK/ERK en el metabolismo de la glucosa

AUTOR/A: D. Marcos Sacristán Moraleda

TUTOR/A: D. José Ramón López López
D.^a Ana M. Portillo de la Fuente

DEPARTAMENTO: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología
Departamento de Matemática Aplicada

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D.^a Sylvia Novo Martín

SECRETARIO: D.^a Pilar Ciudad Velasco

VOCAL: D.^a Ana M. Portillo de la Fuente

SUPLENTE 1: D.^a Ángela Barbero Díez

SUPLENTE 2: D.^a M^a Teresa Alonso Alonso

FECHA: 2023

CALIFICACIÓN:

Agradecimientos

Gracias a toda mi familia, principalmente a mis padres, Eugenio y Pilar, y a mi hermano Daniel, que me han acompañado durante estos cuatro años de carrera y han aguantado de primera mano el estrés y los malos ratos que he sufrido. A mis tutores, Ana y José Ramón, por la confianza depositada en mí y las facilidades proporcionadas para realizar el trabajo. Por supuesto agradecerle a todo el grupo de laboratorio, particularmente a Sara, por haber estado siempre pendientes de mí y dispuestos a ayudar tanto en las prácticas como en el TFG. No quisiera concluir sin reconocer antes el apoyo y la ayuda de mis amigos, tanto de clase como de fuera de ella, que he conocido estos cuatro años o que ya conocía pero he redescubierto. Sin ellos esta magnífica experiencia no habría sido igual.

Resumen

La restenosis de stent coronario es un proceso fisiopatológico en el que la túnica vascular se inflama como respuesta a la colocación de dicho stent, reduciendo el diámetro efectivo de la luz vascular. Con el objetivo de evitar la restenosis se utiliza típicamente everolimus, un inhibidor de la cascada AKT/mTOR. Sin embargo, debido a las complicaciones asociadas que este fármaco conlleva, es de gran interés encontrar dianas terapéuticas alternativas. En este contexto surge el PAP-1 un bloqueante del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3. Según estudios recientes, el bloqueo de este canal está relacionado con la inhibición de la vía de señalización MAPK/ERK. Ambos fármacos funcionan bien por separado, sin embargo, al utilizarlos conjuntamente su efecto se desvanece. Las vías de señalización de AKT/mTOR y MAPK/ERK son dos cascadas tremendamente implicadas tanto en la proliferación como en la migración celular, con lazos de realimentación complejos y una interacción cruzada (crosstalk) que dificulta su interpretabilidad.

Debido a esto se plantea el desarrollo y utilización de modelos computacionales basados en ecuaciones diferenciales para tratar de encontrar la interacción concreta que causa estos resultados. A causa de que se busca un comportamiento general del modelo, no cuantitativo, se propone eliminar los parámetros y constantes asociados a las ecuaciones, simplificando las interacciones y facilitando la explicabilidad del modelo. Se parte desde un modelo base definido como un sistema de siete ecuaciones diferenciales, cada una de las cuales hace referencia a la tasa de fosforilación (activación) de una proteína en concreto, habiendo elegido como proteínas más relevantes PI3K, AKT, mTOR y P70S6K de la vía de AKT/mTOR y Ras, MEK y ERK de la vía MAPK/ERK. A este sistema se le realizan pequeños cambios para obtener otros tres modelos iniciales. Para medir la respuesta del modelo, se utiliza la concentración activa de la proteína P70S6K.

A partir de estos modelos, se realiza el análisis exhaustivo de todos los modelos generados al añadir una proteína intermedia que sea estimulada o inhibida por un máximo de otras dos proteínas previamente definidas del modelo, y que ejerza su acción sobre otras dos proteínas. Tras el estudio de más de 30000 modelos distintos por este método, se comprueba que ninguno consiguió replicar los resultados que se observan en las células reales. Por tanto, se entiende que alguno de los planteamientos de base no era correcto, centrandose en la elección del output o las interacciones intermedias planteadas. Tomando inspiración del problema XOR sufrido por los precursores del Deep Learning, se sugiere utilizar dos proteínas para tratar de explicar el crosstalk entre las dos vías al igual que se utilizaron dos capas ocultas en las redes neuronales para solventar su problema. Ante la imposibilidad de probar todas las combinaciones posibles como en el caso de una única proteína, se opta por una búsqueda inteligente basándose en los principios del álgebra booleana. De esta forma se desarrollan dos modelos funcionales, que se diferencian en su output. En uno de ellos se sigue utilizando P70S6K como output, mientras que en el otro se utiliza una salida con un mayor grado de abstracción que consiste en la combinación de esta proteína con otra de la vía de ERK. Ambos modelos consiguen replicar el comportamiento observado en la realidad mediante mecanismos distintos, por lo que será necesario realizar pruebas adicionales para validar si alguno de los dos es correcto, principalmente el análisis de la expresión de P70S6K en células que han sido incubadas solamente con PAP-1.

Palabras clave

Insulina/Akt, señalización MAPK/ERK, ecuaciones diferenciales ordinarias, simulación numérica

Abstract

Coronary stent restenosis is a pathophysiological process in which the vascular tunica becomes inflamed in response to stent placement, reducing the effective diameter of the vascular lumen. In order to prevent restenosis, everolimus, an inhibitor of the AKT/mTOR cascade, is typically used. However, due to the associated complications that this drug entails, it is of great interest to find alternative therapeutic targets. In this context, PAP-1, a blocker of the voltage-gated potassium channel Kv1.3, has emerged. According to recent studies, blockade of this channel is related to inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway. Both drugs work well separately, however, when used together their effect fades. The AKT/mTOR and MAPK/ERK signaling pathways are two cascades tremendously involved in both cell proliferation and migration, with complex feedback loops and crosstalk interaction that makes their interpretability difficult.

Because of this, the development and use of computational models based on differential equations is proposed to try to find the concrete interaction that causes these results. Because a general behavior of the model is sought, not quantitative, it is proposed to eliminate the parameters and constants associated with the equations, simplifying the interactions and facilitating the explainability of the model. We start from a base model defined as a system of seven differential equations, each of which refers to the rate of phosphorylation (activation) of a specific protein, having chosen as the most relevant proteins PI3K, AKT, mTOR and P70S6K of the AKT/mTOR pathway and Ras, MEK and ERK of the MAPK/ERK pathway. Minor changes are made to this system to obtain three other initial models. To measure the model response, the active concentration of the P70S6K protein is used.

From these models, the exhaustive analysis of all the models generated by adding an intermediate protein that is stimulated or inhibited by a maximum of two other previously defined proteins from the model, and that exerts its action on two other proteins, is performed. After the study of more than 30,000 different models by this method, it was found that none of them succeeded in replicating the results observed in real cells. Therefore, it is understood that some of the basic approaches were not correct, focusing the attention on the choice of the output or the intermediate interactions proposed. Taking inspiration from the XOR problem suffered by the precursors of Deep Learning, it is suggested to use two proteins to try to explain the crosstalk between the two pathways just as two hidden layers were used in neural networks to solve their problem. Given the impossibility of testing all possible combinations as in the case of a single protein, an intelligent search based on the principles of Boolean algebra is chosen. In this way, two functional models are developed, which differ in their output. In one of them, P70S6K is still used as output, while the other one uses an output with a higher degree of abstraction that consists of the combination of this protein with another protein of the ERK pathway. Both models manage to replicate the behavior observed in reality by means of different mechanisms, so additional tests will be necessary to validate whether either of the two is correct, mainly the analysis of P70S6K expression in cells that have been incubated only with PAP-1.

Keywords

Insulin/Akt, MAPK/ERK signaling, ordinary differential equations, numerical simulation

Índice general

1	Introducción	1
1.1	Restenosis	2
1.2	Vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK	2
1.3	Ecuaciones diferenciales y simulación numérica	3
1.4	Motivación	3
1.5	Hipótesis	4
1.6	Objetivos	4
2	Vías de señalización	5
2.1	Introducción	6
2.2	Vía de señalización de AKT/mTOR	8
2.2.1	Cascada de señalización	9
2.2.2	AKT	10
2.2.3	Complejos mTORC1 y mTORC2	11
2.2.4	Mecanismos de realimentación e interacciones en la vía AKT/mTOR	13
2.3	Vía de señalización de MAPK/ERK	15
2.3.1	Cascada de señalización	15
2.3.2	Funciones de ERK	17
2.4	Crosstalk entre ambas vías	18
2.5	Canal Kv1.3	19
3	Ecuaciones diferenciales y simulación numérica	20
3.1	Introducción	21
3.2	Fundamentos de las ecuaciones diferenciales	21
3.3	Métodos numéricos para la resolución de ecuaciones diferenciales	22
3.3.1	Clasificación	22
3.3.2	Métodos Runge-Kutta	23
3.3.3	Métodos BDF	24
3.4	Modelización de vías de señalización celular	26
4	Materiales y métodos	29
4.1	Introducción	30
4.2	Datos de laboratorio	30
4.2.1	Cultivos celulares	30
4.2.2	Inhibidores y factores de crecimiento	30
4.2.3	Western Blot	30
4.3	MATLAB como entorno de programación	31
4.4	Caracterización del modelo	31
4.4.1	Modelo del artículo de Arkun	32
4.4.2	Elección de variables	35
4.4.3	Eliminación de parámetros	36
4.4.4	Output del modelo	38
4.5	Búsqueda de interacciones	39
4.5.1	Condiciones de simulación	39

4.5.2	Algoritmos de inteligencia artificial	40
4.5.3	Búsqueda por fuerza bruta	42
4.5.4	Álgebra booleana en vías de señalización	45
4.5.5	Modelo 1: Mismo output	48
4.5.6	Modelo 2: Distinto output	49
5	Resultados obtenidos	52
5.1	Introducción	53
5.2	Modelo base inicial	53
5.3	Resto de modelos iniciales	58
5.4	Algoritmo de inteligencia artificial	61
5.5	Búsqueda por fuerza bruta	61
5.6	Relación P70S6K y vía MAPK/ERK	63
5.7	Ajuste inteligente del modelo	63
5.7.1	Modelo 1: P70S6K como output	63
5.7.2	Modelo 2: Diferente output del modelo	66
6	Análisis y discusión de los resultados. Limitaciones.	69
6.1	Introducción	70
6.2	Análisis y discusión de los resultados	70
6.2.1	Modelo simple	70
6.2.2	Resto de modelos iniciales	70
6.2.3	Algoritmo basado en IA	71
6.2.4	Búsqueda exhaustiva	71
6.2.5	Relación P70S6K y vía MAPK/ERK	73
6.2.6	Modelo 1: P70S6K como output	74
6.2.7	Modelo 2: Diferente output	74
6.3	Limitaciones	75
7	Grado de consecución de los objetivos. Conclusiones extraídas. Aportaciones originales. Líneas futuras de trabajo	76
7.1	Grado de consecución de los objetivos	77
7.2	Conclusiones extraídas	77
7.3	Aportaciones originales	78
7.4	Líneas futuras de trabajo	78
8	Bibliografía	80
A	Glosario de abreviaturas y acrónimos	87

Lista de figuras

1	Esquema de los procesos de transcripción y traducción en el interior de la célula. <i>For the National Cancer Institute © (2023) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights</i> . . .	7
2	Correspondencia entre tripletes de nucleótidos del ARNm y aminoácido de la secuencia proteica (<i>BIOINNOVA</i>)	7
3	Vía de señalización AKT/mTOR en detalle. <i>Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)</i>	8
4	Esquema de funcionamiento de los receptores RTK (<i>Insulin Signaling and RTK: An Overview - Assay Genie 2023</i>)	9
5	Vía de señalización AKT. Se observa como AKT actúa como nodo de múltiples señales biológicas y da lugar a multitud de respuestas. <i>Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)</i>	10
6	Estructura de los complejos mTORC1 y mTORC2 (Kim, Cook y Chen 2016)	12
7	Mecanismos de activación y funciones de los complejos mTORC1 y mTORC2 (Laplante y Sabatini 2012)	12
8	Diagrama ilustrativo de los mecanismos de autorregulación de la vía AKT/mTOR (Ghomlaghi, Hart et al. 2021)	13
9	Vía de señalización MAPK/ERK en detalle. <i>Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)</i>	16
10	Esquema de la cadena Ras/Raf/MEK/ERK. Los asteriscos simbolizan que la molécula ha alcanzado una conformación activa por fosforilación (Elaboración propia).	17
11	Diagrama en el plano complejo $\xi = h\lambda$ de las regiones de estabilidad de los métodos BDF para $s = 1, 2, \dots, 6$. (Auzinger y Herfort 2014).	26
12	Diagrama esquemático del modelo principal desarrollado. Las flechas negras indican activación y las flechas rojas muestran inhibición. Las variables en color azul son las que determinan las condiciones de simulación.	36
13	Diagrama de barras que representa el porcentaje de área invadida por las células VSMC tras someterles a distintos tratamientos. El uso combinado de everolimus y PAP-1 inhibe la función que ambos cumplen por separado.	38
14	Curva dosis-respuesta de la cantidad de P70S6K fosforilada en función de la concentración de everolimus, normalizado con respecto a la cantidad control sin inhibidores	39
15	Explicación del algoritmo de descenso de gradiente	42
16	Codificación de las interacciones de X_1 en función de sus entradas y salidas.	43
17	Modelado biológico de una puerta NOT mediante un inhibidor (S. Cui et al. 2021). . . .	47
18	Modelado biológico de una puerta OR mediante dos reacciones independientes (S. Cui et al. 2021).	47
19	Modelado biológico de una puerta AND mediante la formación de un complejo (S. Cui et al. 2021).	47
20	Respuesta temporal del modelo base en condiciones de control. Las condiciones de simulación son $EV = 0, PAP = 0, PDGF_1 = 1, PDGF_2 = 1$	53
21	Respuesta temporal del modelo base para una entrada de everolimus de 0.9. Las condiciones de simulación son $EV = 0,9, PAP = 0, PDGF_1 = 1, PDGF_2 = 1$	54
22	Respuesta temporal del modelo base para una entrada de PAP de 0.9. Las condiciones de simulación son $EV = 0, PAP = 0,9, PDGF_1 = 1, PDGF_2 = 1$	55
23	Respuesta temporal del modelo base cuando actúan los dos inhibidores. Las condiciones de simulación son $EV = 0,9, PAP = 0,9, PDGF_1 = 1, PDGF_2 = 1$	56

24	Respuesta final del modelo W_0 a las cuatro condiciones establecidas.	57
25	Respuesta final del modelo W_a las cuatro condiciones establecidas.	58
26	Respuesta final del modelo W_b a las cuatro condiciones establecidas.	59
27	Respuesta final del modelo W_c a las cuatro condiciones establecidas.	60
28	Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al primer cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.	63
29	Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al segundo cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.	64
30	Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al tercer cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.	64
31	Curva dosis respuesta del modelo 1 a everolimus normalizada por la P70S6K control. La línea punteada indica el valor real que se pretende alcanzar.	65
32	Curva dosis respuesta del modelo 1 a PAP-1 normalizada por la P70S6K control. La línea punteada indica el valor real que se pretende alcanzar.	65
33	Diagrama de barras de las concentraciones finales del modelo 2.	66
34	Curva dosis respuesta del modelo 2 a everolimus normalizada por el output control. La línea punteada indica el valor real que se pretende imitar.	67
35	Curva dosis respuesta del modelo 2 a PAP-1 normalizada por el output control. La línea punteada indica el valor real que se pretende imitar.	67
36	Diagrama de barras de las concentraciones finales del modelo 2.	68
37	Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_0	71
38	Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_a	72
39	Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_c . No se incluyen las flechas de realimentación negativa por P70S6K desde la propia molécula para no ensuciar el dibujo.	72
40	Representación del espacio de salida de diferentes funciones lógicas. Una puerta XOR presenta un espacio de salidas no separable linealmente.	73

Lista de tablas

1	Tabla de Butcher para métodos de Runge-Kutta explícitos	24
2	Tabla de Butcher para métodos de Runge-Kutta implícitos	24
3	Valores de α para los métodos BDF	26
4	Valores utilizados como output deseado del modelo	43
5	Información almacenada para cada modelo	44
6	Tabla de verdad de la puerta NOT	45
7	Tabla de verdad de la puerta AND	45
8	Tabla de verdad de la puerta OR	45
9	Tabla de verdad de la puerta XOR	46
10	Tabla de verdad de la puerta NOR	46
11	Tabla de verdad de la puerta NAND	46
12	Tabla de verdad de la puerta XNOR	46
13	Tabla de verdad de la respuesta de P70S6K ante los distintos inhibidores suponiendo que se corresponde con el output del modelo	48
14	Tabla de verdad ampliada de la respuesta del modelo ante los distintos inhibidores	49
15	Tabla de verdad de la respuesta de P70S6K ante los distintos inhibidores, considerando que es activada con el uso de PAP-1.	50
16	Tabla de verdad ampliada de la respuesta del modelo con distinto output a P70S6K ante los distintos inhibidores.	50
17	Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_0	61
18	Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_a	62
19	Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_b	62
20	Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_c	62
21	Comparación de respuestas EV+PAP con respuestas separadas de PAP y EV	63

1 Introducción

1.1	Restenosis	2
1.2	Vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK	2
1.3	Ecuaciones diferenciales y simulación numérica	3
1.4	Motivación	3
1.5	Hipótesis	4
1.6	Objetivos	4
2	Vías de señalización	5

1.1 Restenosis

La restenosis es un proceso patológico que ocurre con frecuencia después de realizar una angioplastia con colocación de stent, y se caracteriza por una reducción anormal del diámetro del vaso sanguíneo como respuesta a la intervención (Wassif y Welt 2023). Esta complicación se desencadena por la respuesta exagerada del tejido vascular a la lesión, que conduce a la proliferación excesiva de Células Musculares Lisas Vasculares (VSMC) y al depósito de matriz extracelular en la capa interna del vaso sanguíneo (Curcio, Torella e Indolfi 2011). La restenosis limita la eficacia a largo plazo de la angioplastia coronaria y puede conllevar la necesidad de reintervención y un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares adversos (Moussa et al. 2020).

Con el objetivo de evitar la restenosis, una de las principales estrategias terapéuticas es utilizar stents liberadores de fármacos (Curcio, Torella e Indolfi 2011). Estos dispositivos integran biomateriales que al descomponerse en contacto con el medio biológico desprenden fármacos antiinflamatorios y antiproliferativos en el mismo. Uno de los medicamentos más ampliamente aceptados y utilizados en este caso es el everolimus (Aoki y Tanabe 2021), un análogo de la rapamicina que actúa inhibiendo mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), lo que impide la proliferación y migración celular (Saxton y Sabatini 2017).

Desafortunadamente, el tratamiento con everolimus produce efectos adversos no deseados, tales como anemia, anorexia, estomatitis y vómitos (Arena et al. 2021), por lo que es necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas. Una de las propuestas es el 5-(4-fenoxibutoxi)psoraleno (PAP-1), un inhibidor del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3 que según los resultados de (Cidad et al. 2015; Styles et al. 2021) actúa a sobre la vía de las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos (MAPK).

1.2 Vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK

La vía de señalización de AKT/mTOR es una ruta celular que desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular (Miricescu et al. 2020). Esta vía está compuesta por dos proteínas principales: la proteína quinasa B (AKT o PKB) y la serina/treonina quinasa mTOR (Yu y W. Cui 2016). La activación de la vía AKT/mTOR se desencadena por la unión de factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y el Factor de Crecimiento similar a la Insulina (IGF), a sus receptores de membrana correspondientes. A continuación, se desencadenan una serie de eventos de señalización intracelular que culminan en la activación de AKT y mTOR (Arkun 2016). El desequilibrio en esta vía puede contribuir a diversas enfermedades, como el cáncer, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas (O'Neill 2013)

Por otro lado, la vía de señalización de MAPK/ERK está compuesta por una cascada de señalización de varios niveles: Ras, Raf, MAPK/ERK Quinasa (MEK) y ERK (Quinasa Regulada por señal Extracelular). Esta vía se activa cuando el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) u otro factor de crecimiento extracelular se une a su receptor correspondiente. Tras esta unión, se forma un complejo denominado Shc/Grb2/SOS, donde la proteína Ras interacciona con SOS (*Son of Sevenless*) y cambia a su forma activa (Arkun 2016). Este cambio conduce a la activación de Raf en la membrana celular, iniciando así una serie de eventos de fosforilación en cascada dentro de la vía Raf/MEK/ERK (Kohno y Pouyssegur 2009). La Quinasa Regulada por señal Extracelular activada (pERK), fosforila SOS, desensambla el complejo Grb2-SOS y desactiva Ras. Esta retroalimentación negativa es responsable de las diferentes respuestas observadas en la vía de las MAPK al ser estimulada por EGF y PDGF (Hornberg et al. 2005).

La cascada de señalización MAPK controla diversas funciones celulares, como el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la proliferación, en respuesta a diferentes factores de crecimiento (Moelling

et al. 2002). Sin embargo, el tipo de respuesta biológica generada por esta vía depende de factores como el tipo de célula, la amplitud y la duración del estímulo externo (Hornberg et al. 2005). Es importante destacar que en muchos casos de cáncer y resistencia a fármacos, se ha observado que la vía MAPK/ERK presenta mutaciones o una sobreexpresión. Esta desregulación de la señalización de ERK se ha asociado con la aparición de tumores (Burotto et al. 2014).

1.3 Ecuaciones diferenciales y simulación numérica

Una ecuación diferencial es una ecuación que contiene las derivadas de una o más variables dependientes con respecto a una o más variables independientes. Son especialmente útiles para el estudio de sistemas cuya expresión analítica no se conoce, pero sí podemos determinar la tasa de variación o velocidad de cambio de las variables que los componen. De esta forma, a partir de la expresión de las derivadas del sistema podemos obtener la expresión de las variables del mismo (Edwards y Penney 2014). Lo ideal sería encontrar la expresión analítica de las variables del sistema, pero lo cierto es que eso solo es posible en un número reducido de casos, por ejemplo cuando las ecuaciones son lineales, y en la mayoría de las situaciones tenemos que recurrir a su aproximación numérica.

La solución numérica de ecuaciones diferenciales consiste en utilizar métodos computacionales para aproximar y resolver numéricamente dichas ecuaciones. En lugar de obtener soluciones analíticas exactas, se utilizan algoritmos numéricos para discretizar la ecuación diferencial en pequeños pasos de tiempo o espacio y calcular las soluciones aproximadas en cada uno de ellos. La integración numérica de ecuaciones diferenciales incluye los métodos de Runge-Kutta, los métodos lineales multipaso, el método de diferencias finitas o el método de elementos finitos, entre otros (R. L. Burden, Faires y A. M. Burden 2016). La simulación numérica de ecuaciones diferenciales permite estudiar el comportamiento de sistemas complejos, modelar fenómenos físicos y biológicos, y obtener resultados numéricos que son útiles para la comprensión y predicción de los sistemas estudiados.

La aplicación de la simulación computacional basada en ecuaciones diferenciales ofrece varias ventajas significativas para el estudio del problema concreto de este TFG. En primer lugar, permite reducir el tiempo y el coste asociados a los experimentos tradicionales, al proporcionar un entorno virtual en el que se pueden realizar múltiples simulaciones de forma rápida y eficiente. Además, ofrece la posibilidad de controlar y modificar de manera precisa las condiciones y los parámetros de estudio, lo que facilita el análisis de diferentes escenarios y la identificación de variables críticas en las interacciones entre las vías de señalización. Por último, esta metodología proporciona una herramienta complementaria a los experimentos de laboratorio, permitiendo validar y ampliar los resultados obtenidos de manera experimental.

1.4 Motivación

La restenosis representa un desafío clínico significativo en el campo de la cardiología (Moussa et al. 2020). Aunque se han desarrollado stents liberadores de fármacos, como el everolimus, para prevenir la proliferación excesiva de VSMC, este tratamiento presenta efectos adversos no deseados (Arena et al. 2021). Por lo tanto, es crucial explorar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la eficacia y reduzcan los efectos secundarios asociados. En este contexto, el uso de PAP-1 como inhibidor del canal de potasio dependiente de voltaje Kv1.3, ha surgido como una opción prometedora (Cidad et al. 2015). Sin embargo, las interacciones entre las vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK, son complejas ya que intervienen multitud de bucles de activación e inhibición cruzada (Arkun 2016), dando lugar a resultados contradictorios. En particular, el uso combinado de everolimus y PAP-1 no inhibe la proliferación celular, objetivo que ambos fármacos consiguen por separado. En este Trabajo Fin de Grado (TFG) se

propone desarrollar un modelo computacional con el objetivo de identificar las causas subyacentes de los resultados contradictorios observados y facilitar la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

1.5 Hipótesis

El uso de Everolimus, un inhibidor de la vía AKT/mTOR y el uso de PAP-1, que inhibe la vía MAPK/ERK, por separado disminuyen la migración y proliferación de VSMC. Sin embargo, al aplicarlos simultáneamente, su efecto es menor, llegando incluso dicho efecto a desaparecer. El crosstalk entre ambas vías es complejo, dependiendo de multitud de interacciones, muchas de las cuales cuentan con evidencias contradictorias en la literatura. Utilizando métodos de simulación por ordenador se puede reducir el tiempo y el coste de los experimentos para estudiar dicho crosstalk. En este TFG se plantea como hipótesis de trabajo que es posible desarrollar un modelo computacional del sistema basado en ecuaciones diferenciales, sobre el que simular distintas condiciones y probar interacciones entre proteínas para ayudar a la búsqueda de la interacción que causa estos resultados.

1.6 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es investigar las interacciones entre las vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK en el contexto de la migración y proliferación de las VSMC. Para lograr esto, se propone desarrollar un modelo computacional basado en ecuaciones diferenciales que permita simular distintas condiciones y explorar las posibles interacciones entre las proteínas involucradas en estas vías de señalización. Para poder llevar a cabo el trabajo propuesto, es necesario cumplir los siguientes objetivos específicos.

- I) Realizar una búsqueda y revisión bibliográfica acerca de las vías de señalización descritas.
- II) Familiarizarse con el lenguaje de programación MATLAB, en especial con las funciones de resolución de ecuaciones diferenciales.
- III) Escoger las moléculas más relevantes del sistema que se usarán como variables del modelo.
- IV) Definir un output del modelo.
- V) Desarrollar un modelo principal sin crosstalk sobre el que comenzar a incluir interacciones.
- VI) Plantear diversas formas de interacción entre ambas vías que permitan explicar el comportamiento del sistema.
- VII) Definir el comportamiento de las proteínas que provocan estas interacciones y como observarlas mediante técnicas de laboratorio.
- VIII) Comprobar dichas interacciones con experimentos en el laboratorio.
- IX) Extraer conclusiones a partir del estudio desarrollado, limitaciones y posibles líneas futuras.

2 Vías de señalización

2.1	Introducción	6
2.2	Vía de señalización de AKT/mTOR	8
2.2.1	Cascada de señalización	9
2.2.2	AKT	10
2.2.3	Complejos mTORC1 y mTORC2	11
2.2.4	Mecanismos de realimentación e interacciones en la vía AKT/mTOR	13
2.3	Vía de señalización de MAPK/ERK	15
2.3.1	Cascada de señalización	15
2.3.2	Funciones de ERK	17
2.4	Crosstalk entre ambas vías	18
2.5	Canal Kv1.3	19
3	Ecuaciones diferenciales y simulación numérica	20

2.1 Introducción

Tanto la vía AKT/mTOR como la vía de las MAPK desempeñan un papel crucial en la proliferación y el crecimiento celular (Laplante y Sabatini 2012; Johnson y Lapadat 2002). Asociado a esta última vía se encuentra el canal de potasio Kv1.3 (Styles et al. 2021), cuya expresión se correlaciona con la proliferación celular (Cidad et al. 2015), aunque su mecanismo de acción no es del todo comprendido. A través del estudio de estos componentes, se busca comprender su interacción y su implicación en procesos fisiológicos y patológicos.

En este capítulo se describirán en mayor detalle ambas vías de señalización, abordando aspectos tales como sus moléculas más relevantes, las señales que los activan, la respuesta celular que generan e inhibidores conocidos. A continuación, se profundizará en el canal de potasio activado por voltaje Kv1.3. Por último, se desarrollará una sección dedicada a evaluar las interacciones descritas entre las dos cascadas de señalización.

Antes de profundizar en las vías de señalización, se realizará una breve descripción de conceptos clave en la bioquímica para facilitar la comprensión de esta sección.

La información genética se codifica en el ADN y se expresa a través de las proteínas. El ADN está compuesto por una secuencia de nucleótidos que contiene las bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). La secuencia de bases en el ADN determina la información genética y sigue la regla de apareamiento complementario: A se une a T y C se une a G (*Discovery of DNA Double Helix: Watson and Crick | Learn Science at Scitable* 2023).

El ADN no puede abandonar el núcleo, por lo que se codifica la información en ARN. La información genética contenida en el ADN se transcribe en ARNm durante un proceso llamado transcripción. La enzima ARN polimerasa sintetiza una cadena de ARNm complementaria a una de las hebras de ADN, reemplazando la timina (T) por uracilo (U) en el ARNm resultante (Clayton 2003). El ARNm lleva la información genética del núcleo al citoplasma de la célula, donde se encuentran los ribosomas (Green y Noller 2003).

La traducción es el proceso en el cual la información del ARNm se utiliza para sintetizar una cadena de aminoácidos y formar una proteína. Los ribosomas se unen al ARNm en el citoplasma y reconocen secuencias de codones de tres bases. Cada codón especifica un aminoácido en particular (Fig. 2). A medida que el ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm, los aminoácidos se añaden a la cadena en crecimiento mediante enlaces peptídicos, formando así la secuencia de la proteína (Green y Noller 2003).

La secuencia de aminoácidos en una proteína determina su estructura tridimensional y, por lo tanto, su función. Para referirnos a un aminoácido en concreto dentro de una cadena, le llamamos por su abreviatura y posición. Así, una valina que ocupe el puesto 102 será Val102. Las proteínas desempeñan diversos roles en el organismo, como enzimas, transportadores, receptores y componentes estructurales (Orengo, Todd y Thornton 1999).

La mayoría de las reacciones de las vías de señalización de este TFG se basan en la fosforilación. Es un proceso químico en el cual se agrega un grupo fosfato a una proteína mediante la acción de una enzima llamada quinasa. Dicha agregación sucede en un aminoácido determinado en la molécula. Por tanto en estas reacciones distinguimos dos componentes, la proteína sustrato que recibe el grupo fosfato y la proteína quinasa que facilita la reacción. Este grupo fosfato modifica la estructura y la función de la proteína, actuando como una especie de interruptor molecular que puede activar o desactivar la actividad

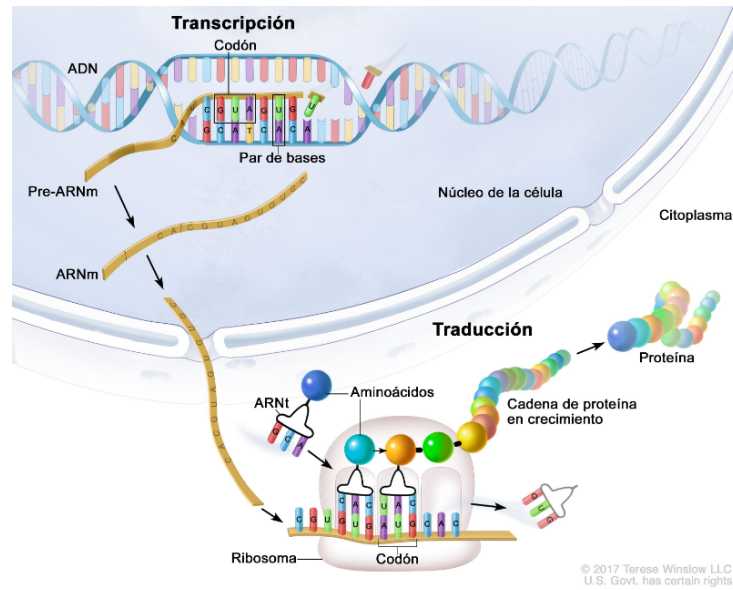


Figura 1: Esquema de los procesos de transcripción y traducción en el interior de la célula. *For the National Cancer Institute © (2023) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights*

		Segunda Letra								
		U		C		A		G		
Primera Letra	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Try	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
	AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
	AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

Figura 2: Correspondencia entre tripletes de nucleótidos del ARNm y aminoácido de la secuencia proteica (BIOINNOVA)

biológica de la proteína. Permite que las células respondan a estímulos internos y externos de manera precisa y coordinada. La reacción opuesta a la fosforilación la llevan a cabo enzimas denominadas fosfatasas (Humphrey, James y Mann 2015).

2.2 Vía de señalización de AKT/mTOR

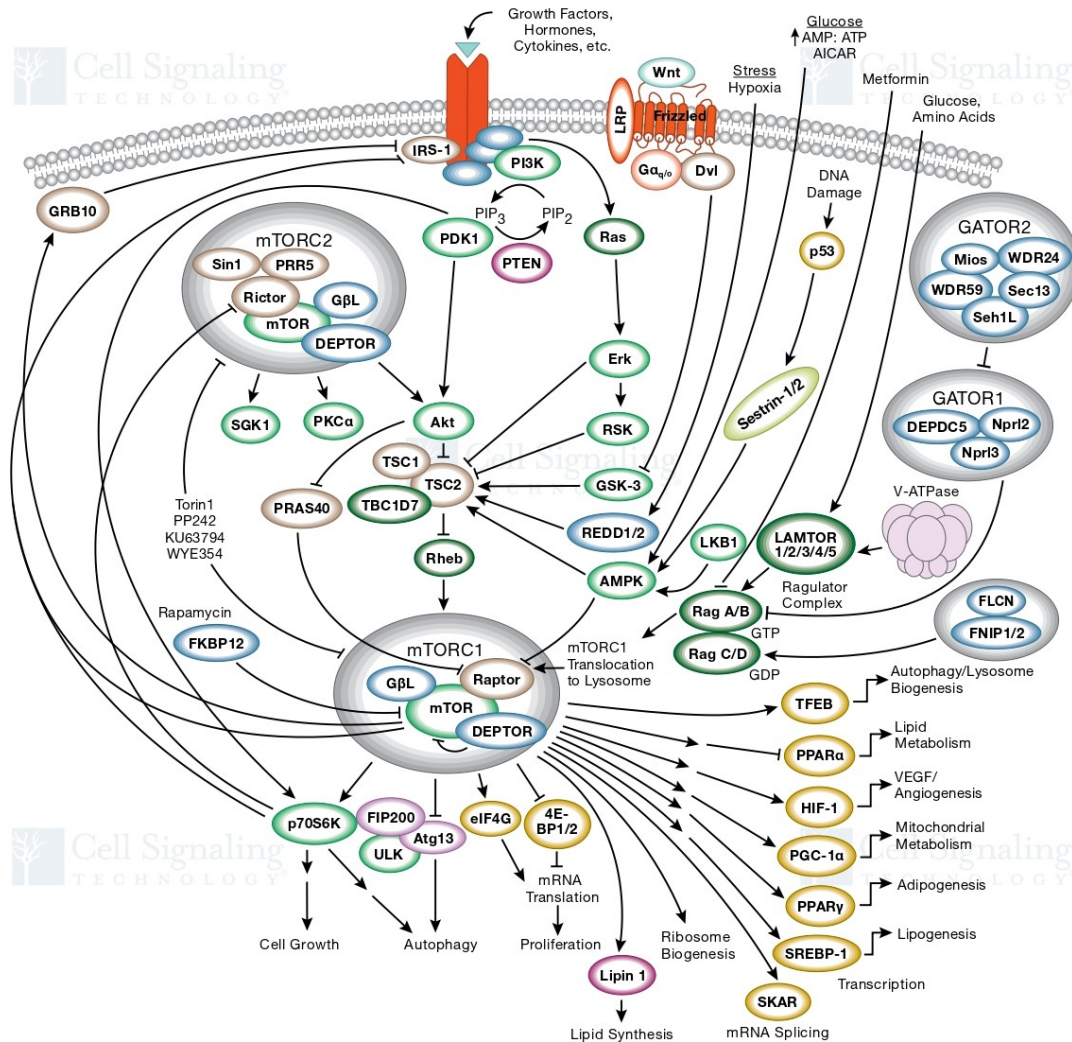


Figura 3: Vía de señalización AKT/mTOR en detalle. *Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)*

La vía de señalización de AKT/mTOR es fundamental para el control del ciclo celular, el metabolismo de determinadas moléculas y la proliferación y migración celular (Saxton y Sabatini 2017). Se trata de una vía de señalización altamente compleja, caracterizada por la participación de numerosos bucles de retroalimentación (Brenner, Tvedt y Bruserud 2016; Ghomlaghi, Hart et al. 2021). Además, esta vía puede ser influenciada por otras vías de señalización con las que comparte ciertas moléculas (Arkun 2016; Shimobayashi y Hall 2014) (Fig. 3).

2.2.1 Cascada de señalización

El primer componente de la vía son los RTK (receptores tirosina quinasa). Estos receptores se encuentran en la membrana celular en forma de monómeros, pero es necesario que formen dímeros para que comience la cascada de señalización. Esto solo es posible cuando dichos monómeros están unidos a su ligando correspondiente, como factores de crecimiento o citoquinas. Entonces dos monómeros se unen y mediante un proceso denominado autotransfosforilación sus dominios tirosina quinasa son fosforilados (Gadgeel y Wozniak 2013) (Fig. 4).

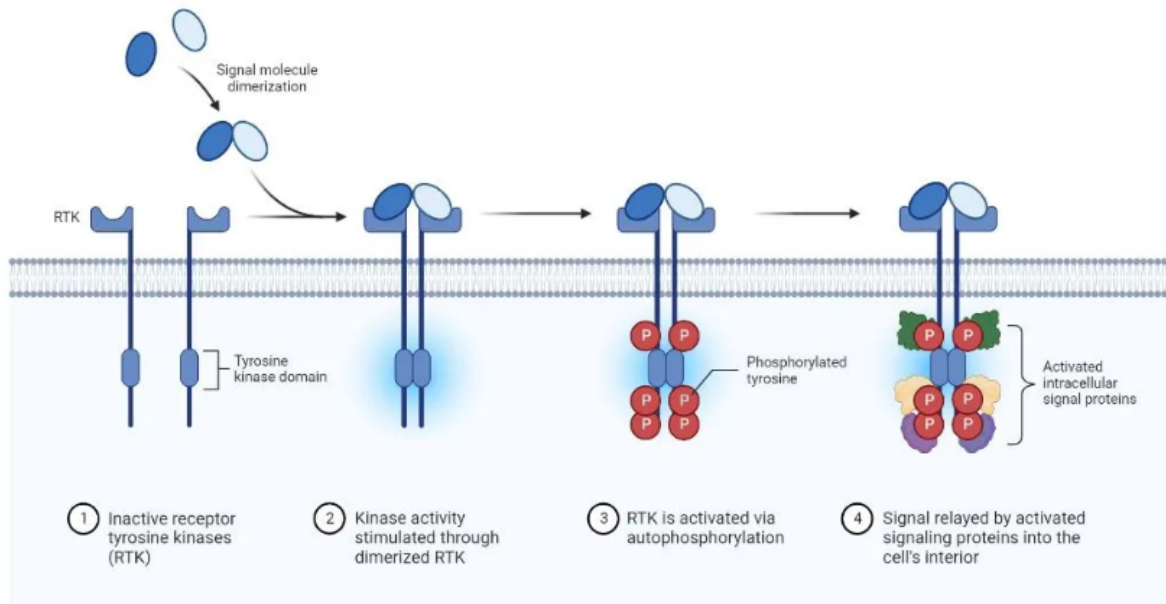


Figura 4: Esquema de funcionamiento de los receptores RTK (*Insulin Signaling and RTK: An Overview* - Assay Genie 2023)

La Fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) es un heterodímero conformado por dos subunidades, la subunidad p85 con función reguladora y la subunidad p110 con función catalítica. Una vez los receptores RTK adquieren una conformación activa, estos fosforilan sus proteínas adaptadoras correspondientes, que se unirán al dominio p85 de la proteína PI3K. Esta unión permite que el dominio p110 se libere, para que más adelante catalice la conversión a Fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) por parte de Fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) (Guerrero-Zotano, Mayer y Arteaga 2016). Dicha reacción puede ser inhibida por la fosfatasa PTEN (Manning y Cantley 2007).

PIP3 recluta tanto a AKT como a PDK1 (quinasa dependiente de 3-fosfoinositido 1) y Complejo mTOR 2 (mTORC2) a la membrana celular. Esto facilita la doble fosforilación de AKT: por parte de PDK1 en su residuo Thr308 y por parte de mTORC2 en el residuo Ser473 (Ghomlaghi, Hart et al. 2021). Para que AKT adquiriera una conformación de máxima actividad requiere ambas fosforilaciones, aunque puede realizar muchas de sus funciones sin necesidad de la fosforilación por mTORC2 (Guerrero-Zotano, Mayer y Arteaga 2016).

AKT activada es capaz de inhibir TSC1/2 (complejo de esclerosis tuberosa 1 y 2), que a su vez inhibe RHEB (homólogo de Ras enriquecido en cerebro). RHEB es uno de los responsables de activar el Complejo mTOR 1 (mTORC1), por tanto una activación de AKT resultará en una activación de mTOR

por este mecanismo de doble inhibición (Laplanche y Sabatini 2012).

2.2.2 AKT

AKT actúa como un nodo central en múltiples vías de señalización que regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y el metabolismo (Manning y Cantley 2007) (Fig. 5). Esta molécula se activa como respuesta a citoquinas, hipoxia, AMP cíclico y factores de crecimiento como PDGF, IGF y EGF (Testa y Tschlis 2005). La activación de AKT está mediada por la fosforilación en dos residuos clave: Ser473 mediante el complejo mTORC2 y Thr308 mediante PDK1 (Saxton y Sabatini 2017). Para facilitar esta última fosforilación es necesario un cambio conformacional producido por PIP3 (Datta, Brunet y Greenberg 1999).

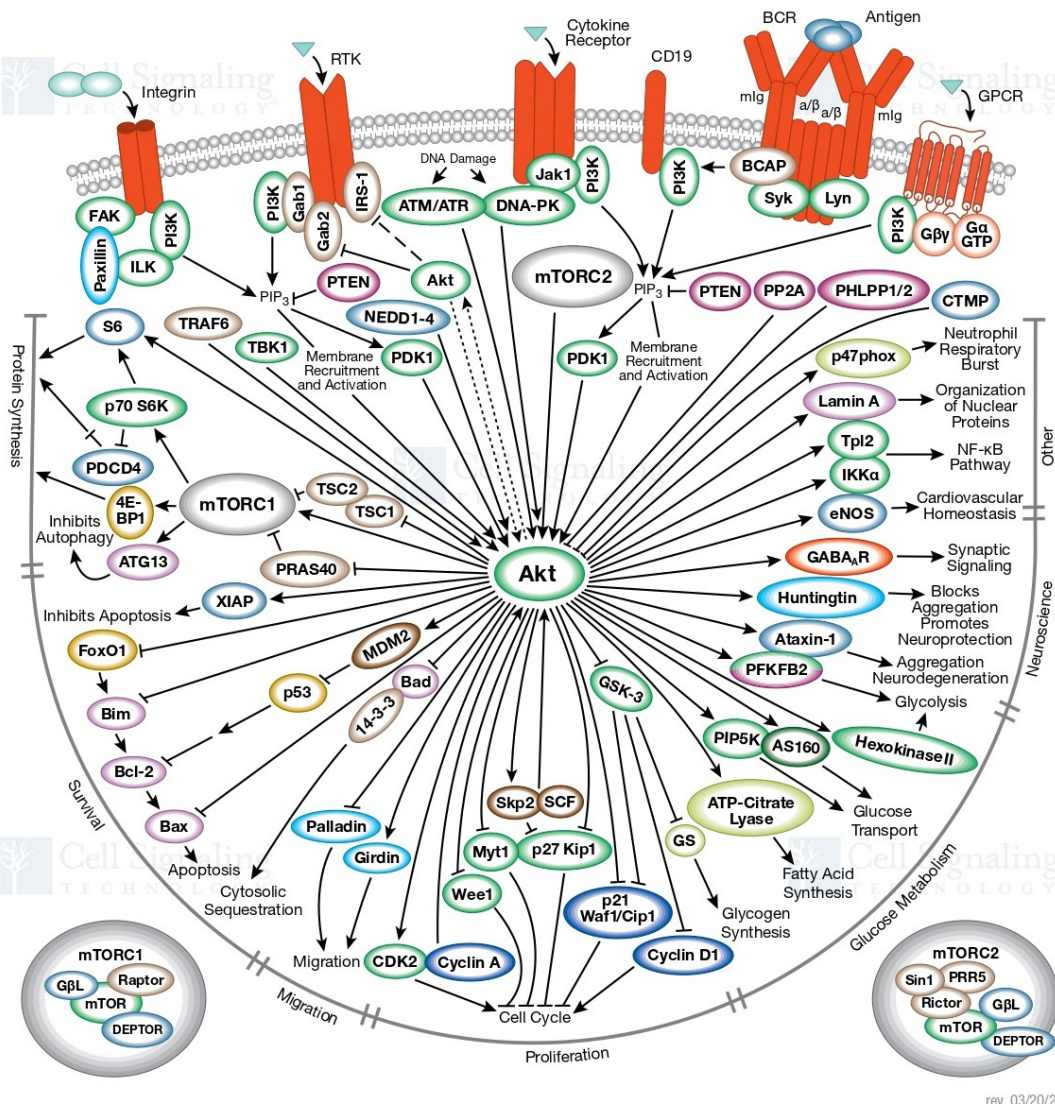


Figura 5: Vía de señalización AKT. Se observa como AKT actúa como nodo de múltiples señales biológicas y da lugar a multitud de respuestas. *Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)*

AKT regula directamente la supervivencia celular al inhibir la apoptosis mediante la fosforilación y la inactivación de proteínas proapoptóticas como BAD y caspasa 9 (Manning y Cantley 2007). Una de las funciones clave de AKT es regular la captación y utilización de glucosa en las células. Actúa estimulando la translocación de transportadores de glucosa GLUT4 hacia la membrana celular, lo que aumenta la captación de glucosa (Kohn et al. 1996). Una vez dentro de la célula, AKT promueve la fosforilación y activación de enzimas clave involucradas en la vía de la glucólisis, estimulando así la producción de energía a partir de la glucosa (Testa y Tsichlis 2005).

AKT promueve la síntesis de lípidos y proteínas (Manning y Cantley 2007). También interviene en la regulación del crecimiento y la proliferación celular al influir en la actividad de proteínas involucradas en el ciclo celular, como la familia de las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas y activando mTOR (Testa y Tsichlis 2005; Laplante y Sabatini 2012).

2.2.3 Complejos mTORC1 y mTORC2

La molécula mTOR ha de formar complejos para poder llevar a cabo sus funciones biológicas. Dichos complejos son el Complejo mTOR 1 (mTORC1) y el Complejo mTOR 2 (mTORC2) (Saxton y Sabatini 2017). Además de la molécula mTOR, ambos compuestos comparten tres subunidades básicas: el complejo estructural Tti1/Tel2, que regula su ensamblaje y estabilidad, la Proteína Letal 8 de mamíferos con SEC13 (mLST8) y una proteína monomérica con dominio DEP (DEPtor) (Laplante y Sabatini 2012).

El complejo mTORC1, como hemos señalado anteriormente, al igual que mTORC2 está formado por mTOR, el compuesto Tti1/Tel2, mLST8 (aunque algunos estudios sugieren que no es indispensable para la función del complejo), y la proteína DEPtor. A diferencia de mTORC2 además posee de forma específica la proteína Raptor que facilita su unión a sustrato y la subunidad inhibitoria PRAS40 (Sustrato de AKT Rico en Prolina de 40 kDa) (Laplante y Sabatini 2012) (Fig. 6).

La formación de este complejo puede ser inhibida por rapamicina y sus análogos (Saxton y Sabatini 2017). Estas sustancias forman los complejos de unión a FK506 (FKBP) e interaccionan con el dominio de unión a FKBP-rapamicina (FRB) de mTOR. De esta forma se evita la acción de mTORC1 sobre sus sustratos y además se compromete la integridad estructural del complejo, por lo que se imposibilita que lleve a cabo sus funciones biológicas (Hausch et al. 2013).

El complejo mTORC2 está compuesto por mTOR, Tti1/Tel2, DEPtor y mLST8, que en este caso es indispensable para el complejo. En lugar de Raptor, el complejo mTORC2 expresa Rictor como molécula para conseguir la unión a sus sustratos, denominado así por su insensibilidad a la rapamicina (rapamycin insensitive companion of mTOR). Por último, este complejo se completa con la Proteína observada con rictor 1 y 2 (protor1/2) y con mSin1 (*mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*) (Laplante y Sabatini 2012; Saxton y Sabatini 2017) (Fig. 6).

A diferencia de mTORC1, el complejo FKBP no puede unirse de forma directa al dominio FRB de mTORC2 debido a la molécula Rictor (Laplante y Sabatini 2012). Sin embargo, aunque en un principio se creía que la rapamicina no inhibía mTORC2, se ha demostrado que lo hace en ciertas líneas celulares (Saxton y Sabatini 2017). Esta inhibición se lleva a cabo sólo tras la exposición prolongada al fármaco, impidiendo la formación del complejo mTORC2 aunque el mecanismo concreto de acción es todavía desconocido (Hausch et al. 2013).

El complejo mTORC1 interviene en multitud de rutas biológicas, pudiendo ser activado como respuesta a aminoácidos, factores de crecimiento, moléculas como la insulina, y niveles altos de oxígeno y

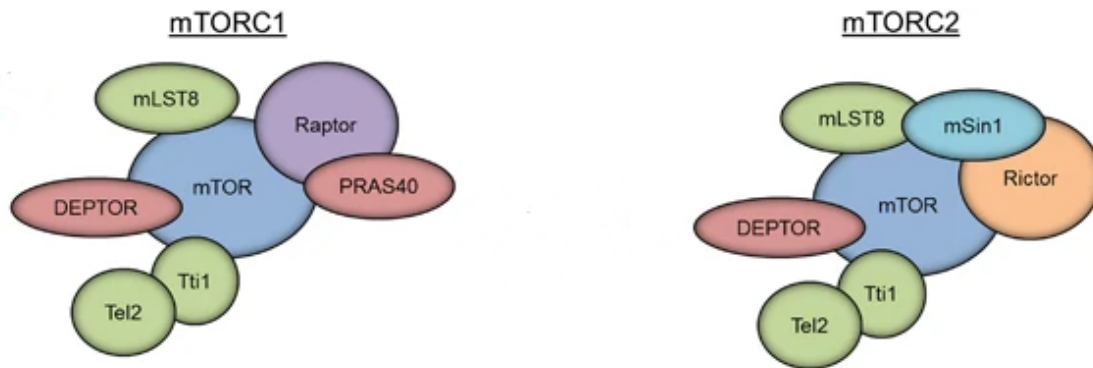


Figura 6: Estructura de los complejos mTORC1 y mTORC2 (Kim, Cook y Chen 2016)

energía intracelular. Sus principales funciones son contribuir a la progresión del ciclo celular, promover la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos y estimular el metabolismo de la glucosa y el catabolismo proteico (Ben-Sahra y Manning 2017; Laplante y Sabatini 2012) (Fig. 7).

La activación del complejo mTORC2 ha sido menos estudiada, demostrándose un menor número de señales biológicas que la promuevan. Su activación más reconocida es desempeñada por factores de crecimiento extracelulares por medio de PIP3. Las funciones de este complejo incluyen controlar la supervivencia y la migración celular (Fu y Hall 2020; Laplante y Sabatini 2012) (Fig. 7).

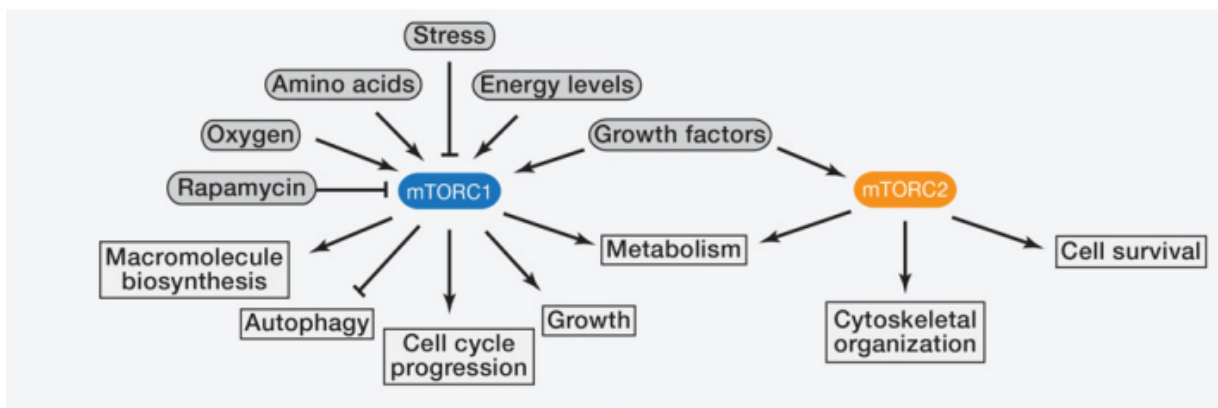


Figura 7: Mecanismos de activación y funciones de los complejos mTORC1 y mTORC2 (Laplante y Sabatini 2012)

El complejo mTORC1 fosforila y activa a su vez la proteína P70S6K, una isoforma de S6K (ribosoma S6 quinasa) (Saxton y Sabatini 2017). Tanto S6K1 (P70S6K) como S6K2 regulan el crecimiento celular a través del control de la traducción proteica por medio de la fosforilación de la proteína S6, que forma parte de la subunidad 40S del ribosoma (Oudit y Penninger 2009). El complejo mTORC1 también es el encargado de llevar a cabo la fosforilación de 4E-BP1 (Oudit y Penninger 2009). La fosforilación de 4E-BP1 juega un papel crucial al evitar que se una a la proteína eIF4E. Esto permite que eIF4E participe en la formación del complejo eIF4F, el cual es necesario para iniciar la traducción de determinadas proteínas

(Laplante y Sabatini 2012).

El complejo mTORC2 regula AKT, SGK1 (Proteína quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1) y la Proteína quinasa C- α (PKC- α), tres miembros clave de la subfamilia de quinasas AGC (Laplante y Sabatini 2012). Las funciones de AKT han sido descritas anteriormente en la subsección 2.2.2, por lo que se mencionarán brevemente las funciones de las otras dos proteínas. SGK1 controla el crecimiento celular, además del transporte iónico mediante la bomba sodio-potasio, canales y transportadores de potasio, sodio y cloro (Lang, Görlach y Vallon 2009). PKC- α junto con otras moléculas afecta al citoesqueleto de actina, contribuyendo a la estructura y forma celular (Jacinto et al. 2004).

2.2.4 Mecanismos de realimentación e interacciones en la vía AKT/mTOR

Para concluir con el análisis de esta vía de señalización, se describirán los mecanismos más relevantes por los que puede autorregularse, principalmente mediante bucles de realimentación y de inhibición (Fig. 8).

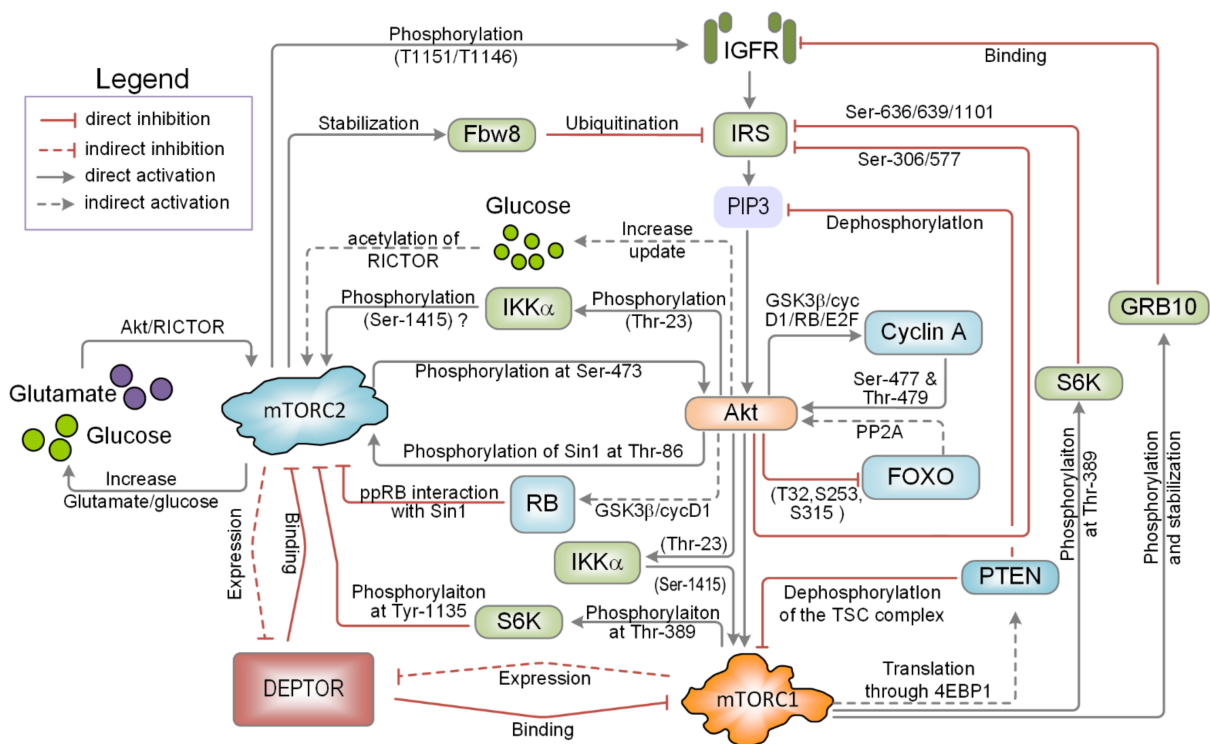


Figura 8: Diagrama ilustrativo de los mecanismos de autorregulación de la vía AKT/mTOR (Ghomlaghi, Hart et al. 2021)

AKT ejerce un control negativo sobre la señalización de PI3K y PIP3. Esto se logra mediante la fosforilación de IRS1/2 en Ser306 y Ser577, lo que reduce la captación en membrana de PI3K, disminuyendo así la fosforilación de PIP2 a PIP3 mediada por PI3K. Esto limita la activación de AKT (Kearney et al. 2019), formando un bucle de realimentación negativa.

AKT además es capaz de inhibir FOXO (*Forkhead box transcription factor*) mediante la fosforilación del mismo en Thr32, Ser253 y Ser315 (Brunet et al. 1999). FOXO por un lado fomenta la expresión de

PI3K y de receptores de insulina, ambos partícipes en la activación de AKT. Por otro lado, FOXO inhibe la actividad de Proteína fosfatasa 2A (PP2A). PP2A es una fosfatasa que revierte la fosforilación de AKT en sus dos residuos clave, Thr308 y Ser473. Por tanto, la interacción entre AKT y FOXO conforma otro bucle de realimentación negativa en la vía (Ghomlaghi, Hart et al. 2021).

Tanto mTORC1 como S6K son capaces de provocar una conformación inactiva de sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) mediante una fosforilación en las serinas 636 y 639 respectivamente, lo que causa una inhibición global de la cascada de señalización (Ghomlaghi, Hart et al. 2021). El complejo mTORC2 también es capaz de desactivar IRS1, pero en este caso estabilizando a Fbw8 (*E3-ligasa F-box/WD repeat-containing protein 8*), que es capaz de degradar IRS1 mediante una ubiquitinación de IRS1 (Ghomlaghi, Hart et al. 2021).

El complejo mTORC1 se ha demostrado que promueve la actividad de PTEN por medio de 4E-BP1 (Mukherjee et al. 2021), por lo que fomenta la desfosforilación de PIP3 en PIP2. De esta forma se inhibe la cascada de señalización a partir de ese nivel impidiendo la fosforilación de AKT.

La proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) y mTORC1 mantienen un mecanismo de inhibición mutua. AMPK inhibe a mTORC1 fosforilando RAPTOR o indirectamente mediante la activación de TSC2 (Ghomlaghi, Hart et al. 2021). El complejo mTORC1 suprime la activación de AMPK al fosforilar sus subunidades α y β (Ghomlaghi, Hart et al. 2021). Esta interacción de retroalimentación doble negativa permite regular la actividad de ambas proteínas, de forma que solo una de las dos se encuentre activa.

PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) es una fosfatasa que inhibe la actividad de AKT y S6K1. La expresión de PHLPP está estimulada a su vez por S6K1, y su estabilidad se ve favorecida por AKT, por lo que PHLPP actúa como nodo en dos bucles de retroalimentación negativa (Ghomlaghi, Hart et al. 2021).

El complejo mTORC2 es capaz de fosforilar los receptores de insulina en Tyr1131 y Tyr1136 y los receptores de factores similares a insulina por la fosforilación de los residuos Tyr1146 y Tyr1151 (Yin et al. 2015). De esta forma se genera un bucle de realimentación positiva en la cascada.

Al igual que mTORC2 es capaz de activar AKT, se ha descrito la reacción en sentido contrario mediante la fosforilación del residuo Thr86 de la subunidad mSin1 del complejo mTORC2 (G. Yang et al. 2015). De este modo se forma un bucle de estabilidad que mantiene la actividad de ambas moléculas aún cuando el estímulo original ha cesado.

Otro mecanismo de autorregulación de esta vía sucede a raíz de la competencia entre dos o más proteínas por determinadas subunidades o sustratos. Como se ha descrito anteriormente, los dos complejos mTOR tienen cuatro subunidades en común: DEPTOR, Tel2-Tit1, mLST8 y la propia molécula mTOR. En concreto se ha descrito un mecanismo de ubiquitinación en mLST8 impidiendo su unión a mSin1 y por tanto inhibiendo la formación de mTORC2. Esta ubiquitinación no impide la formación de mTORC1. Se trata de un mecanismo tipo interruptor que se regula a partir de la insulina, ya que esta hormona es capaz de revertir la ubiquitinación de mLST8, favoreciendo la formación de mTORC2 (Ghomlaghi, G. Yang et al. 2021).

2.3 Vía de señalización de MAPK/ERK

Las MAPKs son una familia de proteínas quinasas que fosforilan serinas y treoninas de proteínas objetivo, regulando actividades celulares como la expresión génica, la mitosis, el movimiento y el metabolismo (Johnson y Lapadat 2002). Debido a su especial relevancia, han sido ampliamente estudiadas y se distinguen tres módulos secundarios dentro de la misma familia (Wei y H. T. Liu 2002). El primero es el módulo de ERK, objeto de estudio de este TFG y que se desarrollará más adelante. Por otro lado se encuentra el módulo de JNK (Quinasas c-Jun N-terminal), descubierto como responsable de la fosforilación del factor de transcripción c-Jun en células expuestas a radiación ultravioleta (Hibi et al. 1993). El último miembro de la familia de las MAPKs es el módulo de p38, activado por estrés y que influencia la respuesta inmune de la célula, así como su supervivencia y diferenciación (Cuadrado y Nebreda 2010). Algunos autores distinguen un cuarto módulo, diferenciando ERK5 de los demás miembros de la familia ERK (Nishimoto y Nishida 2006). Al igual que la vía de mTOR, la vía de MAPK es una vía altamente compleja y que integra multitud de señales biológicas (Fig. 9).

2.3.1 Cascada de señalización

De forma general, todas las vías MAPK transmiten su información de forma secuencial por una red de entre tres y cinco capas (Guo et al. 2020). Estas capas son MAPK Quinasa Quinasa Quinasa (MAP4K), MAPK Quinasa Quinasa (MAP3K), MAPK Quinasa (MAP2K), MAPK y Proteína Quinasa activada por MAPK (MAPKAPK). Las tres primeras son una unidad básica, mientras que las dos últimas dependen del tipo de vía, el estímulo y la línea celular (Guo et al. 2020). En el caso de la vía MAPK/ERK, Ras actúa como proteína activadora al inicio de la misma, Raf toma el papel de MAP3K, MEK sería MAP2K y ERK es la propia MAPK (S. Yang y G. Liu 2017). De esta forma, se genera la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK (Fig. 10).

Al igual que sucede en la vía de señalización AKT/mTOR, el primer paso de la cascada es la activación de los RTK mediada por hormonas, factores de crecimiento (PDGF, EGF) o factores de diferenciación. Estos RTK deben de ser específicos y contener un dominio de homología 2 de Src. Los receptores activos se unen a Grb2 (Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento), y este recluta a SOS, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina. El complejo Grb2-SOS promueve la sustitución de GDP por GTP en la molécula Ras-GDP. De esta forma se consigue la conformación activa Ras-GTP (Knight e Irving 2014; Guo et al. 2020).

El siguiente proceso en la vía de señalización es la activación de Raf, que se encuentra de forma libre en el citosol. Esta se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, Ras se une a Raf en su dominio de unión a Ras (RBD), fomentando su traslocación desde el citoplasma a la membrana y fijándolo a la misma. Una vez allí, Raf puede adquirir su conformación activa mediante fosforilación (Terrell y Morrison 2019).

A continuación, Raf activado puede a su vez activar MEK1 o MEK2 gracias a su dominio catalítico C-terminal. Se cree que una pareja de moléculas Raf junto con una pareja de moléculas MEK1/2 forman un complejo tetrámero MEK/Raf/Raf/MEK que facilita su fosforilación en los residuos Ser218 y Ser222 (Roskoski 2012). El mecanismo de fosforilación puede ser por autofosforilación de las moléculas MEK mediada por Raf o bien por la fosforilación de cada MEK por Raf (Maloney et al. 2022). MEK1/2 se considera una importante reguladora de las vías MAPK, ya que integra múltiples señales biológicas para ejercer una respuesta como nodo común entre diferentes vías de señalización MAPK como p38, c-JUN y la propia vía ERK (Caunt et al. 2015; Maloney et al. 2022).

MEK1/2 son las únicas moléculas conocidas capaces de activar ERK1 o ERK2 (Roskoski 2012), por

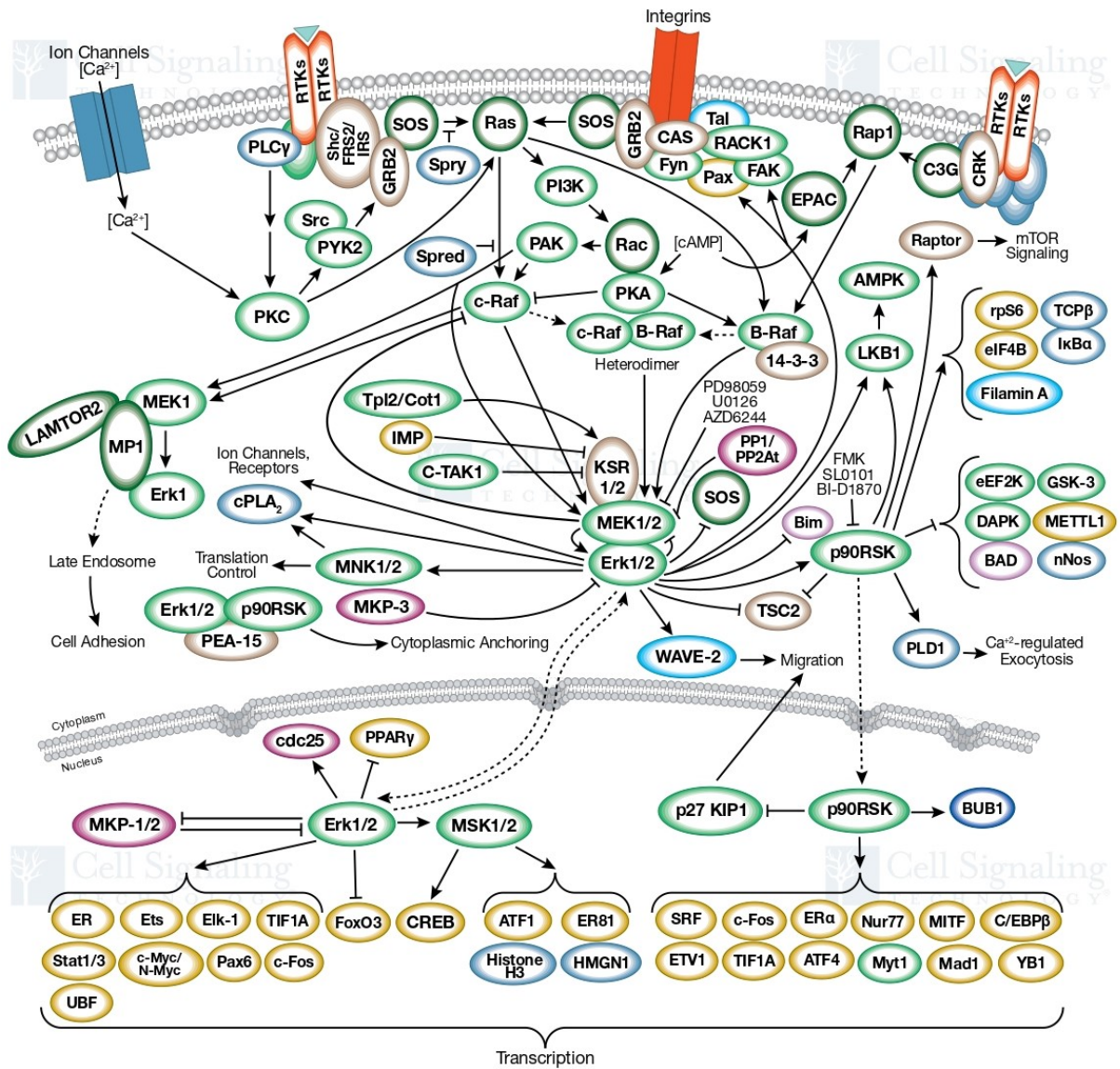


Figura 9: Vía de señalización MAPK/ERK en detalle. *Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)*

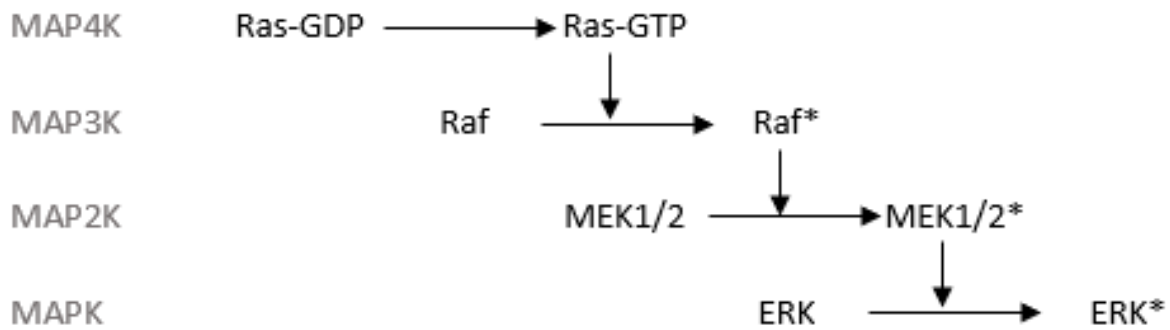


Figura 10: Esquema de la cadena Ras/Raf/MEK/ERK. Los asteriscos simbolizan que la molécula ha alcanzado una conformación activa por fosforilación (Elaboración propia).

lo que se considera una reacción altamente específica. Se trata de una doble fosforilación en Thr202 y Tyr204 en el caso de ERK1, Thr183 y Tyr185 en ERK2 (Marampon, Ciccarelli y Zani 2019). La doble fosforilación es necesaria, ya que si solo ocurriera en uno de los residuos se forma un complejo con MEK que inhibe la cascada de señalización (Eblen 2018). ERK es el último eslabón de la cadena MAPK/ERK, y es el encargado de las funciones biológicas de la misma (Wei y H. T. Liu 2002).

2.3.2 Funciones de ERK

Una vez que ERK ha sido activada gracias a su doble fosforilación mediada por MEK, puede comenzar a realizar sus funciones biológicas. A continuación se describen brevemente algunas de ellas (Roskoski 2012):

Regulación de los factores de transcripción: Una vez activada, la ERK1/2 se desplaza al núcleo celular y fosforila diversos factores de transcripción, como el protooncogen c-Fos, el protooncogen c-Jun, la proteína Elk-1, el protooncogen c-Myc y el factor de transcripción ATF2 dependiente del AMP cíclico. Esta regulación de los factores de transcripción influye en la expresión génica y puede afectar a la proliferación, diferenciación, apoptosis y transcripción celular (Roskoski 2012).

Regulación de la morfología celular y redistribución del citoesqueleto: ERK1/2 fosforila componentes del citoesqueleto como las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs) 1, MAP2 y MAP4 en el citoplasma. Esta fosforilación está implicada en la regulación de la morfología celular y la redistribución del citoesqueleto (Roskoski 2012; Asrih et al. 2011).

Regulación por retroalimentación negativa: Antes de entrar en el núcleo, la ERK1/2 citoplasmática puede inducir una conformación inactiva en proteínas quinasas que se encuentran situadas por encima en la vía ERK, como SOS, Raf-1 y MEK, de forma que establece lazos de realimentación negativa y es capaz de modular su propia actividad (Lake, Corrêa y Müller 2016).

Implicación en la tumorigénesis: La vía de señalización ERK/MAPK está asociada a la tumorigénesis. Se ha detectado una expresión elevada de ERK en multitud de tumores humanos, y la activación descompensada de la vía ERK/MAPK puede promover la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación del ciclo celular, la apoptosis celular y la formación de tejido, todos ellos procesos importantes en la tumorigénesis (Guo et al. 2020).

Proliferación celular y efectos antiapoptóticos: La activación de la vía ERK/MAPK promueve la proliferación celular y tiene un efecto antiapoptótico. Se debe a la inactivación de sustratos proapoptóticos como BAD y Proteína Quinasa Asociada a la Muerte (DAK) (Anjum y Blenis 2008).

Angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos): La vía ERK/MAPK puede ser activada en respuesta a la expresión de factores angiogénicos como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) (Shin et al. 2016). Esta característica cobra especial relevancia en mutaciones que causan tumores, ya que es capaz de promover la angiogénesis tumoral para suministrar nutrientes a los tejidos tumorales facilitando su progresión (Y. Liu et al. 2016).

Regulación del ciclo celular: La vía de señalización MAPK/ERK regula el ciclo celular a través de su interacción con la vía mTOR. Por un lado, es capaz de mediar la fosforilación de P70S6K de forma independiente a mTOR (Iijima et al. 2002), y además puede inhibir TSC2 (inhibidor de mTORC1), de forma que estimula la formación del complejo mTORC1 (Ma et al. 2005). Se ampliará más acerca de la interacción de ambas vías en el siguiente apartado.

2.4 Crosstalk entre ambas vías

Las vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK están íntimamente relacionadas (Arkun 2016), ya que en muchos casos tienen que dar lugar a una respuesta conjunta. A continuación se expondrán algunas de las interacciones más relevantes entre ambas vías:

En primer lugar, las dos vías son activadas por el mismo tipo de receptores, los receptores RTK. De esta forma, moléculas que actúen sobre la misma subfamilia de receptores RTK, como IGF en el Receptor de Insulina 1 (IRS1), producirán una activación simultánea en las dos cascadas de señalización al unirse al receptor (Boulton et al. 1991).

Por este motivo, la activación de la vía mTOR puede a su vez inhibir la vía ERK. P70S6K, uno de los efectores finales de mTORC1, es capaz de fosforilar los receptores de insulina, y por tanto regular negativamente la cascada de MAPK/ERK. Del mismo modo, al inhibir la formación de mTORC1 se potencia la vía de ERK (Carracedo et al. 2008).

Además, Ras puede promover la actividad de PI3K, siendo uno de sus sustratos más estudiados. De esta forma se refuerza la activación conjunta de ambas vías, especialmente en el caso de que Ras haya sido activado por receptores de EGF (Castellano y Downward 2011).

ERK es capaz de fosforilar TSC2, de forma que la inhibe logrando una conformación inactiva de esta molécula. Como TSC2 inhibe la formación del complejo mTORC1, su inhibición provocará un aumento en la concentración de este complejo (Ma et al. 2005).

AKT activo puede generar una conformación inactiva de Raf mediante su fosforilación en el Ser259, por lo que interrumpe la cascada de señalización de MAPK/ERK en ese punto impidiendo la fosforilación tanto de MEK como de ERK. Este es un mecanismo que utilizan las células para promover su proliferación (Zimmermann y Moelling 1999).

Del mismo modo, se ha descrito un mecanismo por el que ERK puede inhibir la activación de AKT. GAB1 (*GRB2-associated-binding protein 1*) es una proteína clave en la activación de PI3K, actuando como paso intermedio entre el receptor de EGF y PI3K. Se ha demostrado que ERK reduce la fosforilación de GAB1, por lo que se reducen los niveles de PI3K y consecuentemente la concentración de AKT

fosforilado (Mattoon et al. 2004; Nazari et al. 2007).

Como se ha comprobado, la interacción entre ambas vías es compleja y permite un comportamiento no lineal de la respuesta celular a diferentes estímulos. Este hecho dota a la modelización del crosstalk entre ellas de una especial importancia para su estudio.

2.5 Canal Kv1.3

El canal Kv1.3 es un miembro de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje Kv (Cidad et al. 2015), lo que significa que su actividad está regulada por cambios en el potencial eléctrico de membrana (Jiménez-Pérez et al. 2016). Al activarse, se vuelve permeable a iones potasio que abandonan la célula debido a la diferencia de concentración entre el medio intra y extracelular, tendiendo a disipar su gradiente electroquímico (Kuang, Purhonen y Hebert 2015). El canal Kv1.3 se encuentra tanto en la membrana celular como en la mitocondria y en el medio intracelular (Styles et al. 2021). El canal Kv1.3 ha sido estudiado principalmente en células T (Schmitz et al. 2005) y en VSMC (Cidad et al. 2015).

La activación de los canales Kv, generalmente como respuesta a una despolarización celular, permiten la salida de iones de potasio al medio extracelular para mantener el potencial de membrana (Kuang, Purhonen y Hebert 2015). Los canales de Kv se componen de proteínas individuales codificadas por genes específicos (Styles et al. 2021). Estas proteínas se unen formando complejos tetrámeros, ya sea de manera homóloga dentro de la misma subfamilia (Kv1-Kv12) o heteróloga. La existencia de múltiples genes de canales Kv, junto con la posibilidad de formar complejos heterotetrámeros, conlleva una amplia diversidad funcional en las corrientes de Kv. Esta diversidad se ve incrementada gracias a la interacción con proteínas accesorias que modulan las propiedades de apertura, facilitan el transporte y promueven la formación de múltiples unidades. Además, las corrientes de Kv pueden ser influenciadas por modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación y fosforilación de las proteínas del canal, las cuales pueden afectar su estructura tridimensional, transporte y actividad funcional (Styles et al. 2021; Kuang, Purhonen y Hebert 2015).

Se ha observado que la sobreexpresión de Kv1.3 promueve la proliferación celular (Cidad et al. 2015) en respuesta a cambios del potencial de membrana, independientemente de los flujos de potasio que atraviesen el canal (Styles et al. 2021). Dicha proliferación está inducida por la fosforilación del residuo Tyr447 del dominio C-terminal del canal (Styles et al. 2021). La fosforilación de este residuo está regulada por la vía de señalización MAPK/ERK (Jiménez-Pérez et al. 2016).

El canal Kv1.3 puede ser inhibido selectivamente por margatoxina, un péptido que se encuentra en el veneno del escorpión corteza centroamericano (Cheong et al. 2011) y por PAP-1, un inhibidor específico del Kv1.3 desarrollado sintéticamente (Schmitz et al. 2005).

En resumen, el canal Kv1.3 promueve la proliferación celular mediante un mecanismo que no es dependiente de los flujos de potasio que lo atraviesan, sino de los cambios del potencial de membrana. Dicho mecanismo está íntimamente relacionado con la cascada de señalización MAPK/ERK y puede ser impedido por inhibidores tradicionales de Kv1.3 como PAP-1 y margatoxina.

3 Ecuaciones diferenciales y simulación numérica

3.1	Introducción	21
3.2	Fundamentos de las ecuaciones diferenciales	21
3.3	Métodos numéricos para la resolución de ecuaciones diferenciales	22
3.3.1	Clasificación	22
3.3.2	Métodos Runge-Kutta	23
3.3.3	Métodos BDF	24
3.4	Modelización de vías de señalización celular	26
4	Materiales y métodos	29

3.1 Introducción

Las ecuaciones diferenciales permiten describir y modelar el comportamiento dinámico de fenómenos biológicos, físicos o químicos, que están regidos por relaciones entre variables y sus derivadas. Sin embargo, obtener soluciones analíticas exactas en muchos casos resulta difícil o incluso imposible. Es aquí donde la simulación numérica entra en juego, ofreciendo métodos computacionales para aproximar y resolver estas ecuaciones, además de ofrecer la posibilidad de realizar múltiples simulaciones de forma eficiente y controlada. Esto resulta especialmente relevante en este TFG, ya que permite explorar diferentes escenarios, analizar la interacción entre las vías de señalización y validar los resultados obtenidos experimentalmente.

En este capítulo se definirán y desarrollarán conceptos relativos a las ecuaciones diferenciales y la simulación numérica de sistemas basados en ellas. Se profundizará en los métodos de resolución de las mismas. En último lugar, se realizará un análisis de la metodología más comúnmente utilizada para modelar y simular cascadas de reacciones bioquímicas.

3.2 Fundamentos de las ecuaciones diferenciales

Una ecuación diferencial es una ecuación que contiene las derivadas de una o más variables dependientes con respecto a una o más variables independientes (Edwards y Penney 2014). Un conjunto de n ecuaciones diferenciales constituye un sistema de ecuaciones diferenciales. Se llama orden de una ecuación diferencial al orden de la derivada más alta que interviene en la ecuación.

Una Ecuación Diferencial Ordinaria (ODE) es una ecuación en la que sólo aparecen derivadas de una o varias variables dependientes respecto a una variable independiente. Se dice que una ecuación diferencial es una ecuación en derivadas parciales si contiene derivadas parciales respecto a dos o más variables independientes.

Por tanto, la representación de una ecuación diferencial ordinaria general de orden n es la siguiente:

$$F\left(t, y, \frac{dy}{dt}, \frac{d^2y}{dt^2}, \dots, \frac{d^ny}{dt^n}\right) = 0.$$

Cuando en una ecuación o sistema diferencial la derivada de mayor orden aparece despejada, diremos que está en forma normal. En el caso escalar, la ecuación de orden n en forma normal tendrá una expresión:

$$y^{(n)} = f(t, y, y', \dots, y^{(n-1)}),$$

y un sistema de n ecuaciones de primer orden en forma normal:

$$\vec{y}' = f(t, \vec{y}), \quad \text{donde} \quad \vec{y} = (y_1, \dots, y_n)^T.$$

Se dice que una función $f(t)$, definida en un intervalo I y con derivadas de orden n , que no contiene parámetros arbitrarios (distintos de los que puedan aparecer en la propia ecuación), es solución particular de la ecuación ordinaria $F(t, y, y', \dots, y^{(n)}) = 0$ en I , si verifica la ecuación en I , es decir, si $F(t, f(t), f'(t), \dots, f^{(n)}(t)) = 0$ en I .

Se llama solución general de la ecuación al conjunto de todas las soluciones particulares.

Generalmente, la descripción de un fenómeno necesita además de la ecuación diferencial ciertas condiciones sobre la solución. Para una ecuación de orden n se necesita el valor inicial de la función y de sus $n - 1$ primeras derivadas, considerando el valor inicial como y_0 . Cuando el fenómeno es de carácter temporal, las condiciones complementarias suelen ser los valores de la solución y sus derivadas sucesivas en algún instante inicial t_0 . En este caso, se trata de un problema de valores iniciales, también llamado problema de Cauchy.

La solución del problema de Cauchy de primer orden

$$\begin{cases} y'(t) = f(t, y) \\ y(t_0) = y_0 \end{cases}$$

es una curva que pasa por (t_0, y_0) y en cada punto la pendiente de la recta tangente es $f(t, y)$.

Ciertas ecuaciones diferenciales de primer orden pueden ser resueltas analíticamente:

- Ecuaciones separables (o reducibles a separables), de la forma $\frac{dy}{dt} = \frac{g(x)}{h(t)}$ (o de la forma $h(y)dy - g(t)dt = 0$).
- Ecuaciones exactas. Sean $M(t, y)$ y $N(t, y)$ funciones continuas en un abierto A de \mathbb{R}^2 . Una ecuación $M(t, y)dx + N(t, y)dy = 0$ se dice que es exacta en A si existe una función f diferenciable en A (a la que se denomina potencial) tal que

$$\frac{\partial f}{\partial x}(t, y) = M(x, y), \quad \frac{\partial f}{\partial y}(t, y) = N(t, y)$$

Algunas ecuaciones no son exactas pero se puede obtener otra ecuación equivalente que sí lo sea multiplicándola por un factor integrante $\mu(t, y)$.

- Ecuaciones lineales. Sean $P(t)$ y $Q(t)$ funciones continuas en un intervalo I de \mathbb{R} . Una ecuación lineal de primer orden es una ecuación de la forma $y' + P(t)y = Q(t)$.
- Ecuaciones de Bernoulli. Sean $P(t)$ y $Q(t)$ funciones continuas en un intervalo I de \mathbb{R} . Una ecuación de Bernoulli es una ecuación de la forma $y' + P(t)y = Q(t)y^n$, donde $n \neq 0$ y $n \neq 1$.

Para problemas más complejos en los que no es posible o es difícil obtener una solución analítica, se recurre a los métodos numéricos para su resolución, siendo en muchas ocasiones esta solución suficiente.

3.3 Métodos numéricos para la resolución de ecuaciones diferenciales

Los métodos numéricos para la resolución de ecuaciones diferenciales se basan en la discretización del dominio y la aproximación numérica de la función. De este modo, el dominio de la función queda discretizado como una malla de puntos sobre los que se calculan los valores aproximados de la función.

3.3.1 Clasificación

Los métodos numéricos para la resolución de ecuaciones diferenciales se agrupan en diferentes categorías en función del enfoque y la metodología que utilicen para resolver el problema, siendo las siguientes algunas de las clasificaciones más utilizadas (Sauer 2006; R. L. Burden, Faires y A. M. Burden 2016; Quarteroni, Sacco y Saleri 2014; Strikwerda 2007; LeVeque 2007):

1. Métodos de un solo paso y métodos multipaso:

- Los métodos de un solo paso calculan la aproximación de la función en cada punto utilizando solo información de un paso previo.
- Los métodos multipaso utilizan información de múltiples puntos anteriores para calcular la solución en un punto dado. Por tanto, suelen requerir un número inicial de puntos de arranque conocidos para comenzar el cálculo.

2. Métodos explícitos y métodos implícitos:

- Los métodos explícitos calculan la solución en un punto utilizando solo información de instantes anteriores.
- Los métodos implícitos involucran además el estado del sistema en instantes futuros para obtener la solución en un punto, lo que puede requerir métodos iterativos.

3. Métodos de paso fijo y métodos de paso variable:

- Los métodos de paso fijo utilizan el mismo tamaño de paso en toda la malla, lo que puede resultar en una precisión variable en diferentes regiones del dominio.
- Los métodos de paso variable ajustan el tamaño del paso según la necesidad, permitiendo una mayor precisión en regiones con cambios rápidos en la solución y un paso más grande en regiones con cambios lentos.

4. Métodos de diferencias finitas y métodos de elementos finitos:

- Los métodos de diferencias finitas discretizan el dominio en una malla y aproximan las derivadas mediante diferencias finitas.
- Los métodos de elementos finitos subdividen el dominio en elementos y aproximan la solución mediante combinaciones lineales de funciones de forma definidas en cada elemento.

3.3.2 Métodos Runge-Kutta

Los métodos Runge-Kutta son unos de los métodos de resolución de ecuaciones diferenciales más utilizados (Butcher 2008). Estos métodos se basan en la aproximación de la solución en diferentes puntos del dominio mediante una combinación ponderada de evaluaciones de la función en esos puntos (Hairer, Nørsett y Wanner 1993).

Un método de Runge-Kutta explícito se puede representar mediante las siguientes ecuaciones (R. L. Burden, Faires y A. M. Burden 2016; Butcher 2008):

$$\begin{aligned}
 k_1 &= h \cdot f(t_n, y_n) \\
 k_2 &= h \cdot f(t_n + c_2 h, y_n + a_{21} k_1) \\
 k_3 &= h \cdot f(t_n + c_3 h, y_n + a_{31} k_1 + a_{32} k_2) \\
 &\vdots \\
 k_s &= h \cdot f(t_n + c_s h, y_n + a_{s1} k_1 + a_{s2} k_2 + \dots + a_{s,s-1} k_{s-1}) \\
 y_{n+1} &= y_n + b_1 k_1 + b_2 k_2 + \dots + b_s k_s
 \end{aligned}$$

donde h es el tamaño del paso, t_n y y_n representan los puntos en el dominio y la solución aproximada en esos puntos, respectivamente, y $f(t, y)$ es la función que define la ecuación diferencial.

Los coeficientes a_{ij} , b_i , y c_i son parámetros específicos del método de Runge-Kutta utilizado. Estos coeficientes determinan el orden de precisión y las características del método. De forma general, se pueden representar los coeficientes del método mediante la denominada tabla de Butcher (LeVeque 2007).

0				
c_2	a_{21}			
c_3	a_{31}	a_{32}		
\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	
c_s	a_{s1}	a_{s2}	\cdots	a_{ss}
	b_1	b_2	\cdots	b_s

Tabla 1: Tabla de Butcher para métodos de Runge-Kutta explícitos

c_1	a_{11}	a_{12}	\cdots	a_{1s}
c_2	a_{21}	a_{22}	\cdots	a_{2s}
\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	\vdots
c_s	a_{s1}	a_{s2}	\cdots	a_{ss}
	b_1	b_2	\cdots	b_s

Tabla 2: Tabla de Butcher para métodos de Runge-Kutta implícitos

Existen diferentes variantes y órdenes de métodos de Runge-Kutta, como el método de Euler, el método del punto medio, el método de Heun o el método de Runge-Kutta de cuarto orden clásico, siendo este último uno de los más conocidos. Cada uno de ellos tiene sus propios coeficientes específicos (Hairer, Nørsett y Wanner 1993).

3.3.3 Métodos BDF

Un problema rígido es aquel en el que la escala temporal de las variables que intervienen en el sistema difiere mucho entre ellas, manifestándose en oscilaciones fuertes o escalas temporales muy diferentes de la solución. En este tipo de problemas, los métodos con regiones de estabilidad acotadas, entre los que se encuentran los métodos explícitos, muestran dificultades para mantener la precisión y la estabilidad de la solución, requiriendo tamaños de paso muy pequeños que involucran un alto coste computacional. Para este tipo de problemas es aconsejable utilizar métodos A-estables, cuya región de estabilidad contiene el semiplano real negativo. Los métodos A-estables son implícitos (Hairer y Wanner 1996).

Como el mayor orden de un método lineal multipaso A-estable es 2, podría pensarse que los métodos lineales multipaso son inferiores a los métodos de Runge-Kutta en lo que se refiere a estabilidad lineal. Sin embargo hay métodos lineales multipaso que, a pesar de no ser A-estables, son $A(\alpha)$ -estables, es

decir, existe un $\alpha \in (0, \pi]$ tal que la cuña infinita de ángulo α está contenida en la región de estabilidad del método (Gander y Wanner 2020).

En este contexto aparecen los métodos BDF (*Backward Differentiation Formula*), una familia de métodos implícitos lineales multipaso especialmente útiles para la resolución de sistemas rígidos. Los métodos BDF se basan en la aproximación de la derivada en el punto t_{n+s} utilizando la siguiente fórmula:

$$h\beta f(t_{n+s}, y_{n+s}) = \sum_{j=0}^s \alpha_j y_{n+j}$$

donde h es el tamaño de paso, s es el orden del método y α_j y β son los coeficientes del método.

Para determinar los coeficientes α_j de los métodos BDF, se utiliza la técnica de interpolación polinómica de Lagrange. Se seleccionan $s + 1$ puntos anteriores, $t_n, t_{n-1}, \dots, t_{n-s}$, junto con los correspondientes valores de $y, y_n, y_{n-1}, \dots, y_{n-s}$. Luego, se construye un polinomio de interpolación de Lagrange utilizando estos puntos. Los coeficientes se obtienen resolviendo el sistema de ecuaciones resultante (R. L. Burden, Faires y A. M. Burden 2016).

A continuación se detallan las fórmulas de los métodos BDF hasta orden 6 (Suli y Mayers 2003).

- Método BDF de orden 1 (método de Euler implícito):

$$hf(t_{n+1}, y_{n+1}) = y_{n+1} - y_n$$

- Método BDF de orden 2:

$$\frac{2}{3}hf(t_{n+2}, y_{n+2}) = y_{n+2} - \frac{4}{3}y_{n+1} + \frac{1}{3}y_n$$

- Método BDF de orden 3:

$$\frac{6}{11}hf(t_{n+3}, y_{n+3}) = y_{n+3} - \frac{18}{11}y_{n+2} + \frac{9}{11}y_{n+1} - \frac{2}{11}y_n$$

- Método BDF de orden 4

$$\frac{12}{25}hf(t_{n+4}, y_{n+4}) = y_{n+4} - \frac{48}{25}y_{n+3} + \frac{36}{25}y_{n+2} - \frac{16}{25}y_{n+1} + \frac{3}{25}y_n$$

- Método BDF de orden 5

$$\frac{60}{137}hf(t_{n+5}, y_{n+5}) = y_{n+5} - \frac{300}{137}y_{n+4} + \frac{300}{137}y_{n+3} - \frac{200}{137}y_{n+2} + \frac{75}{137}y_{n+1} - \frac{12}{137}y_n$$

- Método BDF de orden 6

$$\frac{60}{147}hf(t_{n+6}, y_{n+6}) = y_{n+6} - \frac{360}{147}y_{n+5} + \frac{450}{147}y_{n+4} - \frac{400}{147}y_{n+3} + \frac{225}{147}y_{n+2} - \frac{72}{147}y_{n+1} + \frac{10}{147}y_n$$

Como estos métodos son implícitos requieren la resolución de un sistema de ecuaciones no lineales en cada paso para obtener el valor de la solución (Hairer y Wanner 1996).

La región de estabilidad de los métodos BDF es el lugar geométrico de los puntos del plano complejo $\xi = h\lambda$ en el que la solución del método para una ecuación lineal escalada está acotada cuando h tiende a cero, siendo h el tamaño de paso y λ el autovalor de la matriz jacobiana de la ecuación (Hairer y Wanner 1996). Los métodos BDF con un orden mayor de 6 no son estables en el cero, lo que imposibilita su uso para la resolución de sistemas (Suli y Mayers 2003). Los métodos BDF de orden 1 y 2 son A-estables, es decir, tienen estabilidad absoluta en el hemiplano complejo izquierdo. Sin embargo, esta propiedad no se mantiene para los métodos BDF de órdenes superiores (Auzinger y Herfort 2014) (Fig. 11).

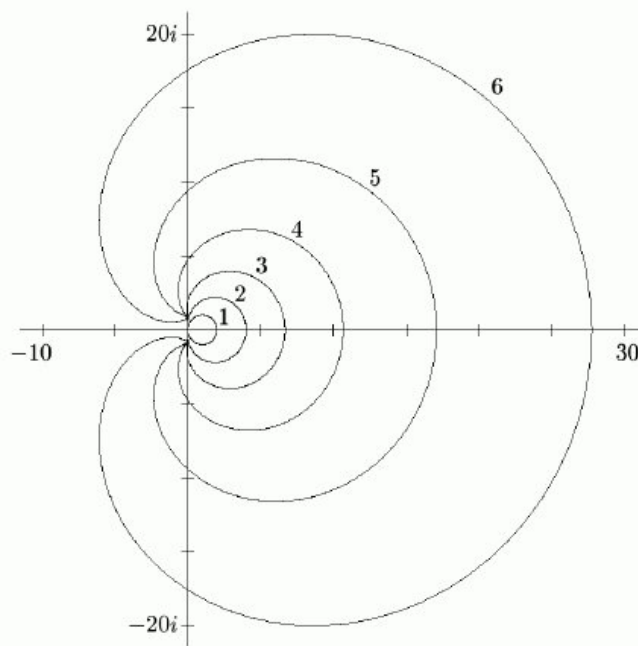


Figura 11: Diagrama en el plano complejo $\xi = h\lambda$ de las regiones de estabilidad de los métodos BDF para $s = 1, 2, \dots, 6$. (Auzinger y Herfort 2014).

Los métodos BDF de 3,4,5 y 6 pasos son $A(\alpha)$ -estables. En la siguiente tabla se muestran los valores de α para estos métodos BDF.

k	α
3	86.03
4	73.35
5	51.84
6	17.84

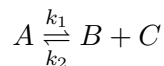
Tabla 3: Valores de α para los métodos BDF

Como puede verse cuanto más alto es el orden del método BDF más pequeño es el ángulo α .

3.4 Modelización de vías de señalización celular

El uso de sistemas de ecuaciones diferenciales resulta de gran utilidad para modelar fenómenos químicos, en particular para este TFG, vías de señalización celular. Para comprender el proceso de modeli-

zación, empezaremos con una reacción química reversible general, de la forma



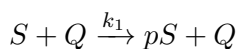
donde A , B y C son las especies químicas que intervienen en la reacción y k_1 y k_2 las constantes de equilibrio de la reacción, expresadas en unidades de concentración por unidad de tiempo, por ejemplo mol/s .

La velocidad de formación de los compuestos vendrá dada por su derivada, y se puede obtener inmediatamente el sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden en forma normal que rige el sistema:

$$\begin{aligned}\frac{d[A]}{dt} &= -k_1[A] + k_2[B][C] \\ \frac{d[B]}{dt} &= k_1[A] - k_2[B][C] \\ \frac{d[C]}{dt} &= k_1[A] - k_2[B][C]\end{aligned}$$

donde $[A]$ y $[B]$ representan las concentraciones de los diferentes compuestos. Para un sistema de n especies químicas, lo podremos expresar como un sistema de n ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, cuya resolución mediante métodos numéricos en un intervalo I es inmediata.

En el caso concreto de las fosforilaciones, que son las reacciones que se dan mayormente en las vías de señalización estudiadas, la modelización es similar. En una reacción de fosforilación de un sustrato S catalizada por una proteína quinasa Q :

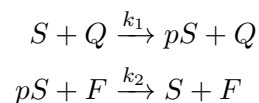


donde pS simboliza el sustrato fosforilado. Las velocidades de reacción del sistema, expresadas en forma normal:

$$\begin{aligned}\frac{d[S]}{dt} &= -k_1[S][Q] \\ \frac{d[pS]}{dt} &= k_1[S][Q] \\ \frac{d[Q]}{dt} &= 0\end{aligned}$$

Cabe destacar que la concentración de proteína quinasa Q no cambia, ya que actúa como catalizador, es decir, ayuda a que se produzca sin consumirse en el proceso. Por otro lado, la velocidad de aparición del sustrato fosforilado coincide con la velocidad a la que desaparece el sustrato sin fosforilar, ya que la concentración total de sustrato S_{tot} es constante al no tener en cuenta fenómenos de traducción ni degradación proteica. Por tanto, se puede prescindir de la representación de uno de ellos.

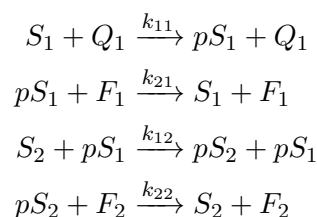
La expresión de esta reacción indica que no es reversible. Para conseguir la reversibilidad del proceso de fosforilación, se introduce en el sistema otro tipo de catalizador, la fosfatasa F . De esta forma, las reacciones de fosforilación y desfosforilación del sustrato quedarían determinadas como:



Y el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\begin{aligned} \frac{d[pS]}{dt} &= k_1[S][Q] - k_2[pS][F] \\ \frac{d[Q]}{dt} &= \frac{d[F]}{dt} = 0 \end{aligned}$$

La particularidad de las vías de señalización es que se comportan como una serie de reacciones en cadena, de forma que el sustrato de una reacción actúa como catalizador en la siguiente. Si distinguimos dos niveles consecutivos, 1 y 2, donde el sustrato del nivel 1 activado pS_1 actúa como quinasa del sustrato de nivel 2:



En este caso, el sistema de ecuaciones diferenciales adquiere un grado mayor de complejidad:

$$\begin{aligned} \frac{d[pS_1]}{dt} &= k_{11}[S_1][Q_1] - k_{21}[pS_1][F_1] \\ \frac{d[pS_2]}{dt} &= k_{12}[S_1][pS_1] - k_{22}[pS_2][F_2] \\ \frac{d[Q_1]}{dt} &= \frac{d[F_1]}{dt} = \frac{d[F_2]}{dt} = 0 \end{aligned}$$

Se podrían añadir cuantos niveles más como sean necesarios, incluyendo sustratos de niveles anteriores como quinasas o fosfatasas e incluso términos de realimentación desde un nivel posterior a uno que se encuentre por encima en la cascada.

4 Materiales y métodos

4.1	Introducción	30
4.2	Datos de laboratorio	30
4.2.1	Cultivos celulares	30
4.2.2	Inhibidores y factores de crecimiento	30
4.2.3	Western Blot	30
4.3	MATLAB como entorno de programación	31
4.4	Caracterización del modelo	31
4.4.1	Modelo del artículo de Arkun	32
4.4.2	Elección de variables	35
4.4.3	Eliminación de parámetros	36
4.4.4	Output del modelo	38
4.5	Búsqueda de interacciones	39
4.5.1	Condiciones de simulación	39
4.5.2	Algoritmos de inteligencia artificial	40
4.5.3	Búsqueda por fuerza bruta	42
4.5.4	Álgebra booleana en vías de señalización	45
4.5.5	Modelo 1: Mismo output	48
4.5.6	Modelo 2: Distinto output	49

5	Resultados obtenidos	52
----------	-----------------------------	-----------

4.1 Introducción

En este apartado se describirán los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de este TFG. En primer lugar, se detallará el proceso seguido para la obtención de los datos de laboratorio, incluyendo la preparación de cultivos de células mamarias con sus correspondientes inhibidores y factores de crecimiento y la realización de pruebas de Western Blot para medir la expresión de ciertas proteínas. Se ha escogido MATLAB como lenguaje de programación para desarrollar un modelo en el que se han eliminado ciertas proteínas y parámetros para facilitar su interpretación y la búsqueda de interacciones entre ambas vías. Se ha probado con varios outputs del modelo, centrando la búsqueda en la proteína P70S6K. El estudio del crosstalk entre vías se ha llevado a cabo analizando los resultados obtenidos por diversos métodos, como la búsqueda por combinatoria y fuerza bruta y el uso de álgebra booleana y puertas lógicas.

4.2 Datos de laboratorio

4.2.1 Cultivos celulares

Se han utilizado cultivos primarios de células humanas de músculo liso vascular, derivadas de arterias mamarias de donantes anónimos, pertenecientes a la colección COLMAH (Colección de Muestras Arteriales Humanas). Tras limpiar el vaso dejando sólo la capa muscular (túnica media), la muestra se troceó en pequeños fragmentos que se sembraron en explantes. Al cabo de unas semanas, las células proliferan y migran desde los explantes a la placa, dando lugar a una línea celular primaria.

Las células se mantienen en medio de cultivo *Minimum Essential Medium* (MEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS), insulina (5 µg/ml, Gibco®), L-glutamina (2mM, Lonza®), factores de crecimiento (bFGF, 2 ng/ml, y EGF, 5ng/ml Gibco®) y un cóctel de antibióticos.

Las células se manipulan siempre en una campana de flujo laminar (Telstar Biostar) con filtro HEPA que retiene partículas superiores a 0.2µm con una eficacia del 99.9 % y utilizando material y soluciones estériles. Los cultivos se han mantenido en un incubador de CO₂ (Hera Cell 150) bajo atmósfera de 95 % aire y 5 % CO₂ a 37°C.

4.2.2 Inhibidores y factores de crecimiento

Se incuban las células con PDGF para medir su respuesta sin inhibidores, ya que activa ambas vías de señalización (Arkun 2016). Para inhibir la vía de mTOR se utiliza Everolimus, que impide la conformación del complejo mTORC1, anulando la señalización de la cascada desde ese punto (Laplante y Sabatini 2012). Se utilizan PAP-1 y margatoxina como inhibidores del canal de potasio Kv1.3, inhibiendo la señalización de la vía de MAPK/ERK (Cidad et al. 2015).

4.2.3 Western Blot

El Western Blot es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para detectar y cuantificar proteínas específicas en una muestra. El procedimiento involucra varias etapas, incluyendo la separación de las proteínas por electroforesis en gel, la transferencia de las proteínas a una membrana y la detección de las proteínas de interés utilizando anticuerpos específicos (Towbin, Staehelin y Gordon 1979).

Primero, las proteínas se separan por tamaño mediante electroforesis en gel, generalmente utilizando geles de poliacrilamida. Debido a que todas las proteínas tienen una carga negativa similar, estas se

desplazarán hacia el polo positivo. Aquellas con menor masa se desplazarán más fácilmente, por lo que cuando acabe el periodo de migración se encontrarán separadas en bandas en función de su peso molecular. Luego, las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana al colocar esta membrana sobre el gel y aplicar presión.

Una vez transferidas las proteínas, se bloquea la membrana con leche para evitar la unión no específica de los anticuerpos. Luego, se incuba la membrana con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. Este anticuerpo se une selectivamente a la proteína de interés si está presente en la muestra. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realiza un lavado con PBS (solución salina tamponada con fosfato) para eliminar cualquier anticuerpo no unido. Este proceso se repite dos o tres veces. Se realiza el mismo procedimiento con el anticuerpo secundario, que se unirá específicamente al primario y permite su visualización.

Finalmente, la señal generada se visualiza y registra utilizando métodos como la quimioluminiscencia o la fluorescencia. La intensidad de la señal está relacionada con la cantidad de proteína presente en la muestra, lo que permite la cuantificación de la proteína de interés. Se utiliza la proteína tubulina como referencia de intensidad.

4.3 MATLAB como entorno de programación

MATLAB ha sido el lenguaje de programación escogido para el desarrollo de este TFG. Se trata de un lenguaje interpretado de alto nivel, especialmente utilizado en campos como el procesado de señal y de imagen. Está enfocado al cálculo numérico y permite hacer multitud de comandos de forma vectorial, evitando utilizar bucles anidados y reduciendo el tiempo de cómputo (*MATLAB* 2023).

Para la resolución de sistemas de ecuaciones diferenciales en MATLAB, se utilizan las funciones `ode`. En el caso particular de este TFG, se ha utilizado la función `ode15s`, un solver de ecuaciones diferenciales de paso y orden variables. La función `ode15s` de MATLAB utiliza una combinación de los métodos BDF de órdenes de 1 a 5, que elige dependiendo de la rigidez del problema que se está integrando. La información de este método ha sido obtenida de los artículos de Shampine en SIAM, así como de la web oficial de MATLAB (Shampine y Reichelt 1997; Shampine, Reichelt y Kierzenka 1999; MathWorks 2023).

La función `ode15s` se caracteriza por adaptar el tamaño del paso y el orden del método para lograr una solución eficiente y precisa. Esto significa que ajusta automáticamente el tamaño del paso de integración a medida que avanza en el tiempo, adaptándose a la naturaleza de la ecuación diferencial. Además, el orden del método también se ajusta en función de la rigidez de la solución.

En comparación con `ode45`, `ode15s` es especialmente útil cuando se enfrenta a problemas rígidos. Este tipo de problemas puede ser desafiante para los solvers explícitos como `ode45`, que debido a su región de estabilidad acotada requieren pasos de integración muy pequeños para mantener la precisión. En cambio, los métodos que utiliza `ode15s` tienen regiones de estabilidad no acotadas, de manera que no hay restricción del tamaño de paso a causa de la estabilidad. Esto le permite adaptarse mejor a las variaciones rápidas y lentas de la solución.

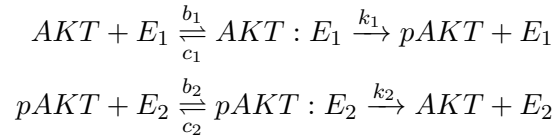
4.4 Caracterización del modelo

A continuación se detallan los pasos seguidos para el diseño del modelo principal sin crosstalk que se usará en este TFG para analizar la interacción entre la vía de señalización de AKT/mTOR y la de

MAPK/ERK.

4.4.1 Modelo del artículo de Arkun

Se parte desde el modelo expuesto en (Arkun 2016), que consiste en un sistema de 17 ecuaciones diferenciales y 7 algebraicas para modelar ambas vías. El método de modelización que utiliza en este artículo es similar al expuesto en la sección 3.4 de este TFG. Por ejemplo, para la fosforilación y defosforilación de AKT:



donde E_1 es una quinasa de AKT y E_2 una fosfatasa. Se consideran los compuestos transitorios $AKT : E_1$ y $pAKT : E_2$. Las ecuaciones diferenciales que rigen estas reacciones:

$$\begin{aligned} \frac{d[AKT]}{dt} &= -b_1[AKT][E_1] + c_1[AKT : E_1] + k_2[pAKT : E_2] \\ \frac{d[AKT : E_1]}{dt} &= b_1[AKT][E_1] - (c_1 + k_1)[AKT : E_1] \\ \frac{d[pAKT]}{dt} &= -b_2[pAKT][E_2] + c_2[pAKT : E_2] + k_1[AKT : E_1] \\ \frac{d[pAKT : E_2]}{dt} &= b_2[pAKT][E_2] - (c_2 + k_2)[pAKT : E_2] \end{aligned}$$

Se añade otra ecuación para el receptor de insulina:

$$\frac{d[pIRS1]}{dt} = \gamma + (\Phi - \epsilon\Psi)[pAKT] - \delta[pIRS1]$$

donde γ denota el nivel de insulina, Ψ el de nutrientes, δ el valor de la defosforilación espontánea del receptor de insulina y ϵ la defosforilación producida por AKT. Definiendo las variables:

$$x_1 = \frac{[AKT]}{X_T}, \quad x_2 = \frac{[AKT : E_1]}{X_T}, \quad x_3 = \frac{[pAKT]}{X_T}, \quad x_4 = \frac{[pAKT : E_2]}{X_T}, \quad x_5 = \frac{[pIRS]}{X_T}$$

Se pueden reformular las ecuaciones anteriores.

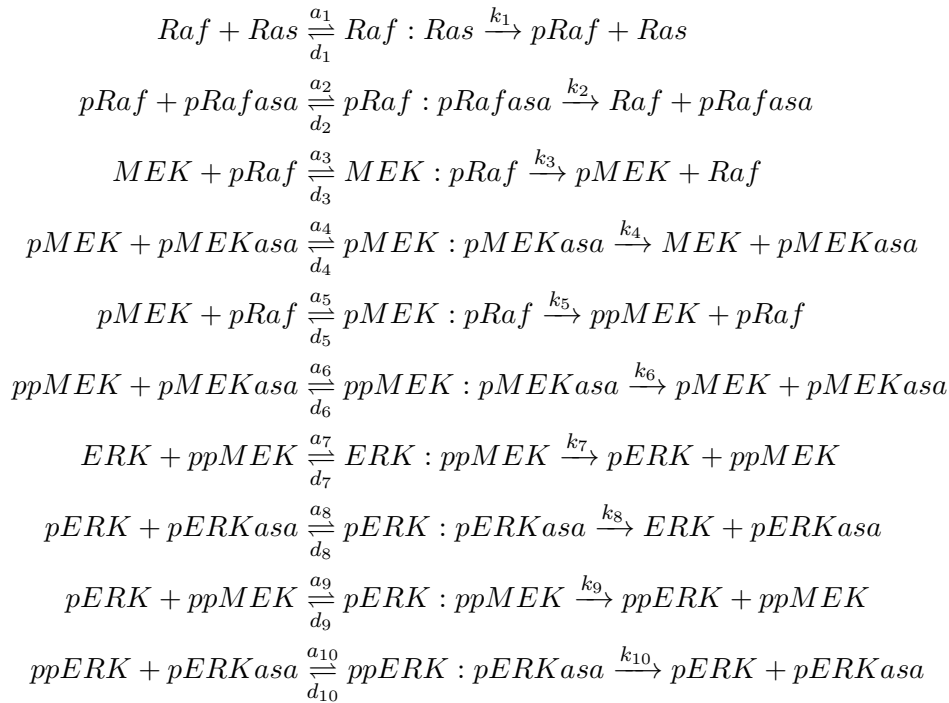
$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= -\frac{c_1 + k_1}{K_1} x_1(\beta x_5 - x_2) + c_1 x_2 + k_2 x_4 \\ \frac{dx_2}{dt} &= \frac{c_1 + k_1}{K_1} x_1(\beta x_5 - x_2) - (c_1 + k_1) x_2 \\ \frac{dx_3}{dt} &= -\frac{c_2 + k_2}{K_2} x_3(E_{2T} - x_4) + c_2 x_4 + k_1 x_2 \\ \frac{dx_4}{dt} &= \frac{c_2 + k_2}{K_2} x_3(E_{2T} - x_4) - (c_2 + k_2) x_4 \\ \frac{dx_5}{dt} &= \frac{\delta}{\beta} \left(\frac{k_2}{k_1} \right) E_{2T} \lambda + (\Phi - \epsilon\Psi) x_3 - \delta(d_1 + k_1) x_5 \end{aligned}$$

donde $X_T = [AKT] + [pAKT]$.

A continuación una estas expresiones asumiendo que el pseudoestado estacionario se mantiene para los complejos $AKT : E_1$ y $pAKT : E_2$, por lo que iguala a cero $\frac{dx_2}{dt}$ y $\frac{dx_4}{dt}$. De esta forma, caracteriza la vía AKT con dos ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{d[AKT]}{dt} &= - \left(\frac{c_1 + k_1}{K_1} \right) [AKT] \left(\beta[pIRS1] - \frac{\beta[AKT][pIRS1]}{K_1 + [AKT]} \right) + c_1 \frac{\beta[AKT][pIRS1]}{K_1 + [AKT]} \\ &\quad + k_2 \frac{E_{2T}(1 - [AKT])}{K_2 + (1 - [AKT])} \\ \frac{d[pIRS1]}{dt} &= \left(\frac{\delta}{\beta} \right) \left(\frac{k_2}{k_1} \right) E_{2T} \lambda + (\Phi - \epsilon\Psi)(1 - [AKT]) - \delta(c_1 + k_1)[pIRS1] \end{aligned}$$

Como se puede observar, no se incluye ninguna ecuación que modele mTOR ni ninguna especie química que se encuentre en niveles inferiores de la cascada AKT/mTOR. La descripción que hace este artículo de la vía MAPK/ERK es mucho más detallada, constando de 15 ecuaciones diferenciales para modelar las siguientes reacciones:



donde cada p que se encuentra frente a una molécula hace referencia a que dicha molécula está fosforilada, si hay dos simboliza una doble fosforilación. Al añadir el sufijo *asa* se refiere a que es una molécula que actúa como fosfatasa del prefijo al que acompaña. Así, $pERKasa$ es una fosfatasa de pK .

Las ecuaciones que modelan la vía MAPK/ERK son las siguientes:

$$\begin{aligned}
\frac{d[pRaf]}{dt} &= k_1[Raf : Ras] - a_2[pRaf][pRafasa] + d_2[pRaf : pRafasa] \\
&\quad - a_3[pRaf][MEK] + (k_3 + d_3)[MEK : pRaf] - a_5[pMEK][pRaf] \\
&\quad + (k_5 + d_5)[pMEK : pRaf] \\
\frac{d[pRaf : pRafasa]}{dt} &= a_2[pRaf][pRafasa] - (d_2 + k_2)[pRaf : pRafasa] \\
\frac{d[MEK : pRaf]}{dt} &= a_3[MEK][pRaf] - (d_3 + k_3)[MEK : pRaf] \\
\frac{d[pMEK]}{dt} &= k_3[MEK : pRaf] - a_4[pMEK][pMEKasa] + d_4[pMEK : pMEKasa] \\
&\quad - a_5[pMEK][pRaf] + d_5[pMEK : pRaf] + k_6[ppMEK : pMEKasa] \\
\frac{d[pMEK : pMEKasa]}{dt} &= a_4[pMEK][pMEKasa] - (d_4 + k_4)[pMEK : pMEKasa] \\
\frac{d[pMEK : pRaf]}{dt} &= a_5[pMEK : pRaf] - (d_5 + k_5)[pMEK : pRaf] \\
\frac{d[ppMEK]}{dt} &= k_5[pMEK : pRaf] - a_6[ppMEK][pMEKasa] + d_6[ppMEK : pMEKasa] \\
&\quad - a_7[ppMEK][ERK] + (d_7 + k_7)[ERK : ppMEK] - a_9[pERK][ppMEK] \\
&\quad + (d_9 + k_9)[pERK : ppMEK] \\
\frac{d[ppMEK : pMEKasa]}{dt} &= a_6[ppMEK][pMEKasa] - (d_6 + k_6)[ppMEK : pMEKasa] \\
\frac{d[ERK : ppMEK]}{dt} &= a_7[ERK][ppMEK] - (d_7 + k_7)[ERK : ppMEK] \\
\frac{d[pERK]}{dt} &= k_7[ERK : ppMEK] - a_8[pERK][pERKasa] + d_8[pERK : pERKasa] \\
&\quad - a_9[pERK][ppMEK] + d_9[pERK : ppMEK] - k_{10}[ppERK : pERKasa] \\
\frac{d[pERK : pERKasa]}{dt} &= a_8[pERK][pERKasa] - (d_8 + k_8)[pERK : pERKasa] \\
\frac{d[pERK : ppMEK]}{dt} &= a_9[pERK][ppMEK] - (d_9 + k_9)[pERK : ppMEK] \\
\frac{d[ppERK]}{dt} &= k_9[pERK : ppMEK] - a_{10}[ppERK][pERKasa] \\
&\quad + d_{10}[ppERK : pERKasa] \\
\frac{d[ppERK : pERKasa]}{dt} &= a_{10}[ppERK][pERKasa] - (d_{10} + k_{10})[ppERK : pERKasa]
\end{aligned}$$

El modelo es completado con las siguientes ecuaciones algebraicas, que aseguran que se cumpla la ley de conservación de la masa:

$$\begin{aligned}
Raf_{tot} &= Raf + pRaf + Ras : Raf + pRas : pRafasa + MEK : pRaf + pMEK : pRaf \\
MEK_{tot} &= MEK + pMEK + ppMEK + MEK : pRaf + pMEK : pRaf \\
&\quad + pMEKasa : pMEK + pMEKasa : ppMEK + ERK : ppMEK \\
&\quad + pERK : ppMEK \\
ERK_{tot} &= ERK + pERK + ppERK + ppMEK : ERK + ppMEK : ERK \\
&\quad + pERKasa : ppERK + pERKasa : pERK \\
Ras_{tot} &= Ras + Ras : Raf \\
E2_{tot} &= E2 + pRas : E2 \\
pMEKasa_{tot} &= pMEKasa : pMEK + pMEKasa : ppMEK + pMEKasa \\
pERKasa_{tot} &= pERKasa : pERK + pERKasa : ppERK + pERKasa
\end{aligned}$$

Sin embargo, de las 17 ecuaciones diferenciales, solo 2 hacen referencia a la vía mTOR y las otras 15 desarrollan la vía ERK. Además, los valores de los parámetros de equilibrio utilizados para modelar la vía de señalización MAPK/ERK son extraídos de los resultados de (Qiao et al. 2007) para que el sistema sea biestable, pero no se corresponden del todo con la realidad. Y como se ha comentado anteriormente, no se incluye modelización de mTOR ni sus sustratos. Por estos motivos, modificamos este modelo para poder interactuar mejor con la vía mTOR.

4.4.2 Elección de variables

Una de las decisiones más importantes a la hora de desarrollar el modelo es el número de variables que va a tener. Un número elevado daría como resultado un modelo redundante, ya que muchos de los niveles de las cascadas de señalización simplemente se dedican a propagar la información aguas abajo. Por otro lado, un número reducido de variables no permitiría realizar un estudio fiable de la interacción entre ambas vías, ya que no se tendrían en cuenta elementos importantes. Tras repasar la teoría de las vías de señalización protagonistas del TFG, se ha considerado que las variables más importantes a incluir en el modelo de ecuaciones diferenciales sean las siguientes:

- Vía AKT/mTOR: La dividimos en cuatro niveles de señalización consecutivos, incluyendo términos de retroalimentación negativa:
 1. PI3K: Primer elemento del modelo en la cascada.
 2. AKT: Activado por PI3K, promueve la formación de mTORC1. Se incluye un lazo de realimentación negativa con mTORC1: mTORC1 compite con mTORC2 por la utilización de sus compuestos como mTOR, mLST8, DEPTOR y Tti1-Tel2, y mTORC2 activa AKT, por lo que una mayor expresión del compuesto mTORC1 resultará en una menor de mTORC2 y este a su vez no podrá fosforilar AKT.
 3. mTORC1: Activado por AKT mediante la inhibición de TSC y la consiguiente activación de RHEB. Ambos pasos se suprimen en el modelo. mTORC1 inhibe la fosforilación de AKT y fosforila P70S6K.
 4. P70S6K: Es el último elemento de esta vía en el modelo, fosforilado por mTORC1.
- Vía MAPK/ERK: se consideran tres niveles de activación consecutiva. En este caso las moléculas que intervienen son las siguientes:

1. Ras: Primera molécula de activación en la cascada de MAPK/ERK. Activa Raf mediante fosforilación.
2. MEK: Aunque en la realidad Ras fosforila Raf y este a su vez fosforila MEK, se puede reducir la complejidad del modelo al integrar estos dos pasos en uno solo. MEK es activado por Ras en el modelo y fosforila ERK.
3. ERK: Última proteína de la vía, actúa como elemento de retroalimentación negativa para las dos proteínas que se encuentran por encima.

Además de las propias variables cuya expresión diferencial se introducirá al modelo, se añaden variables para determinar las condiciones de simulación:

- PDGF como factor de crecimiento, ya que es el utilizado en los experimentos de laboratorio y activa ambas vías.
- Inhibidores
 - Everolimus: bloquea la formación del complejo mTORC1.
 - PAP-1: Es un inhibidor del canal de potasio Kv1.3 que desactiva a su vez la vía de MAPK/ERK. Para el desarrollo del modelo se ha considerado que al ser un canal localizado en la membrana celular, detiene la vía a nivel de Ras.

De esta forma, el diagrama del modelo a simular sería el mostrado en la Fig. 12:

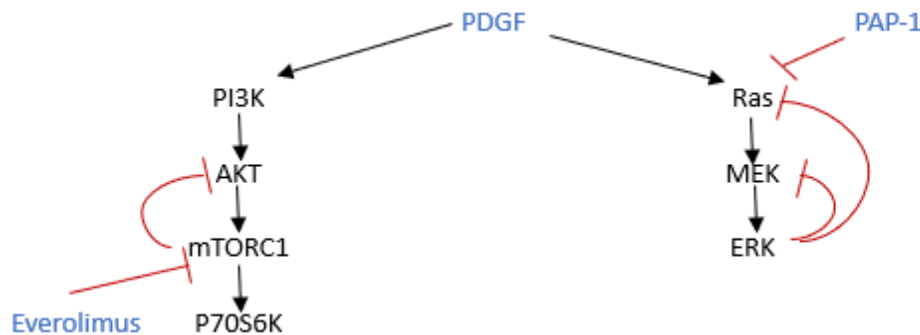


Figura 12: Diagrama esquemático del modelo principal desarrollado. Las flechas negras indican activación y las flechas rojas muestran inhibición. Las variables en color azul son las que determinan las condiciones de simulación.

4.4.3 Eliminación de parámetros

El modelo de Arkun presenta una fuerte dependencia con respecto a los valores de sus parámetros, y en algunos casos han sido elegidos artificialmente para mostrar resultados específicos. Además, el objetivo de este TFG es encontrar interacciones específicas entre las vías de señalización que produzcan una respuesta cualitativamente distinta en el output del modelo, no interesa tanto el valor exacto del mismo. Por estos motivos en este TFG se plantea una nueva forma de trabajo, la reducción de ciertos

parámetros de las ecuaciones diferenciales del modelo, de forma que las interacciones a desarrollar sean meramente cualitativas (inhibe/activa/no hace nada).

Por tanto, todas las constantes se igualan a 1, tanto las constantes de equilibrio como la concentración total de cada especie. Además se incluye un término en cada variable correspondiente a la acción de fosfatasas y defosforilación espontánea de cada compuesto. De esta forma evitamos la saturación de los diferentes compuestos que ocurriría si no se regulasen. Tras una exposición prolongada de PDGF sin un término de autorregulación: $\lim_{t \rightarrow \infty} [X] = [X_{tot}] = 1$.

El conjunto de reacciones que se han considerado:



Con estas suposiciones, para cada proteína que interviene en el modelo se tiene un reservorio $X_{tot} = 1$. Habrá una porción que esté activa, X , y otra inactiva, $1 - X$. Consideramos como cada variable del modelo la parte activa de cada especie. Por tanto, el sistema de siete ecuaciones diferenciales que rige el modelo principal es el siguiente:

$$\begin{aligned} \frac{d[PI3K]}{dt} &= (1 - [PI3K])[PDGF_1] - [PI3K] \\ \frac{d[AKT]}{dt} &= (1 - [AKT])[PI3K] - [AKT][mTORC1] - [AKT] \\ \frac{d[mTORC1]}{dt} &= (1 - Everolimus)(1 - [mTORC1])[AKT] - [mTORC1] \\ \frac{d[P70S6K]}{dt} &= (1 - [P70S6K])[mTORC1] - [P70S6K] \\ \frac{d[Ras]}{dt} &= (1 - PAP)(1 - [Ras])[PDGF_2] - [ERK][Ras] - [Ras] \\ \frac{d[MEK]}{dt} &= (1 - [MEK])[RAS] - [ERK][MEK] - [MEK] \\ \frac{d[ERK]}{dt} &= (1 - [ERK])[MEK] - [ERK] \end{aligned}$$

4.4.4 Output del modelo

Es necesario encontrar un marcador biológico que nos permita relacionar las variables del modelo desarrollado con la proliferación celular. Al ser un concepto relativamente abstracto, no es trivial identificar dicha relación. Los datos de los que se dispone muestran el siguiente comportamiento, representado en la Fig. 13. Se aprecia que el uso combinado de everolimus y PAP-1 no reduce el área invadida por las células, función que consiguen por separado.

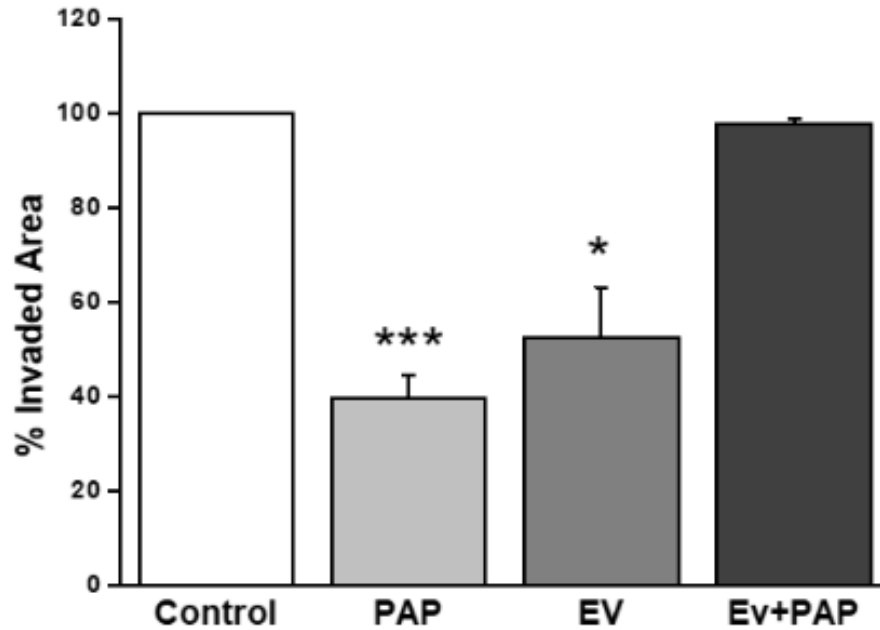


Figura 13: Diagrama de barras que representa el porcentaje de área invadida por las células VSMC tras someterles a distintos tratamientos. El uso combinado de everolimus y PAP-1 inhibe la función que ambos cumplen por separado.

Tras revisar la literatura correspondiente a las vías de señalización estudiadas, se ha propuesto y acordado con los tutores identificar como biomarcador de la proliferación celular la cantidad de P70S6K fosforilada. Esto se debe a que es una proteína efectora de la cascada de señalización mTOR (Laplanche y Sabatini 2012), cuya expresión se ha visto inhibida también al bloquear la vía de ERK (Lehman y Gomez-Cambronero 2002). Los experimentos de laboratorio mediante Western Blot muestran la siguiente respuesta de P70S6K para dosis de everolimus de 2.5, 5, 10, 25 y 50 μM , con y sin PAP-1 a una concentración fija (Fig. 14).

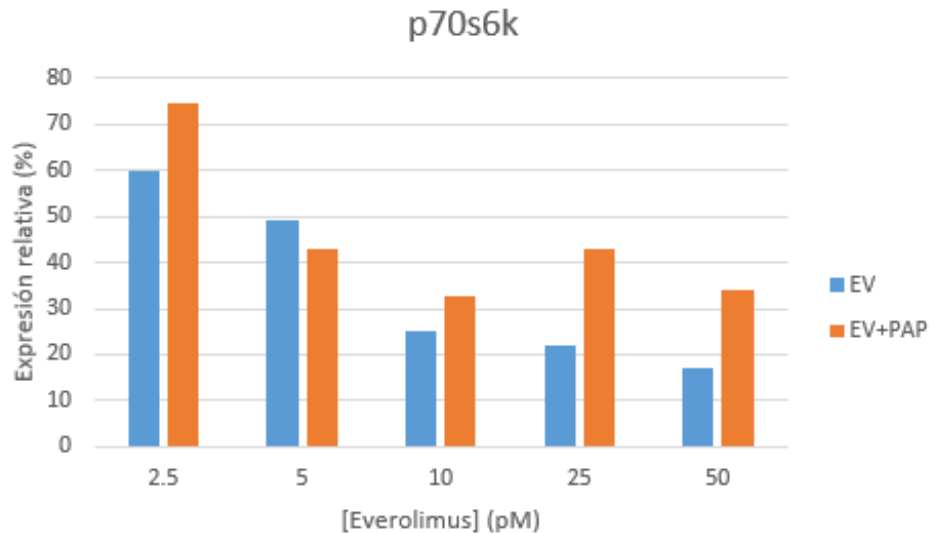


Figura 14: Curva dosis-respuesta de la cantidad de P70S6K fosforilada en función de la concentración de everolimus, normalizado con respecto a la cantidad control sin inhibidores

Se aprecia que de forma general, al aumentar la concentración de everolimus disminuye la expresión de P70S6K y al añadir PAP-1, aumenta la expresión de P70S6K.

4.5 Búsqueda de interacciones

A continuación se detallan los distintos enfoques que se han seguido para tratar de encontrar una interacción que explique los resultados obtenidos en el laboratorio, es decir, que el output del modelo se asemeje a la situación control al utilizar PAP-1 y everolimus conjuntamente, mientras que al utilizarlos por separado este output se reduzca. Inicialmente se intentó programar un algoritmo basado en *Machine Learning*, aunque debido a las restricciones y planteamiento del problema no fue posible. Seguidamente se trató de encontrar las interacciones causantes del comportamiento del sistema mediante el análisis de todas aquellas que cumplieran unas condiciones determinadas. Por último, se utilizaron los resultados obtenidos con este método para refinar el modelo gracias a herramientas de álgebra booleana.

4.5.1 Condiciones de simulación

En primer lugar, se modifican las condiciones de simulación. Se tienen cuatro variables ajustables, siendo estas $PDGF_1$, $PDGF_2$, EV y PAP , todas tomando valores reales entre 0 y 1. $PDGF_1$ representa la activación de la vía mTOR por PDGF y $PDGF_2$ simboliza la activación de la vía ERK. Las variables de EV y PAP hacen referencia al efecto de los inhibidores sobre sus sustratos, no a su concentración. Según nuestras condiciones de modelado, la función de los inhibidores se puede modelar

como una reducción en la disponibilidad del sustrato, ya que impiden que puedan reaccionar con otras moléculas:

$$[X_{disponible}] = (1 - \text{Inh})[X]$$

Cuando la acción del inhibidor sea máxima, $\text{Inh} = 1$, el sustrato disponible será cero, y cuando se mínima $\text{Inh} = 0$, coincidirá con el real.

Para cada simulación se utiliza un valor de estas variables, que se definen como variables globales en el script de MATLAB.

Se utiliza la función `ode15s` descrita anteriormente, a la que se pasan los siguientes argumentos:

- Función que resolver, en forma de sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias.
- Vector de tiempos, en este caso se utiliza un vector de 1000 elementos que recorre tiempos de 0 a 100, ya que para estos valores el modelo alcanza convergencia.
- Condiciones iniciales, vector columna de N elementos, tantos como ecuaciones diferenciales tenga el modelo. Tras probar con distintas condiciones iniciales y ver que se alcanzaban los mismos valores finales, se decide inicializar todos los valores a cero.

Se tomará como salida final del modelo el valor en el instante $t = 100$.

4.5.2 Algoritmos de inteligencia artificial

Una primera aproximación a la hora de tratar de encontrar las interacciones entre ambas vías se basaba en el uso de herramientas de inteligencia artificial y Machine Learning. El objetivo de estos algoritmos es optimizar un problema minimizando una función de pérdidas L que depende de los parámetros del modelo, W . En este caso la función de pérdidas se podría definir como la distancia entre los valores de P70S6K (a partir de ahora P70) observados y los predichos por el modelo:

$$Loss(W) = \sum_i |P70_{real_i} - P70_{predicted_i}|$$

donde cada instancia i de P70 hace referencia a unas condiciones de simulación distintas.

Los parámetros del modelo son las interacciones entre las distintas proteínas, pudiéndose representar un conjunto de interacciones como una matriz $N \times N$, donde N es el número de proteínas que intervienen. Cada fila de la matriz es la proteína que actúa como quinasa o fosfatasa de las proteínas que se encuentran en las columnas. Un 1 indica interacción positiva, y -1 interacción negativa. Representando la matriz que define el modelo de base, con solo 7 proteínas:

$$W_0 = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

El orden seguido para ordenar las proteínas ha sido desde arriba de la cascada de señalización y alternando una proteína de cada vía, comenzando con la vía mTOR. Es decir:

1. PI3K
2. Ras
3. AKT
4. MEK
5. mTOR
6. ERK
7. P70

Y si se añaden más proteínas al modelo, se incluyen al final. Este método de orden alterno tiene ventajas a la hora de programar que se comentará más adelante. Se observa una diagonal principal de -1, ya que se ha configurado que cada proteína autoinhiba su activación para que no saturen.

Añadiendo una proteína más al modelo aumenta la complejidad del mismo, incrementando el número de posibles interacciones en $2N_0 + 1$, siendo N_0 el número de proteínas del modelo inicial. En el caso más sencillo, pasando de 7 a 8 proteínas, habría 15 interacciones nuevas (aunque muchas de esas pueden tener un valor de cero):

$$W_1 = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & w_{17} \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & w_{27} \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & w_{37} \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & w_{47} \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 & w_{57} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & w_{67} \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & -1 & w_{77} \\ w_{81} & w_{82} & w_{83} & w_{84} & w_{85} & w_{86} & w_{87} & -1 \end{bmatrix}$$

Como cada nuevo parámetro puede tomar 3 valores (1, 0, -1), el número de posibles modelos distintos añadiendo una proteína es de $3^{14} \approx 4,8 \times 10^6$. Es un número muy elevado, y eso que sólo se ha incluido una proteína más.

Para penalizar modelos excesivamente complejos se introduce un término de regularización que se suma a la función de pérdidas. Tradicionalmente se utiliza uno de los dos siguientes tipos de regularización, L1 y L2 (Chukwura y Chinenye Jecinta 2023):

$$L_1(W) = \sum_i |w_i|$$

$$L_2(W) = \sum_i w_i^2$$

De esta forma se fomenta que los pesos se reduzcan, favoreciendo la simplicidad del mismo. Esto es de utilidad en este problema ya que una proteína que produzca interacciones con muchas otras resta explicabilidad al mismo.

Para resolver el problema de optimización planteado, los algoritmos de inteligencia artificial buscan encontrar el mínimo de la función de pérdidas mediante un proceso denominado descenso de gradiente. Se calcula el gradiente de la función de pérdidas respecto a los pesos del modelo en un punto inicial del espacio de parámetros. En cada iteración se desplaza en dirección contraria al gradiente calculado, hasta encontrar un mínimo (local o máximo) (Fig. 15).

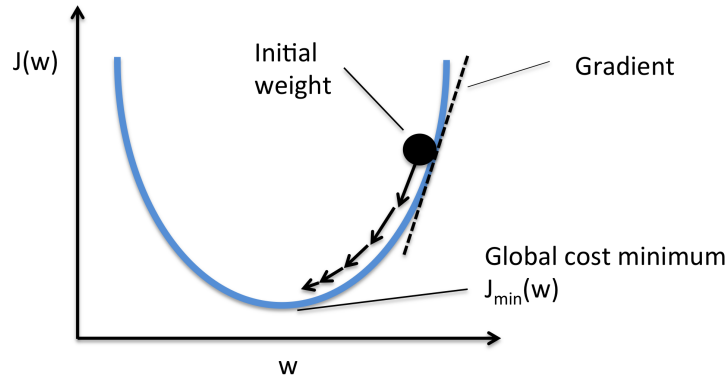


Figura 15: Explicación del algoritmo de descenso de gradiente

4.5.3 Búsqueda por fuerza bruta

La metodología de búsqueda de interacciones mediante un algoritmo de fuerza bruta se basa en la evaluación de todos los posibles supuestos. Se reduce el espacio de búsqueda para que sea computacionalmente asequible y biológicamente coherente a aquellas interacciones que cumplan las siguientes condiciones:

- Una única proteína añadida al modelo, a la que se denomina X_1 .
- Máximo de dos proteínas que afecten a la nueva proteína.
- Al menos una de las dos interacciones anteriores ha de ser positiva, para que la concentración de X_1 no se estabilice en cero. Si ninguna de las componentes de su derivada es positiva, su concentración no podrá aumentar.
- Máximo de dos proteínas activadas/inactivadas directamente por X_1 .
- Al menos un término de interacción cruzada, de forma que la nueva proteína interfiera en el cross-talk entre ambas vías.

Por tanto, X_1 tendrá las interacciones mostradas en la Fig. 16, donde a y b son los índices de las proteínas que la afectan, y c y d las proteínas cuya actividad cambia a causa de X_1 . Un valor negativo de los parámetros a , b , c o d simboliza una interacción inhibitoria, por ejemplo si $a = -3$ quiere decir que X_1 es inhibida por la proteína con el índice 3, que se corresponde con AKT según la numeración escogida. Si uno de los valores es cero, quiere decir que no ocurre dicha interacción en el modelo considerado. Cada modelo tendrá un identificador $a_i b_i c_i d_i$ que le define completamente. Dicho esto, un modelo con el identificador 2 – 305 incluye una proteína X_1 que es activada por Ras (2), inhibida por AKT (-3) y que a su vez fomenta la activación de mTOR (5).

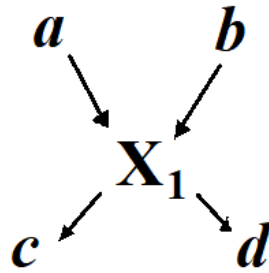


Figura 16: Codificación de las interacciones de X_1 en función de sus entradas y salidas.

Es trivial programar un conjunto de bucles for anidados que recorran el espacio de búsqueda cumpliendo estas condiciones. Para cada una de los modelos a los que da lugar cada iteración de estos bucles, se realizan los siguientes pasos con el objetivo de rellenar la tabla 5:

1. Calcular la respuesta del modelo bajo las condiciones de $PAP = 0$ y $Everolimus = 0$. Se define este valor como valor control.
2. Discretizar en 101 puntos, de 0 a 1 con un paso de 0.01, el valor de la variable $Everolimus$ y de PAP .
3. Calcular la respuesta del modelo para cada uno de los 101 valores de $Everolimus$, normalizando respecto al control.
4. Realizar el mismo proceso para la variable PAP .
5. A partir de los valores de las pruebas de migración celular (Fig. 13), encontrar aquellos valores que de las variables EV y PAP que produzcan la respuesta con menor error para los casos en los que actúan las dos variables por separado. Los valores que se consideraron fueron los que se muestran en la Tabla 4.

Control	EV	PAP	EV+PAP
1	0.5	0.4	0.97

Tabla 4: Valores utilizados como output deseado del modelo

6. Utilizar los dos valores para calcular la respuesta conjunta del modelo.
7. Evaluar la función de pérdidas definida anteriormente para los algoritmos de inteligencia artificial como distancia entre los valores reales y los obtenidos con el modelo. En este caso no hace falta regularización L_1 o L_2 , ya que se restringe el número de interacciones de la nueva proteína.

Donde R_N indica la respuesta del modelo a esas condiciones. Además de las interacciones, se guardan en la tabla la salida del modelo para cada una de las cuatro condiciones. El mejor modelo será aquel cuya función de pérdidas sea menor, ya que se adaptará mejor a los datos reales.

Este proceso se repite para varios modelos basales con distintas configuraciones a los que se añade una proteína. Las configuraciones basales son las siguientes:

a	b	c	d	EV	PAP	EV + PAP	Pérdidas
a_1	b_1	c_1	d_1	R_{EV_1}	R_{PAP_1}	R_{EV+PAP_1}	$Loss_1$
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	
a_{8160}	b_{8160}	c_{8160}	d_{8160}	$R_{EV_{8160}}$	$R_{PAP_{8160}}$	$R_{EV+PAP_{8160}}$	$Loss_{8160}$

Tabla 5: Información almacenada para cada modelo

- Modelo básico W_0 : El modelo que definimos anteriormente. Se toma en cuenta la realimentación negativa de ERK con MEK y Ras, además de la realimentación negativa de mTOR hacia AKT. La matriz característica:

$$W_0 = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

- Modelo con activación de mTOR por ERK. Como se ha descrito exhaustivamente en la literatura, ERK es capaz de activar el complejo mTORC1 mediante la inhibición de TSC2 (Arkun 2016; Laplante y Sabatini 2012; Ma et al. 2005). Por tanto, este nuevo modelo basal incluye una interacción positiva ERK \rightarrow mTOR. Su matriz de parámetros básica:

$$W_\alpha = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

- Modelo que incluye la realimentación negativa de los receptores RTK por P70S6K (Castellano y Downward 2011). Se incluyen dos interacciones negativas que surgen de P70S6K, hacia PI3K y hacia Ras, ya que son los primeros elementos de sus respectivas vías. Su matriz de parámetros básica:

$$W_b = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

- Combinando los dos anteriores:

$$W_c = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 1 & -1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

De esta forma se obtienen cuatro tablas de posibles modelos, una para cada modelo basal.

4.5.4 Álgebra booleana en vías de señalización

Una puerta lógica es un dispositivo que realiza una operación booleana, es decir actúa sobre un conjunto de variables binarias, que pueden tomar valor 0 (inactivo) o 1 (activo) para producir una salida que tomará uno de esos dos valores (Mendelson 1997).

La puerta lógica más sencilla es la puerta NOT, que simplemente invierte la entrada. Su resultado será 0 si la entrada es 1 y viceversa.

A	NOT(A)
0	1
1	0

Tabla 6: Tabla de verdad de la puerta NOT

La puerta AND sólo dará un resultado activo si todas sus entradas son 1.

A	B	AND(A, B)
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

Tabla 7: Tabla de verdad de la puerta AND

La puerta lógica OR dará 1 como resultado si cualquiera de sus entradas es 1.

A	B	OR(A, B)
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

Tabla 8: Tabla de verdad de la puerta OR

La puerta XOR se activará cuando una sola de sus entradas sea 1.

A	B	XOR(A, B)
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	0

Tabla 9: Tabla de verdad de la puerta XOR

La puerta NOR es la negación de la puerta OR, es decir, su salida será uno si ninguna de sus entradas es positiva.

A	B	NOR(A, B)
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

Tabla 10: Tabla de verdad de la puerta NOR

La puerta NAND es la negación de la puerta AND, será nula solo cuando todas sus entradas sean positivas.

A	B	NAND(A, B)
0	0	1
0	1	1
1	0	1
1	1	0

Tabla 11: Tabla de verdad de la puerta NAND

La puerta XNOR es la negación de la puerta XOR, por lo que será positiva cuando sus entradas sean iguales.

A	B	XNOR(A, B)
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	1

Tabla 12: Tabla de verdad de la puerta XNOR

En (S. Cui et al. 2021) se propone la idea de modelar cascadas de señalización celulares y genéticas mediante el uso de puertas lógicas, ya que muchas de las respuestas producidas pueden interpretarse como respuestas binarias. Una puerta NOT es equivalente a que la molécula de entrada sea un inhibidor de la salida (Fig. 17), caso de la relación entre AKT y TSC. Por otro lado, se puede modelar una puerta OR como varias señales de entrada que activen independientemente una proteína (Fig. 18), por ejemplo la fosforilación de Ra-GDP a Ras-GTP puede ser estimulada por diversos factores extracelulares. Por último, una función lógica AND es equivalente a tener una proteína cuya activación es dependiente de

una segunda reacción encadenada sobre el sustrato de la primera o de un complejo (Fig. 19), como la doble fosforilación por PDK1 y mTORC2 requerida para que AKT sea completamente activa.

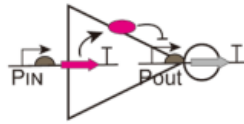


Figura 17: Modelado biológico de una puerta NOT mediante un inhibidor (S. Cui et al. 2021).

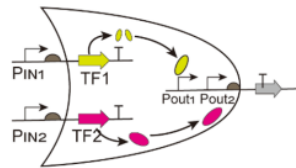


Figura 18: Modelado biológico de una puerta OR mediante dos reacciones independientes (S. Cui et al. 2021).

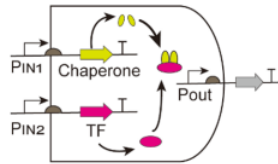
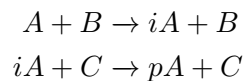


Figura 19: Modelado biológico de una puerta AND mediante la formación de un complejo (S. Cui et al. 2021).

Toda función lógica se puede modelar enlazando las puertas lógicas AND, OR y NOT (*Implementation of Boolean Functions using Logic Gates | NAND, NOR 2023*), por ejemplo la función XOR(A,B):

$$\text{XOR}(A, B) = \text{AND}(\text{OR}(A, B), \text{NOT}(\text{AND}(A, B)))$$

Para las simulaciones anteriores solamente se han modelado funciones OR, es decir, la activación de una proteína era independiente de su activación previa por otra quinasa. En el presente trabajo, el modelamiento de una puerta AND se consigue mediante la activación secuencial, incluyendo un estado intermedio de semi-activación. Suponiendo una especie A , para cuya activación es necesaria la acción de dos proteínas distintas, B y C :



donde pA es la proteína activa y iA una conformación intermedia. Siguiendo con la metodología empleada hasta el momento:

$$A_{TOT} = 1 = A + iA + pA$$

Por lo que las ecuaciones diferenciales que rigen estas reacciones serán:

$$\frac{d[iA]}{dt} = (1 - [iA] - [pA])[B] - [iA][C]$$

$$\frac{d[pA]}{dt} = [iA][C]$$

Ante los resultados negativos que se obtienen con el algoritmo de búsqueda exhaustiva, se procede a realizar una búsqueda más inteligente y concisa para desarrollar un modelo correcto. Se distinguen dos supuestos, el que se ha seguido hasta ahora, en el que la proteína P70S6K se corresponde con la salida del modelo, de forma que su actividad sea máxima en situación control y bajo el uso de ambos inhibidores y esté reducida cuando se aplican por separado; y una situación en la que PAP-1 afecte positivamente a P70S6K, tanto en presencia como en ausencia de everolimus. En esta última se deberá encontrar otro output del modelo.

4.5.5 Modelo 1: Mismo output

Para el desarrollo de este modelo se parte de la suposición de que la concentración de P70S6K se corresponde con la salida final del modelo. Por tanto, se puede plantear la Tabla 13.

Everolimus	PAP-1	P70S6K
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	1

Tabla 13: Tabla de verdad de la respuesta de P70S6K ante los distintos inhibidores suponiendo que se corresponde con el output del modelo

Esta tabla es la misma que la de una puerta XOR, siendo las variables independientes los dos inhibidores. Se tratará por tanto de encontrar una función lógica con los datos de los que se dispone basada en puertas NOT, OR y AND, ya que son las que se pueden relacionar directamente con interacciones entre proteínas.

Se plantea modelar dicha función como la suma de la actividad de dos proteínas, una que solo esté activada en situación control, cuando no hay efecto de ningún inhibidor, y otra que solamente esté activada cuando las células sean incubadas con ambos inhibidores. Se sabe que mTOR activa directamente P70S6K, es inhibido por everolimus y su activación depende de ERK, por lo que podría corresponderse con la primera función descrita, modelando esta puerta AND como dos fosforilaciones consecutivas, la primera de las cuales da lugar a un estado llamado pre-mTOR. La segunda función debe ser una proteína X_1 capaz de fosforilar P70S6K cuya actividad aumente al inhibir mTOR por everolimus y al inhibir Ras con PAP-1. Se resume en la Tabla 14.

Para conseguir este comportamiento se añade una segunda proteína, X_2 , que inhibe X_1 y estará activa siempre que no se utilicen ambos inhibidores simultáneamente. Se desarrolla el modelo de ecuaciones diferenciales basándose en las condiciones descritas anteriormente. Se define entonces el siguiente sistema de ecuaciones:

Everolimus	PAP-1	mTOR	X_1	P70S6K OR(mTOR, X_1)
0	0	1	0	1
0	1	0	0	0
1	0	0	0	0
1	1	0	1	1

Tabla 14: Tabla de verdad ampliada de la respuesta del modelo ante los distintos inhibidores

$$\begin{aligned} \frac{d[PI3K]}{dt} &= (1 - [PI3K])PDGF_1 - [PI3K] \\ \frac{d[AKT]}{dt} &= (1 - [AKT])[PI3K] - [AKT][mTOR] - [AKT] \\ \frac{d[premTOR]}{dt} &= (1 - EV)(1 - [mTOR] - [premTOR])[AKT] - [premTOR][ERK] - [premTOR] \\ \frac{d[mTOR]}{dt} &= [premTOR][AKT] - [mTOR] \\ \frac{d[P70S6K]}{dt} &= (1 - [P70S6K])[mTOR + X_1] - [P70S6K] \\ \frac{d[Ras]}{dt} &= (1 - PAP)(1 - [Ras])PDGF_2 - [ERK][Ras] - [Ras] \\ \frac{d[MEK]}{dt} &= (1 - [MEK])[RAS] - [ERK][MEK] - [MEK] \\ \frac{d[ERK]}{dt} &= (1 - [ERK])[MEK] - [ERK] \\ \frac{d[X_2]}{dt} &= (1 - [X_2])([Ras] + [mTOR]) - [X_2] \\ \frac{d[X_1]}{dt} &= (1 - [X_1])[PI3K] - [X_2][X_1] - [X_1] \end{aligned}$$

donde la nueva proteína X_1 , solo alcanzará un estado activo cuando X_2 esté inactiva, es decir, cuando tanto Ras como mTOR sean inhibidos. Como se planteó antes, un término de autoinhibición es añadido en la expresión de la derivada de cada proteína para evitar que la concentración de dicha proteína llegue a su punto de saturación.

En resumen, el comportamiento de este modelo se podría sintetizar como si al sistema original, en el que P70S6K solo es activada cuando no se usa ninguno de los inhibidores, se le añade una proteína que es capaz de generar una activación de P70S6K independiente de mTOR, pero este fenómeno sucede solo en aquellos casos en los que se utilizan PAP-1 y everolimus conjuntamente.

4.5.6 Modelo 2: Distinto output

En este caso se supone que el uso de PAP-1 potencia la actividad de P70S6K. El mecanismo propuesto es que Ras inhibe su formación, ya que es la molécula que más se ve influenciada por PAP-1 bajo las suposiciones del modelo. Al inactivar Ras mediante PAP-1 se evita la inhibición de P70S6K por esta molécula. De esta forma, P70S6K sólo tendrá una conformación totalmente inactiva cuando se utilice everolimus sin PAP. Tabla 15.

Everolimus	PAP-1	P70S6K
0	0	1
0	1	1
1	0	0
1	1	1

Tabla 15: Tabla de verdad de la respuesta de P70S6K ante los distintos inhibidores, considerando que es activada con el uso de PAP-1.

Ahora el objetivo será relacionar mediante una función lógica la actividad de P70S6K con la salida deseada del modelo. Para esta situación en particular, una posibilidad es asociar mediante una puerta AND la proteína P70S6K y una proteína X_1 , que se vea activada por everolimus e inhibida cuando solo se utiliza PAP, es decir, que tenga un comportamiento complementario al de P70S6K (Tabla 16).

Everolimus	PAP-1	P70S6K	X_1	Output AND(P70S6K, X_1)
0	0	1	1	1
0	1	1	0	0
1	0	0	1	0
1	1	1	1	1

Tabla 16: Tabla de verdad ampliada de la respuesta del modelo con distinto output a P70S6K ante los distintos inhibidores.

Como se ha descrito previamente, se puede modelar una puerta AND como dos fosforilaciones consecutivas con un estado inactivo intermedio. Esto se utilizará para modelar el funcionamiento del output del modelo. El sistema de ecuaciones diferenciales en forma normal utilizado:

$$\begin{aligned}
\frac{d[PI3K]}{dt} &= (1 - [PI3K])PDGF_1 - [PI3K] \\
\frac{d[AKT]}{dt} &= (1 - [AKT])[PI3K] - [AKT][mTOR] - [AKT] \\
\frac{d[mTOR]}{dt} &= (1 - EV)(1 - [mTOR])[AKT] - [mTOR] \\
\frac{d[P70S6K]}{dt} &= (1 - [P70S6K])[mTOR] - [Ras][P70S6K] - [P70S6K] \\
\frac{d[Ras]}{dt} &= (1 - PAP)(1 - [Ras])PDGF_2 - [ERK][Ras] - [Ras] \\
\frac{d[MEK]}{dt} &= (1 - [MEK])[RAS] - [ERK][MEK] - [MEK] \\
\frac{d[ERK]}{dt} &= (1 - [ERK])[MEK] - [ERK] \\
\frac{d[X_1]}{dt} &= (1 - [X_1])[Ras] - [mTOR][X_1] - [X_1] \\
\frac{d[preOutput]}{dt} &= (1 - [preOutput] - [Output])[P70S6K] - [preOutput] \\
\frac{d[Output]}{dt} &= [preOutput][X_1] - [Output]
\end{aligned}$$

donde preOutput es el estado intermedio no activo de la proteína de salida del modelo, denominada Output, y X_1 es la proteína añadida. Al igual que antes, se añade a todas las ecuaciones un término de autoinhibición para evitar que saturen.

5 Resultados obtenidos

5.1	Introducción	53
5.2	Modelo base inicial	53
5.3	Resto de modelos iniciales	58
5.4	Algoritmo de inteligencia artificial	61
5.5	Búsqueda por fuerza bruta	61
5.6	Relación P70S6K y vía MAPK/ERK	63
5.7	Ajuste inteligente del modelo	63
5.7.1	Modelo 1: P70S6K como output	63
5.7.2	Modelo 2: Diferente output del modelo	66
6	Análisis y discusión de los resultados. Limitaciones.	69

5.1 Introducción

En el presente capítulo se describirán los resultados obtenidos mediante los métodos planteados anteriormente. En primer lugar se visualizará la respuesta del modelo W_0 , al que se denomina modelo de base. A continuación se repetirá el mismo proceso para el resto de modelos iniciales. Seguidamente, se mostrarán los resultados obtenidos tras la ejecución de los distintos algoritmos planteados.

5.2 Modelo base inicial

En primer lugar se programa el modelo inicial, sin crosstalk, que se usará de base para analizar la interacción entre ambas vías de señalización. La respuesta temporal de las siete proteínas del modelo a una entrada continua de PDGF sin ninguno de los inhibidores viene dada en la Fig. 20:

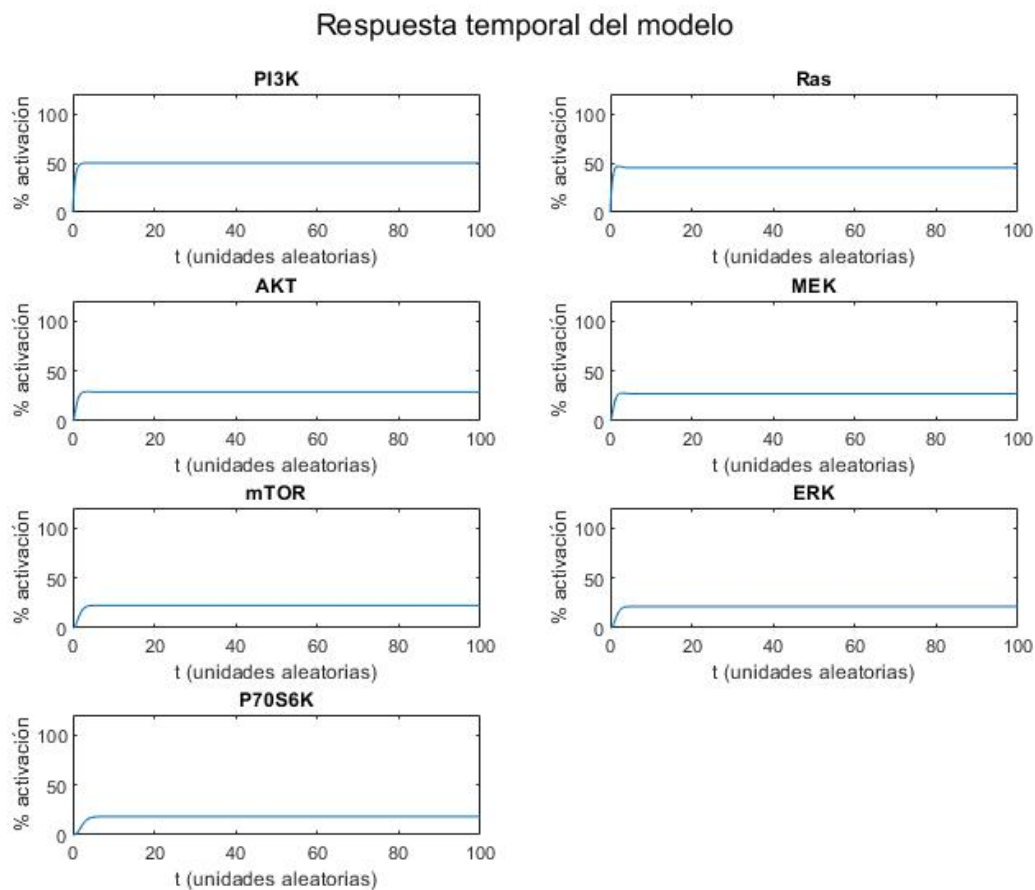


Figura 20: Respuesta temporal del modelo base en condiciones de control. Las condiciones de simulación son $EV = 0$, $PAP = 0$, $PDGF_1 = 1$, $PDGF_2 = 1$.

Se calcula su respuesta para valores elevados (0.9) de ambos inhibidores, por separado (Figs. 21 and 22) y en conjunto (Fig. 23):

Se observa mejor como un diagrama de barras de las concentraciones finales de cada proteína (Fig. 24), método que se utilizará a partir de ahora para representar la respuesta de los modelos.

La curva dosis-respuesta de dicho modelo a la acción de everolimus, con y sin PAP es la siguiente:

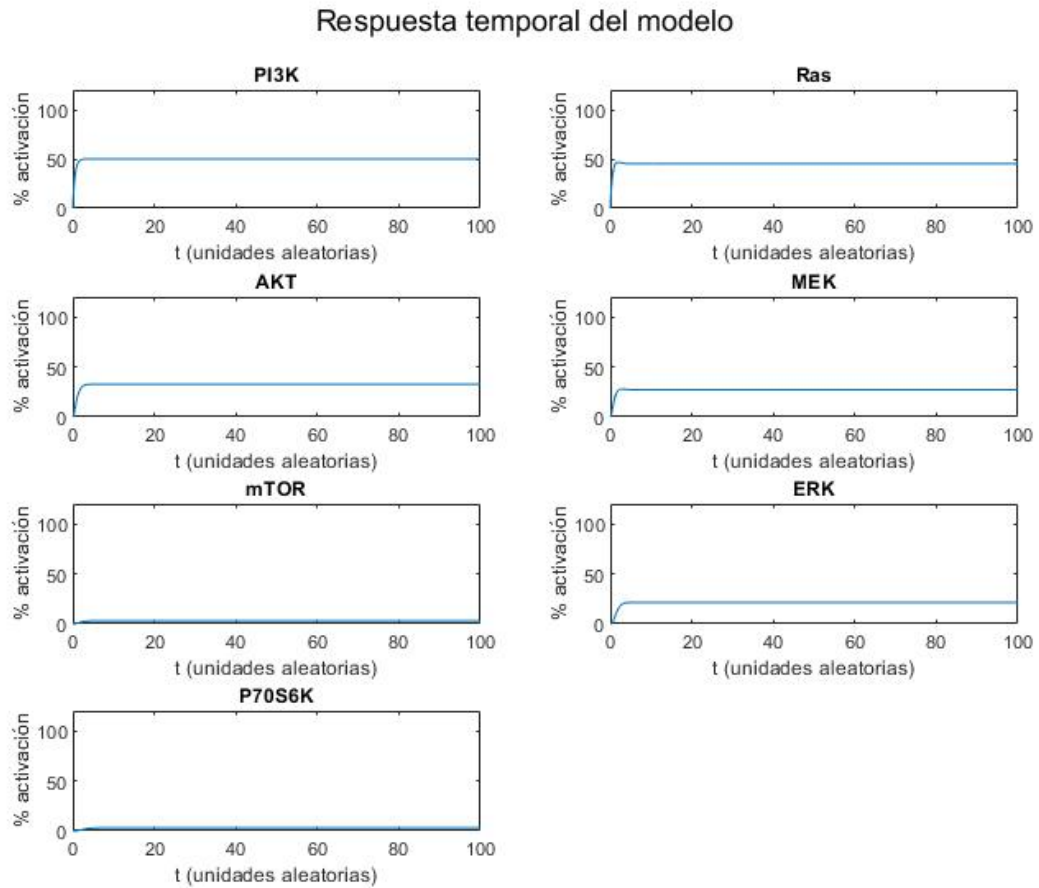


Figura 21: Respuesta temporal del modelo base para una entrada de everolimus de 0.9. Las condiciones de simulación son $EV = 0,9$, $PAP = 0$, $PDGF_1 = 1$, $PDGF_2 = 1$.

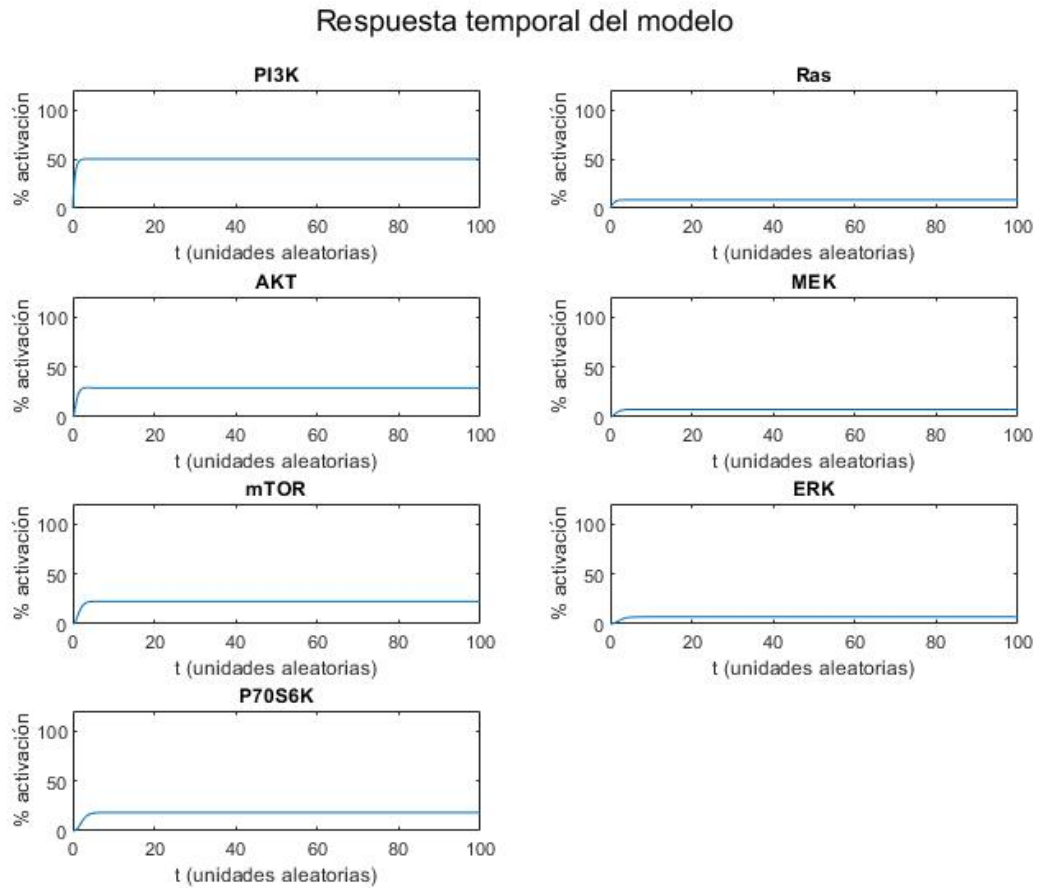


Figura 22: Respuesta temporal del modelo base para una entrada de PAP de 0.9. Las condiciones de simulación son $EV = 0$, $PAP = 0,9$, $PDGF_1 = 1$, $PDGF_2 = 1$.

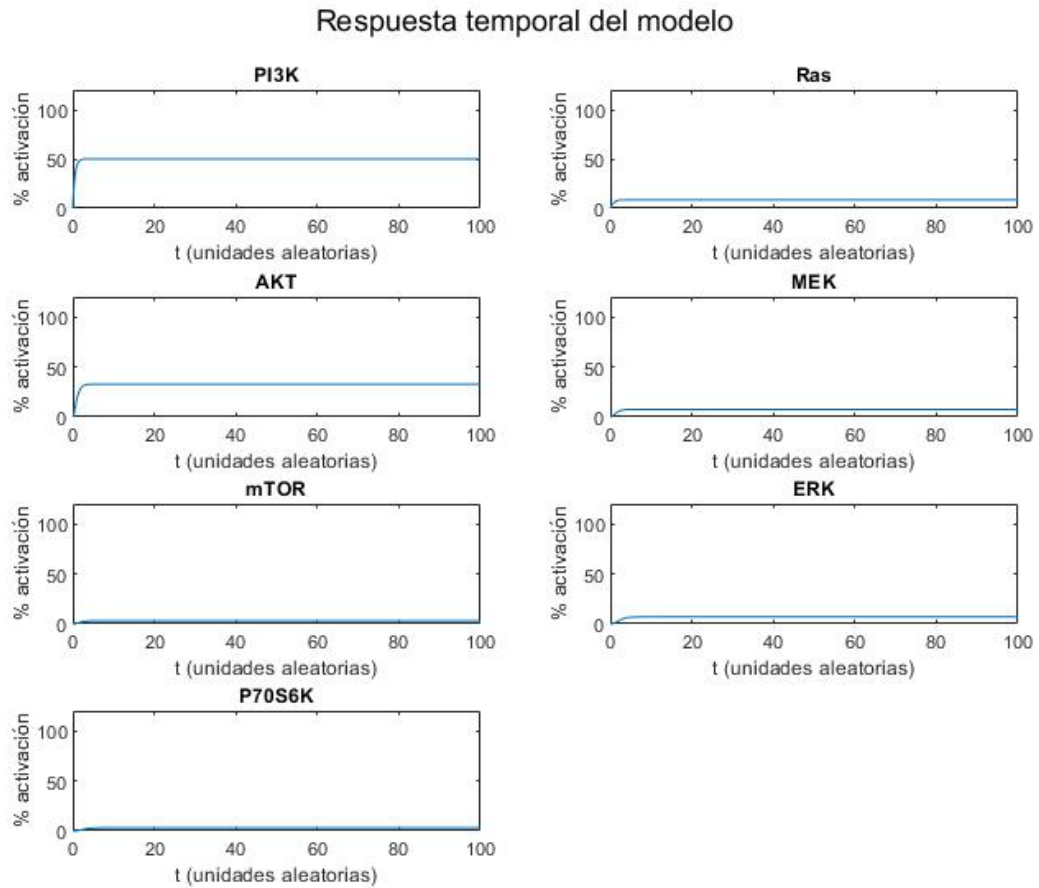


Figura 23: Respuesta temporal del modelo base cuando actúan los dos inhibidores. Las condiciones de simulación son $EV = 0,9$, $PAP = 0,9$, $PDGF_1 = 1$, $PDGF_2 = 1$.

Respuesta final del modelo normalizada frente a la situación control

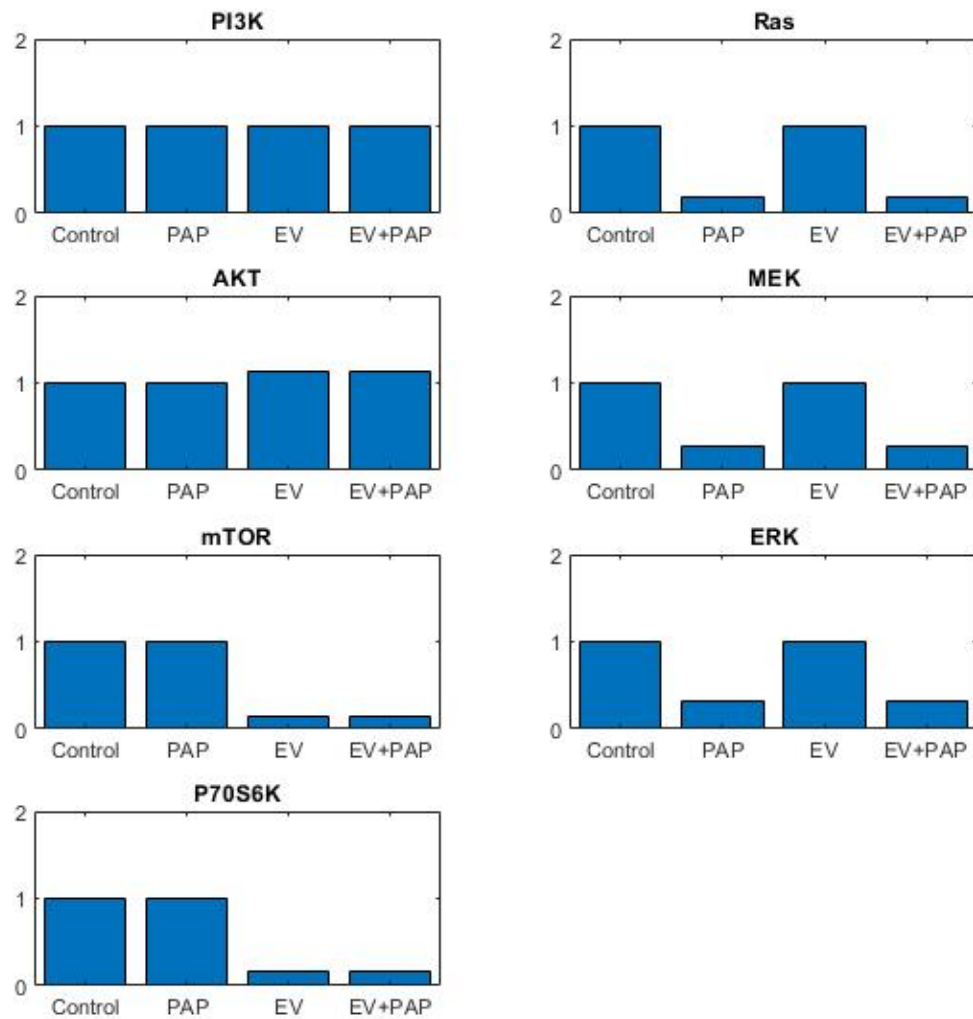


Figura 24: Respuesta final del modelo W_0 a las cuatro condiciones establecidas.

5.3 Resto de modelos iniciales

Para el resto de modelos de partida, con interacción positiva ERK-mTOR W_a (Fig. 25), con realimentación negativa por parte de P70S6K W_b (Fig. 26), y con ambas interacciones W_c (Fig. 27).

Respuesta final del modelo normalizada frente a la situación control

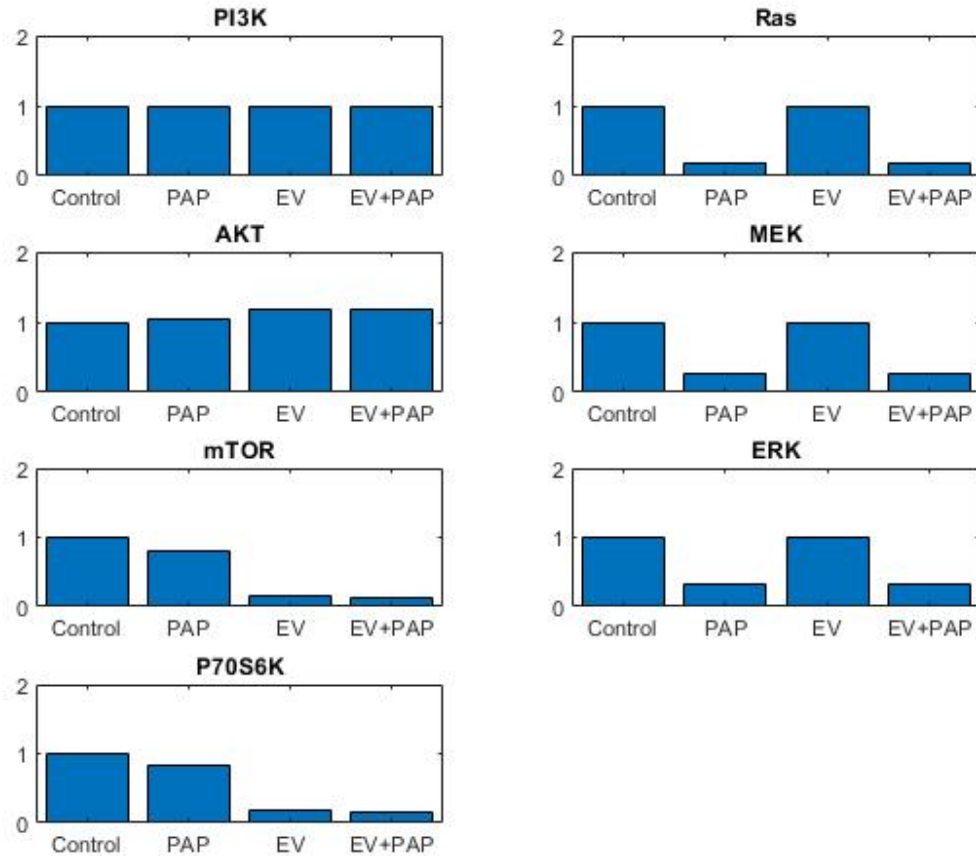


Figura 25: Respuesta final del modelo W_a las cuatro condiciones establecidas.

Respuesta final del modelo normalizada frente a la situación control

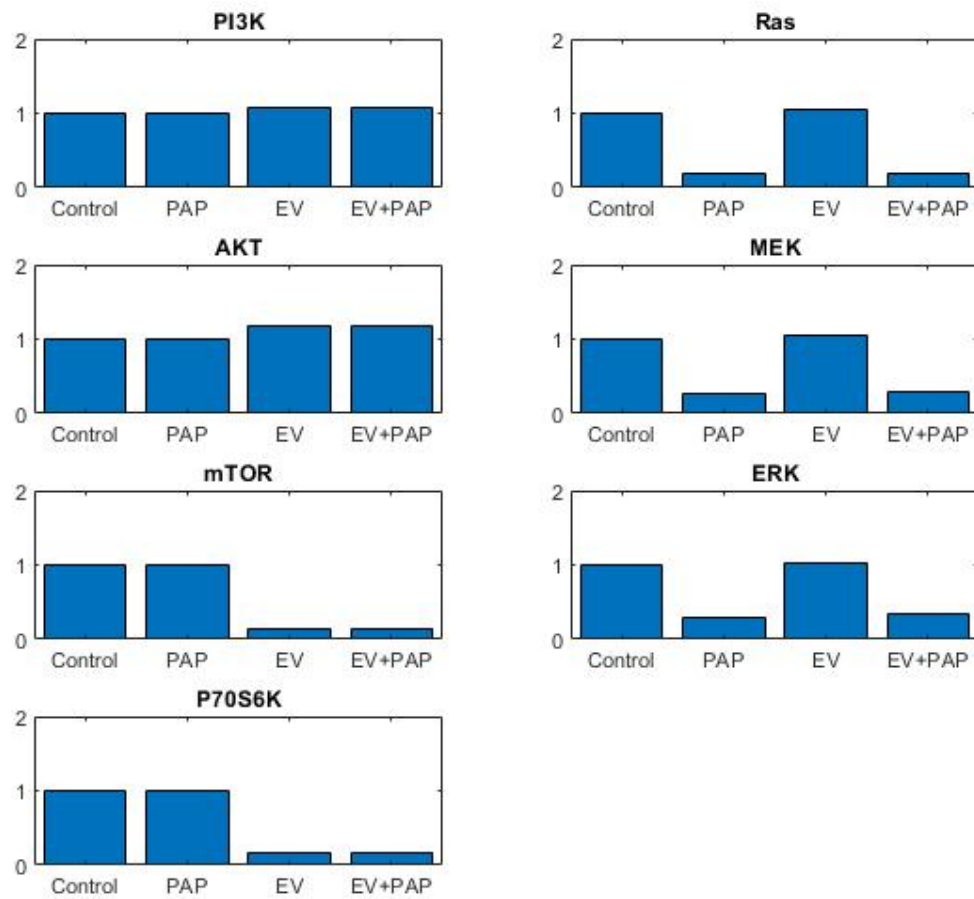


Figura 26: Respuesta final del modelo W_b a las cuatro condiciones establecidas.

Respuesta final del modelo normalizada frente a la situación control

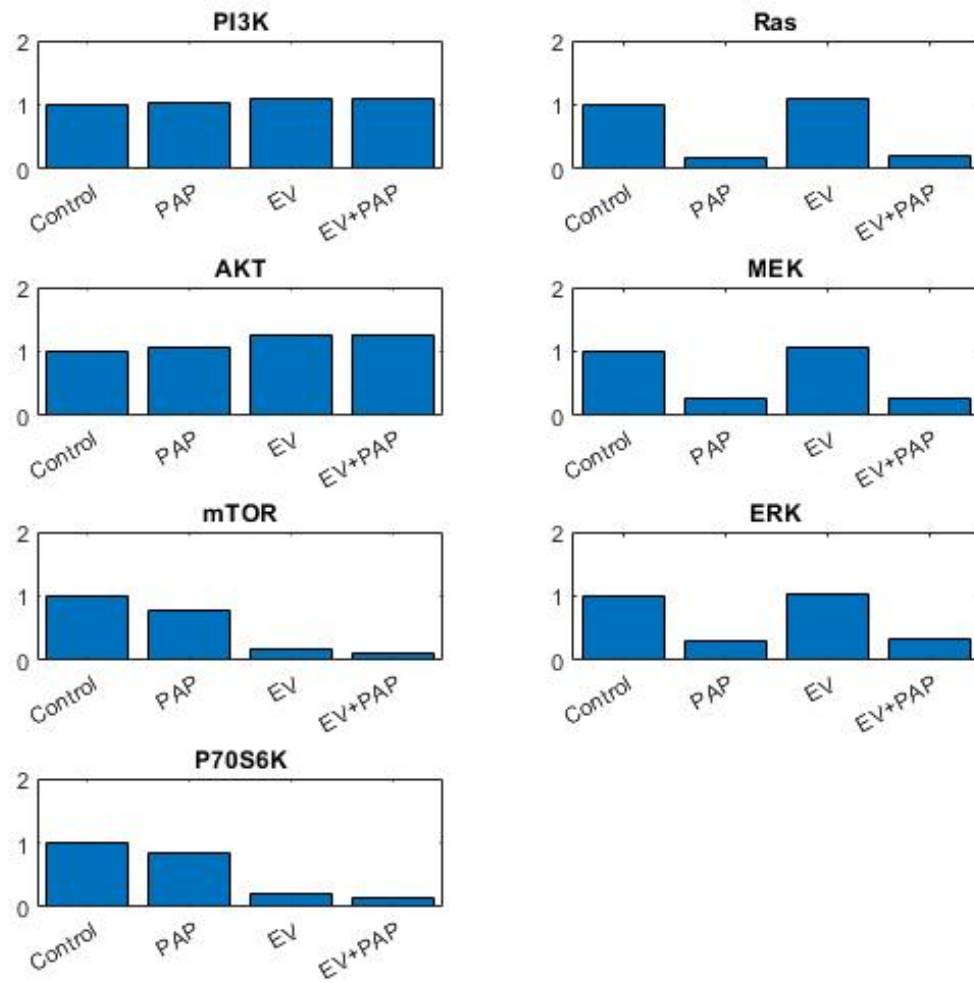


Figura 27: Respuesta final del modelo W_c a las cuatro condiciones establecidas.

5.4 Algoritmo de inteligencia artificial

No fue posible programar un algoritmo basado en inteligencia artificial para este problema en concreto. Se explicará con mayor detalle en la sección de discusión de resultados.

5.5 Búsqueda por fuerza bruta

Se programó una función que recorre el espacio de búsqueda mediante el uso de cuatro bucles for anidados (uno para cada una de las interacciones de la proteína añadida al modelo).

Debido a que se realizó el análisis de más de 30000 modelos, no es práctico mostrar las tablas de resultados completas. Se presentan los mejores 10 modelos para cada tipo de modelo inicial, W_0 (Tabla 17), W_a (Tabla 18), W_b (Tabla 19) y W_c (Tabla 20), siendo estos representativos del comportamiento idóneo que deberá tener un modelo con las características iniciales planteadas. Se supone como mejor modelo aquel que tenga una función de pérdidas menor. Un índice negativo en sus alguna de sus interacciones hace referencia a que ésta es negativa.

Se recuerda el orden de los índices para facilitar la comprensión de las tablas:

1. PI3K
2. Ras
3. AKT
4. MEK
5. mTOR
6. ERK
7. P70

Ranking	a	b	c	d	EV	PAP	EV + PAP	Pérdidas
1.	6	-3	-4	7	0.4932	0.3997	0.4367	0.5402
2.	6	-3	0	7	0.5007	0.3997	0.4183	0.5528
3.	6	-3	1	7	0.5004	0.3995	0.4181	0.5529
4.	6	-3	-1	7	0.5014	0.3997	0.4188	0.5529
5.	6	-3	-2	7	0.4953	0.4008	0.4194	0.5562
6.	2	-3	-1	7	0.5145	0.4001	0.4001	0.5845
7.	2	-3	6	7	0.5146	0.4001	0.4001	0.5846
8.	2	-3	4	7	0.5146	0.4001	0.4001	0.5846
9.	2	-3	-6	7	0.5146	0.4002	0.4002	0.5846
10.	2	-3	0	7	0.5147	0.4002	0.4002	0.5847

Tabla 17: Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_0

Se observa que en los 10 mejores modelos, aunque los resultados son muy similares a los observados en la realidad para PAP y everolimus por separado, no se consigue que el output del modelo bajo ambos inhibidores replique lo observado en la realidad. Se calcula una variable lógica para cada modelo, que

Ranking	a	b	c	d	EV	PAP	EV + PAP	Pérdidas
1.	3	1	-6	-4	0.5007	0.4010	0.4253	0.5464
2.	3	2	-6	-4	0.5040	0.4009	0.4254	0.5494
3.	3	-5	-6	-4	0.5083	0.3988	0.4229	0.5567
4.	3	-7	-6	-4	0.5112	0.4010	0.4253	0.5570
5.	3	0	-6	-4	0.4976	0.3998	0.3998	0.5729
6.	3	7	-6	-4	0.5133	0.3990	0.3990	0.5852
7.	3	5	-6	-4	0.5179	0.3990	0.3990	0.5899
8.	3	-2	-6	-4	0.5239	0.3999	0.3999	0.5942
9.	3	-1	-6	-4	0.5286	0.3999	0.3999	0.5989
10.	3	1	-4	-2	0.5310	0.4017	0.4017	0.6010

Tabla 18: Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_a

Ranking	a	b	c	d	EV	PAP	EV + PAP	Pérdidas
1.	6	-3	3	7	0.5010	0.3999	0.4572	0.5139
2.	6	-3	-1	7	0.5035	0.4000	0.4592	0.5143
3.	6	-3	-2	7	0.4999	0.3997	0.4291	0.5413
4.	2	-3	-4	7	0.4973	0.3999	0.4127	0.5601
5.	6	-3	5	7	0.5008	0.3994	0.4026	0.5688
6.	2	-3	1	7	0.5007	0.4004	0.4004	0.5707
7.	2	-3	0	7	0.4979	0.4003	0.4003	0.5721
8.	2	-3	-5	7	0.4978	0.4005	0.4005	0.5722
9.	2	-3	6	7	0.5016	0.3995	0.3995	0.5726
10.	6	-3	2	7	0.4962	0.4003	0.4003	0.5738

Tabla 19: Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_b

Ranking	a	b	c	d	EV	PAP	EV + PAP	Pérdidas
1.	3	-5	-4	-6	0.4970	0.4000	0.4727	0.5003
2.	3	0	-6	-4	0.5033	0.4006	0.4720	0.5019
3.	3	-5	-4	-7	0.4936	0.3998	0.4617	0.5149
4.	1	-5	-6	-4	0.4973	0.4006	0.4558	0.5175
5.	3	-7	-4	-6	0.4949	0.3997	0.4553	0.5200
6.	1	3	-6	-4	0.4955	0.3993	0.4540	0.5212
7.	1	0	-4	-6	0.5046	0.3991	0.4533	0.5222
8.	3	0	-7	-4	0.5004	0.3993	0.4460	0.5252
9.	1	-5	-4	-7	0.5038	0.3998	0.4475	0.5264
10.	3	-5	-7	-6	0.5028	0.3995	0.4448	0.5284

Tabla 20: Tabla en la que se indican las interacciones de los 10 modelos con menor función de pérdidas obtenidos desde el modelo base W_c

sólo será 1 si la respuesta a EV+PAP es mayor que la respuesta a PAP y EV por separado. Se suma dicha variable para cada tipo de modelo de base, obteniéndose la Tabla 21.

Tipo de modelo	Número de modelos que cumplen la condición
W_0	0
W_a	0
W_b	0
W_c	0

Tabla 21: Comparación de respuestas EV+PAP con respuestas separadas de PAP y EV

Ante estos resultados negativos, se plantean varias posibilidades. En primer lugar, quizás la salida del modelo no es la indicada. Se dispone de datos que muestran una relación negativa entre la concentración de everolimus y la concentración de P70S6K activa, además de un aumento de P70S6K al utilizar PAP-1 junto con everolimus comparado con el uso individual de everolimus (Fig. 14). Sin embargo, no se dispone de información acerca de qué sucede con la concentración de P70S6K tras incubar las células solamente con PAP-1. Por tanto se realizan diversos Western Blot para tratar de encontrar esta relación.

5.6 Relación P70S6K y vía MAPK/ERK

Se realizan pruebas de Western Blot para comprobar si la proteína P70S6K es un output del modelo acertado. Se dispone de tres cultivos celulares, a los que se incubaba con cuatro condiciones distintas: sin ningún efecto externo (0%), con PDGF, con PDGF y PD98059 (un inhibidor muy potente de MEK, a partir de ahora PD98), y con PDGF y PAP-1. Los resultados de los tres cultivos se muestran en las Figs. 28 to 30.

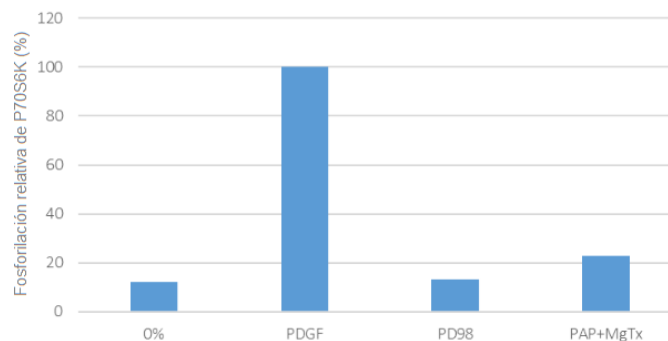


Figura 28: Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al primer cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.

5.7 Ajuste inteligente del modelo

5.7.1 Modelo 1: P70S6K como output

En primer lugar, se obtienen las curvas dosis respuesta del modelo a ambos inhibidores por separado (Figs. 31 and 32), con el objetivo de obtener los valores adecuados para que la salida del modelo sea comparable con la que se observa en el laboratorio.

En este caso no se consigue que el modelo llegue a valores tan bajos como los reales, por lo que se asignan valores elevados a las dos variables correspondientes a los inhibidores (0.95) para la representación del mismo. Se obtienen de esta manera cuatro condiciones de simulación: la situación control, con

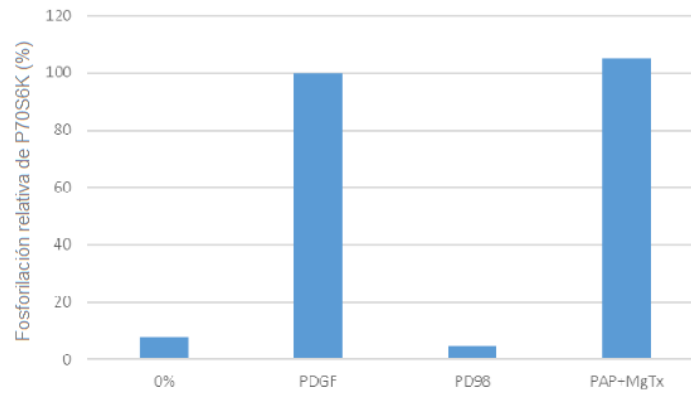


Figura 29: Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al segundo cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.

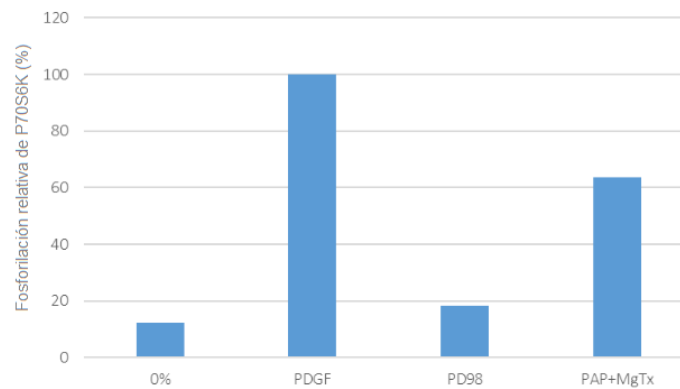


Figura 30: Resultados de las pruebas de Western Blot realizadas al tercer cultivo de células VSMC, normalizado en porcentaje respecto a la situación de solo PDGF.

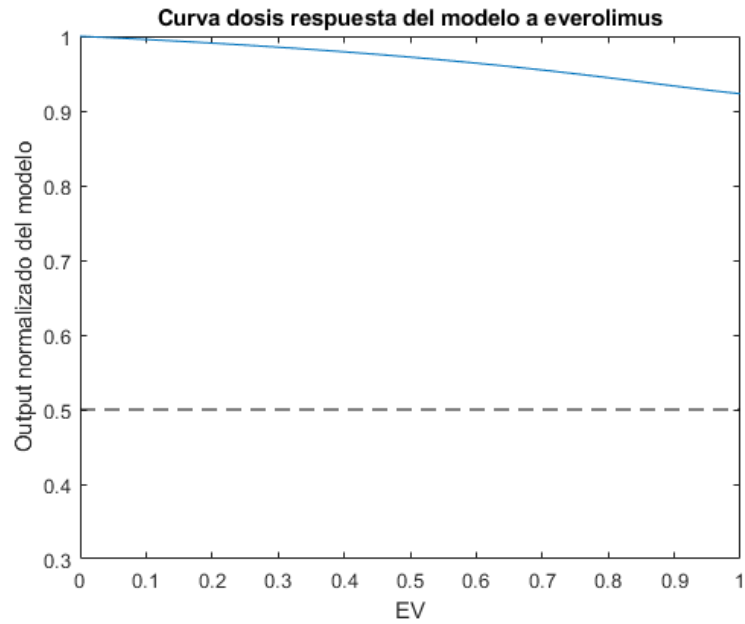


Figura 31: Curva dosis respuesta del modelo 1 a everolimus normalizada por la P70S6K control. La línea punteada indica el valor real que se pretende alcanzar.

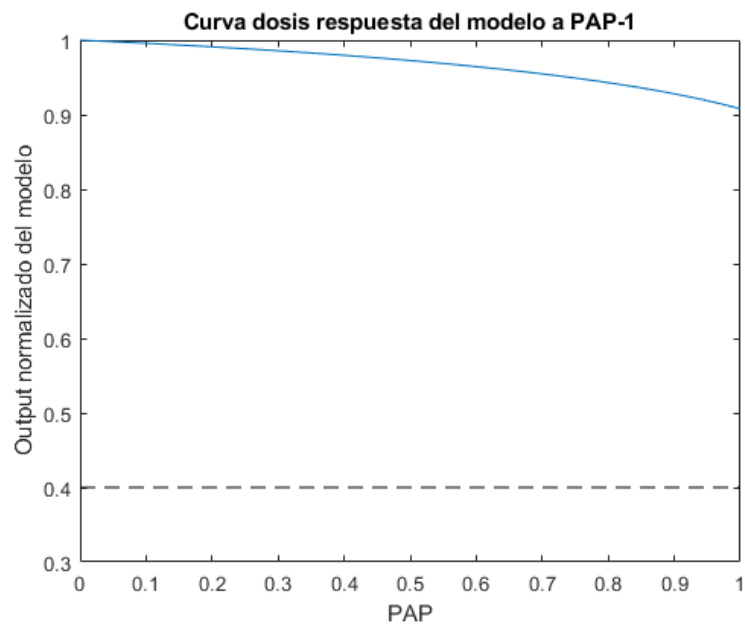


Figura 32: Curva dosis respuesta del modelo 1 a PAP-1 normalizada por la P70S6K control. La línea punteada indica el valor real que se pretende alcanzar.

everolimus, con PAP-1 y con ambos. $PDGF_1$ y $PDGF_2$ mantendrán valores de 1 en todas las simulaciones. Los resultados se muestran en la Fig. 33

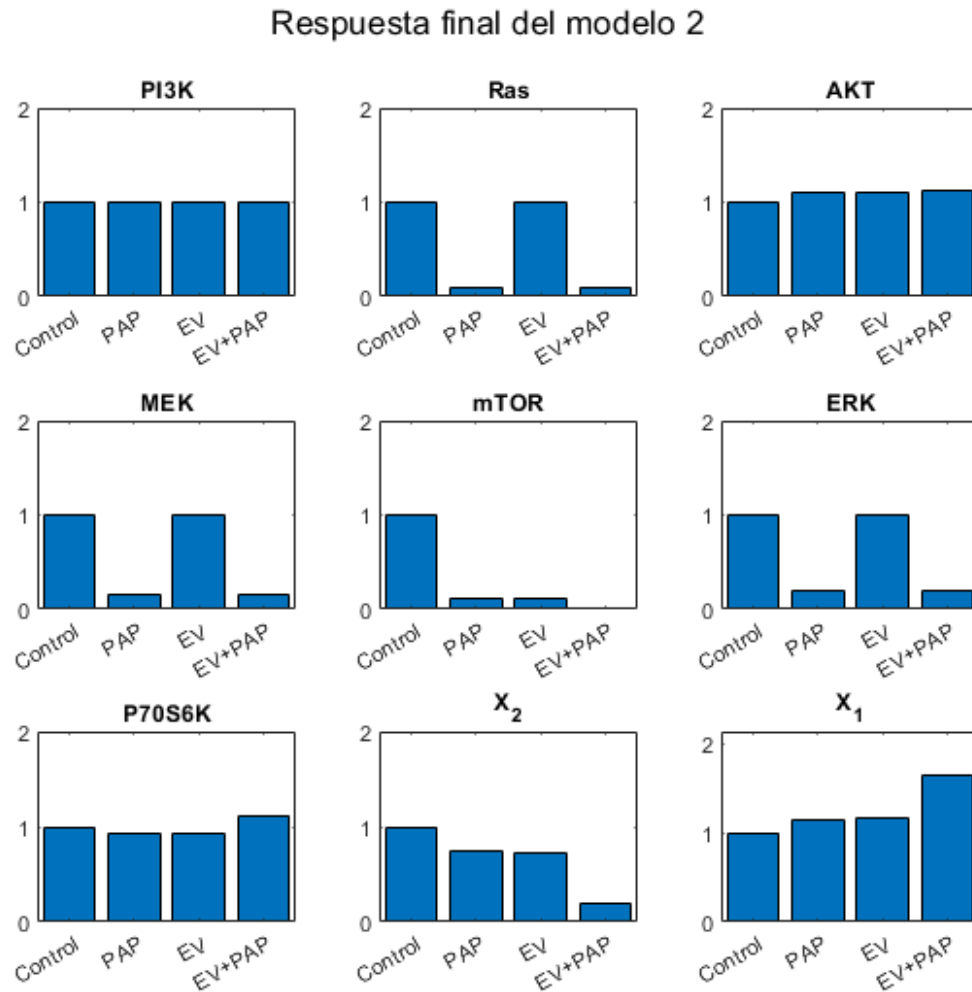


Figura 33: Diagrama de barras de las concentraciones finales del modelo 2.

5.7.2 Modelo 2: Diferente output del modelo

Se calculan las curvas dosis respuesta del modelo a ambos inhibidores por separado (Figs. 34 and 35), para poder obtener los valores necesarios para que el output del modelo se corresponda con el observado en la realidad.

Se realizan simulaciones en cuatro condiciones distintas para ilustrar el comportamiento del modelo, combinando el uso o no de los inhibidores (Fig. 36). Cuando no se utilizan, se asigna valor 0 a su variable, mientras que si se utiliza everolimus el valor de EV será 0.86 y en el caso de usar PAP-1 el valor de PAP será 0.96. En todas ellas se asigna un valor de 1 tanto a $PDGF_1$ como a $PDGF_2$.

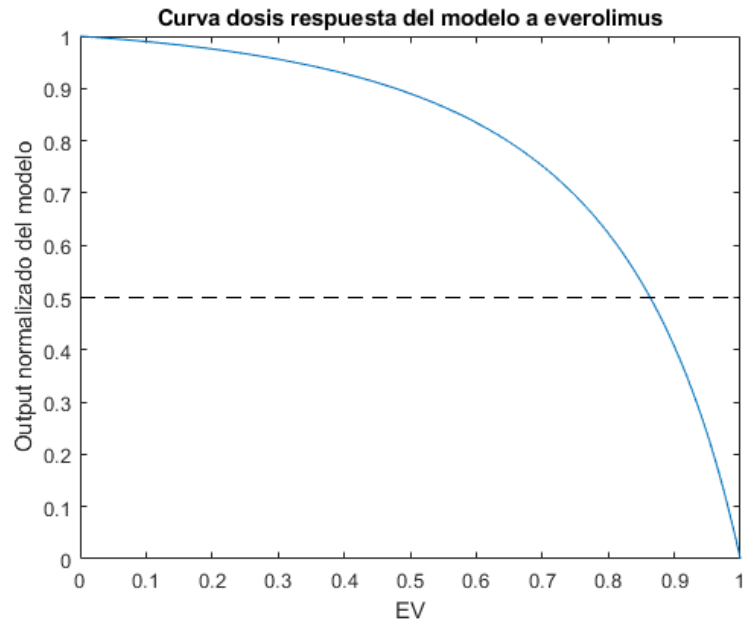


Figura 34: Curva dosis respuesta del modelo 2 a everolimus normalizada por el output control. La línea punteada indica el valor real que se pretende imitar.

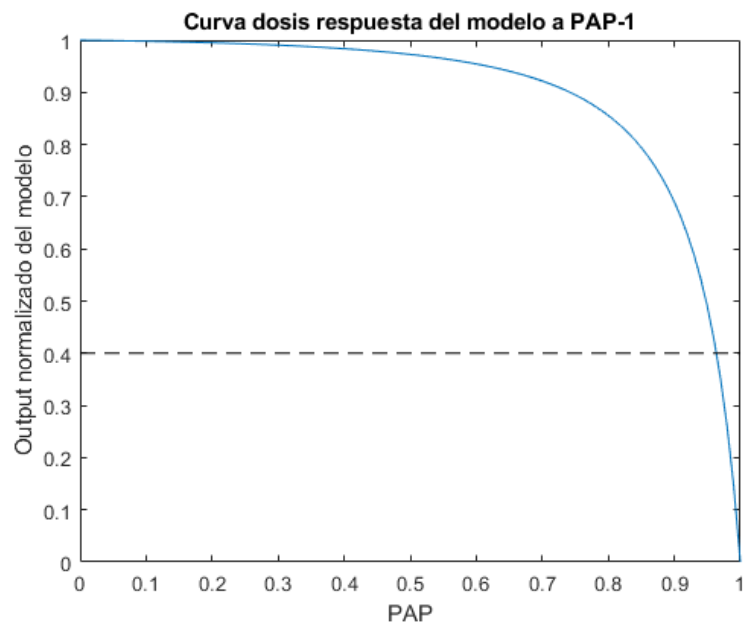


Figura 35: Curva dosis respuesta del modelo 2 a PAP-1 normalizada por el output control. La línea punteada indica el valor real que se pretende imitar.

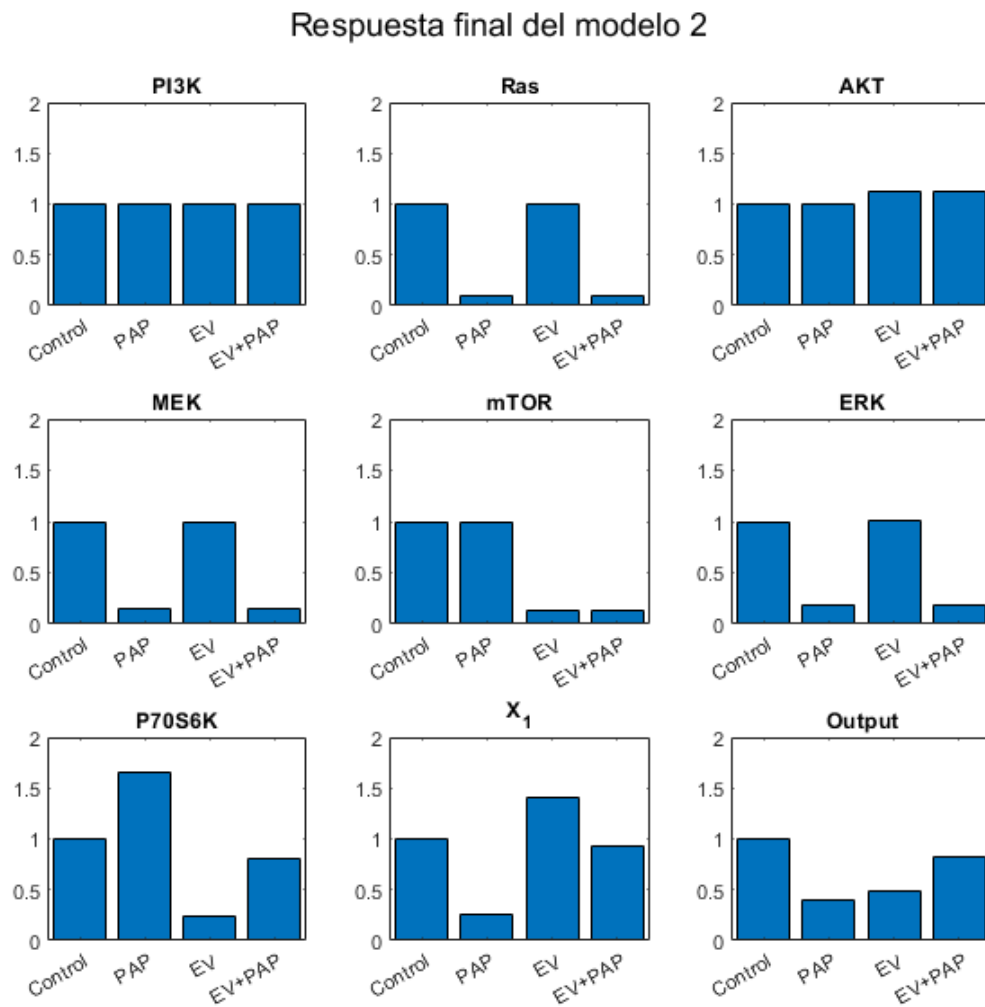


Figura 36: Diagrama de barras de las concentraciones finales del modelo 2.

6 Análisis y discusión de los resultados. Limitaciones.

6.1	Introducción	70
6.2	Análisis y discusión de los resultados	70
6.2.1	Modelo simple	70
6.2.2	Resto de modelos iniciales	70
6.2.3	Algoritmo basado en IA	71
6.2.4	Búsqueda exhaustiva	71
6.2.5	Relación P70S6K y vía MAPK/ERK	73
6.2.6	Modelo 1: P70S6K como output	74
6.2.7	Modelo 2: Diferente output	74
6.3	Limitaciones	75
7	Grado de consecución de los objetivos. Conclusiones extraídas. Aportaciones originales. Líneas futuras de trabajo	76

6.1 Introducción

En este capítulo se analizarán los resultados obtenidos anteriormente, comenzando por los modelos básicos definidos al principio, continuando con los resultados que se obtienen después de la búsqueda exhaustiva de interacciones. Por último se analizará la respuesta de los dos modelos obtenidos gracias al uso de las reglas de álgebra booleana.

6.2 Análisis y discusión de los resultados

6.2.1 Modelo simple

La respuesta temporal del modelo inicial W_0 se estabiliza rápidamente, alcanzando cada proteína una concentración activa constante (Fig. 20). Al asignar a la variable EV un valor no nulo, en este caso 0.9, se observa cómo la concentración final de mTOR y de P70S6K disminuye, mientras que la de AKT aumenta ligeramente (Fig. 21). Este comportamiento es debido a que al utilizar everolimus, se inhibe la formación de mTOR, impidiendo la activación de P70S6K por esta molécula. En cuanto al aumento de AKT, se explica por una reducción de la intensidad de realimentación negativa por parte de mTOR. Repitiendo el proceso pero ahora cambiando el valor de PAP a 0.9, con $EV = 0$, todas las proteínas de la vía MAPK/ERK ven reducida su actividad (Fig. 22). Esto se debe al bloqueo de Ras por parte de PAP, ya que se ha establecido que este inhibidor bloquee la cascada MAPK/ERK a nivel de Ras. Al utilizar valores de 0.9 para ambos inhibidores (Fig. 23), se combina lo que sucede por separado, es decir, disminuyen las concentraciones de mTOR y P70S6K al igual que las de Ras, MEK y ERK. Para apreciar mejor las diferencias entre las distintas condiciones, se representa en un diagrama de barras la concentración final de cada proteína normalizada frente a la concentración final que presenta en la situación control, sin inhibidores (Fig. 24). Este modelo aún no refleja lo que ocurre en la realidad, ya que no presenta un comportamiento tal que el uso combinado de ambos inhibidores anule sus efectos. Por tanto, se debe modificar este modelo para tratar de obtener estos resultados.

6.2.2 Resto de modelos iniciales

Se repite el mismo procedimiento que se ha seguido con el modelo anterior para los modelos W_a , W_b y W_c , obteniendo las figuras 25, 26 y Fig. 27 respectivamente.

En el modelo W_a (Fig. 25), se aprecia como las concentraciones de mTOR y P70S6K disminuyen al aplicar PAP, lo cual es una consecuencia directa de la interacción añadida entre ERK y mTOR. Utilizando PAP, se bloquea la activación de Ras y esto a su vez impide que tanto MEK como ERK puedan adquirir una conformación activa. ERK por tanto no ejerce su acción sobre mTOR, evento que sí ocurre en ausencia de PAP, por lo que la expresión de mTOR es menor que en control. El uso combinado de los dos inhibidores resulta en una concentración aún menor de P70S6K, porque se unen sus acciones.

En cuanto al modelo W_b (Fig. 26), el uso de everolimus restringe la formación de P70S6K, impidiendo su actividad sobre PI3K y Ras, por lo que la concentración activa de estas moléculas aumenta ligeramente con la presencia de este inhibidor. El resultado del modelo al utilizar PAP no presenta ninguna diferencia con el del modelo inicial.

Por último, el modelo W_c (Fig. 27) presenta un comportamiento que integra las respuestas de los modelos W_a y W_b . La aplicación de PAP reduce las concentraciones de mTOR y P70S6K por la activación de mTOR mediada por ERK, y la disminución de la actividad de P70S6K tanto por everolimus como por PAP provoca un aumento en la concentración de PI3K. En el caso de Ras, al actuar PAP directamente

sobre esta molécula su actividad no aumenta por inhibición de la realimentación negativa de P70S6K. Esto sí sucede aunque el efecto es mínimo con la aplicación de everolimus.

Al igual que sucedía en el modelo principal, ninguno de estos modelos derivados del primero es capaz de explicar el comportamiento real del sistema.

6.2.3 Algoritmo basado en IA

Debido a las características y al planteamiento del problema, no se pudo programar un algoritmo de inteligencia artificial para tratar de resolverlo. En primer lugar, se trata de un problema con un espacio de búsqueda discreto, es decir, una interacción concreta sucede o no sucede (se han eliminado los parámetros). Por tanto, la función de pérdidas cuyo mínimo se desea encontrar no tiene un gradiente como tal, por lo que no se pueden realizar técnicas de descenso de gradiente. Además, el tiempo computacional empleado para la evaluación de un modelo en concreto no es muy elevado, por lo que se pueden emplear técnicas de búsqueda exhaustiva. De esta forma se evita que la solución se atasque en un mínimo local de la función de pérdidas, que es uno de los principales inconvenientes del uso de este tipo de algoritmos.

A pesar de esta limitación, este planteamiento ha servido para definir una función de pérdidas para evaluar los modelos y para encontrar un método de codificación de los modelos basados en matrices con 1, -1 o 0.

6.2.4 Búsqueda exhaustiva

Para el modelo base W_0 se aprecia una tendencia bastante clara. Los mejores modelos son aquellos cuya proteína añadida X_1 está inhibida por AKT y que activa P70S6K. Además, esta proteína es activada también por ERK o Ras, mientras que la otra interacción de salida parece no ser importante, ya que se aprecian valores distintos para los diferentes modelos. La representación gráfica del modelo viene dada en la Fig. 37.

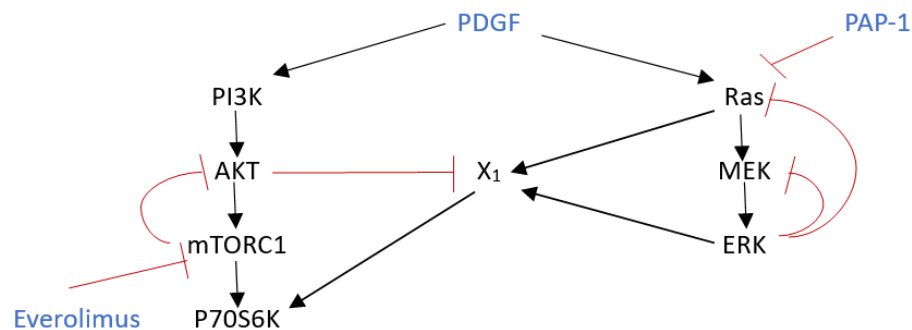


Figura 37: Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_0 .

Tiene sentido que aparezcan interacciones positivas entre la cascada MAPK/ERK y la nueva proteína que activa P70S6K, ya que de esta forma se consigue que la concentración final de P70S6K dependa directamente de el uso de PAP-1. En cuanto a la inhibición por parte de AKT se explica como un método para que el everolimus tenga mayor efecto, ya que al utilizar everolimus disminuye mTOR, lo que aumenta AKT por realimentación negativa. Al ser P70S6K estimulada también por X_1 , ya no es tan dependiente de mTOR, por lo que para que su actividad final siga dependiendo de esta molécula se añade este bucle de inhibición.

En cuanto al modelo W_a , en el que ya se incluye la activación de mTOR por ERK se observa que la proteína X_1 muestra unas interacciones repetitivas también. En este caso es activada por AKT e inhibe tanto a ERK como a MEK. La segunda proteína que activa este modelo no parece tan relevante, ya que igual que sucedía antes es muy variable. La representación gráfica se muestra en la Fig. 38.

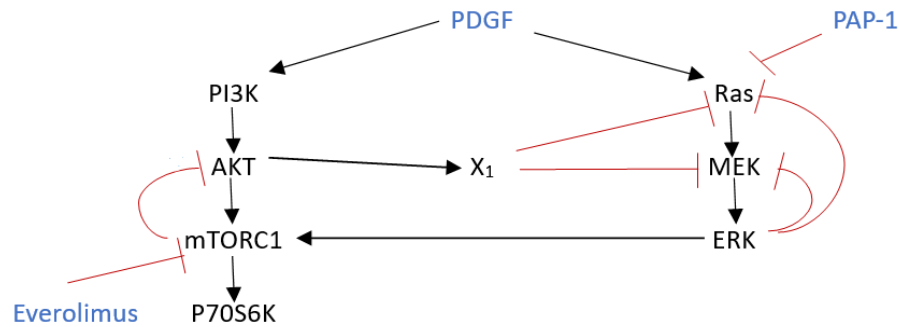


Figura 38: Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_a .

Se puede comprobar que se trata de una forma alternativa de obtener los mismos resultados que en el caso anterior, ya que mediante la activación por AKT (que será mayor en presencia de everolimus) se consigue una reducción en la otra vía de señalización, que consecuentemente provocará una disminución de P70S6K mediada por mTOR.

Poniendo atención a la tabla de resultados del modelo W_b se aprecia como es prácticamente idéntica a la de W_0 , por lo que se entiende que la inhibición de Ras y PI3K por P70S6K no tiene mucho efecto final si se aplica sobre este modelo.

Por último, en los modelos derivados del modelo W_c sí que parece intervenir dicha realimentación. Resulta claro que al menos PI3K o AKT han de activar la nueva molécula X_1 , en muchos casos además inhibida por mTOR (5 de los 10 primeros modelos, en tres de ellos no hay molécula b y en los dos restantes varía). X_1 a su vez inhibe MEK (9/10 ocasiones), ERK (7/10) o directamente P70S6K (4/10). Se representa el modelo en la Fig. 39.

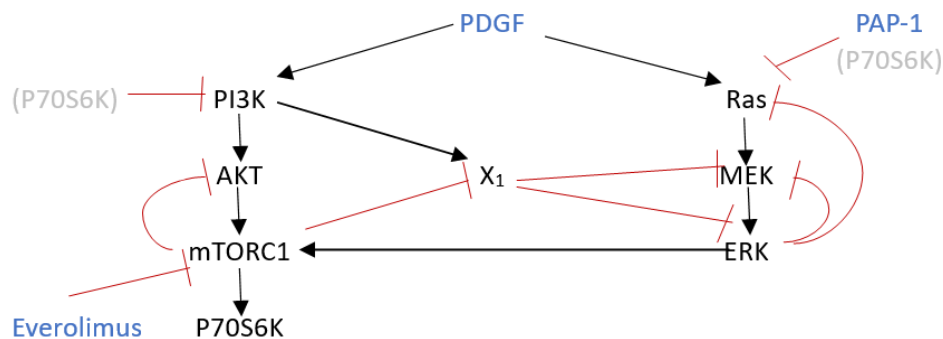


Figura 39: Esquema del mejor modelo obtenido desde el modelo inicial W_c . No se incluyen las flechas de realimentación negativa por P70S6K desde la propia molécula para no ensuciar el dibujo.

Es bastante parecido al que se obtiene para el modelo W_a , por lo que se acepta que el feedback generado por P70S6K no dota a los modelos de mayor grado de ajuste.

Una vez analizados los distintos tipos de modelos resultantes de la búsqueda exhaustiva, se comprueba que este método permite aproximar con bastante exactitud la salida del modelo bajo efecto de uno solo de los inhibidores. Sin embargo, ninguno de los modelos generados es capaz de conseguir que la respuesta ante ambos inhibidores sea similar a la control, ni tan siquiera que supere la respuesta a PAP-1 y a everolimus simultáneamente (Tabla 21). De hecho, más del 95 % del valor de la función de pérdidas se corresponde con la diferencia entre la salida del modelo para EV+PAP.

Una posible explicación podría ser que el output del modelo no sea el correcto, y que haya que buscar otro, utilizando la expresión de P70S6K como un estado intermedio entre las entradas y la salida del modelo.

Por otro lado, el problema puede ser que la interacción existente sea más complicada y no se puede modelar solo con una proteína intermedia con dos interacciones, sino que haya que utilizar varias proteínas encadenadas. Esto es un problema muy similar al denominado "problema XOR" que se presentó en los orígenes del diseño de redes neuronales artificiales y mantuvo el desarrollo de la tecnología del Deep Learning en pausa durante 17 años (Zhao, Deng y Wang 2002). Al contrario que las puertas AND y OR, una puerta XOR genera un espacio de salidas que no es linealmente separable (Fig. 40).

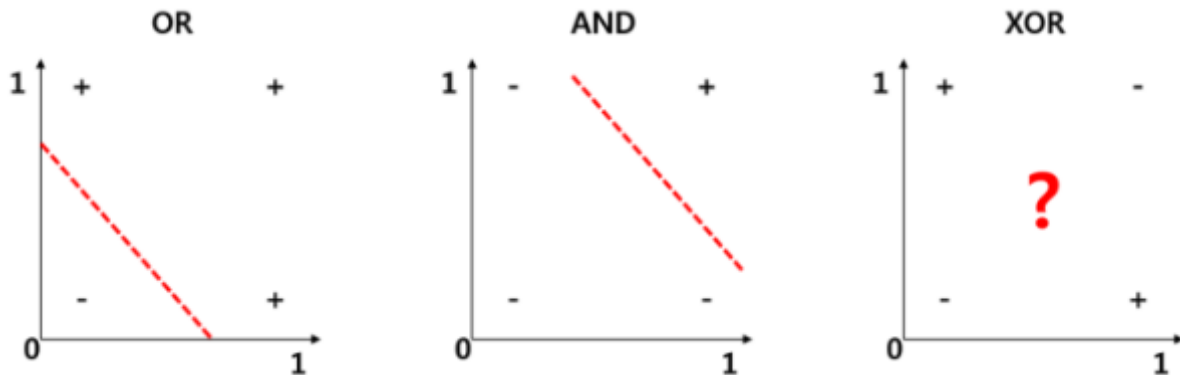


Figura 40: Representación del espacio de salida de diferentes funciones lógicas. Una puerta XOR presenta un espacio de salidas no separable linealmente.

Con una sola capa de neuronas se obtienen subespacios linealmente separables, por lo que en este caso no es posible separar las salidas de una función XOR mediante una única capa. La solución que se encontró a este problema fue añadir una segunda capa oculta, de forma que la salida final de la red se obtuviera a partir de un estado oculto producido directamente a través de las entradas. Asemejándolo con el problema a resolver en este TFG, la respuesta binaria de las células (proliferar vs no proliferar) se corresponde con la de una puerta XOR, siendo las variables de entrada PAP-1 y everolimus. Por tanto, parece lógico utilizar una segunda proteína para obtener la respuesta deseada.

6.2.5 Relación P70S6K y vía MAPK/ERK

Se observa como cuando no se utiliza ningún factor de crecimiento la expresión de P70S6K activa es muy baja, lo cual es coherente. Al utilizar PD98, la concentración también decae notablemente. Sin embargo, la respuesta de esta proteína a PAP-1 es más complicada de interpretar. En el primer cultivo celular (Fig. 28) la concentración de P70S6K se ve muy reducida tras la exposición a PAP-1, mientras que en el segundo (Fig. 29) se ve ligeramente aumentada y en el tercero (Fig. 30) se reduce aproximadamente un 40 %. Estos resultados no son concluyentes, ya que se trata de un tamaño muestral muy pequeño y

cada individuo tiene una respuesta distinta.

De este análisis se puede extraer la siguiente información. P70S6K es un buen output para relacionar las vías de AKT/mTOR y MAPK/ERK, ya que se ve disminuida cuando suprimimos cualquiera de las dos mediante el uso de everolimus o de PD98. Por el contrario, el uso de PAP-1 parece no afectar a esta molécula con la misma evidencia, pero no se puede afirmar con certeza ya que el tamaño muestral es muy pequeño y la dispersión de los datos se podría relacionar con otras variables. La diferencia entre el efecto de PAP-1 y PD98 en la actividad de P70S6K se puede deber a que ejerzan su acción a distinta altura en la vía de ERK. Por tanto, el comportamiento contradictorio observado en las células no se debe simplemente a la inhibición de la cascada de MAPK, sino en concreto al efecto de PAP-1, distinto al de otros inhibidores clásicos de esta vía como PD98.

6.2.6 Modelo 1: P70S6K como output

Las curvas dosis respuesta de el modelo 1 a everolimus (Fig. 31) y a PAP-1 (Fig. 32) presentan una relación negativa entre la salida del modelo y el efecto del fármaco. Sin embargo, cuando el efecto es máximo no se consigue que la salida sea suficientemente baja, sino que no llega a bajar del 90 % con respecto al control. Esto posiblemente se deba a que no se utilizan parámetros para ajustar el modelo, lo que ponderaría las interacciones entre cada par de proteínas y daría una salida más exacta.

Al fijarse en la respuesta de todas las variables del modelo a las diferentes condiciones de simulación (Fig. 33), se consigue por fin que la concentración final de P70S6K sea superior al utilizar dos inhibidores que al utilizarlos por separado, aunque por poca diferencia, posiblemente debido a la falta de ajuste del modelo, pero el comportamiento cualitativo es el correcto. El resto de proteínas siguen la conducta prevista. Por ejemplo, mTOR está activo solo en condiciones control, mientras que las proteínas de la vía ERK ven bajar su concentración cuando se aplica PAP-1. En cuanto a las nuevas proteínas introducidas, X_2 se comporta como se ha propuesto que lo haga a la hora de modelarlo, es decir, que solamente esté inactiva cuando se usan ambos inhibidores. Pero X_1 por otro lado no cumple exactamente su función, ya que aunque su actividad es máxima cuando actúan PAP-1 y everolimus, sigue teniendo bastante nivel de fosforilación basal en el resto de casos. Esto es lo que provoca que la salida del modelo (P70S6K) sea más elevada de lo que debería cuando se usan los inhibidores de forma independiente. Se podría solucionar ajustando las constantes de equilibrio de las reacciones o las concentraciones totales de determinadas especies, pero sería un ajuste individualizado demasiado artificial que iría en contra de la idea de simplificación de parámetros que se ha seguido durante este trabajo.

Partiendo de los resultados obtenidos con este modelo, la proteína X_1 implicada en el crosstalk entre ambas vías debe ser una proteína situada al principio de la vía de AKT/mTOR capaz de fosforilar P70S6K, y que se vea inhibida tanto por mTOR como por Ras. Se sugiere que dicha proteína sea PDK1.

6.2.7 Modelo 2: Diferente output

Al representar las curvas dosis respuesta del segundo modelo desarrollado frente a la variable EV (Fig. 34) y la variable PAP (Fig. 35) se observa como se trata de una relación negativa, a mayor valor de estas variables la respuesta del modelo es más baja. Además en este caso se llega a alcanzar una salida igual a cero cuando se utilizan valores muy elevados de los inhibidores, efecto que no se conseguía en el anterior modelo. La pendiente de la curva de everolimus es menos pronunciada que la curva de PAP-1, ya que hay un número mayor de moléculas intermedias entre mTOR y la salida final que entre Ras. Los valores de las variables que mejor adaptan el comportamiento observado en la realidad son 0.86 para EV y 0.96 para PAP, ya que es donde las curvas dosis respuesta toman dicho valor (0.5 y 0.4 respectivamente).

Al analizar la respuesta de todas las variables del modelo bajo las cuatro condiciones, se aprecia como las moléculas de la vía MAPK siguen el mismo patrón, viendo su expresión reducida cuando se aplica PAP, independientemente del uso o no de everolimus. PI3K no ve alterada su actividad bajo ningún supuesto, y AKT aumenta ligeramente ante el uso de everolimus debido a la disminución de la fuerza del bucle de inhibición por parte de mTOR, cuya concentración se reduce al aplicar este inhibidor. En cuanto a P70 y la proteína añadida al modelo X_1 , reflejan comportamientos complementarios, ya que es lo que se ha buscado. Ambas presentan una actividad similar para las condiciones de control y bajo efecto conjunto de los dos inhibidores, pero P70 aumenta su actividad ante la presencia de PAP y la disminuye en presencia de everolimus, mecanismo opuesto al que muestra X_1 . El valor de la variable de salida del modelo se adapta fielmente a la realidad, ya que es visiblemente mayor bajo efecto de ambos inhibidores que bajo el uso de ambos por separado.

En caso de que este segundo modelo sea correcto, habría que encontrar una proteína X_1 situada en la vía de MAPK/ERK cuya actividad se vea inhibida por PAP-1 y por mTOR, y que actúe de forma conjunta con P70S6K para contribuir a la proliferación y migración celular. Tras la revisión bibliográfica correspondiente, no se ha conseguido asociar dicha proteína con una existente.

6.3 Limitaciones

Durante el desarrollo de este TFG se ha utilizado una metodología que ha podido ocasionar ciertas limitaciones, corregibles en futuros trabajos. En primer lugar, la simplificación del modelo, tanto por la reducción de proteínas y reacciones intermedias, como por la omisión de parámetros, han podido alterar los resultados y provocar que no se correspondan con la realidad al ignorar interacciones que puedan ser relevantes pero no se han considerado como tal. En cuanto al planteamiento de las interacciones, se ha supuesto que PAP-1 bloquea la vía de señalización de ERK a nivel de Ras por afectar al canal de potasio Kv1.3, que es una proteína de membrana. Esto no está demostrado con certeza. Debido a que se ha considerado un espacio de búsqueda discreto (una interacción sucede o no sucede), el gradiente de la función de costes no existe y por tanto no se han podido utilizar técnicas de inteligencia artificial basadas en descenso del gradiente. En cuanto a los experimentos de laboratorio utilizados para obtener información natural, la técnica de Western Blot es una técnica que puede ser ruidosa y aporta información semicuantitativa. Esto sumado a la variabilidad biológica intersujeto causa que los datos de laboratorio sean difíciles de interpretar. Asimismo, en un principio solo se disponía de datos sobre la respuesta final celular, es decir, el comportamiento observable de las células. La falta de información acerca de concentraciones de ciertas proteínas de las cascadas de señalización ha generado que el espacio de búsqueda sea prácticamente ilimitado. Por otro lado, para la búsqueda por fuerza bruta sólo se ha considerado una proteína intermedia con un máximo de cuatro interacciones, debido al elevado tiempo de cómputo que otras alternativas supondrían. Un espacio de búsqueda mayor habría aportado más resultados. Por último, aunque los dos modelos que se han obtenido aplicando operaciones de álgebra de Boole compartan la respuesta apreciada en la realidad, existe la posibilidad de que el funcionamiento interno sea distinto, ya que se puede alcanzar el mismo resultado final mediante interacciones distintas más complejas y estos modelos se han diseñado de esta forma para que imiten el comportamiento real.

7 Grado de consecución de los objetivos. Conclusiones extraídas. Aportaciones ori- ginales. Líneas futuras de trabajo

7.1	Grado de consecución de los objetivos	77
7.2	Conclusiones extraídas	77
7.3	Aportaciones originales	78
7.4	Líneas futuras de trabajo	78
8	Bibliografía	80
A	Glosario de abreviaturas y acrónimos	87

7.1 Grado de consecución de los objetivos

Durante este TFG se ha desarrollado un modelo inicial para después ampliarlo introduciendo términos de interacción cruzada entre las dos cascadas que lo componen. La evaluación de los distintos modelos resultantes ha permitido cumplir con mayor o menor grado los objetivos expuestos en la sección 1.6 de este documento:

- I) Se ha realizado una búsqueda y revisión bibliográfica acerca de las vías de señalización AKT/mTOR y MAPK/ERK.
- II) Se ha completado la familiarización con el lenguaje de programación MATLAB, y comprendido y utilizado las funciones de resolución de ecuaciones diferenciales.
- III) Se han escogido las 7 moléculas con más relevancia del sistema que se han usado como variables del modelo.
- IV) Se ha definido un output del modelo, P70S6K, aunque se ha considerado otro para un modelo concreto a la espera de más datos.
- V) Se ha desarrollado un modelo principal sin crosstalk sobre el que comenzar a incluir interacciones.
- VI) Se han planteado dos formas de interacción entre ambas vías que permiten explicar el comportamiento del sistema.
- VII) Se ha definido cómo encontrar dichas interacciones mediante experimentos de laboratorio.
- VIII) Aún no se han comprobado estas interacciones en el laboratorio.
- IX) Por último, en base a este trabajo, se han establecido conclusiones, limitaciones y posibles líneas futuras.

7.2 Conclusiones extraídas

En base al análisis de los resultados discutidos anteriormente, durante este TFG se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La proteína P70S6K es un buen indicador del funcionamiento conjunto entre las vías de señalización de mTOR y ERK, ya que su actividad se ve reducida cuando cualquiera de estas se bloquea mediante el uso de inhibidores clásicos como everolimus y PAP-1.
2. El comportamiento observado en los cultivos de VSMC no se debe simplemente a la inhibición conjunta de ambas cascadas de señalización, sino al efecto de PAP-1 sobre el canal de potasio Kv1.3, que en este TFG se ha modelado como un efecto sobre Ras por ser la proteína que se encuentra al inicio de la cascada MAPK/ERK y por tanto más probabilidades tiene de estar en contacto con la membrana.
3. Se requieren al menos dos proteínas de crosstalk adicionales en el modelo para explicar el comportamiento que se da en las células en cultivo, de forma similar a la necesidad de utilizar al menos dos capas de neuronas en redes neuronales artificiales para resolver el problema XOR.
4. Se ha conseguido explicar mediante dos modelos distintos la interacción buscada entre ambas vías, uno en el que una proteína distinta de mTOR es capaz de fosforilar P70S6K bajo efecto de PAP-1 y everolimus; y otro en el que la salida del sistema se corresponde con la acción conjunta de P70S6K y una proteína de la vía de MAPK/ERK que se ve inhibida por mTOR.

5. El uso de modelos computacionales ha servido para centrar la búsqueda de la interacción causante del comportamiento del sistema, tratando así de reducir tanto el tiempo empleado como el coste de los experimentos necesarios.

7.3 Aportaciones originales

Aunque para el desarrollo de este TFG se parte de un modelo previamente descrito en la literatura (Arkun 2016), se realizan una serie de aportaciones originales que lo diferencian del existente. En primer lugar, la más evidente es la eliminación de parámetros y constantes del modelo para conseguir una respuesta cualitativa, ya que no interesa tanto la cantidad exacta como que su comportamiento imite al real. Además, se añaden ecuaciones al modelo para modelar sustratos de niveles inferiores de la vía AKT/mTOR y se eliminan bastantes ecuaciones de la vía MAPK/ERK por su redundancia. El método de búsqueda de interacciones discretas entre las dos cascadas de señalización mediante el análisis exhaustivo de todos los posibles modelos que cumplan ciertas condiciones se ha desarrollado de forma original. Se pudo llevar a cabo ya que no hacía falta adaptar las constantes de interacción, lo que hubiera supuesto una carga computacional demasiado elevada debido al gran número de modelos evaluados. Esto a su vez podría haber incrementado la posibilidad de que el ajuste del modelo sea falso, ya que tendría muchos grados de libertad.

7.4 Líneas futuras de trabajo

Se comenzarán describiendo las líneas futuras con respecto al desarrollo de modelos y su mejora. Una de las principales limitaciones se relaciona con la simplificación del modelo utilizado, donde se han reducido el número de elementos a tener en cuenta. Esta simplificación puede haber afectado los resultados al ignorar interacciones y procesos que podrían tener un impacto significativo en la dinámica celular. Por tanto, sería interesante explorar modelos más complejos y detallados que tengan en cuenta proteínas adicionales que han sido omitidas, como TSC o Raf. En cuanto a las estrategias de búsqueda utilizadas, se optó por una búsqueda exhaustiva limitada a una proteína intermedia y un número máximo de interacciones. Sin embargo, esto implica un compromiso entre la complejidad del modelo y el tiempo de cómputo necesario. En futuros trabajos, se podría considerar la utilización de distintos espacios de búsqueda, como incluir una segunda proteína intermedia o que cada proteína pueda tener más de cuatro interacciones, lo que potencialmente podría proponer nuevas interacciones y relaciones. Con el objetivo de poder validar la respuesta de estos modelos, sería conveniente contar con resultados de la expresión de proteínas de ambas cascadas de señalización, como mTOR y MEK.

Por otra parte, en cuanto a la validación de los modelos propuestos se presentan las siguientes líneas futuras. En primer lugar, realizar pruebas de Western Blot de la expresión de P70S6K bajo el efecto de PAP-1 en un número mayor de muestras permitiría corroborar si se trata del output correcto del modelo, o por el contrario hay que considerar otro. Esto ayudaría a elegir cual de los dos modelos propuestos sería el idóneo con el que continuar trabajando.

En caso de que el nivel de fosforilación de P70S6K sea menor con PAP-1, esta proteína se trataría del output indicado. Para confirmar o no la teoría de que la proteína de crosstalk implicada en este comportamiento sea PDK1, se propone medir su nivel de fosforilación mediante Western Blot bajo las cuatro condiciones distintas que se han establecido durante el trabajo (control, PAP-1, everolimus y PAP-1 + everolimus). Si lo simulado en el modelo es cierto, la concentración de esta proteína debería ser mayor cuando se combinan PAP-1 y everolimus que en el resto de casos, incluso en la situación control sin inhibidores.

Si por el contrario el nivel de fosforilación de P70S6K es mayor al incubar con PAP-1, habría que medir el nivel de actividad de los sustratos de ERK y comprobar si hay alguno cuya actividad aumente al utilizar everolimus, ya que esto indicaría que es inhibido por mTOR y se correspondería con la proteína X_1 propuesta, que junto con P70S6K funcionan como una puerta lógica AND para dar lugar a la respuesta celular.

8 Bibliografía

- [1] Rana Anjum y John Blenis. «The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008 9:10 9.10 (oct. de 2008), págs. 747-758. ISSN: 1471-0080. DOI: 10.1038/nrm2509.
- [2] Jiro Aoki y Kengo Tanabe. «Mechanisms of drug-eluting stent restenosis». En: *Cardiovascular Intervention and Therapeutics* 36.1 (ene. de 2021), págs. 23-29. ISSN: 18684297. DOI: 10.1007/s12928-020-00734-7/METRICS.
- [3] Claudia Arena et al. «Everolimus therapy and side-effects: A systematic review and meta-analysis». En: *International Journal of Oncology* 59.1 (jul. de 2021), págs. 1-9. ISSN: 17912423. DOI: 10.3892/IJO.2021.5234/HTML.
- [4] Yaman Arkun. «Dynamic Modeling and Analysis of the Cross-Talk between Insulin/AKT and MAPK/ERK Signaling Pathways». En: *PLOS ONE* 11.3 (mar. de 2016), e0149684. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0149684.
- [5] Mohamed Asrih et al. «Role of ERK1/2 activation in microtubule stabilization and glucose transport in cardiomyocytes». En: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 301.5 (nov. de 2011), págs. 836-843. ISSN: 01931849. DOI: 10.1152/AJPENDO.00160.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10101163420006.JPEG.
- [6] Winfried Auzinger y Wolfgang Herfort. «A uniform quantitative stiff stability estimate for BDF schemes». En: *Opuscula Mathematica* (feb. de 2014).
- [7] Issam Ben-Sahra y Brendan D. Manning. «mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth». En: *Current Opinion in Cell Biology* 45 (abr. de 2017), págs. 72-82. ISSN: 0955-0674. DOI: 10.1016/J.CEB.2017.02.012.
- [8] Teri G. Boulton et al. «ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF». En: *Cell* 65.4 (mayo de 1991), págs. 663-675. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90098-J.
- [9] Annette K. Brenner, Tor Henrik Andersson Tvedt y Øystein Bruserud. «The Complexity of Targeting PI3K-Akt-mTOR Signalling in Human Acute Myeloid Leukaemia: The Importance of Leukemic Cell Heterogeneity, Neighbouring Mesenchymal Stem Cells and Immunocompetent Cells». En: *Molecules* 2016, Vol. 21, Page 1512 21.11 (nov. de 2016), pág. 1512. ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/MOLECULES21111512.
- [10] Anne Brunet et al. «Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor». En: *Cell* 96.6 (mar. de 1999), págs. 857-868. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
- [11] Richard L. Burden, J. Douglas Faires y Annette M. Burden. *Numerical Analysis*. Cengage Learning, 2016.
- [12] Mauricio Burotto et al. «The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective». En: *Cancer* 120.22 (nov. de 2014), págs. 3446-3456. ISSN: 1097-0142. DOI: 10.1002/CNCR.28864.
- [13] J.C. Butcher. *Numerical methods for ordinary differential equations*. John Wiley & Sons, 2008.
- [14] Arkaitz Carracedo et al. «Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer». En: *The Journal of Clinical Investigation* 118.9 (sep. de 2008), págs. 3065-3074. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI34739.

- [15] Esther Castellano y Julian Downward. «RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway». En: *Genes & Cancer* 2.3 (mayo de 2011), págs. 261-274. ISSN: 19476027. DOI: 10.1177/1947601911408079.
- [16] Christopher J. Caunt et al. «MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road». En: *Nature Reviews Cancer* 2015 15:10 15.10 (sep. de 2015), págs. 577-592. ISSN: 1474-1768. DOI: 10.1038/nrc4000.
- [17] Alex Cheong et al. «Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by KV1.3 channel blockers». En: *Cardiovascular Research* 89.2 (feb. de 2011), pág. 282. ISSN: 00086363. DOI: 10.1093/CVR/CVQ305.
- [18] Jude Chukwura e Ibebuike Chinenye Jecinta. «A Review of Techniques for Regularization». En: *International Journal of Research in Engineering and Science (IJRES)* ISSN 11 (2023), págs. 360-367.
- [19] Pilar Ciudad et al. «Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway». En: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467.8 (ago. de 2015), págs. 1711-1722. ISSN: 1432-2013. DOI: 10.1007/S00424-014-1607-Y.
- [20] D. A. Clayton. «Replication and Transcription of Vertebrate Mitochondrial DNA». En: *Cell Biology* 7 (nov. de 2003), págs. 453-478. ISSN: 07434634. DOI: 10.1146/ANNUREV.CB.07.110191.002321.
- [21] Ana Cuadrado y Angel R. Nebreda. «Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling». En: *Biochemical Journal* 429.3 (ago. de 2010), págs. 403-417. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20100323.
- [22] Shixiu Cui et al. «Multilayer Genetic Circuits for Dynamic Regulation of Metabolic Pathways». En: *ACS synthetic biology* 10.7 (jul. de 2021), págs. 1587-1597. ISSN: 2161-5063. DOI: 10.1021/ACSSYNBIO.1C00073.
- [23] Antonio Curcio, Daniele Torella y Ciro Indolfi. «Mechanisms of Smooth Muscle Cell Proliferation and Endothelial Regeneration After Vascular Injury and Stenting – Approach to Therapy →». En: *Circulation Journal* 75.6 (jun. de 2011), págs. 1287-1296. ISSN: 1346-9843. DOI: 10.1253/CIRCJ.CJ-11-0366.
- [24] Sandeep Robert Datta, Anne Brunet y Michael E. Greenberg. «Cellular survival: a play in three Acts». En: *Genes & development* 13.22 (1999), págs. 2905-2927. ISSN: 0890-9369. DOI: 10.1101/GAD.13.22.2905.
- [25] *Discovery of DNA Double Helix: Watson and Crick | Learn Science at Scitable*. URL: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397/> (visitado 07-06-2023).
- [26] Scott T. Eblen. «Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes». En: *Advances in Cancer Research* 138 (ene. de 2018), págs. 99-142. ISSN: 0065-230X. DOI: 10.1016/BS.ACR.2018.02.004.
- [27] C. H. Edwards y D. E. Penney. *Differential Equations and Boundary Value Problems: Computing and Modeling - Charles Henry Edwards, David E. Penney - Google Libros*. Pearson, 2014.
- [28] Wenxiang Fu y Michael N. Hall. «Regulation of mTORC2 Signaling». En: *Genes* 2020, Vol. 11, Page 1045 11.9 (sep. de 2020), pág. 1045. ISSN: 2073-4425. DOI: 10.3390/GENES11091045.

- [29] Shirish M. Gadgeel y Antoinette Wozniak. «Preclinical Rationale for PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors as Therapy for Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer». En: *Clinical Lung Cancer* 14.4 (jul. de 2013), págs. 322-332. ISSN: 1525-7304. DOI: 10.1016/J.CLLC.2012.12.001.
- [30] Martin J Gander y Gerhard Wanner. «Exact BDF stability angles with maple». En: *BIT Numerical Mathematics* 60.3 (2020), págs. 615-617.
- [31] Milad Ghomlaghi, Anthony Hart et al. «Feedback, crosstalk and competition: Ingredients for emergent non-linear behaviour in the pi3k/mTOR signalling network». En: *International Journal of Molecular Sciences* 22.13 (jul. de 2021), pág. 6944. ISSN: 14220067. DOI: 10.3390/IJMS22136944/S1.
- [32] Milad Ghomlaghi, Guang Yang et al. «Dynamic modelling of the PI3K/mTOR signalling network uncovers biphasic dependence of mTORC1 activation on the mTORC2 subunit Sin1». En: *Computational Biology* (sep. de 2021). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1008513.
- [33] Rachel Green y Harry F. Noller. «RIBOSOMES AND TRANSLATION». En: *Biochemistry* 66 (nov. de 2003), págs. 679-716. ISSN: 00225282. DOI: 10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.66.1.679.
- [34] Angel Guerrero-Zotano, Ingrid A. Mayer y Carlos L. Arteaga. «PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment». En: *Cancer and Metastasis Reviews* 35.4 (dic. de 2016), págs. 515-524. ISSN: 15737233. DOI: 10.1007/S10555-016-9637-X/TABLES/2.
- [35] Yan-Jun Guo et al. «ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review)». En: *Experimental and Therapeutic Medicine* 19.3 (mar. de 2020), págs. 1997-2007. ISSN: 1792-0981. DOI: 10.3892/ETM.2020.8454.
- [36] Ernst Hairer, Syvert P. Nørsett y Gerhard Wanner. *Solving Ordinary Differential Equations I: Nonstiff Problems*. 2nd. Berlin: Springer-Verlag, 1993. ISBN: 978-3-540-56670-0.
- [37] Ernst Hairer y Gerhard Wanner. *Solving Ordinary Differential Equations II: Stiff and Differential-Algebraic Problems*. 2nd. Berlin: Springer-Verlag, 1996. ISBN: 978-3-540-56670-0.
- [38] Felix Hausch et al. «FKBPs and the Akt/mTOR pathway». En: *Cell Cycle* 12.15 (ago. de 2013), pág. 2366. ISSN: 15514005. DOI: 10.4161/CC.25508.
- [39] M. Hibi et al. «Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain». En: *Genes & development* 7.11 (1993), págs. 2135-2148. ISSN: 0890-9369. DOI: 10.1101/GAD.7.11.2135.
- [40] Jorrit J. Hornberg et al. «Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters». En: *Oncogene* 24.36 (ago. de 2005), págs. 5533-5542. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/SJ.ONC.1208817.
- [41] Sean J. Humphrey, David E. James y Matthias Mann. «Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation». En: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26.12 (dic. de 2015), págs. 676-687. ISSN: 1043-2760. DOI: 10.1016/J.TEM.2015.09.013.
- [42] Yoshihiro Iijima et al. «c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells». En: *Journal of Biological Chemistry* 277.25 (jun. de 2002), págs. 23065-23075. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M200328200.
- [43] *Implementation of Boolean Functions using Logic Gates | NAND, NOR*. URL: <https://www.electronicshub.org/implementation-of-boolean-functions-using-logic-gates/> (visitado 18-05-2023).

- [44] *Insulin Signaling and RTK: An Overview - Assay Genie*. URL: <https://www.assaygenie.com/blog/insulin-signaling-and-rtk> (visitado 01-06-2023).
- [45] Estela Jacinto et al. «Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive». En: *Nature cell biology* 6.11 (nov. de 2004), págs. 1122-1128. ISSN: 1465-7392. DOI: 10.1038/NCB1183.
- [46] Laura Jiménez-Pérez et al. «Molecular Determinants of Kv1.3 Potassium Channels-induced Proliferation». En: *The Journal of biological chemistry* 291.7 (feb. de 2016), págs. 3569-3580. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/JBC.M115.678995.
- [47] Gary L. Johnson y Razvan Lapadat. «Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases». En: *Science* 298.5600 (2002), págs. 1911-1912.
- [48] Alison L. Kearney et al. «Serine 474 phosphorylation is essential for maximal Akt2 kinase activity in adipocytes». En: *Journal of Biological Chemistry* 294.45 (nov. de 2019), págs. 16729-16739. ISSN: 1083351X. DOI: 10.1074/JBC.RA119.010036/ATTACHMENT/DC64B827-9D40-472E-AA79-EB5784C65098/MMC1.ZIP.
- [49] L. C. Kim, R. S. Cook y J. Chen. «mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment». En: *Oncogene* 2017 36:16 36.16 (oct. de 2016), págs. 2191-2201. ISSN: 1476-5594. DOI: 10.1038/onc.2016.363.
- [50] Thomas Knight y Julie Anne Elizabeth Irving. «Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting». En: *Frontiers in Oncology* 4 JUN (jun. de 2014), pág. 160. ISSN: 2234943X. DOI: 10.3389/FONC.2014.00160/BIBTEX.
- [51] Aimee D. Kohn et al. «Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation». En: *The Journal of biological chemistry* 271.49 (1996), págs. 31372-31378. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/JBC.271.49.31372.
- [52] Michiaki Kohno y Jacques Pouyssegur. «Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy». En: <https://doi.org/10.1080/07853890600551037> 38.3 (mayo de 2009), págs. 200-211. ISSN: 07853890. DOI: 10.1080/07853890600551037.
- [53] Qie Kuang, Pasi Purhonen y Hans Hebert. «Structure of potassium channels». En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 72.19 (oct. de 2015), pág. 3677. ISSN: 14209071. DOI: 10.1007/S00018-015-1948-5.
- [54] David Lake, Sonia A.L. Corrêa y Jürgen Müller. «Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway». En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 73.23 (jun. de 2016), pág. 4397. ISSN: 14209071. DOI: 10.1007/S00018-016-2297-8.
- [55] Florian Lang, Agnes Görlach y Volker Vallon. «Targeting SGK1 in diabetes». En: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 13.11 (nov. de 2009), págs. 1303-1311. ISSN: 14728222. DOI: 10.1517/14728220903260807.
- [56] Mathieu Laplante y David M. Sabatini. «mTOR Signaling in Growth Control and Disease». En: *Cell* 149.2 (2012), págs. 274-293.
- [57] Jason A. Lehman y Julian Gomez-Cambronero. «MOLECULAR CROSSTALK BETWEEN p70S6K AND MAPK CELL SIGNALING PATHWAYS». En: *Biochemical and biophysical research communications* 293.1 (abr. de 2002), pág. 463. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00238-3.
- [58] Randall J. LeVeque. *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*. Siam, 2007.

- [59] Yang Liu et al. «Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling». En: *Oncotarget* 7.26 (jun. de 2016), pág. 40148. ISSN: 19492553. DOI: 10.18632/oncotarget.9512.
- [60] Li Ma et al. «Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis». En: *Cell* 121.2 (abr. de 2005), págs. 179-193. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.031.
- [61] Ryan C. Maloney et al. «The mechanism of activation of MEK1 by B-Raf and KSR1». En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022 79:5 79.5 (mayo de 2022), págs. 1-21. ISSN: 1420-9071. DOI: 10.1007/s00018-022-04296-0.
- [62] Brendan D. Manning y Lewis C. Cantley. «AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream». En: *Cell* 129.7 (jun. de 2007), págs. 1261-1274. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- [63] Francesco Marampon, Carmela Ciccarelli y Bianca Maria Zani. «Biological Rationale for Targeting MEK/ERK Pathways in Anti-Cancer Therapy and to Potentiate Tumour Responses to Radiation». En: *International Journal of Molecular Sciences* 20.10 (mayo de 2019). ISSN: 14220067. DOI: 10.3390/ijms20102530.
- [64] MathWorks. *ode15s - MATLAB*. <https://es.mathworks.com/help/matlab/ref/ode15s.html>. 2023.
- [65] *MATLAB*. <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>. Accedido el 22 de mayo de 2023. 2023.
- [66] Dawn R. Mattoon et al. «The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway». En: *BMC biology* 2 (nov. de 2004). ISSN: 1741-7007. DOI: 10.1186/1741-7007-2-24.
- [67] Elliott Mendelson. *Boolean Algebra and Switching Circuits: Volume 38*. Courier Corporation, 1997.
- [68] Daniela Miricescu et al. «PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects». En: *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 173 22.1 (dic. de 2020), pág. 173. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms22010173.
- [69] Karin Moelling et al. «Regulation of Raf-Akt Cross-talk». En: *The Journal of biological chemistry* 277.34 (ago. de 2002), págs. 31099-31106. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M111974200.
- [70] Issam D. Moussa et al. «Trends and Outcomes of Restenosis After Coronary Stent Implantation in the United States». En: *Journal of the American College of Cardiology* 76.13 (sep. de 2020), págs. 1521-1531. ISSN: 15583597. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.08.002.
- [71] Radha Mukherjee et al. «Regulation of PTEN translation by PI3K signaling maintains pathway homeostasis». En: *Molecular Cell* 81.4 (feb. de 2021), 708-723.e5. ISSN: 1097-2765. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.01.033.
- [72] Hossein Nazari et al. «Angiotensin II inhibits insulin-induced actin stress fiber formation and glucose uptake via ERK1/2». En: *The journal of medical investigation : JMI* 54.1-2 (feb. de 2007), págs. 19-27. ISSN: 1343-1420. DOI: 10.2152/jmi.54.19.
- [73] Satoko Nishimoto y Eisuke Nishida. «MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2». En: *EMBO Reports* 7.8 (ago. de 2006), pág. 782. ISSN: 1469221X. DOI: 10.1038/sj.embor.7400755.

- [74] Cora O'Neill. «PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease». En: *Experimental Gerontology* 48.7 (jul. de 2013), págs. 647-653. ISSN: 0531-5565. DOI: 10.1016/J.EXGER.2013.02.025.
- [75] Christine A. Orengo, Annabel E. Todd y Janet M. Thornton. «From protein structure to function». En: *Current Opinion in Structural Biology* 9.3 (jun. de 1999), págs. 374-382. ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/S0959-440X(99)80051-7.
- [76] Gavin Y. Oudit y Josef M. Penninger. «Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN». En: *Cardiovascular Research* 82.2 (mayo de 2009), págs. 250-260. ISSN: 0008-6363. DOI: 10.1093/CVR/CVP014.
- [77] Liang Qiao et al. «Bistability and Oscillations in the Huang-Ferrell Model of MAPK Signaling». En: *PLOS Computational Biology* 3.9 (2007), e184. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/JOURNAL.PCBI.0030184.
- [78] Alfio Quarteroni, Riccardo Sacco y Fausto Saleri. *Numerical Mathematics*. Springer, 2014.
- [79] Robert Roskoski. «MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation». En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417.1 (ene. de 2012), págs. 5-10. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/J.BBRC.2011.11.145.
- [80] Timothy Sauer. *Numerical Analysis*. Pearson Education, 2006.
- [81] Robert A. Saxton y David M. Sabatini. «mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease». En: *Cell* 168.6 (mar. de 2017), págs. 960-976. ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/J.CELL.2017.02.004.
- [82] Alexander Schmitz et al. «Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases». En: *Molecular pharmacology* 68.5 (nov. de 2005), págs. 1254-1270. ISSN: 0026-895X. DOI: 10.1124/MOL.105.015669.
- [83] L. F. Shampine y M. W. Reichelt. «The MATLAB ODE Suite». En: *SIAM Journal on Scientific Computing* 18 (1997), págs. 1-22.
- [84] L. F. Shampine, M. W. Reichelt y J.A. Kierzenka. «Solving Index-1 DAEs in MATLAB and Simulink». En: *SIAM Review* 41 (1999), págs. 538-552.
- [85] Mitsugu Shimobayashi y Michael N. Hall. «Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 15:3 15.3 (feb. de 2014), págs. 155-162. ISSN: 1471-0080. DOI: 10.1038/nrm3757.
- [86] Masahiro Shin et al. «Vegfa signals through ERK to promote angiogenesis, but not artery differentiation». En: *Development (Cambridge)* 143.20 (oct. de 2016), págs. 3796-3805. ISSN: 14779129. DOI: 10.1242/DEV.137919/264114/AM/VEGFA-SIGNALS-THROUGH-ERK-TO-PROMOTE-ANGIOGENESIS.
- [87] John C. Strikwerda. *Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations*. Siam, 2007.
- [88] Faye L. Styles et al. «Kv1.3 voltage-gated potassium channels link cellular respiration to proliferation through a non-conducting mechanism». En: *Cell Death & Disease* 2021 12:4 12.4 (abr. de 2021), págs. 1-14. ISSN: 2041-4889. DOI: 10.1038/s41419-021-03627-6.
- [89] E. Suli y D.F. Mayers. *An introduction to numerical analysis*. Cambridge University Press, 2003.
- [90] Elizabeth M. Terrell y Deborah K. Morrison. «Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases». En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 9.1 (ene. de 2019). ISSN: 21571422. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A033746.

-
- [91] Joseph R. Testa y Philip N. Tsichlis. «AKT signaling in normal and malignant cells». En: *Oncogene* 2005 24:50 24.50 (nov. de 2005), págs. 7391-7393. ISSN: 1476-5594. DOI: 10.1038/sj.onc.1209100.
- [92] Harry Towbin, Theophil Staehelin y Jeffrey Gordon. «Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.» En: (1979).
- [93] Heba Wassif y Frederick G.P. Welt. «Restenosis». En: *SCAI Interventional Cardiology Board Review: Second Edition* (feb. de 2023), págs. 10-15. ISSN: 1941-7640. DOI: 10.3109/9780203213810-14.
- [94] Zhang Wei y Hui Tu Liu. «MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells». En: *Cell Research* 2002 12:1 12.1 (2002), págs. 9-18. ISSN: 1748-7838. DOI: 10.1038/sj.cr.7290105.
- [95] Guang Yang et al. «A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation». En: *Cell Reports* 12.6 (ago. de 2015), págs. 937-943. ISSN: 2211-1247. DOI: 10.1016/J.CELREP.2015.07.016.
- [96] Sufang Yang y Guohua Liu. «Targeting the RAS/RAF/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma». En: *Oncology Letters* 13.3 (mar. de 2017), págs. 1041-1047. ISSN: 17921082. DOI: 10.3892/OL.2017.5557/HTML.
- [97] Yancun Yin et al. «mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR». En: *Cell Research* 2016 26:1 26.1 (nov. de 2015), págs. 46-65. ISSN: 1748-7838. DOI: 10.1038/cr.2015.133.
- [98] Jason S.L. Yu y Wei Cui. «Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination». En: *Development* 143.17 (sep. de 2016), págs. 3050-3060. ISSN: 0950-1991. DOI: 10.1242/DEV.137075.
- [99] Yanling Zhao, Bimin Deng y Zhanrong Wang. «Analysis and study of perceptron to solve XOR problem». En: *Proceedings - 2nd International Workshop on Autonomous Decentralized System, IWADS 2002* (2002), págs. 168-173. DOI: 10.1109/IWADS.2002.1194667.
- [100] Sven Zimmermann y Karin Moelling. «Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)». En: *Science (New York, N.Y.)* 286.5445 (nov. de 1999), págs. 1741-1744. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/SCIENCE.286.5445.1741.

A Glosario de abreviaturas y acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
AKT	Proteína quinasa B.
AMPK	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BDF	<i>Backward Differentiation Formula.</i>
COLMAH	Colección de Muestras Arteriales Humanas.
DAPK	Proteína Quinasa Asociada a la Muerte.
Dominio FRB	Dominio de unión a FKBP-rapamicina.
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico.
ERK	Quinasa Regulada por señal Extracelular.
FBS	Suero Fetal Bovino.
Fbw8	<i>E3-ligase F-box/WD repeat-containing protein 8.</i>
FKBP	Proteína de unión a FK506.
FOXO	<i>Forkhead box transcription factor.</i>
GAB1	<i>GRB2-associated-binding protein 1.</i>
GDP	Guanosín difosfato.
Grb2	Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento.
GTP	Guanosín trifosfato.
IGF	Factor de Crecimiento similar a la Insulina.
IRS1	Receptor de Insulina 1.
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1.
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal.
MAP2K	MAPK Quinasa.
MAP3K	MAPK Quinasa Quinasa.
MAP4K	MAPK Quinasa Quinasa Quinasa.
MAPK	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos.

MAPKAPK	Proteína Quinasa activada por MAPK.
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos.
MEK	MAPK/ERK Quinasa.
MEM	<i>Minimun Essential Medium.</i>
mLST8	Proteína Letal 8 de mamíferos con SEC13.
mSin1	<i>Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1.</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin.</i>
mTORC1	Complejo mTOR 1.
mTORC2	Complejo mTOR 2.
ODE	Ecuación Diferencial Ordinaria.
PAP-1	5-(4-fenoxibutoxi)psoraleno.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato.
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PDK1	Quinasa dependiente de 3-fosfoinositida 1.
pERK	Quinasa Regulada por señal Extracelular activada.
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase.</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa.
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato.
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato.
PKC-α	Proteína quinasa C- α .
PP2A	Protein fosfatasa 2A.
PRAS40	Sustrato de AKT Rico en Prolina de 40 kDa.
protor1/2	Proteína observada con rictor 1 y 2.
RBD	Dominio de unión a Ras.
RHEB	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro.
RTK	Receptor tirosina quinasa.
S6K	Ribosoma S6 Quinasa.
SGK1	Proteína quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1.
SOS	<i>Son of Sevenless.</i>
TFG	Trabajo Fin de Grado.

TSC1/2	Complejo de esclerosis tuberosa 1 y 2.
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.
VSMC	Células Musculares Lisas Vasculares.