

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

---

**Modelado booleano y simulación de redes moleculares  
regulatorias del TGF- $\beta$  en la metástasis ósea de cáncer de  
mama**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Erick Eduardo Martínez Acosta**

Ensenada, Baja California, México  
2019

Tesis defendida por

**Erick Eduardo Martínez Acosta**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Israel Marck Martínez Pérez**  
Codirector de tesis

**Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**

**Dr. Salvador Villarreal Reyes**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Erick Eduardo Martínez Acosta © 2019*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y directores de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Erick Eduardo Martínez Acosta** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

### **Modelado booleano y simulación de redes moleculares regulatorias del TGF- $\beta$ en la metástasis ósea de cáncer de mama**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Israel Marck Martínez Pérez**  
Codirector de tesis

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte a nivel global, la mayoría de estas muertes se atribuyen a la metástasis. Los cánceres que realizan metástasis al hueso con mayor frecuencia son el cáncer de mama, de próstata y de pulmón. El factor de crecimiento y transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina con un papel principal en el establecimiento y progresión de éstos cánceres. El TGF- $\beta$  es un factor dual, en etapas tempranas inhibe la formación del cáncer, mientras que, en etapas avanzadas del cáncer, promueve la metástasis a través de su habilidad de regular procesos como las vías de señalización que regulan la metástasis hacia el hueso. Otros factores como IL-6, IL-8, IL-11, y PTHrP también favorecen la metástasis ósea y contribuyen al desbalance de la remodelación del hueso incrementando la resorción ósea, en lo que se conoce como ciclo vicioso. Si bien el conocimiento actual de la enfermedad se ha generado mediante la investigación experimental, el uso de modelos y simulación computacional es una herramienta muy valiosa para extender y complementar la investigación en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Por lo anterior, se propone el uso de modelos booleanos y simulación *in silico* para analizar la dinámica molecular del cáncer de mama metastásico de hueso y su interacción con la remodelación del hueso. Este trabajo está basado en trabajos reportados en los últimos años, en el área de metástasis ósea cáncer de mama, TGF- $\beta$ , entre otras moléculas, para la posterior construcción del modelo booleano. Se implementaron los *softwares* de simulación GINsim, Logic.Ly y BoolNet. Obteniéndose un modelo que simula el comportamiento del sistema asociado a la remodelación ósea, y la osteólisis causada por el efecto de factores osteolíticos en el hueso asociados al cáncer de mama metastásico al hueso. Finalmente, se realizó una validación computacional del modelo, inhibiendo PTHrP en el modelo booleano emulando lo que ocurre en estudios celulares al inhibir la producción de esta molécula. Nuestros resultados muestran que nuestro modelo es consistente con los resultados esperados y es un primer acercamiento a la representación booleana de esta enfermedad. Se requiere de estudios futuros para enriquecer este modelo integrando más literatura que permita tener un modelo más robusto y predictivo.

**Palabras clave:** Cáncer de mama, Metástasis ósea, Simulación, Computacional, Modelo booleano

Abstract of the thesis presented by **Erick Eduardo Martínez Acosta** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

**Boolean modeling and simulation of molecular regulatory networks of TGF- $\beta$  in breast cancer bone metastasis**

Abstract approved by:

---

**PhD. Patricia Juárez Camacho**

Thesis codirector

---

**PhD. Israel Marck Martínez Pérez**

Thesis codirector

Breast cancer is one of the leading causes of death globally, most of these deaths are attributed to metastasis. The cancers that perform bone metastases most often are breast, prostate and lung cancer. The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a cytokine with a major role in the establishment and progression of these cancers. TGF- $\beta$  is a dual factor, in early stages it inhibits the formation of cancer, while, in advanced stages of cancer, it promotes metastasis through its ability to regulate processes such as signaling pathways that regulate bone metastasis. Other factors such as IL-6, IL-8, IL-11, and PTHrP also favor bone metastasis and contribute to the imbalance of bone remodeling by increasing bone resorption, in what is known as the vicious cycle. Although current knowledge of the disease has been generated through experimental research, the use of models and computational simulation is a very valuable tool to extend and complement research in the search for new therapeutic targets. Therefore, the use of Boolean models and in silico simulation is proposed to analyze the molecular dynamics of metastatic bone breast cancer and its interaction with bone remodeling. This work is based on work reported in recent years, in the area of breast cancer bone metastasis, TGF- $\beta$ , among other molecules, for the subsequent construction of the boolean model. Simulation software GINsim, Logic.Ly and BoolNet were implemented. Obtaining a model that simulates the behavior of the system associated with bone remodeling, and the osteolysis caused by the effect of osteolytic factors in the bone associated with metastatic breast cancer to the bone. Finally, a computational validation of the model was performed, inhibiting PTHrP in the Boolean model emulating what happens in cell studies by inhibiting the production of this molecule. Our results show that our model is consistent with the expected results and is a first approach to the Boolean representation of this disease. Future studies are required to enrich this model by integrating more literature that allows for a more robust and predictive model.

**Keywords: Breast cancer, Bone metastasis, Simulation, Computational, Boolean model**

## **Dedicatoria**

*El esfuerzo de realizar este trabajo de superación profesional se lo dedico a mi madre. La culminación de esta etapa en mi vida fue impulsada principalmente por su amor y confianza en mí.*

*A mi padre que siempre estuvo al tanto de mí progreso y dedicó su tiempo y atención por genuinamente comprender mi trabajo. Gracias por creer en lo que hago.*

*A mi hermano Carlos que siempre ha estado presente cuando lo he necesitado. Te quiero mucho hermano.*

## Agradecimientos

*Agradezco a mis co-tutores la Dra. Patricia Juárez y el Dr. Israel Martínez por guiarme en el desarrollo de este trabajo que me ha formado académica y personalmente. A mis sinodales el Dr. Pierrick Fournier, Dr. Carlos Brizuela y Dr. Salvador Villarreal, por sus aportes intelectuales. Agradezco a todo el comité por su tiempo y aceptar el reto multidisciplinario que supone la biología de sistemas.*

*A mis compañeros de generación por el apoyo moral y académico. A los ecólogos, los nanos, los micros y biomédicos. En especial a Edith, María, Chantal, Vareska, Edgardo, Juan C., Lalo e Iván. Sin ustedes la maestría no tendría color.*

*A mis compañeros del grupo P&P, por el apoyo en las exposiciones, por escucharme con atención y permitirme ser parte del todo. Por esas mañanas de donas, café y ciencia.*

*Quiero agradecer de todo corazón a mi mejor amiga Cindy, por estar presente en todas las etapas de mi formación como maestro, por ser un apoyo incondicional y escuchar mis exposiciones miles de veces.*

*Agradezco a CICESE por aceptarme como estudiante. Al Posgrado en Ciencias de la Vida, particularmente al Departamento de Innovación Biomédica por brindarme las herramientas y el ambiente adecuado para la realización de mi Maestría en Ciencias. Agradezco a CONACYT por la beca de manutención con el número de registro 685105.*

## Tabla de contenido

Resumen en inglés .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes .....	4
1.1.1. Conceptos biológicos.....	4
1.1.1.1. El Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	4
1.1.1.1.1. Función general y estructura del TGF- $\beta$ .....	4
1.1.1.1.2. Receptores del TGF- $\beta$ .....	5
1.1.1.1.3. Inhibidores del TGF- $\beta$ .....	6
1.1.1.1.3.1. Inhibición por I-Smads.....	6
1.1.1.1.3.2. Inhibición por vía de Erk MAP quinasa.....	6
1.1.1.1.3.3. Inhibición por co-represor transcripcional.....	6
1.1.1.1.3.4. Degradación de Smads.....	7
1.1.1.1.4. Vía canónica (proteínas SMAD).....	7
1.1.1.2. Cáncer.....	8
1.1.1.2.1. Metástasis .....	9
1.1.1.2.1.1. Metástasis ósea.....	9
1.1.1.2.1.2. Vías de señalización en la metástasis ósea .....	9
1.1.1.2.1.3. TGF- $\beta$ y metástasis de hueso .....	10
1.1.1.2.1.4. Ciclo vicioso .....	10
1.1.2. Modelado de sistemas biológicos .....	12
1.1.2.1. Modelo .....	12
1.1.2.2. Constantes, parámetros y variables .....	12
1.1.2.3. Condiciones iniciales .....	13
1.1.2.4. Estados estables (estados y ciclos atractores) .....	13
1.1.3. Modelos matemáticos y sistemas biológicos .....	13
1.1.3.1. Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) .....	14
1.1.3.2. Modelos Booleanos.....	15
1.1.3.3. Aplicación de modelos matemáticos en el estudio de la biología y el cáncer .....	18

1.1.3.3.1.	Usos de modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) en el cáncer.....	18
1.1.3.3.2.	Usos de modelos booleanos en el cáncer .....	19
1.2.	Justificación .....	20
1.3.	Hipótesis.....	20
1.4.	Objetivos .....	20
1.4.1.	Objetivo general.....	20
1.4.2.	Objetivos específicos.....	21
1.5.	Delimitaciones del trabajo .....	21
1.6.	Organización de la tesis.....	22
2.	Metodología.....	24
2.1.	Extracción de reglas de literatura .....	24
2.1.1.	Modelado Cualitativo .....	25
2.2.	Simplificación del modelo booleano .....	27
2.3.	Simulación .....	28
2.3.1.	Comparativa de <i>softwares</i> .....	30
2.4.	Validación.....	32
2.4.1.	Inhibición de PTHrP .....	32
2.4.2.	Prueba de robustez .....	32
3.	Resultados y discusión .....	34
3.1.	Extracción de reglas .....	34
3.2.	Simplificación del modelo .....	38
3.3.	Simulaciones.....	40
3.3.1.	<i>Software</i> GINsim.....	40
3.3.2.	<i>Software</i> Logic.Ly.....	42
3.3.3.	Paquetería BoolNet de R .....	52
3.4.	Validación del modelo.....	60
3.4.1.	Inhibición de PTHrP .....	60
3.4.2.	Prueba de robustez .....	62
4.	Conclusiones.....	64
	Literatura citada.....	67

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Vía canónica del TGF- $\beta$ .....	8
2	Ciclo vicioso del hueso.....	11
3	Sistema de moléculas hipotético.....	14
4	Compuertas lógicas, tablas de verdad y símbolos.....	16
5	Sistema de activaciones e inhibiciones en modelo booleano.....	17
6	Flujo de trabajo.....	24
7	Diagrama de flujo de búsqueda y filtro de literatura.....	25
8	Ejemplo de diagrama de interacciones.....	26
9	Ejemplo de interpretación de aportes.....	27
10	Reglas de simplificación de modelo.....	28
11	Moléculas y procesos en lenguaje de BoolNet.....	29
12	Funciones de BoolNet para cargar y desplegar modelo.....	30
13	Función de BoolNet para obtener atractores de simulación.....	30
14	Arreglo de compuertas en Logic.Ly para anti PTHrP.....	32
15	Función de BoolNet para cálculo de distancia de Hamming.....	33
16	Modelo booleano en yEd.....	37
17	Modelo booleano en yEd con primera reducción.....	38
18	Modelo booleano en yEd con reducción a 29 nodos para BoolNet.....	39
19	Diagrama de modelo booleano en GINsim.....	40
20	Resultado de simulación en GINsim.....	41
21	Diagrama de modelo booleano en Logic.Ly.....	42
22	Resumen de resultados de simulación en Logic.Ly.....	43
23	Condiciones iniciales y ciclo atractor de remodelado óseo en Logic.Ly.....	45

24	Condiciones iniciales y estado atractor de destrucción y formación de hueso en Logic.Ly.....	47
25	Condiciones iniciales y ciclo atractor de comportamiento osteolítico en Logic.Ly.....	48
26	Condiciones iniciales y ciclo atractor de crecimiento de cáncer en Logic.Ly.....	49
27	Condiciones iniciales y estado atractor de comportamiento osteolítico en Logic.Ly...	50
28	Condiciones iniciales y estado atractor de crecimiento de cáncer en Logic.Ly.....	51
29	Diagrama de modelo generado en BoolNet.....	52
30	Estado atractor de BoolNet con entradas en estado bajo.....	53
31	Ciclos atractores de BoolNet (solo OCp ON).....	54
32	Estado atractor de BoolNet (solo OCp y Wnt-3a ON).....	55
33	Ciclos atractores de BoolNet (solo OCp, TBRII y SMAD4 ON).....	56
34	Ciclos atractores de BoolNet (solo OCp, TBRII, SMAD4 y SDF1 ON).....	57
35	Estado atractor de BoolNet (solo OCp, TBRII, SMAD4, Wnt3a ON).....	58
36	Estado atractor de BoolNet (solo OCp, TBRII, SMAD4, Wnt3a y SDF1 ON).....	59
37	Ciclo atractor de Logic.Ly con anti PTHrP.....	61
38	Ciclo atractor de BoolNet con PTHrP inactivo.....	61
39	Distancia de Hamming promedio.....	62

# Lista de tablas

Tabla		Página
1	Ventajas y desventajas de herramientas de simulación utilizadas.....	31
2	31 reglas extraídas de aportes en literatura.....	36

## Capítulo 1. Introducción

---

Cáncer es el nombre al cual se ha asociado un conjunto de enfermedades genéticas que se desarrollan por la acumulación de mutaciones en el genoma, las cuales afectan el crecimiento y desarrollo controlado de las células. En el 2018 se reportaron 18.1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y 9.6 millones de muertes por esta causa (Ferlay et al., 2019).

Las células sanas pueden convertirse en cancerígenas debido a agentes mutagénicos, mutaciones por errores en la replicación o reparación del ADN, etc. Cuando las células de un tejido en particular se han convertido en cancerígenas y comienzan a crecer se habla de un tumor primario, el cual puede clasificarse en varios estadios según su tamaño, capacidad invasiva y si se ha diseminado a otros tejidos. A un tumor que tiene la capacidad de invadir otros tejidos y realizar metástasis se le conoce como tumor maligno. Tal es el caso del cáncer de mama, el cual es un tumor maligno que puede poseer la habilidad de invadir el tejido que lo rodea y viajar a órganos distantes del cuerpo (Weigelt et al., 2005). El cáncer de mama es la segunda causa más común de muerte por cáncer a nivel global, y de acuerdo con un estudio elaborado en 2018, representó cerca del 11.6% del total (aproximadamente 2.1 millones de muertes) (Bray et al., 2018).

La metástasis se presenta en etapas avanzadas del cáncer, cuando las células cancerígenas de un tumor primario viajan a través del sistema linfático o vascular para alcanzar otro tejido y comenzar a desarrollarse, tratándose entonces de un tumor metastásico. De acuerdo con la Asociación Americana del Cáncer el 90% de las muertes por cáncer son por causa de la metástasis. Además, se ha reportado que los cánceres que metastatizan al hueso con mayor frecuencia son el cáncer de mama, pulmón y próstata (Coleman, 1997).

Para el caso del cáncer de mama, cuando estas células cancerígenas viajan para desarrollarse en un nuevo sitio en el hueso, se le conoce como metástasis ósea de cáncer de mama. En el hueso existe un equilibrio dinámico entre la destrucción y formación del hueso, sin embargo, en presencia de células cancerígenas un factor clave llamado factor de crecimiento y transformación  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a través de distintas señalizaciones moleculares favorece la activación de osteoclastos (Hiraga et al., 2006) e inhibe la formación del hueso (Kang et al., 2005).

La gran familia de factores de crecimiento  $\beta$  está compuesta por más de 30 proteínas, incluyendo las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- $\beta$ , la cual es una citocina homodimérica (Cheifetz et al., 1990). Las vías de

señalización del TGF- $\beta$  participan en diversas funciones celulares, tales como crecimiento, diferenciación, motilidad, invasión, producción de matriz extracelular, vasculogénesis, angiogénesis, respuesta inmune e inflamatoria (Neuzillet et al., 2015). Interesantemente, se ha descrito a TGF- $\beta$  como un factor dual, ya que en células sanas TGF- $\beta$  se presenta como un agente antitumoral, sin embargo, en etapas avanzadas del cáncer este mismo factor presenta efectos contrarios, siendo clave para el desarrollo y progresión de la enfermedad (Tian et al., 2011).

Pese a los casi 35 años del descubrimiento del TGF- $\beta$  y del gran estudio al que ha sido sometido, se desconoce mucho sobre las interacciones moleculares de su vía canónica con otras vías de señalización relacionadas a su actividad tumoral. Por ejemplo, aunque se ha observado una relación entre la sobreexpresión de la proteína inhibitoria SMAD7 (regulador negativo de la vía canónica del TGF- $\beta$ ) y el aumento en la presencia de quinasa c-Jun N-terminal (JNK), no se ha elucidado la dinámica molecular que permite este comportamiento (Yan y Chen, 2011). Otro comportamiento observado es la sensibilidad de líneas celulares de cáncer de mama a TGF- $\beta$  en la ausencia de receptores de estrógeno, pero no así en la presencia de este tipo de receptores hormonales (Hayashi et al., 2017). El papel de los receptores hormonales en el contexto del TGF- $\beta$  no está totalmente caracterizado. Comprender más sobre estos elementos relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer podría ayudar a la generación de tratamientos nuevos y más eficaces.

A la fecha se han implementado distintos enfoques para proponer estrategias terapéuticas y ampliar el estudio del cáncer y la metástasis, aunque por lo regular dicho conocimiento se ha generado en base a la investigación experimental, hoy en día las herramientas matemáticas y computacionales permiten un análisis de la dinámica molecular basado en la información actual sobre la enfermedad, con el fin de comprender mejor los mecanismos asociados y generar cierto poder predictivo. Las ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) han sido el pilar de la representación matemática de sistemas biológicos, particularmente desde los primeros estudios acerca de la formación y destrucción ósea (Hart et al., 1984), enfermedades metabólicas (Lemaire et al., 2004), hasta la interacción del cáncer con la señalización autocrina y paracrina de osteoclastos y osteoblastos en la remodelación del hueso (Ayati et al., 2010). Una característica de los modelos basados en ODEs, es que requieren de constantes experimentales de los elementos que participan en el sistema analizado, si bien algunos parámetros pueden ser inferidos, mientras se disponga de más constantes mayor será la fidelidad de representación que se obtiene del modelo. Esta es la limitante por la que este tipo de modelos tienden a ser reducidos (menos de 10 elementos) (Jerez y Camacho, 2018). Por otra parte, los modelos booleanos de sistemas biológicos prescinden de estas constantes, ya que se basan en el álgebra booleana para representar de manera

cualitativa la naturaleza de las interacciones entre los elementos del sistema, es decir, mediante los valores 1 (estado alto) y 0 (estado bajo) se puede expresar activación e inhibición, respectivamente. Esto permite que el estudio se amplíe considerando más elementos en el sistema que un modelo de ODEs, y en este sentido, el potencial de encontrar nuevos y mejores blancos terapéuticos incrementa.

De acuerdo con Bibi et al. (2017), para representar la dinámica del sistema mediante un modelo booleano es necesario establecer un modelo biológico, es decir, un esquema que incorpore todos los elementos de las vías de señalización a considerar, así como las interacciones entre ellos. Posteriormente, basado en la literatura se establecen las reglas de interacción de las moléculas con operaciones booleanas. Luego se traslada el modelo esquemático y todo lo recopilado sobre sus interacciones a un *software* especializado de modelos booleanos de redes regulatorias moleculares, donde se pueden implementar distintas herramientas para su análisis. En este punto se pueden aplicar diferentes enfoques para proponer nuevos blancos terapéuticos, o ver el comportamiento de fármacos conocidos en la dinámica general del sistema. Además, con este tipo de modelos es posible proponer mecanismos de acción entre moléculas donde solo se conozca una correlación.

A pesar de las ventajas de los modelos booleanos el número de estudios relacionados con la metástasis ósea de cáncer de mama es prácticamente nulo. Sin embargo, dados los buenos resultados de los modelos predictivos en otros trabajos, por ejemplo, en mecanismos de proteínas de choque térmico (Vasaikar et al., 2015), sistemas de redes moleculares regulatorias del blanco de rapamicina (mTOR) (Bibi et al., 2017), identificación de nuevos blancos terapéuticos en células de cáncer de mama resistentes a trastuzumab (Sahin et al., 2009), entre otros, en este trabajo se propone el uso de modelado booleano y simulación computacional para analizar la dinámica molecular del TGF- $\beta$  en el cáncer de mama metastásico de hueso.

## **1.1. Antecedentes**

### **1.1.1. Conceptos biológicos**

#### **1.1.1.1. El Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

##### **1.1.1.1.1. Función general y estructura del TGF- $\beta$**

El Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) fue descubierto y purificado a principios de los 80's. En un principio se le relacionó con el factor de crecimiento epidermal (EGF) debido a su función como estimulador del crecimiento dependiente de la concentración del factor (Roberts et al., 1983). Desde entonces se han encontrado nuevas funciones reguladas por TGF- $\beta$ . Algunas de sus principales actividades consisten en regular negativamente la proliferación celular epitelial, y favorecer la diferenciación. También tiene la capacidad de controlar la respuesta inmune e inflamatoria a través de acciones en la proliferación y actividad de células B y T, regulando así su homeostasis (Attisano et al., 1994; Joan Massagué y Gomis, 2006), y suprimiendo la actividad de macrófagos y células asesinas naturales (NK) (Wahl, 1992). Se ha comprobado la relación del TGF- $\beta$  con la síntesis y remodelación de la matriz extracelular, alterando la adhesividad celular e interacciones célula-célula (Massagué, 1990)(J. Massagué, 1990). Además, se ha reportado que en concentraciones bajas del TGF- $\beta$  este posee actividad pro-angiogénica, mientras que en concentraciones altas realiza actividades anti-angiogénicas (Pepper, 1997; Pepper et al., 1993). El efecto del TGF- $\beta$  y de las citocinas en general sobre las distintas células puede ser completamente contrario, y esto depende del contexto celular y la concentración de citocina (Nathan y Sporn, 1991). Otro elemento que define la función que TGF- $\beta$  tendrá es el receptor del TGF- $\beta$  activado, a través del cual se desencadena una cascada de señalización bien regulada que llega a regular genes específicos (Attisano y Wrana, 2002).

Se han identificado tres isoformas del TGF- $\beta$  en humanos, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, y aunque cada una es expresada por su propio gen, poseen un porcentaje de identidad del 71% al 76% entre sus secuencias de nucleótidos (Cheifetz et al., 1990). Las isoformas son complejos homodiméricos de 25 kDa, donde cada monómero del complejo consiste en dos pares antiparalelos de cadenas- $\beta$  que forman una superficie plana con una hélice- $\alpha$  separada. Poseen dos enlaces disulfuro intracadena que forman un anillo enhebrado por un tercer enlace disulfuro intracadena, cuyo arreglo ha sido denominado nudo de cisteína (Miyazono y Heldin, 2008). Las tres isoformas de TGF- $\beta$  son sintetizadas como una pro-proteína de 55 kDa que consiste en una proregión amino terminal y una región madura carboxilo terminal. La proregión facilita la dimerización adecuada de la pro-proteína. TGF- $\beta$  es secretada en una forma inactiva en la que la forma madura del carboxilo terminal de 12.5 kDa y 112 aminoácidos de longitud es unido no

covalentemente con el resto amino terminal del péptido asociado a la latencia (LAP, *Latency-Associated Peptide*) de 80 kDa (Miyazono y Heldin, 2008). Este complejo es conocido como el complejo TGF- $\beta$  latente pequeño, el cual puede asociarse con miembros de la familia de la proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP, *Latent TGF- $\beta$ -Binding Protein*) para formar el gran complejo TGF- $\beta$ . La liberación de TGF- $\beta$  de los complejos latentes es conocida como activación, y aunque se desconoce el mecanismo preciso, puede ser facilitada por proteasas incluyendo plasmina y metaloproteinasas de matriz, así como por trombospondinas o integrinas-  $\alpha\beta 6$  (Jakowlew et al., 2008). Posteriormente, los dímeros de TGF- $\beta$  son cortados por endoproteasas en el motivo de aminoácidos RXXR conservado, localizado justo río arriba del péptido TGF- $\beta$  maduro. Cortes extracelulares son facilitados a través de furinas, las cuales son convertasas de proproteínas que procesan proteínas precursoras latentes en su forma biológicamente activa (Jakowlew et al., 2008).

#### **1.1.1.1.2. Receptores del TGF- $\beta$**

Al mismo tiempo en que se descubrieron los efectos del TGF- $\beta$ , comenzó a estudiarse su mecanismo de señalización, en el que se encontró que los encargados de traducir la señal de la familia TGF- $\beta$  del exterior de la célula al interior son un conjunto de receptores llamados receptores del TGF- $\beta$ : TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2, TGF $\beta$ R3. Los receptores del TGF- $\beta$  1 y 2 son proteínas transmembranales de un solo paso con un dominio quinasa situado intracelularmente el cual fosforila residuos serina y treonina. Cuando la molécula del TGF- $\beta$  es presentada al receptor 2, el TGF $\beta$ R1 es atraído a la señal formando un complejo TGF $\beta$ R2, TGF- $\beta$  y TGF $\beta$ R1. Una vez formado este complejo, ocurre una fosforilación del TGF $\beta$ R2 al TGF $\beta$ R1, activando el dominio quinasa. Una vez activado, el TGF $\beta$ R1 puede fosforilar las proteínas SMADS, las cuales continúan con la señal dentro de la célula (Attisano y Wrana, 2002). TGF $\beta$ R3, también llamado betaglicano (BG), es una proteína anclada a la membrana extracelular que sirve como receptor accesorio para presentar TGF- $\beta$  al TGF $\beta$ R2 (López et al., 1994). Además, BG puede anclarse a inhibinas para potenciar su efecto antagonista de BMPs (Bilandzic y Stenvers, 2011).

La multifuncionalidad de la familia del TGF- $\beta$  se debe a la combinación de receptores del TGF- $\beta$  que presentan las células. La señal del TGF- $\beta$ 1, 2 y 3 está mediada por los receptores tipo 1: ALK1-7, y el receptor tipo 2: TGF $\beta$ R2 (Wakefield y Hill, 2013).

### **1.1.1.1.3. Inhibidores del TGF- $\beta$**

Como se ha descrito, la vía de señalización del TGF- $\beta$  se encuentra altamente regulada, positiva y negativamente. Esta regulación se lleva a cabo a nivel extracelular, membranal, citoplasmático y nuclear. Un desbalance en estos procesos permite el desarrollo tumoral y su diseminación a otros tejidos.

#### **1.1.1.1.3.1. Inhibición por I-Smads**

Las Smad6/7 son Smads inhibidoras (I-Smads) reguladas por TGF- $\beta$ , activinas y BMPs. Dichas Smads son antagonistas de las Co-Smads (Smad4) por lo que forman complejos con las R-Smads (Smad2/3/1/5/8). Las I-Smads se caracterizan por unirse a los receptores del TGF- $\beta$ 1 activados por los receptores tipo 2, y promover la liberación de las R-Smads interactuando con estas. Smad7 inhibe la señalización del TGF- $\beta$ , activinas y BMPs en una retroalimentación negativa en la que las Smad3 y 4 se unen al promotor de la Smad7 para activar su expresión. La Smad6 inhibe preferentemente la señalización de BMPs, y su expresión es estimulada por las Smads activadas por BMPs (Miyazono, 2000).

#### **1.1.1.1.3.2. Inhibición por vía de Erk MAP quinasa**

La vía de Erk MAP quinasa es activada por Ras a través de factores de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Erk inhibe la señalización del TGF- $\beta$  fosforilando residuos treonina de Smads evitando que estos sean capaces de llegar adentro del núcleo. Mutaciones pro-oncogénicas de Ras inhiben las señales de inhibición de crecimiento por parte del TGF- $\beta$  a través de este mecanismo en el que las R-Smads no pueden ser translocadas al núcleo (Miyazono, 2000).

#### **1.1.1.1.3.3. Inhibición por co-represor transcripcional**

Los co-represores se encuentran dentro del núcleo, y se unen a las R-Smads en lugar de factores de transcripción que promueven la expresión de genes. C-Ski se une a Smad2, Smad3 y Smad4, y discrimina las Smads activadas por BMPs. Además, C-Ski recluta histonas desacetilasas (HDACs) para reprimir la

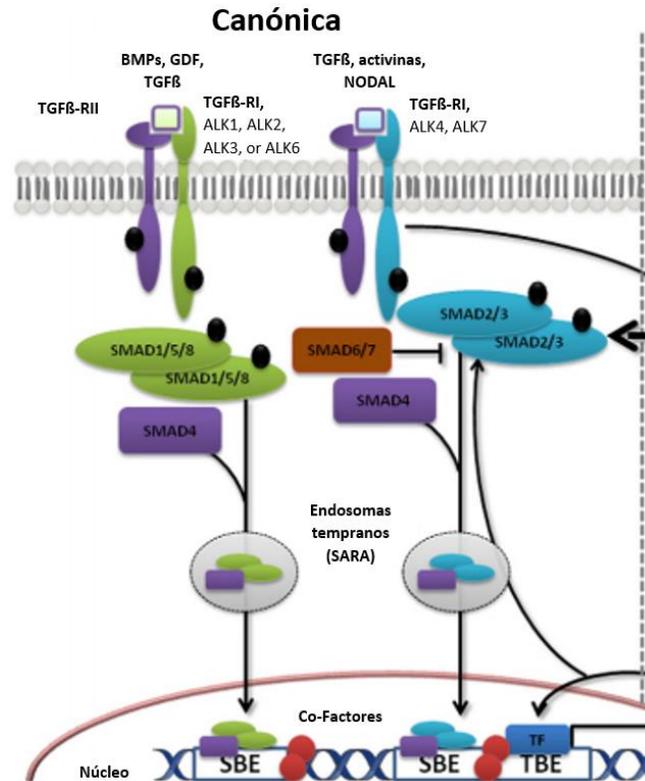
transcripción de genes objetivos de los complejos Smad. SnoN es una proteína relacionada a c-Ski, la cual reprime la activación rápida de genes que responden a TGF- $\beta$ . Este co-represor es degradado por proteosomas una vez que se haya dado el estímulo del TGF- $\beta$  y la acumulación de Smad3 en el núcleo. C-Ski es degradado cuando se lleva a cabo el estímulo del TGF- $\beta$ . SnoN es expresado por TGF- $\beta$  y se encarga de terminar la señalización de este en una retroalimentación negativa (Miyazono, 2000).

#### **1.1.1.1.3.4. Degradación de Smads**

Las proteínas Smads son degradadas por ubiquitinización, a través de las enzimas de activación de ubiquitinas E1, enzimas de conjugación de ubiquitinas E2 y ligasas de ubiquitina E3. Esta última se encarga del reconocimiento específico de proteínas. Smurf1 es una ligasa de ubiquitina E3 que degrada específicamente Smad1 y Smad5 activados por la vía de señalización de BMPs. Las Smads pueden prescindir de esta manera dependiente de ligasa para ser degradadas, tal es el caso de la Smad2 que depende de localización nuclear para ser ubiquitinada una vez efectuada su función al ser activadas por TGF- $\beta$  (Miyazono, 2000).

#### **1.1.1.1.4. Vía canónica (proteínas SMAD)**

En la ruta clásica de transducción de la señal del TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  llega al TGF $\beta$ R2 y TGF $\beta$ R1. TGF $\beta$ R2 fosforila al TGF $\beta$ R1, el cual activa por fosforilación al complejo Smad2/3. La proteína Smad4 (Smad común o co-Smad) puede unirse al complejo fosforilado Smad2/3 (Smads activados por receptor o R-Smad) permitiendo su internalización al núcleo, donde podrán unirse a factores de transcripción específico para activar ó reprimir genes regulados por TGF- $\beta$  y generar las respuestas celulares requeridas (Figura 1) (Neuzillet et al., 2015). Esta vía de señalización se encuentra regulada en varios niveles por fosforilaciones, transporte nucleocitoplasmático, SMADS inhibidores, como la proteína Smad7, y degradación de receptores por ubiquitinación (Shi y Massagué, 2003).



**Figura 1.** Vía canónica de TGF- $\beta$ . Moléculas de la familia del TGF- $\beta$  llegan al receptor II, lo que provoca la formación del complejo TGF- $\beta$ -RII-RI, el cual está activado por fosforilación (círculos negros). Los receptores fosforilan a las R-SMADS de color verde y azul, los cuales en conjunto con la Co-SMAD4 (color morado) son introducidos al núcleo mediante endosomas. Una vez en el núcleo los complejos se unen a Co-factores para regular genes. Modificado de Neuzillet C. et al., (2015).

### 1.1.1.2. Cáncer

La formación de tumores en humanos es un proceso complicado que involucra múltiples eventos y factores que generalmente ocurren sobre un periodo de tiempo extendido. Las células de cáncer humano a menudo requieren habilidades que la mayoría de las células no poseen ordinariamente, incluyendo resistencia a la inhibición de crecimiento, proliferación independiente de factores de crecimiento, replicación sin límites, invasión, metástasis, evasión de apoptosis y vigilancia inmune, y soporte de angiogénesis a través de la inestabilidad genómica. Estos procesos son regulados por rutas de transducción de señales complejas que además controlan la homeostasis celular normal. Dentro de estas vías de señalización, destaca la del TGF- $\beta$  que regula muchos aspectos de las funciones celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis, adhesión, angiogénesis, vigilancia inmune y supervivencia (Jakowlew et al., 2008).

### **1.1.1.2.1. Metástasis**

#### **1.1.1.2.1.1. Metástasis ósea**

La metástasis se lleva a cabo en etapas avanzadas del cáncer mediante una cascada de señalización compleja, cuando las células tumorales han crecido lo suficiente que comienzan a desprenderse del tumor primario a través de un proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT) e invaden el sistema vascular, este último conocido como intravasación. Posteriormente las células cancerosas que viajan a través de la circulación (CTCs) se adhieren y atraviesan las paredes vasculares cercanas al nuevo órgano a invadir en un proceso llamado extravasación. La siguiente parte es la menos estudiada y corresponde a la colonización. Este proceso requiere que las células se establezcan, comiencen y mantengan el crecimiento, además necesita del desarrollo de los procesos de creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis) para el suministro de nutrientes y oxígeno (Chaffer y Weinberg, 2011). En el caso particular de la metástasis ósea, se trata de la diseminación del cáncer primario a los huesos. Las interacciones del tumor metastásico con las células del hueso generan lesiones osteoblásticas y/u osteolíticas, con mayor actividad de formación de hueso o mayor actividad de destrucción de hueso, respectivamente. De acuerdo con (Brown et al., 2005), el cáncer de mama, pulmón y próstata, son los principales cánceres primarios que migran al hueso.

#### **1.1.1.2.1.2. Vías de señalización en la metástasis ósea**

Cuando se trata de la metástasis ósea se puede favorecer un aumento de la destrucción de hueso (metástasis osteolítica) o un aumento tanto de la destrucción como la formación del hueso, terminando en el favorecimiento de este último (metástasis osteoblástica). Debido a que la metástasis osteolítica es la más común en el cáncer de mama, las vías de señalización estudiadas en este trabajo se limitan a este tipo de lesiones (Guise et al., 2005).

### **1.1.1.2.1.3. TGF- $\beta$ y metástasis de hueso**

Análisis inmunohistoquímicos de metástasis de hueso de cáncer de mama, y análisis de ensayos ELISA de la vía de señalización dependiente de Smads del TGF- $\beta$ , muestran que no solo las vías no canónicas están relacionadas con la metástasis ósea, puesto que se ha encontrado la participación del TGF- $\beta$ , Smads 2, 3 y 4 en la expresión de interleucina 11 (IL-11) (Kang et al., 2005). IL-11 es conocido por estimular la resorción ósea (Morinaga et al., 1997), sin embargo, para esto es importante que la vía canónica del TGF- $\beta$  pierda actividades supresoras de tumores (Kang et al., 2005).

En la mayoría de los ensayos mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-fosfopéptidos contra fosfo-Smad2 se encontró tinción nuclear en las células tumorales, sugiriendo la señalización activa de TGF- $\beta$  en el tumor primario de cáncer de mama, mientras que los ensayos con anti-fosfo-Smad1/5/8 sugieren la actividad de proteínas morfogénicas de hueso (BMP) en el desarrollo del tumor primario y en la metástasis de hueso (Katsuno et al., 2008).

Otra intervención del TGF- $\beta$  a través de la vía de señalización canónica en la metástasis ósea de cáncer de mama es la promoción de la síntesis de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) en tumores, favoreciendo la metástasis osteolítica y contribuyendo así al “ciclo vicioso” de la metástasis ósea (Guise, 2002).

### **1.1.1.2.1.4. Ciclo vicioso**

La remodelación ósea se lleva a cabo en un equilibrio dinámico entre la resorción del hueso, por parte de los osteoclastos, y la formación del hueso, por parte de los osteoblastos (Rodan, 1998). Los osteoblastos activos sintetizan el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL) el cual se une al receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANK) expresado por los precursores de osteoclastos (OCp), permitiendo su diferenciación a osteoclastos activos (OCa) (Kozlow y Guise, 2005). Los precursores de los osteoblastos son los osteoblastos respondedores, quienes sintetizan osteoprotegerina (OPG) que compete por RANKL, regulando negativamente la maduración de OCp. Los OCa son células multinucleadas compuestas por varios OCp (Teitelbaum, 2000). Al realizar la resorción del hueso, liberan minerales, además de factores de crecimiento como TGF- $\beta$  (Guise et al., 2005). Este último inhibe la maduración de los osteoblastos y promueve la apoptosis de osteoclastos activos. Cuando un tumor de cáncer de mama,



### **1.1.2. Modelado de sistemas biológicos**

Para poder tener un primer acercamiento a la representación de sistemas biológicos mediante modelos matemáticos es necesario abordar ciertos conceptos básicos descritos en los siguientes subapartados.

#### **1.1.2.1. Modelo**

Un modelo es una abstracción de un objeto o proceso que conserva algunas de sus características. Por ejemplo, una red bioquímica de reacciones puede representarse mediante nodos para las moléculas y flechas para las reacciones. Los modelos computacionales requieren de sentencias específicas sobre el sistema, las cuales son respaldadas por trabajo experimental o conocimiento bioquímico (Klipp et al., 2016).

#### **1.1.2.2. Constantes, parámetros y variables**

Dependiendo de si el modelo es cuantitativo o cualitativo, estos se constituyen de tres principales tipos de componentes, descritos a continuación:

Constantes. Son valores fijos, es decir que no cambian en ninguna circunstancia. Por ejemplo, el valor del número de Avogadro, el número de Euler ( $e$ ),  $\pi$ , por citar algunos ejemplos (Tenazinha y Vinga, 2011).

Parámetros. Adquieren un valor establecido, que depende de las condiciones del sistema y de propiedades intrínsecas de los elementos en cuestión. Por ejemplo, la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de una reacción enzimática, las constantes de difusión, disociación, etc. (Tenazinha y Vinga, 2011).

Variables. Son elementos con valores que pueden cambiar dependiendo de las interacciones con el resto de las variables. Un conjunto de variables puede describir el comportamiento del sistema, estas son conocidas como variables de estado y son necesarias para definir el estado del sistema (Tenazinha y Vinga, 2011).

### **1.1.2.3. Condiciones iniciales**

Las condiciones iniciales son los valores de las variables de estado al principio del análisis dinámico del sistema. Dependiendo del número de variables y la complejidad de sus interacciones, las distintas condiciones iniciales pueden dar lugar a diferentes estados y ciclos atractores (Wolkenhauer, 2001).

### **1.1.2.4. Estados estables (estados y ciclos atractores)**

El concepto de estado estable es importante en el análisis de la dinámica de sistemas biológicos. Es el comportamiento constante del sistema, en términos de las variables de estado, el cual se alcanza después de un cierto tiempo. Un tipo de estado estable se da cuando todas las variables se mantienen constantes en el tiempo, también conocido como estado atractor. También existe el ciclo atractor, que surge cuando el comportamiento constante es oscilatorio, es decir que las variables de estado cambian, pero vuelven a tomar el mismo valor en un orden en particular (Pal et al., 2005).

### **1.1.3. Modelos matemáticos y sistemas biológicos**

Algunos de los fenómenos moleculares estudiados en el laboratorio tienen una clara explicación basada en principios bioquímicos. Sin embargo, muchas de las interacciones de moléculas o componentes de sistemas no pueden explicar su comportamiento dentro de sistemas más complejos de una manera intuitiva. Los modelos matemáticos en conjunto con herramientas computacionales permiten comprender la dinámica de estos procesos y realizar simulaciones de su comportamiento bajo ciertas condiciones y en el contexto de un sistema más completo.

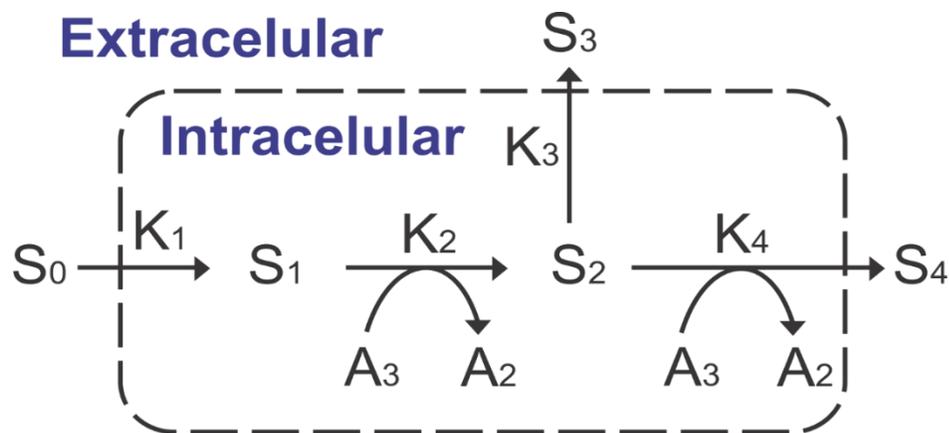
Existen distintas características que diferencian a los modelos. Los modelos cualitativos describen las interacciones entre las moléculas del sistema, mientras que un modelo cuantitativo asigna un valor numérico a los elementos y sus interacciones, los cuales pueden o no cambiar. En los modelos determinísticos los estados futuros del sistema pueden ser predichos conociendo su estado actual, mientras que los modelos estocásticos permiten conocer una distribución de probabilidades para un estado sucesivo del sistema. Los valores de las variables temporales o de estado pueden ser discretas (que

pueden adquirir valores restringidos y por lo general enteros en cambios observables) o continuas (donde se puede tomar un valor dentro de un intervalo ininterrumpido) (Kitano, 2002).

### 1.1.3.1. Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs)

Este tipo de modelos implementan variables continuas que permite analizar el comportamiento dinámico del sistema en cambios físicos y fisicoquímicos, de ahí su dependencia de parámetros cinéticos (por ejemplo, de síntesis, degradación y difusión) y detalles sobre mecanismos de interacción. Con base en lo anterior es que estos modelos resultan prácticos cuando se consideran pocos elementos de un sistema (Machado et al., 2011).

Si tomamos como ejemplo el sistema de la Figura 3 en el que se interpreta de manera simplificada el proceso de síntesis de energía mediante la glucólisis, extraído de Klipp et al. (2016), es posible desarrollar un modelo con ecuaciones diferenciales. Los cambios en las concentraciones de cada molécula estarán dados por los parámetros de síntesis, inhibición y de degradación a la que estén sujetas.



**Figura 3.** Ejemplo de sistema metabólico. El sistema molecular representado se asemeja a los primeros pasos del metabolismo de nutrientes llamado glucólisis, mediante el cual son convertidos a energía, mayormente en adenosín trifosfato (ATP), y en aminoácidos y lípidos. Todas las reacciones se llevan a cabo por enzimas que tienen su correspondiente velocidad enzimática  $K$ . La glucosa extracelular y su concentración es representado por  $S_0$ , y la glucosa intracelular por  $S_1$ . Glucosa mono-fosforilada (glucosa-6-fosfato, G6P) es  $S_2$ , y fructosa bi-fosforilada (fructosa-1, 6-bifosfato, F16P2) es  $S_4$ . G6P es sintetizada por otras vías generando  $S_3$ . Las fosforilaciones se llevan a cabo consumiendo ATP ( $A_3$ ) y convirtiéndolo a ADP ( $A_2$ ).  $S_0$ ,  $S_3$  y  $S_4$  son variables externas, mientras que el resto son variables internas. Rediseñado de Klipp et al. (2016).

Suponiendo una cinética de Ley de acción de masas, donde la tasa de reacción es proporcional a la concentración de sus sustratos, el sistema de ecuaciones diferenciales simple quedaría de la siguiente manera:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = K_1[S_0] - K_2[S_1][A_3], \quad (1)$$

$$\frac{d[S_2]}{dt} = K_2[S_1][A_3] - K_3[S_2] - K_4[S_2][A_3], \quad (2)$$

$$\frac{d[S_3]}{dt} = K_3[S_2], \quad (3)$$

$$\frac{d[S_4]}{dt} = K_4[S_2][A_3], \quad (4)$$

$$\frac{d[A_2]}{dt} = K_2[S_1][A_3] + K_4[S_2][A_3], \quad (5)$$

$$\frac{d[A_3]}{dt} = -K_2[S_1][A_3] - K_4[S_2][A_3]; \quad (6)$$

donde los elementos entre corchetes significan concentración y  $K_x$  son constantes de síntesis.

Aunque pueda parecer simple el enfoque de modelado, la dependencia de las constantes cinéticas, las cuales probablemente sean desconocidas es lo que hace difícil obtener una representación fiel del sistema. Es posible obtener algunas constantes e inferir el resto, sintonizando los valores para obtener el comportamiento deseado, pero todo depende de qué tan estudiado esté la red molecular, y de la complejidad de este. Lo que restaría después de resolver el sistema de ecuaciones es su simulación, para lo cual existen *softwares* como MATLAB. En este ejemplo en particular la molécula  $S_1$  y  $A_3$  tendrían que ser inicializadas con alguna concentración ya que actúan como entrada, debido a que no le antecede ningún otro elemento y las moléculas  $S_3$  y  $S_4$  serían las salidas ya que no les precede ningún elemento.

### 1.1.3.2. Modelos Booleanos

Los modelos booleanos implementan variables discretas, por lo que prescinden de parámetros cinéticos, permitiendo la consideración de una cantidad grande de elementos (en comparación a los basados en

ODEs), ofreciendo así, un amplio análisis cualitativo y dinámico del comportamiento del sistema (Klipp et al., 2016). Una red booleana (grafo) consiste en un conjunto de moléculas representados por nodos (variables booleanas) interconectadas entre sí por aristas que representan el tipo de interacción, por lo que cada nodo puede tener uno de dos valores (1 o 0) y estos pueden ser modificados por la acción de otros nodos. Todas las interacciones son traducidas a reglas booleanas con ayuda de los operadores lógicos AND, OR y NOT, principalmente (Figura 4). Distintos tipos de activación, así como la inhibición de moléculas pueden representarse mediante arreglos de estas tres compuertas.

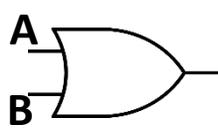
AND		
A	B	C
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

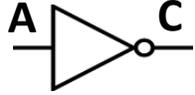
OR		
A	B	C
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

NOT	
A	C
0	1
1	0







**Figura 4.** Compuertas lógicas, tablas de verdad y símbolos. La salida de la compuerta AND es 1 solo en el caso de que todas sus entradas sean 1. La salida de la compuerta OR es 1 siempre que una de sus compuertas sea 1. La salida de la compuerta NOT es siempre el valor opuesto a la entrada.

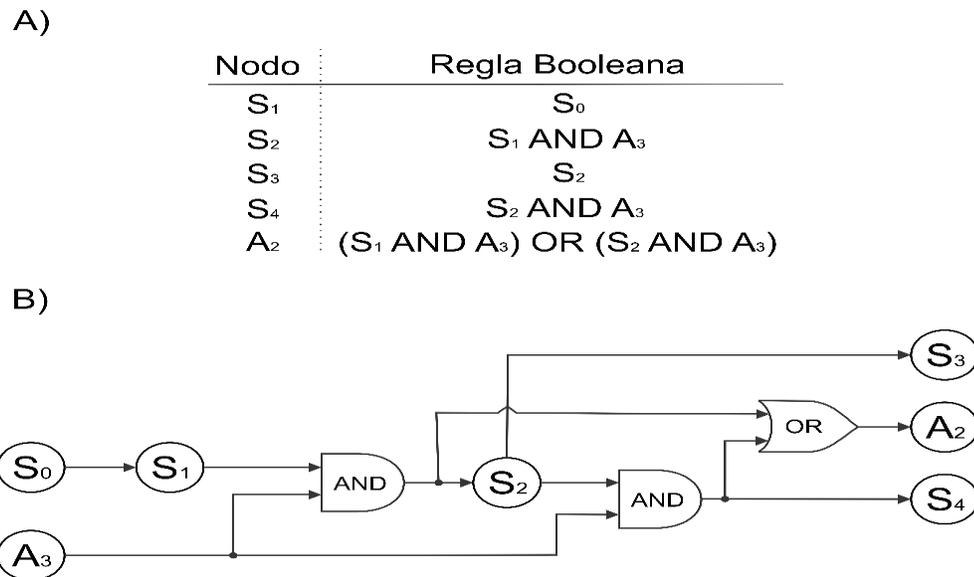
La simulación de modelos booleanos requiere del establecimiento de un método de actualización de variables. Existe la actualización síncrona, donde los cambios en los estados del sistema se dan de manera ordenada de acuerdo con la estructura del modelo. También existe la actualización asíncrona, donde los cambios de las variables se dan uno a la vez de manera aleatoria (Abou-Jaoudé et al., 2016).

Después de construir el modelo biológico en forma de grafo y establecer las interacciones regulatorias entre los elementos en base a la literatura, la simulación permite estudiar el comportamiento temporal

cualitativo del sistema para comprender cómo las perturbaciones alteran el sistema (Wang et al., 2012). Todo a través del análisis de los estados y ciclos atractores resultantes.

La secuencia de estados obtenidos representa la trayectoria del sistema. Dado que se tiene un número finito de variables, se obtiene un número finito de transiciones de estado. Cada transición converge a un estado o ciclo estable, también llamados atractores. El tamaño del ciclo es el número de estados del ciclo, por lo que un estado estable es un ciclo de tamaño 1 (Klipp et al., 2016).

Siguiendo el ejemplo de la Figura 3, y haciendo uso del conocimiento previo sobre las interacciones entre moléculas, es posible obtener un conjunto de reglas booleanas como en la Figura 5A. Estas reglas son necesarias para la simulación en muchos *softwares* especializados, sin embargo, otras herramientas de simulación podrían solo necesitar de un esquema gráfico como en la Figura 5B.



**Figura 5.** Sistema de activaciones e inhibiciones en modelos booleanos. A) Reglas booleanas de cada nodo del sistema. Si las condiciones en ellas se cumplen, entonces el nodo regulado pasa de un estado bajo (0 lógico) a un estado alto (1 lógico). B) Modelo booleano esquemático, los círculos representan las moléculas  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ , y los operadores lógicos AND y OR son representados por sus propios símbolos. Al igual que en el modelo de ODEs, las entradas del sistema son  $S_0$  y  $A_3$ , y sus salidas son  $S_3$ ,  $A_2$  y  $S_4$ .

Después de la simulación del modelo, se analizarían los estados o ciclos atractores obtenidos. Nótese que no es necesaria ninguna constante cinética, por lo que este modelo tiene la facilidad de considerar más elementos del sistema biológico en comparación a los modelos cuantitativos como el basado en ODEs.

### **1.1.3.3. Aplicación de modelos matemáticos en el estudio de la biología y el cáncer**

#### **1.1.3.3.1. Uso de modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) en el cáncer**

El primer esfuerzo por comprender el sistema dinámico del hueso a través del modelado matemático se realizó por Komarova et al. (2003), quienes modelaron a través de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) la señalización autócrina y parácrina de los osteoblastos y osteoclastos que se encargan de remodelar el hueso. En este trabajo se modeló en un espacio discreto la dinámica de población celular y la evolución de la masa ósea, cuyos eventos fueron iniciados por un cambio en las condiciones iniciales del estado estable. Cabe destacar que los elementos considerados en el sistema fueron TGF- $\beta$ , factor de crecimiento insulínico (IGF), OPG, RANKL, OCp, OBp y apoptosis (Komarova et al., 2003).

Posteriormente se publicó un modelo matemático diferente para la remodelación ósea que consideraba interacciones entre osteoblastos y osteoclastos a través de PTH (aplicado continuamente), RANK, RANKL, OPG, TGF- $\beta$ , OCp, OBp, Oca y OBa. El modelo matemático se desarrolló bajo la cinética de Michaelis-Menten con ODEs. Lograron replicar algunas enfermedades metabólicas del hueso como deficiencia de estrógeno, deficiencia de vitamina D, senescencia y exceso de glucocorticoides. Además, el modelo predice que la combinación de terapias anti-resorción y anabólicas proveen beneficios significativos en comparación con la monoterapia. También se logró confirmar que las terapias anti-resorción no son capaces de restaurar la pérdida de hueso parcialmente, mientras que terapias de formación de hueso producen mejores resultados (Lemaire et al., 2004).

Inspirados en el trabajo de Komarova et al. (2003), se propuso una ampliación del modelo para incorporar el efecto de mieloma múltiple en la dinámica de remodelación ósea. Suponen que el crecimiento del tumor sigue una ley de Gompertz, el cual afecta la señalización de osteoblastos y osteoclastos, desregulando el ciclo de remodelado periódico, favoreciendo la disminución de la masa ósea. Sin embargo, aunque se proponen distintos enfoques de tratamiento, este modelo no contempla la influencia del crecimiento del mieloma en el sistema de remodelación ósea (Ayati et al., 2010).

En el año 2018 se publicó un trabajo sobre modelado y simulación de metástasis de hueso e interacciones entre las unidades multicelulares básicas (BMU, por sus siglas en inglés) que comprenden osteoblastos y osteoclastos. El modelo se basa en una ley de poder funcional que representa la señalización paracrina entre las células BMU junto con un crecimiento logístico para las células cancerosas. Los autores llevaron a cabo un análisis de estabilidad dinámica y los resultados obtenidos proporcionaron información

biológica sobre el éxito o fracaso de la invasión de metástasis óseas. Además, realizaron simulaciones numéricas para ilustrar los resultados teóricos, mostrando diversas interacciones dinámicas de las células tumorales osteoclastos-osteoblastos que son consistentes con el comportamiento experimental de trabajos previos (Jerez y Camacho, 2018).

#### **1.1.3.3.2. Uso de modelos booleanos en el cáncer**

Actualmente la aplicación de modelos booleanos en la metástasis ósea de cáncer de mama es nula, sin embargo, se han reportado trabajos donde buscan mejorar la comprensión de sistemas complejos implicados en procesos celulares normales y unos cuantos más sobre procesos oncogénicos.

Por ejemplo, se reportó un trabajo sobre modelado booleano para analizar el comportamiento de la red regulatoria del ciclo celular mamífero. Debido a que la mayoría de la información hasta entonces recaía en interacciones cualitativas, este tipo de enfoque resultó adecuado para delinear las propiedades dinámicas de las redes implicadas. Encontraron que, para una representación más fiel de este sistema tan complejo, no bastaba con implementar una sola estrategia de transición de estados, sino una combinación de la técnica síncrona con la asíncrona. En la actualización síncrona del modelo, las interacciones de cada molécula (activación/inhibición) se van efectuando al mismo tiempo, mientras que, en la actualización asíncrona, cada interacción se ve reflejada una molécula o nodo a la vez (Fauré et al., 2006).

Además, se ha modelado de manera booleana las vías intrínsecas, extrínsecas y relacionadas a la apoptosis en las que existe interconexión de elementos (“crosstalk”) (Schlatter et al., 2009). El modelo responde a muchos estímulos externos como ligando Fas, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), radiación UVB, interleucina-1 $\beta$  e insulina. Este modelo provee una descripción fiable del comportamiento de la red apoptótica ya que fue validado experimentalmente y ofrece nuevas ideas sobre la interacción compleja entre factores pro y anti apoptóticos (Schlatter et al., 2009).

Nuevamente, por las limitaciones de información que se presenta para poder desarrollar modelos cuantitativos, en otro estudio se optó por un análisis cualitativo amplio de la señalización de vías principales y secundarias del receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR)/ErbB (Samaga et al., 2009). EGFR (ErbB1) y su familia regulan procesos celulares como supervivencia, proliferación, diferenciación y motilidad, lo que hace que los receptores ErbB sean dianas importantes para el desarrollo

de fármacos anticancerígenos. Con este modelo se logró demostrar inconsistencias entre los resultados experimentales y el conocimiento cualitativo actual, dando lugar a nuevas hipótesis. Por ejemplo, uno de los resultados del análisis de este modelo sugiere la independencia de algunos elementos como PI3K de Rac/Cdc42 inducido por la cascada de p38 y JNK en hepatocitos (Samaga et al., 2009).

## **1.2. Justificación**

Se ha reportado una tasa importante de mortalidad anual debida al cáncer metastásico, y las estrategias actuales para combatir este tipo de enfermedades no han podido detener la tendencia, lo que sugiere la necesidad de mejorar el entendimiento de la enfermedad para ser capaz de proponer nuevos y mejores blancos terapéuticos. El uso de modelos cuantitativos ofrece la consideración de pocos elementos del sistema, por lo que, en este sentido, el uso de modelos cualitativos como el modelado booleano podría ofrecer un estudio más amplio, así como un primer acercamiento ya que actualmente no existen trabajos sobre modelado matemático y simulación computacional de metástasis ósea de cáncer de mama.

## **1.3. Hipótesis**

El uso del modelado booleano y la simulación computacional de las interacciones cualitativas entre las moléculas de señalización reguladas por el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ ) en metástasis ósea de cáncer de mama permitirá alcanzar un mejor entendimiento de su comportamiento, lo que podría ayudar a localizar nuevos y mejores blancos terapéuticos.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Estudio del comportamiento dinámico de modelos de redes regulatorias moleculares del TGF- $\beta$  en metástasis ósea de cáncer de mama, basado en el análisis booleano y simulación computacional.

### 1.4.2. Objetivos específicos

1. Extraer los aportes de trabajos sobre la red del TGF- $\beta$  en la metástasis ósea de cáncer de mama y la remodelación del hueso.
2. Construir modelo booleano a partir de los aportes extraídos, generando un esquema gráfico traducible a los *softwares* de simulación.
3. Simplificación de modelo utilizando las reglas de reducción descritas en Naldi et al. (2009).
4. Simulación del modelo a través de *softwares* especializados y no especializados y validación computacional con base en experimentos de laboratorio reportados en la literatura.

### 1.5. Delimitaciones del trabajo

Este trabajo se centra en el estudio de la dinámica molecular de las células de remodelación del hueso y células de cáncer de mama metastásico de hueso presentes en el mismo microambiente. Las principales vías de regulación presentes son las del TGF- $\beta$  en células de metástasis ósea de cáncer de mama, la activación de osteoblastos y osteoclastos. También se encuentran los procesos de destrucción y formación del hueso, aunque no se detallan a profundidad. Además, se manejan los procesos de establecimiento y crecimiento del cáncer.

El modelo realizado es de tipo booleano, y su actualización es síncrona, por lo que, los cambios en la actividad de las moléculas son discretos, siendo modificados al mismo tiempo bajo la acción directa de sus reguladores en ese instante. Cabe mencionar que los estados de las moléculas son binarios, es decir, que están presentes o ausentes, y son representados por 1's o 0's, respectivamente. De esta manera solo es posible representar efectos a un nivel y no efectos múltiples dependientes de ciertas concentraciones.

Respecto a la cantidad de elementos en un modelo, los de tipo cuantitativo tienden a ser reducidos por su dependencia de constantes experimentales. En este sentido, los modelos booleanos permiten simular 'n' elementos, donde la limitante se encuentra en la simulación de sus  $2^n$  combinaciones. Para 'n's muy grandes puede no ser computable comercialmente, pero para el número de nodos en el modelo de este

trabajo aun fue posible simular sin complicaciones de manera síncrona. Otra limitación se encuentra en los *softwares* de modelos booleanos, ya que para la paquetería de BoolNet 'n' no puede ser mayor a 29 si se quieren utilizar sus herramientas de análisis.

## 1.6. Organización de la tesis

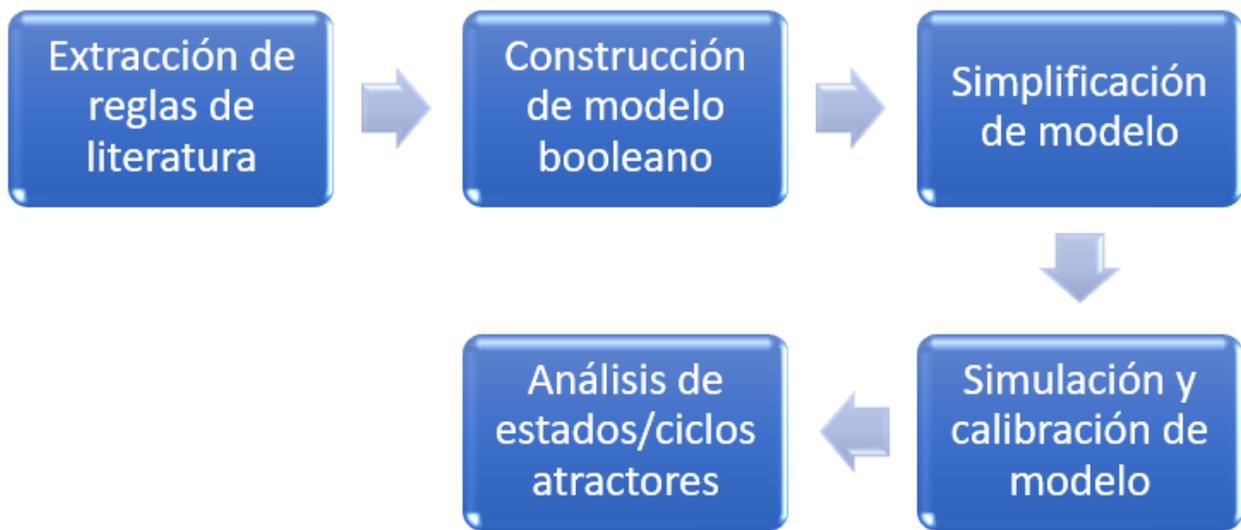
A continuación, se describe el contenido de la presente tesis, con el fin de orientar al lector en el objetivo de cada sección.

1. **Introducción.** En este apartado se introduce la epidemiología y tendencia en la metástasis ósea de cáncer de mama. Se describe la molécula clave en esta enfermedad, la cual es TGF- $\beta$ , y se habla sobre los modelos cuantitativos y cualitativos para analizar la información actual generada mediante la experimentación de laboratorio. Como parte de la introducción se incluyen los antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos del trabajo.
2. **Metodología.** Se profundiza en los pasos a seguir para la elaboración del trabajo, como la abstracción de aportes de trabajos relacionados a la metástasis ósea de cáncer de mama, la construcción y simplificación del modelo y, por último, el uso de *software* para la simulación del modelo, así como la implementación de herramientas de análisis de modelos booleanos.
3. **Resultados.** Las reglas extraídas de la literatura, los modelos booleanos implementados en las herramientas GINsim, Logic.Ly y la paquetería de R llamada BoolNet son presentados aquí, así como los datos obtenidos de sus correspondientes simulaciones. También se presenta la simulación de validación del modelo y una prueba de robustez.
4. **Discusión.** En este punto se discuten los resultados obtenidos de las simulaciones y se les da una explicación biológica a los comportamientos obtenidos (estados y ciclos atractores) con base en las condiciones iniciales establecidas. Se reconocen algunas limitaciones y puntos de mejora del modelo, y se plantea el uso de más de dos niveles de activación.

5. **Conclusiones.** Se define el éxito del trabajo de acuerdo con los objetivos planteados. Además, se justifica el potencial uso del modelo para el estudio de la dinámica molecular de este sistema bajo la inhibición de moléculas con el fin de buscar blancos terapéuticos.

## Capítulo 2. Metodología

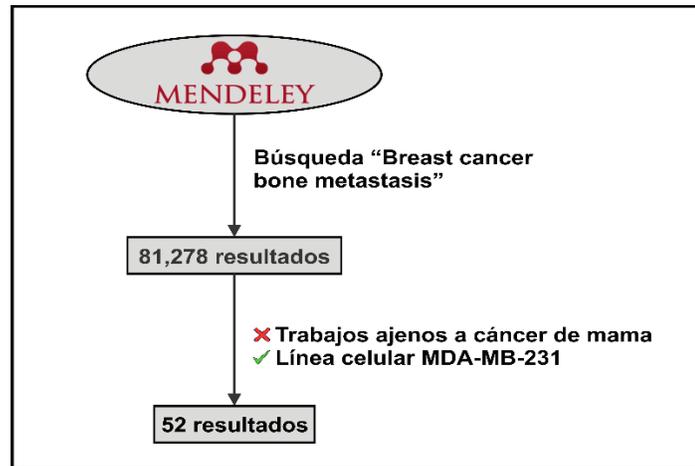
Para llevar a cabo el trabajo de esta tesis se siguió un flujo de trabajo similar al reportado por Bibi et al. (2017) (Figura 6), donde primero se hace una búsqueda de literatura relacionada al sistema a modelar, en este caso la metástasis ósea de cáncer de mama. Posteriormente se extraen los aportes de dichos trabajos con el fin de construir un primer modelo booleano. Seguido de una simplificación del sistema basada en el trabajo de Naldi et al. (2009), sin perder características principales del modelo. Luego se realiza la simulación y calibración del modelo, para finalmente analizar los estados y ciclos atractores obtenidos.



**Figura 6.** Flujo de trabajo para el desarrollo de la presente tesis.

### 2.1. Extracción de reglas de literatura

Haciendo uso del motor de búsqueda de Mendeley, se realizaron consultas de trabajos donde relacionen las vías de señalización del TGF- $\beta$ , así como otros factores moleculares con la metástasis ósea de cáncer de mama. Se implementó la siguiente palabra clave: “Breast cancer bone metastasis” con la cual se obtuvieron 81,278 resultados (Figura 7). Posteriormente, leyendo los títulos, resúmenes y metodologías de los trabajos, se excluyeron aquellos de tipo *in vitro* e *in vivo* no relacionados al cáncer de mama, y como filtro de inclusión se permitieron preferencialmente los estudios que hayan utilizado la línea celular MDA-MB-231. No fue posible filtrar todos los resultados y debido al tiempo solo se obtuvieron 52 entradas.



**Figura. 7.** Diagrama de flujo de búsqueda y filtro de literatura. Inicialmente se hizo la búsqueda bajo la palabra clave “Breast cancer bone metástasis” con 81,278 entradas. La cruz roja indica que se eliminaron resultados con ese criterio y la paloma verde significa lo contrario, que se mantuvieron los resultados que cumplieron ese criterio.

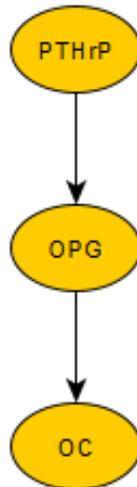
Finalmente, se procedió a la lectura de los 52 artículos y se extrajo el aporte de cada trabajo en una tabla de Excel. Además, se incluyeron algunos artículos y revisiones para extraer información sobre la dinámica de remodelado del hueso normal. En total se derivaron 31 reglas o hechos (Tabla 2).

Un ejemplo de cómo se extrajeron las reglas se describe a continuación. Del trabajo de Morinaga et al. (1997) se extrajo “IL-11 está asociado con la osteólisis ya que induce la osteoclastogénesis y suprime la actividad de osteoblastos”. Posteriormente se interpretó con operadores booleanos y flechas como se muestra a continuación;  $IL11 \rightarrow \uparrow OC \text{ AND } \perp \text{ actividad OB}$ , donde la flecha horizontal indica que el elemento de la izquierda promueve lo que sucede a la derecha, la flecha vertical señala que se activa a al OC y el símbolo de  $\perp$  representa inhibición, finalmente el operador AND solo representa que se están llevando a cabo dos actividades, la activación de OC y la inhibición de la actividad de OB. De esta manera se interpretó el resto de los aportes.

### 2.1.1. Modelado Cualitativo

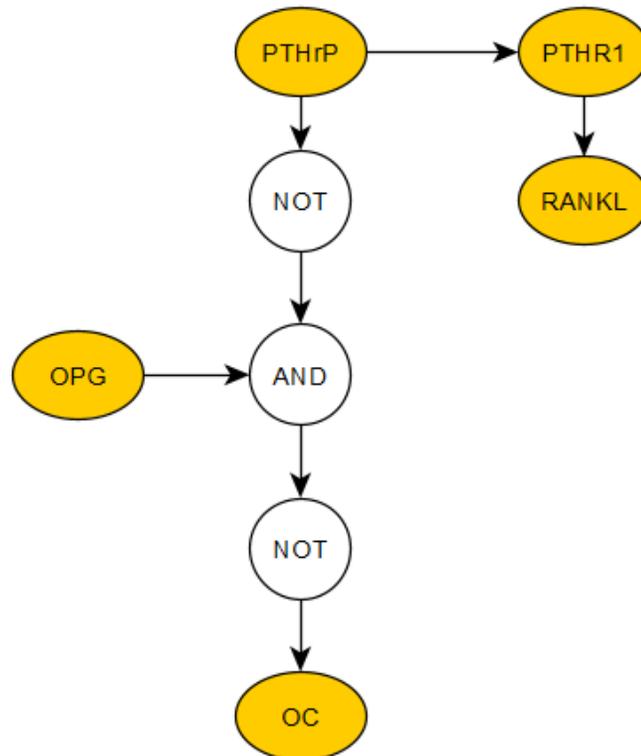
Se utilizó el *software* yEd, el cual es una herramienta amigable para el diseño y visualización de modelos esquemáticos (yWorks, 2019).

Con base en las reglas extraídas de la literatura, se diseñó un grafo con todas las moléculas consideradas y la existencia de una relación entre dichas moléculas mediante aristas. Por ejemplo, se encontró que existe una relación de PTHrP hacia OPG en la regulación de la activación de osteoclastos (Thomas et al., 1999) la cual se representa en la Figura 8.



**Figura 8.** Ejemplo de grafo de interacciones. Las flechas indican la dirección de reacción, mas no el tipo de relación. Los óvalos amarillos son moléculas, mientras que los óvalos con tres puntos señalan que existen otros elementos más adelante.

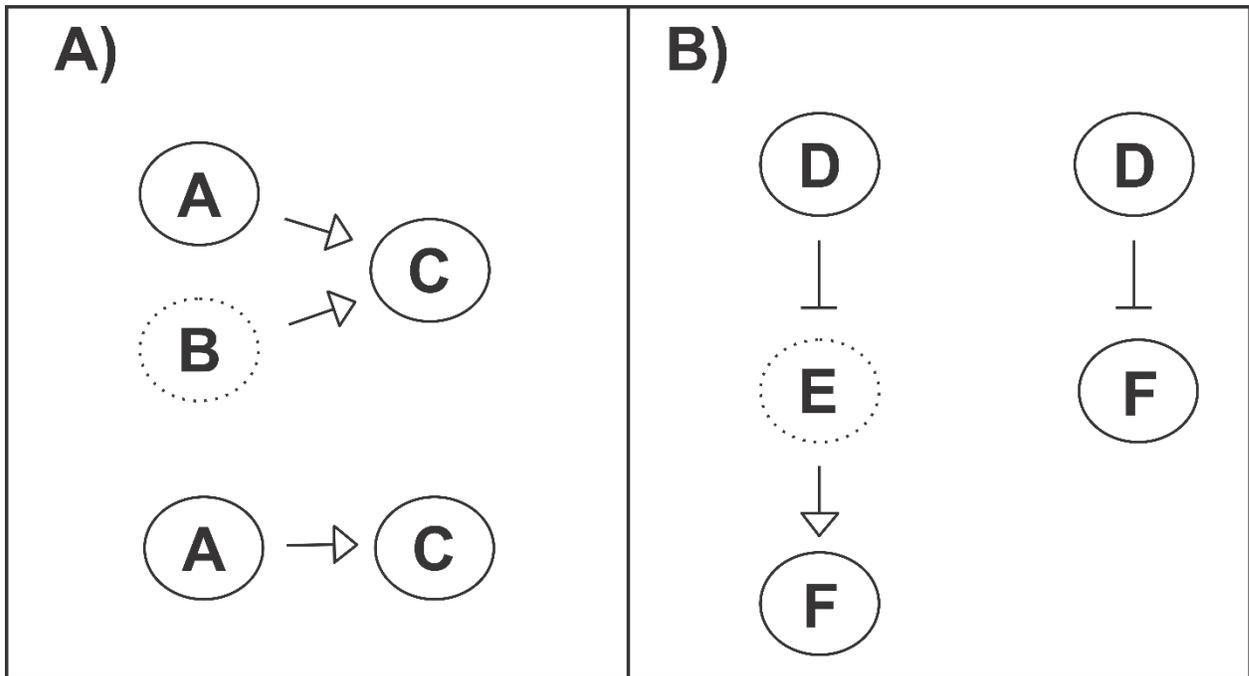
Posteriormente, haciendo uso de las compuertas lógicas AND, OR y NOT se diseñó el modelo booleano a partir del grafo, detallando el tipo de interacción tomando como referencia las reglas extraídas. Por ejemplo, se encontró que PTHrP activa el receptor PTHR1 para promover RANKL, y que además tiene la actividad de inhibir OPG el cual es un inhibidor de la activación de osteoclastos (Thomas et al., 1999), la representación de estas interacciones se muestra en la Figura 9. De esta manera se procedió con las reglas restantes, resultando en el modelo de la Figura 16, el cual contiene 8 entradas y 15 salidas, 17 compuertas lógicas, 47 nodos y 74 aristas. Las entradas del sistema son todos aquellos elementos que, de acuerdo con la literatura consultada no se detallan más moléculas o procesos que les precedan. Con una lógica similar, las salidas del sistema son todos aquellos elementos que, de acuerdo con la literatura consultada, no se detallan más moléculas o procesos que les procedan.



**Figura 9.** Ejemplo de interpretación de reglas extraídas de la literatura. PTHrP realiza las siguientes dos actividades, activar PTHR1 para promover RANKL, y la inhibición de OPG. La activación es apreciable directamente, sin embargo, para la inhibición es necesario un arreglo de compuertas NOT y AND, las cuales permitirán que la actividad de OPG se lleve a cabo solo en la ausencia de PTHrP, pues en su presencia la compuerta NOT invertiría el valor de 1 a 0, evitando que la compuerta AND entregue un 1 a la salida para elementos más adelante en el sistema.

## 2.2. Simplificación del modelo booleano

Para fines de simulación, se buscó reducir el problema de combinatoria en las condiciones iniciales, por lo que se eliminaron aquellos nodos de entrada que tenían un mismo efecto en el sistema (Figura 10A). Además, siguiendo la metodología propuesta por Naldi et al. (2009) para la reducción de redes, las interacciones en serie con más de dos elementos fueron simplificadas a interacciones directas entre los dos elementos en extremos, como se ilustra en la Figura 10B.



**Figura 10.** Regla de simplificación de interacciones. A) Las entradas A y B promueven independientemente a C por lo que tienen el mismo efecto en el sistema. Además, por tratarse de entradas con el mismo tiempo discreto de acción, es posible eliminar una de ellas. B) Suponiendo tres moléculas que se relacionan en serie (D, E y F), donde D inhibe E y esta a su vez promueve F, es posible simplificar las interacciones eliminando el elemento intermedio (E en círculo punteado) y estableciendo el efecto, indirecto de D hacia F como una interacción directa, es decir, D inhibiendo a F (Naldi, Remy, et al., 2009).

### 2.3. Simulación

Para estudiar la dinámica molecular de la metástasis ósea del cáncer de mama, se utilizaron *softwares* de simulación de modelos booleanos. En un principio, se trabajó con el *software* Gene Interaction Network simulation (Naldi et al., 2009), el cual está especializado en el diseño y simulación de redes regulatorias genéticas, con parámetros ajustables de las características del modelo cualitativo desarrollado.

Para lo anterior se realizó un diagrama del sistema equivalente de yEd en GINsim (Figura 19), y se escribieron las reglas de interacción para cada nodo. De esta manera se comenzó por simular todas las posibles combinaciones de las 8 entradas, de modo síncrono con todos los nodos a excepción de aquellas entradas en un estado inicial '0'.

Debido a que los resultados obtenidos en GINsim son poco personalizables en cuanto a su presentación y manejo, resultó de difícil análisis (Figura 20, A y B), por lo que se buscó un *software* adicional que permitiera solo el monitoreo de las salidas dadas bajo ciertas condiciones iniciales.

Dentro de los criterios de búsqueda del *software* se consideró que estuviera documentado y actualizado, que posea una interfaz amigable, que permitiera además el uso de compuertas y etiquetas para la organización del modelo. Con estos criterios se optó por Logic.Ly (Logic.Ly, 2019), el cual está pensado para el diseño y simulación de circuitos digitales. Se realizó el diagrama equivalente de yEd en Logic.Ly (Figura 21), y dado que esta representación con compuertas lógicas no requiere establecer la interacción por nodo, se procedió a la directa simulación manual de cada una de las posibles combinaciones de entrada. La actualización de los nodos fue síncrona. De las 256 distintas condiciones iniciales simuladas se obtuvieron 7 comportamientos distintos. Un resumen de los distintos comportamientos se muestran en la Figura 22 y se discuten de manera independiente desde la Figura 23 hasta la 28.

Finalmente se utilizó una paquetería de R especializada en modelos booleanos llamada BoolNet (Müssel et al., 2010), esta librería permite construir, simular y analizar modelos booleanos mediante sus distintas herramientas. No obstante, para obtener las transiciones de estado de las simulaciones, el modelo no debe exceder los 29 nodos. Una vez simplificado el modelo (lo suficiente para su análisis), se describió en un archivo llamado “BCBM.txt” cada una de las moléculas y procesos presentes en el sistema, y se especificaron las reglas booleanas mediante las cuales son reguladas (Figura 11).

```
BCBM - Notepad
File Edit Format View Help
targets, factors
Ocp, Ocp
TBRII, TBRII
SMAD67, SMAD67
SMAD4, SMAD4
Wnt3a, Wnt3a
SDF1, SDF1
RANKL, (PTHrP | Ocp | IL8 | IL11 | OB | IL6) & (!OPG | PTHrP)
OC, RANKL & Ocp
OPG, BResorption
Ca, BResorption
TGFB, BResorption
OBp, TGFB
PDGF, TGFB
Jagg1, TGFB
OB, OBp & PDGF
IL6, Jagg1
SMAD23, TBRII & TGFB & !SMAD67
PTHrP, Gli2
Gli2, Wnt3a | GReg
GReg, SMAD23 & SMAD4
IL11, GReg
COX2, GReg
CXCR4, GReg
PGE2, COX2
IL8, PGE2
BResorption, OC
BFormation, OB & !IL11
Homing, CXCR4 & SDF1
CancerGrowth, Ca & Homing
```

**Figura 11.** Moléculas y procesos del sistema en reglas booleanas para BoolNet. La primera línea describe los tipos de parámetros separados por coma. Primero se escribe la molécula o proceso, y después de la coma las reglas que lo regulan. Los operadores lógicos AND, OR, y NOT se representan mediante &, | y ! respectivamente. Si en *factors* se encuentra lo mismo que en *targets* significa autoregulación, lo cual se implementó para cada una de las entradas.

Posteriormente se generó una imagen de la interpretación de la paquetería sobre las conexiones del modelo con los comandos de la Figura 12. Con estos comandos se generó la imagen de la Figura 19.

```
> #Cargar el modelo en archivo BCBM.txt a variable BCBM
> BCBM <- loadNetwork("BCBM.txt")
> #Desplegar modelo construido a partir de las reglas
> plotNetworkwiring(BCBM)
```

**Figura 12.** Captura de funciones de paquetería BoolNet en R utilizados en consola para cargar el modelo y desplegarlo en una imagen.

Una vez cargado el modelo al entorno, se utilizó el comando de la Figura 13 para simular cada una de las condiciones iniciales implementadas en Logic.Ly mostradas en la Figura 22. También se utilizó el método de actualización síncrona pero en este caso para cada condición inicial la paquetería simula las distintas combinaciones del resto de los elementos del sistema, es decir, no se inicializan en '0' como en los dos *softwares* anteriores. El resultado de estas simulaciones se muestra en las Figuras 30-36.

```
> attr <- getAttractors(BCBM, genesON = c("Ocp", "wnt3a", genesOFF = c("TBR1", "SMAD67", "SMAD4", "SDF1")))
```

**Figura 13.** Función de paquetería BoolNet en R, para la creación de variable attr a la cual se le asignan los atractores de la simulación del modelo BCBM, con moléculas (consideradas entradas) en un estado constante de encendido o apagado. BoolNet toma los elementos que se mantendrán constantes, y realiza múltiples simulaciones cambiando el estado inicial de los elementos no constantes, con el fin de obtener aquellos estados o ciclos atractores.

### 2.3.1. Comparativa de *softwares*

En total se utilizaron tres herramientas para la simulación del modelo (GINsim, Logic.Ly y BoolNet). Si bien GINsim es un *software* especializado que permite simular modelos con un número grande de elementos, los resultados que se obtienen muestran los cambios del sistema desde las condiciones iniciales hasta los estados o ciclos atractores, lo cual incrementa la dificultad de seguir un determinado resultado. Además, las herramientas de análisis son limitadas. En contraste, Logic.Ly, un *software* no especializado en sistemas biológicos, sino en el diseño y simulación de circuitos digitales, permite simular el modelo con compuertas lógicas y analizar manualmente los estados y ciclos atractores obtenidos para cada una de las condiciones iniciales por separado. Sin embargo, sus herramientas de análisis de resultados son inexistentes y el método de actualización de nodos es solo síncrono. Por otro lado, BoolNet no solo es un *software*

especializado en el diseño y simulación de redes moleculares, sino que también posee herramientas de análisis y presentación de datos que facilitan interpretar y dar seguimiento a los estados y ciclos atractores del sistema. Posee actualización de nodos síncrona y asíncrona. El inconveniente de esta paquetería recae en la limitante de número de nodos que pueden ser simulados mediante sus herramientas. En la Tabla 1 se muestran más características de cada una de estas herramientas. A simple vista BoolNet es la que ofrece más ventajas y menos desventajas respecto a los otros *softwares*, por lo que para futuros trabajos podría solo emplearse esta paquetería.

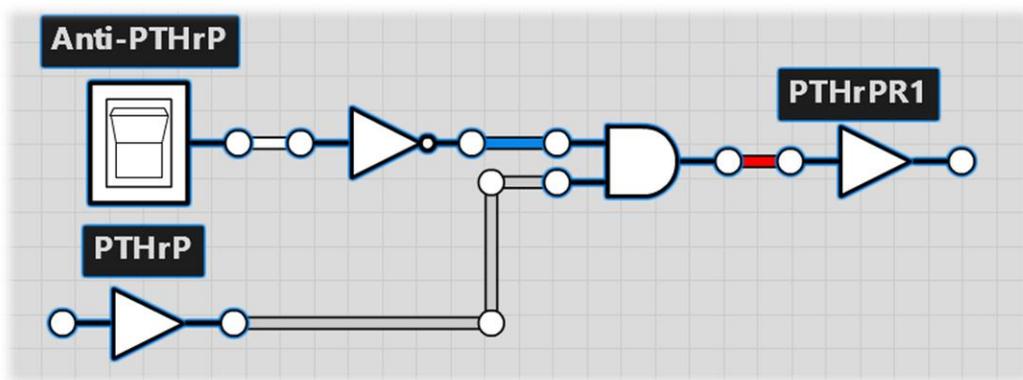
**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de herramientas de simulación utilizadas.

<b>Software</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>GINsim</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especializado en diseño y simulación de modelos booleanos de redes moleculares</li> <li>• Distintos métodos de actualización de nodos (elementos, síncrono y asíncrono)</li> <li>• Interfaz de diseño de modelo semi gráfica</li> <li>• Simulación automática y personalizable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil interpretación de resultados en sistemas con más de 20 nodos</li> <li>• Poca flexibilidad de análisis de resultados</li> <li>• Sin herramientas de análisis post-simulación</li> </ul>
<b>Logic.Ly</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil visualización de salidas del sistema</li> <li>• Diseño de modelos en interfaz gráfica amigable</li> <li>• Sin límite aparente de nodos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No especializado en diseño, simulación y análisis de modelos booleanos</li> <li>• Introducción de condiciones iniciales y simulación manual</li> <li>• Solo actualización de nodos síncrona</li> </ul>
<b>BoolNet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especializado en el diseño, simulación y análisis de modelos booleanos</li> <li>• Actualización de nodos síncrona y asíncrona</li> <li>• Fácil visualización de estados y ciclos atractores del sistema</li> <li>• Simulación automática y personalizable</li> <li>• Varias herramientas de análisis post-simulación</li> <li>• Fácil exportado de modelo y resultados a otras plataformas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitación en número de nodos (hasta 29 nodos)</li> </ul>

## 2.4. Validación

### 2.4.1. Inhibición de PTHrP

Después de las simulaciones del modelo en Logic.ly, se procedió a validar computacionalmente el efecto inhibitor de PTHrP que, de acuerdo con un trabajo experimental consultado, su efecto es la inhibición de la metástasis ósea osteolítica dependiente del TGF- $\beta$  (Käkönen et al., 2002). El arreglo de compuertas en Logic.Ly para simular este inhibidor se puede apreciar en la Figura 14. Además, el resultado de esta simulación se muestra en la Figura 37.



**Figura 14.** Logic.Ly. Arreglo de compuertas de inhibidor Anti-PTHrP. El interruptor Anti-PTHrP se encuentra apagado, por lo que la compuerta NOT que le precede convierte la señal de apagado/ausente (0 lógico) en un 1, de manera que la compuerta AND a la que está conectada en conjunto con la señal de PTHrP permitirá la acción de esta última molécula. En caso contrario, la compuerta NOT tendría una salida '0' en la presencia de Anti-PTHrP, provocando la obstrucción de la señal (inhibición) y la futura activación del receptor de PTHrP.

Este mismo experimento de inhibición de PTHrP se llevó a cabo con BoolNet estableciendo la molécula en estado fijo bajo durante las simulaciones y los resultados se pueden consultar en la Figura 38.

### 2.4.2. Prueba de robustez

Existen herramientas dentro de la paquetería BoolNet de R, que permiten calcular qué tan sensible son los estados y ciclos atractores a los cambios aleatorios en las condiciones iniciales, ya que en la naturaleza estos sistemas se encuentran inmersos en una gran cantidad de ruido, es decir, otras señales que

interfieren con la señalización deseada. Una de estas herramientas es la perturbación de trayectorias, en la que los estados transitorios del sistema son modificados y se realizan pruebas de robustez comparando los estados o ciclos atractores de un conjunto de condiciones iniciales generadas aleatoriamente y sus copias perturbadas. El comando utilizado en esta prueba fue el que se muestra en la Figura 15.

```
| > HD1 <- perturbTrajectories(BCBM, measure = "hamming", flipBits = 1)
```

**Figura 15.** Función de BoolNet para el cálculo de la distancia de Hamming. El cálculo es efectuado en el modelo booleano cargado en la variable BCBM, el parámetro “*measure*” determina el tipo de medición de robustez y “*FlipBits*” el número de variables modificadas a las condiciones iniciales.

La métrica utilizada para medir la robustez fue la distancia de Hamming, la cual mide el número de diferencias entre el resultado de ambas simulaciones, es decir, la simulación y su copia perturbada. Cuando el número de perturbaciones en las condiciones iniciales incrementa súbitamente la distancia de Hamming de los estados o ciclos atractores comparados, esto sugiere que el modelo es muy sensible a los cambios en las condiciones iniciales, una característica principal del comportamiento caótico.

## Capítulo 3. Resultados y discusión

---

### 3.1. Extracción de reglas

Un extracto de los aportes de cada trabajo consultado se puede observar en la Tabla 2. En dicha tabla se muestra la traducción de los aportes a un lenguaje de símbolos ( $\rightarrow$ ,  $\uparrow$  y  $\perp$ ) y operadores lógicos (AND, OR y NOT), los cuales sirven como guía para su posterior integración a los *softwares* utilizados en la simulación del modelo booleano. En total son 31 reglas o aportes los cuales se resumen a continuación:

**Reglas 1-12.** Reglas extraídas de literatura que se relacionan con la remodelación ósea en condiciones normales o sanas del hueso. Relacionándose además con la señalización normal de la vía canónica del TGF- $\beta$ .

El resto de las reglas (Tabla 2, reglas 13 a 31) son hechos extraídos de la literatura relacionados con la metástasis ósea de cáncer de mama.

**Reglas 13 y 14.** Se muestra que la proteína PTHrP es favorecida por la acción de Gli2, y que este a su vez puede ser sintetizada por dos vías distintas, la del TGF- $\beta$  y la de Wnt3a de manera independiente.

**Reglas 15, 23, 29 y 30.** Describen las moléculas reguladas por TGF- $\beta$  mediante su vía canónica.

**Regla 16.** De acuerdo con Buijs J. et al. (2011), SDF-1 en conjunto con CXCR4 son necesarios para el establecimiento del cáncer.

**Regla 17.** Se muestra la actividad de PTHrP promoviendo RANKL e inhibiendo OPG.

**Regla 18.** IL11 promueve la activación de OC's e inhibe la actividad de OB's (formación de hueso).

**Reglas 19-21.** Se encuentra el sistema de Jagged-1 y Notch3 reguladas por TGF- $\beta$ .

**Reglas 19, 22, 24 y 30.** Con estas reglas se incorporan al modelo algunas otras moléculas cuyos trabajos no reconocen la vía del TGF- $\beta$  por la que son reguladas o al menos se sabe que es mediante una vía no canónica.

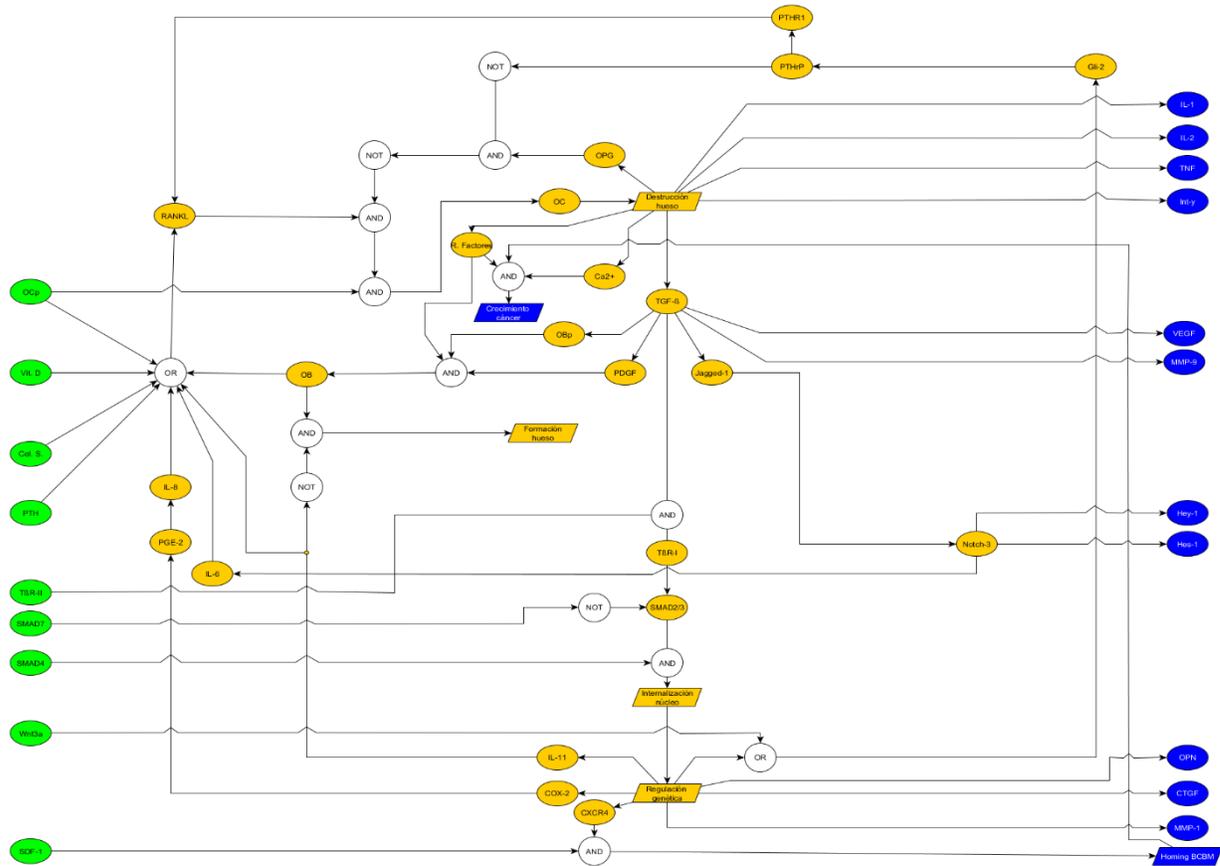
**Reglas 25-28.** Señalan la regulación de RANKL mediante IL8 sintetizado por PGE2, el cual es regulado positivamente por COX-2, una molécula regulada a nivel de promotor por TGF- $\beta$ .

**Regla 31.** Se muestra la dependencia del establecimiento del cáncer con Ca para que se lleve a cabo el crecimiento del cáncer.

**Tabla 2.** 31 reglas extraídas de aportes en literatura. Los renglones de color verde son extraídos de condiciones normales, mientras que los rojos de trabajos sobre la metástasis ósea de cáncer de mama. Se describen los procesos biológicos mediante compuertas AND, OR y símbolos como → el cual significa que un elemento promueve la activación (↑) o inhibición (⊥) de otro.

No. Regla	Información extraída	Referencias
1	OB → ↑Formación de hueso	Lemaire et al. (2004)
2	OC → ↑Destrucción de hueso	Lemaire et al. (2004)
3	Destrucción hueso → ↑TGF-β AND ↑BMPs AND ↑OPG AND ↑IGF-I AND ↑IGF-II AND ↑interferon-γ AND ↑TNF AND ↑IL-1 AND ↑IL-2 AND ↑Ca	Chiechi et al. (2013)
4	OCp (OC precursor) OR SC (Stromal cell) OR OB OR PTH OR Vitamina-D OR IL-6 OR IL-11 OR PGE2 → ↑RANKL	Chiechi et al. (2013)
5	TGF-β → ↑OBp (OB precursor)	Iqbal et al. (2009)
6	OBp AND BMPs AND IGF-I AND IGF-II AND Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) → ↑OB	Canalis et al. (2009)
7	(NOT OPG AND RANKL) AND OCp (RANK) → ↑OC	Gou et al. (2004)
8	TGF-β AND TBRII → ↑TBRI	Attisano y Wrana (2002)
9	TBRI → ↑SMAD2/3	Attisano y Wrana (2002)
10	SMAD2/3 AND SMAD4 → ↑ Internalización al núcleo	Attisano y Wrana (2002)
11	Internalización al núcleo → ↑ Regulación genética	Attisano y Wrana (2002)
12	SMAD7 → ⊥SMAD2/3	Miyazono (2000)
13	Wnt3a OR TGF-β vía canónica → ↑Gli2	Johnson et al. (2014)
14	Gli2 → ↑PTHrP	Johnson et al. (2014); Sethi et al. (2011)
15	TGF-β vía canónica → ↑IL11 AND ↑Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) AND ↑MMP-1 AND ↑CXCR4 AND ↑PTHrP	Guise et al. (1996)
16	CXCR4 AND SDF-1 (Stromal-derived factor-1 de OBs) → Homing	Buijs et al. (2011); Sethi et al. (2011)
17	PTHrP → ↑RANKL AND ⊥ OPG	Thomas et al. (2011)
18	IL11 → ↑OC AND ⊥ actividad OB	Morinaga et al. (1997); Jilka et al. (1992)
19	TGF-β → ↑Jagged-1	Buijs et al. (2011)
20	Jagged-1 → ↑Notch3 (OBc y OCs)	Buijs et al. (2011)
21	Notch3 → ↑IL6 (OBs) AND ↑Hes-1 AND ↑Hey-1	Buijs et al. (2011); Zhang et al. (2010)
22	TGF-β → ↑IL6 AND ↑IL11 (IL8 producida por otra vía)	Guise et al. (2003)
23	TGF-β vía canónica → ↑IL11 AND ↑CTGF (Connective tissue growth factor)	Kang et al. (2005)
24	TGF-β → ↑MMP-9	Stark et al. (2007); Duivenvoorden et al. (1999)
25	TGF-β → ↑COX-2 (Ciclooxigenasa-2)	Hiraga et al. (2006)
26	COX-2 → ↑PGE2 (Prostaglandina E2)	Hiraga et al. (2006)
27	PGE2 → ↑IL8	Hiraga et al. (2006); Heymann (2014)
28	IL8 → ↑RANKL	Hiraga et al. (2006); Heymann (2014)
29	TGF-β → ↑IL11 AND ↑CTGF AND ↑CXCR4 (CXC chemokine receptor 4) AND ↑OPN (Osteopontina) AND ↑MMP-1	Dunn et al. (2009)
30	TGF-β → ↑PTHrP AND ↑IL6 AND ↑IL8 AND ↑VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) AND ↑PDGF	Dunn et al. (2009)
31	Ca AND Factores de destrucción de hueso AND Homing → ↑Cancer Growth	Heymann (2014)

Posteriormente se realizó un esquema gráfico del modelo con base en la Tabla 2. Para esto se utilizó el *software* yEd que permite editar y generar diagramas. El resultado se puede ver en la Figura 16, la cual servirá de base para el futuro diseño del modelo booleano en los *softwares* de simulación.

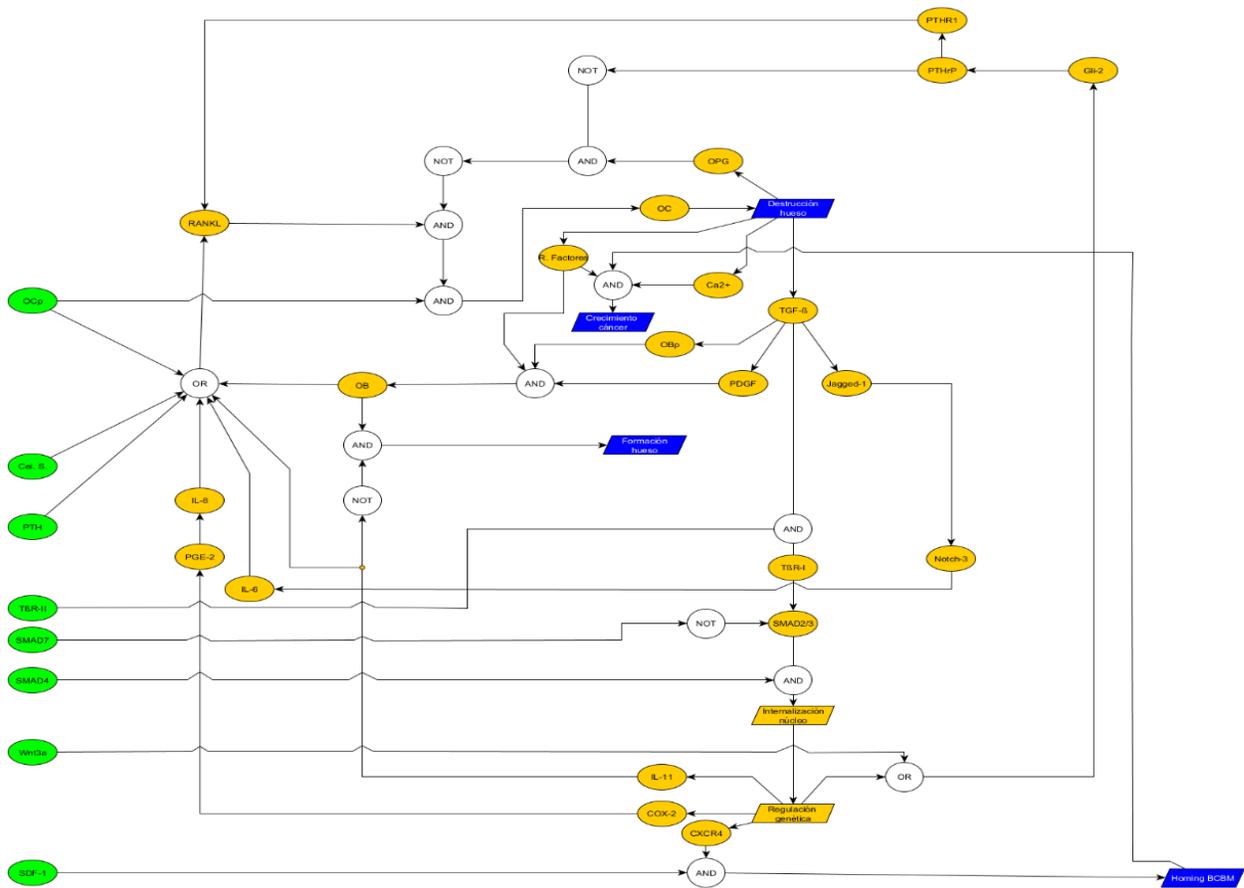


**Figura 16.** Diseño hecho en el *software* gráfico yEd. Diagrama de interacciones moleculares basado en los artículos consultados bajo las palabras clave “TGF-β AND Breast cancer bone metástasis”. Los óvalos verdes son las entradas del sistema, los elementos de color azul son moléculas o procesos de salida, los elementos amarillos son moléculas o procesos internos del sistema, y los círculos blancos son los operadores AND, OR y NOT.

Como se puede observar, las entradas OCp, células estromales (Cel. S) y hormona paratiroidea (PTH) se encuentran relacionadas en la síntesis de RANKL. En condiciones normales, es decir, sin el efecto negativo del resto de las entradas, favorecerían el remodelado del hueso sano. Las entradas TBR-II, SMAD7 y SMAD4 pertenecen a la vía canónica del TGF-β y se encargan de su modulación, la presencia de SMAD7 inhibe la señalización, mientras que la presencia de las otras dos moléculas favorece la eventual regulación genética. Los genes regulados por esta vía, comprendidos en este modelo, corresponden a los relacionados con la metástasis ósea de cáncer de mama. Wnt-3a regula a Gli-2 de manera independiente a TGF-β. Mientras que SDF-1 en conjunto con CXCR4 regulada por TGF-β permite el establecimiento del cáncer.

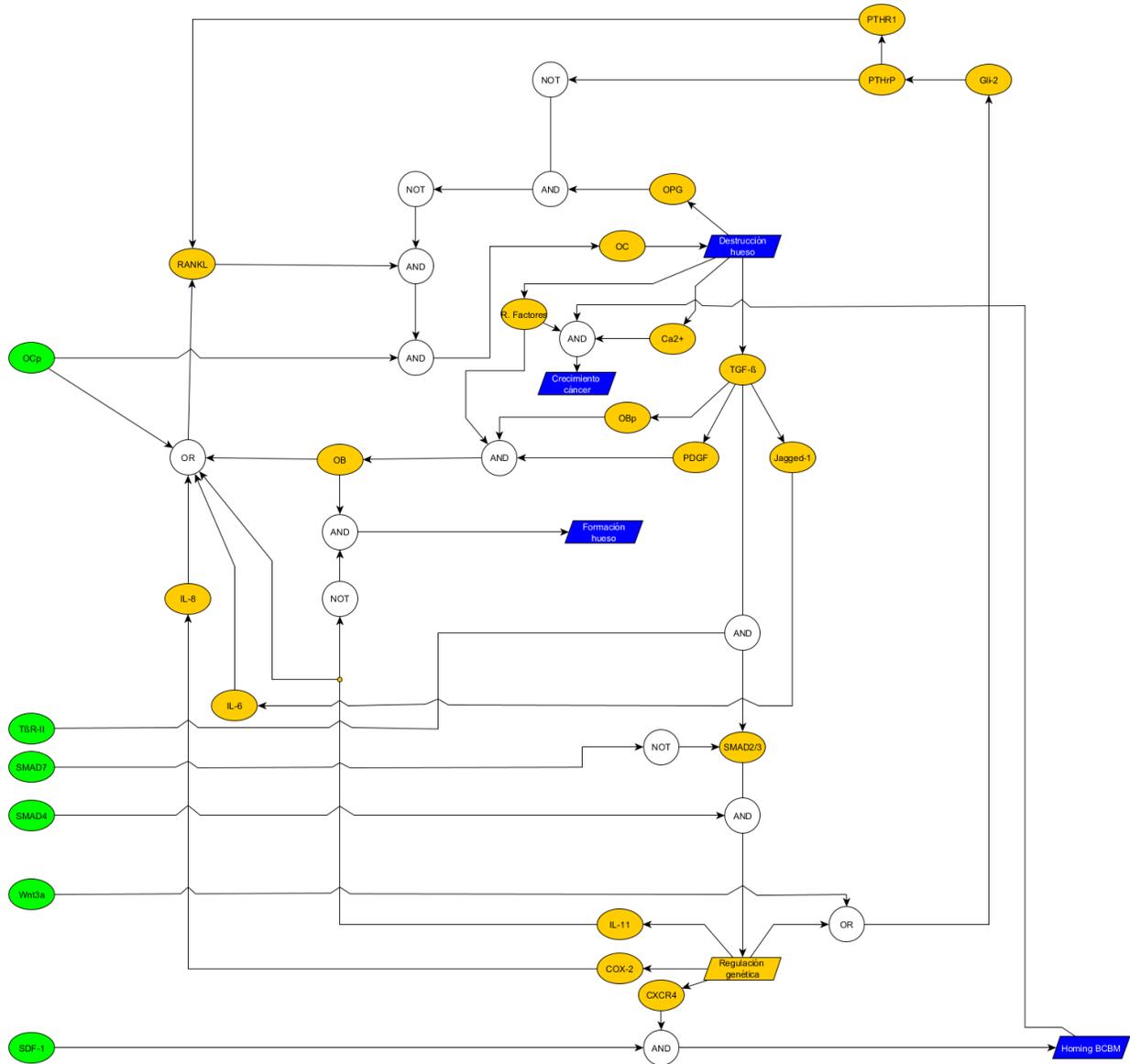
### 3.2. Simplificación del modelo

En una primera instancia, no fue necesaria la simplificación de nodos e interacciones. Sin embargo, dado que se tienen 9 entradas y estas pueden tener el valor de 1 o 0, las combinaciones posibles son 512 ( $2^9$ ), por lo cual se buscó reducir el modelo considerando solamente 8 de 9 entradas. En el modelo existen 4 entradas que tienen el mismo efecto en el sistema, por lo que se optó por eliminar de manera aleatoria una de ellas (Vitamina D). De esta manera la combinación de 8 entradas resulta más manejable (256 combinaciones de entrada). Además, solo se tomaron en cuenta 4 de 15 salidas, las cuales fueron los procesos de formación ósea, destrucción ósea, establecimiento de cáncer y crecimiento de cáncer (Figura 17). El resto de los elementos de salida pueden llegar a ser redundantes o poco informativos, por lo que gracias a esta consideración se disminuyó el monitoreo de potenciales 32,768 combinaciones de salida a solo 16. El modelo de la Figura 17 se utilizó en las herramientas GINsim y Logic.Ly.



**Figura 17.** Diseño con primera reducción hecho en el *software* gráfico yEd. Similar al de la Figura 16, pero con la eliminación de vitamina D. Los óvalos verdes son las entradas del sistema, los elementos de color azul son moléculas o procesos de salida, los elementos amarillos son moléculas o procesos internos del sistema, y los círculos blancos son los operadores AND, OR y NOT.

Posteriormente, por limitaciones de *software* (paquetería BoolNet de R), se redujeron los 36 nodos restantes a solo 29. Se eliminaron dos entradas del sistema, las cuales son células estromales y PTH, ya que ambas tienen el mismo efecto que los precursores de osteoclastos sobre RANKL. Además, se eliminaron 5 nodos con efectos en serie (TβR-I, Internalización al núcleo, Notch-3, PGE-2, PTHrPR), siguiendo la metodología antes descrita por Naldi et al. (2009). El modelo resultante se muestra en la Figura 18.

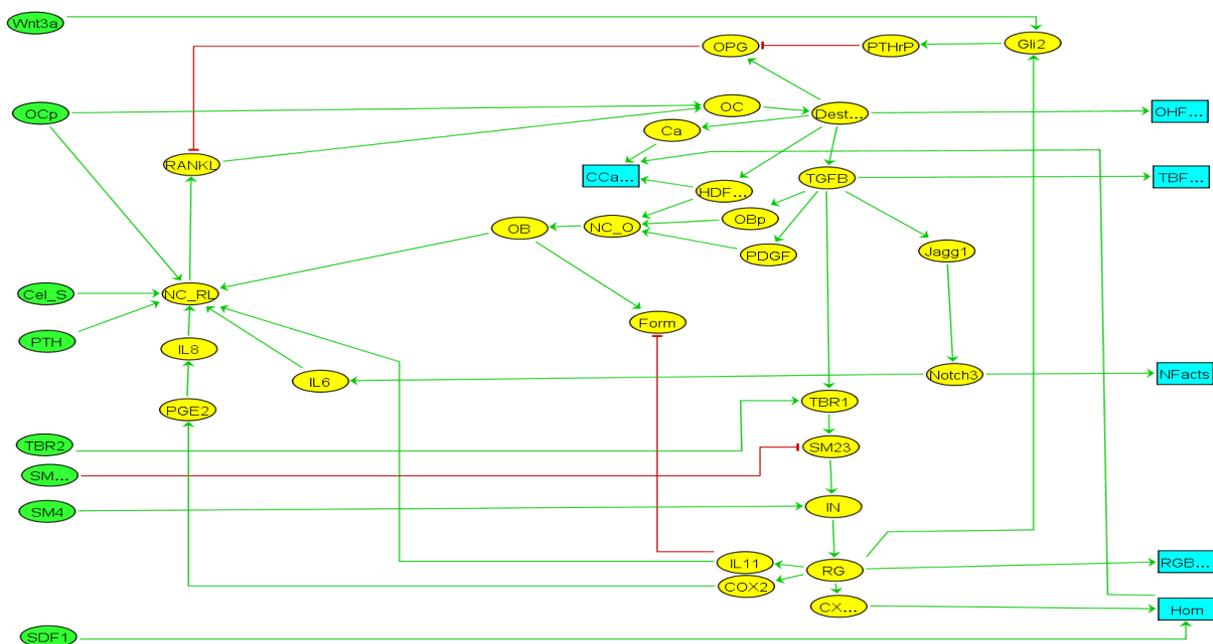


**Figura 18.** Diseño con reducción a 29 nodos para BoolNet. En este caso se eliminaron las entradas células estromales y PTH por tener el mismo efecto en el sistema que OCp. También se redujeron cinco nodos con reacciones en serie de acuerdo con Naldi A. et al., 2009. Los óvalos verdes son las entradas del sistema, los elementos de color azul son moléculas o procesos de salida, los elementos amarillos son moléculas o procesos internos del sistema, y los círculos blancos son los operadores AND, OR y NOT.

### 3.3. Simulaciones

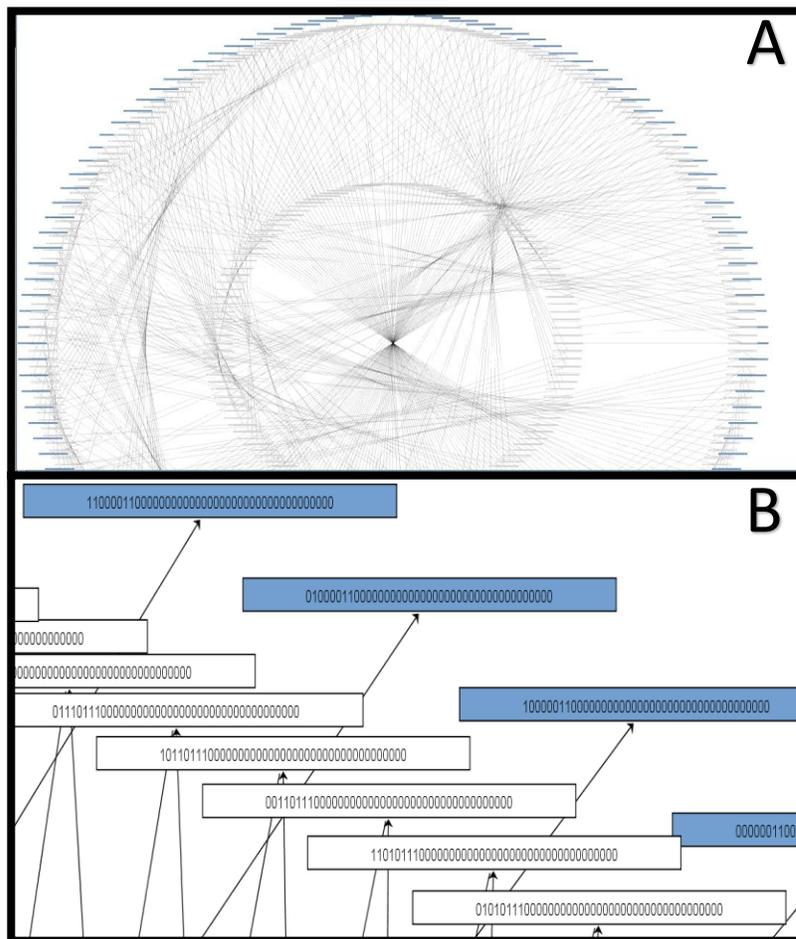
#### 3.3.1. Software GINsim

En la Figura 19 se muestra el modelo resultante de integrar las reglas de la Tabla 2, con ayuda del esquema de la Figura 16. Las flechas verdes y líneas rojas indican el tipo de relación que tiene una molécula con la siguiente. Sin embargo, estas líneas sirven de guía visual, ya que las interacciones de activación e inhibición se establecen internamente en cada molécula con los operadores lógicos. Si se descompone el modelo en bloques o unidades funcionales (motivos) de unos cuantos nodos, se puede identificar al menos tres motivos clave. El primero es el formado entre OC y OB, que a través de otros nodos forman una retroalimentación positiva. Este tipo de motivos genera una respuesta continua ya que uno activa al otro y viceversa. El segundo motivo clave incluye los elementos OC, destrucción de hueso, OPG y RANKL formado de cascadas de activación y retrasos con retroalimentación negativa. Dicho motivo genera las oscilaciones entre la destrucción y formación de hueso. El tercer motivo más importante es el del TGF- $\beta$  y todos los nodos en serie hasta RG (Regulación genética) estableciendo un gran retraso en la señal, pero finalmente llegando a regular procesos que favorecen la destrucción del hueso sobre la formación.



**Figura 19.** Diagrama de modelo diseñado en GINsim. Los óvalos verdes son las entradas, los rectángulos azules son salidas, el resto de los elementos amarillos son moléculas o procesos del sistema, las flechas verdes indican que hay una relación positiva y las líneas rojas que existe una inhibición. Los tipos de relaciones que regulan a cada molécula se especifica aparte.

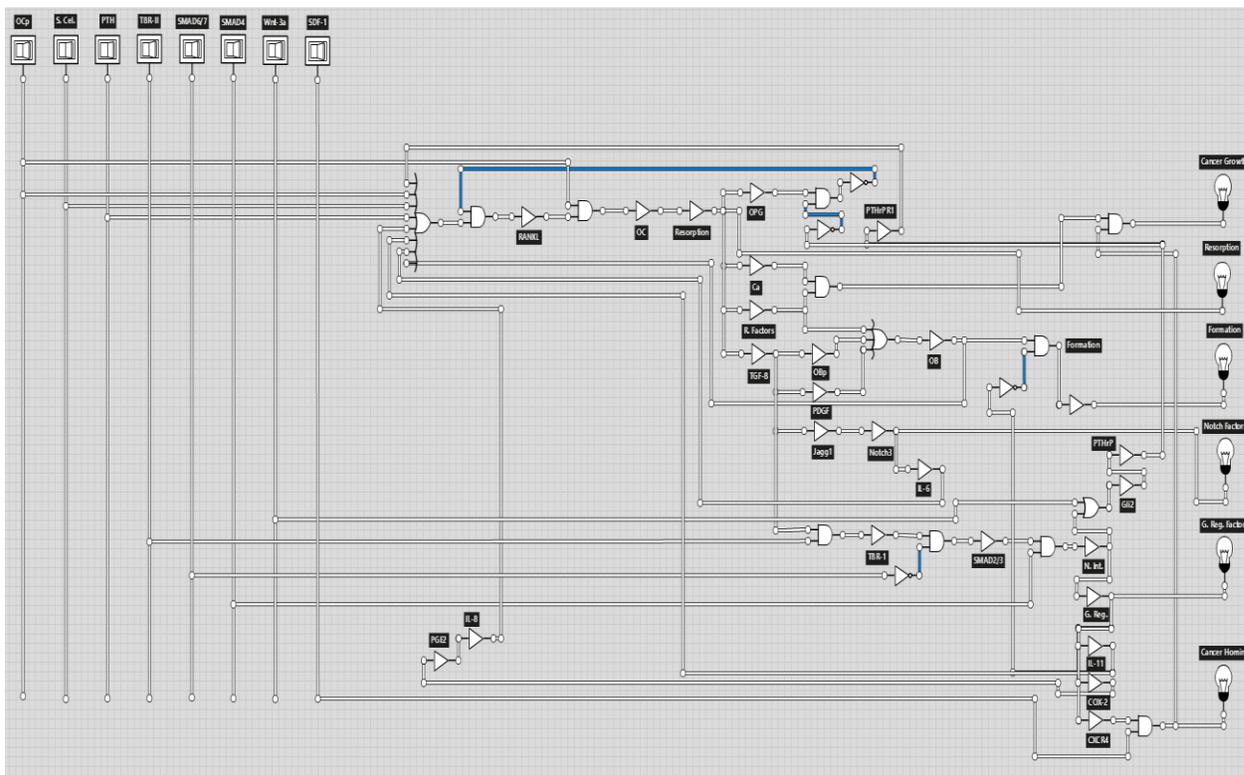
Una vez obtenido el modelo equivalente en GINsim, se procedió a la simulación. El método de actualización del sistema fue síncrono, y se establecieron todas las condiciones iniciales combinatoriamente posibles en cuanto a las entradas. La Figura 20 A muestra el grafo de transiciones entre estados obtenidos por GINsim, en el que los extremos de rectángulos azules indican estados atractores y los rectángulos de color blanco representan transiciones de estado. En la Figura 20 B se hace un acercamiento a un extremo en particular del grafo, donde es posible ver el estado del sistema respecto a cada una de las moléculas simuladas. Sin embargo, como se puede apreciar en ambas figuras, a simple vista es difícil analizar los resultados, además de que el *software* no posee herramientas para su análisis post-simulación, y los resultados no se pueden exportar a algún otro *software* que si lo permita. Debido a esto, se buscó un *software* que permitiera observar y analizar exclusivamente las salidas para las condiciones iniciales establecidas.



**Figura 20.** Resultados de simulación síncrona en GINsim. A) Primeros resultados con máximo alejamiento posible. B) Acercamiento de primeros resultados, cada número representa el estado (presente o ausente) de cada elemento del sistema y cada rectángulo representa el estado actual del sistema, los rectángulos azules son estados atractores y los rectángulos blancos son estados transitorios.

### 3.3.2. Software Logic.Ly

Con la misma lógica de GINsim, se diseñó el diagrama para el software Logic.Ly. Por tratarse de un programa para circuitos electrónicos digitales, el resultado en la Figura 21 indica directamente los tipos de interacción entre moléculas mediante los símbolos de los operadores lógicos.



**Figura 21.** Diagrama equivalente del sistema, diseñado en Logic.Ly. Los interruptores horizontales en la parte superior izquierda son las entradas del sistema, estos pueden permanecer encendidos o apagados. Los focos en el costado derecho son las salidas del sistema, las transiciones de encendidos y apagados son los analizados para obtener estados o ciclos atractores. Los triángulos blancos son buffers que sirven como moléculas o procesos, y el resto de los símbolos son compuertas lógicas que describen el tipo de interacción, AND, OR y NOT.

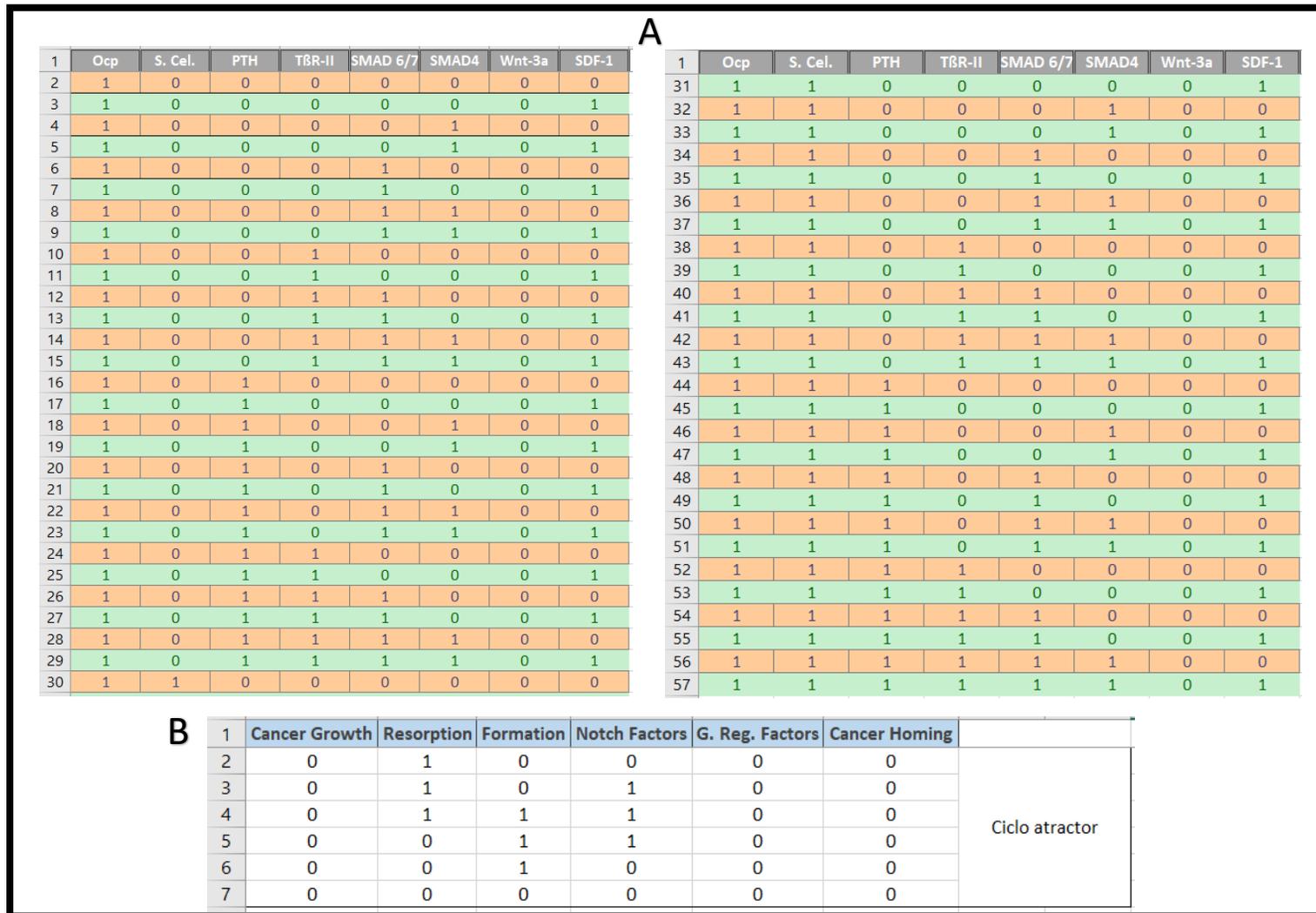
En Logic.Ly tanto la simulación como la extracción de los resultados se realizó manualmente. Cada estado del sistema fue actualizándose paso a paso de manera síncrona hasta que se llegó a un punto donde se repetía el mismo estado del sistema (estado atractor), o se repetía una serie de estados del sistema en un orden en particular (ciclo atractor). De las 256 simulaciones se obtuvieron 7 comportamientos distintos, 3 ciclos atractores y 4 estados atractores, los cuales se pueden apreciar en la Figura 22 y de acuerdo con la literatura poseen cierta congruencia biológica. Se muestran las condiciones iniciales que dieron lugar a cada uno de los distintos comportamientos en las Figuras 23-28.

Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Estado atractor
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	Ciclo atractor
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	Estado atractor
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	Ciclo atractor
1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	Ciclo atractor
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	
1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	Estado atractor
1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	
1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Estado atractor
1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	

**Figura 22.** Resumen de resultados obtenidos de la simulación en LogicLy. Las primeras 8 columnas corresponden a las entradas y su valor como condiciones iniciales para la simulación, éstas son Precusores de osteoclastos (OCp), Células estromales (S. Cel.), PTH, TBR-II, SMAD6/7, SMAD4, Wnt-3a y SDF1. Las siguientes 6 columnas corresponden a las salidas del sistema, éstas son Crecimiento del cáncer, Resorción ósea, Formación ósea, Factores notch, Genes regulados por TGF-β y Establecimiento del cáncer. Cada fila corresponde al estado actual del sistema en cuanto entradas y salidas se refiere, y sus transiciones se realizan de arriba hacia abajo. A la derecha se encuentra un bloque de ciclo atractor, el cual señala que esas transiciones se repiten indeterminadamente de arriba hacia abajo. Los bloques de estado atractor indican que el último estado del sistema es el que se mantiene indeterminadamente, es decir, la fila que se encuentra hasta abajo.

El primer estado atractor generado tras la simulación en Logic.Ly (Figura 22) corresponde a cualquier condición inicial que posea la entrada OCp en estado bajo (por simplificación solo se muestra la primera condición de entrada). Si bien son condiciones iniciales no biológicamente viables, la respuesta en las cuatro salidas (resorción, formación, establecimiento y crecimiento del cáncer) en estado bajo es congruente, ya que sin OCp los OC activos no estarían presentes en el sistema, y consecuentemente no habría inicio del remodelado óseo mediante la destrucción del hueso. De haber obtenido un resultado con salidas activas o en estado alto el modelo no estaría respondiendo adecuadamente, por lo que se resalta la importancia de simular todas las combinaciones de entrada aun sin estas ser viables.

En la Figura 23 A se pueden observar todas las condiciones iniciales que fueron simuladas y llevaron al primer ciclo atractor (Figuras 21 y 23 B). Se podría resumir la constante del conjunto de condiciones iniciales en el siguiente enunciado: Cualquier combinación de entrada que contenga OCp activo, que mantenga Wnt-3a en estado bajo y que no tenga la vía canónica del TGF- $\beta$  activa, ya sea por la acción de inhibidores de la vía (SMAD 6/7) o la ausencia del receptor II del TGF- $\beta$ . Si se cumple el enunciado anterior en las condiciones iniciales de las simulaciones el resultado es un ciclo atractor que se puede relacionar al remodelado del hueso. En las transiciones de la Figura 23 B, se muestra como primero se tienen 3 estados de destrucción del hueso consecutivos, seguidos de tres estados de formación de hueso. Esto pudiera sugerir la representación de un equilibrio entre formación y destrucción de hueso. OCp es capaz de activarse, lo cual comienza la destrucción del hueso y la posterior activación de osteoblastos para la formación del hueso, y debido a que OCp se mantiene activo en todo momento los ciclos se repiten indefinidamente en el tiempo.



**Figura 23.** Condiciones iniciales y ciclo atractor de remodelado óseo en Logic.Ly. A) Se enlistan las 56 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Ciclo atractor de grado 6 (correspondiente al número de transiciones) resultante, el orden de transiciones es de la fila 2 a la 7, una vez en la fila 7 el sistema cambia al estado en la fila 2, donde se repiten las transiciones en un ciclo indeterminado en el tiempo.

El siguiente estado atractor (Figura 24 B) se obtuvo mediante la simulación del conjunto de 56 condiciones iniciales que se muestran en la Figura 24 A. Estas coinciden en mantener las entradas OCp y Wnt-3a en estado alto, mientras que la vía canónica del TGF- $\beta$  no esté activa. El resto de las entradas puede variar sin cambiar el comportamiento obtenido en las salidas del sistema. La presencia de OCp inicia los ciclos de remodelado óseo, sin embargo, Wnt-3a regula positivamente a Gli2, el cual es necesario para la síntesis de PTHrP, inhibidor de OPG (inhibidor de la señalización de RANKL). Con base en lo anterior, se elimina la regulación negativa de la activación de OCp, por lo que la destrucción del hueso es constante, y así la liberación de factores que regulan el reclutamiento y activación de OBp. Además, la inhibición de la actividad de OB's por IL-11 no está presente por la ausencia de la vía canónica del TGF- $\beta$ , por lo que tanto la destrucción como la formación del hueso se mantienen constantemente activas. Estos resultados concuerdan parcialmente con trabajo reportado que sustenta que Wnt-3a favorece la osteólisis del hueso en la metástasis ósea de cáncer de mama (Johnson et al., 2014), favoreciendo la destrucción del hueso sobre la formación, sin embargo, los resultados sugieren que es necesaria la acción del TGF- $\beta$  para obtener este efecto.

**A**

1	Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
2	1	0	0	0	0	0	1	0
3	1	0	0	0	0	0	1	1
4	1	0	0	0	0	1	1	0
5	1	0	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	1	0	1	0
7	1	0	0	0	1	0	1	1
8	1	0	0	0	1	1	1	0
9	1	0	0	0	1	1	1	1
10	1	0	0	1	0	0	1	0
11	1	0	0	1	0	0	1	1
12	1	0	0	1	1	0	1	0
13	1	0	0	1	1	0	1	1
14	1	0	0	1	1	1	1	0
15	1	0	0	1	1	1	1	1
16	1	0	1	0	0	0	1	0
17	1	0	1	0	0	0	1	1
18	1	0	1	0	0	1	1	0
19	1	0	1	0	0	1	1	1
20	1	0	1	0	1	0	1	0
21	1	0	1	0	1	0	1	1
22	1	0	1	0	1	1	1	0
23	1	0	1	0	1	1	1	1
24	1	0	1	1	0	0	1	0
25	1	0	1	1	0	0	1	1
26	1	0	1	1	1	0	1	0
27	1	0	1	1	1	0	1	1
28	1	0	1	1	1	1	1	0
29	1	0	1	1	1	1	1	1
30	1	1	0	0	0	0	1	0

1	Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
31	1	1	0	0	0	0	1	1
32	1	1	0	0	0	1	1	0
33	1	1	0	0	0	1	1	1
34	1	1	0	0	1	0	1	0
35	1	1	0	0	1	0	1	1
36	1	1	0	0	1	1	1	0
37	1	1	0	0	1	1	1	1
38	1	1	0	1	0	0	1	0
39	1	1	0	1	0	0	1	1
40	1	1	0	1	1	0	1	0
41	1	1	0	1	1	0	1	1
42	1	1	0	1	1	1	1	0
43	1	1	0	1	1	1	1	1
44	1	1	1	0	0	0	1	0
45	1	1	1	0	0	0	1	1
46	1	1	1	0	0	1	1	0
47	1	1	1	0	0	1	1	1
48	1	1	1	0	1	0	1	0
49	1	1	1	0	1	0	1	1
50	1	1	1	0	1	1	1	0
51	1	1	1	0	1	1	1	1
52	1	1	1	1	0	0	1	0
53	1	1	1	1	0	0	1	1
54	1	1	1	1	1	0	1	0
55	1	1	1	1	1	0	1	1
56	1	1	1	1	1	1	1	0
57	1	1	1	1	1	1	1	1

**B**

1	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing	
2	0	1	0	0	0	0	Estado atractor
3	0	1	0	1	0	0	
4	0	1	1	1	0	0	

**Figura 24.** Condiciones iniciales y estado atractor de destrucción y formación de hueso en Logic.Ly. A) Se enlistan las 56 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Estado atractor (ciclo de grado 1) resultante, el orden de transiciones es de la fila 2 a la 4. Una vez en la fila 4 el sistema activamente mantiene esa última transición en un ciclo indeterminado en el tiempo.

Las condiciones iniciales del segundo ciclo atractor de acuerdo con la Figura 22, se encuentran en la Figura 25 A, y son únicamente 4 de las 256 combinaciones de entrada posibles. La constante entre estas cuatro condiciones es la presencia de OCp y la vía canónica del TGF- $\beta$  (TBR-II y SMAD4). Previo al ciclo atractor existen transiciones de estados que muestran una especie de equilibrio entre destrucción y formación de hueso, sin embargo, una vez en el ciclo atractor existe una unidad de tiempo más de destrucción que de formación, esto se debe a que el modelo no discrimina si la salida de cáncer está presente o no para regular sus genes asociados mediante la vía canónica del TGF- $\beta$ . De esta manera se favorece la destrucción del hueso como si se tratase de un efecto osteolítico de cáncer, pero sin que esté presente. Este efecto no es el esperado, y es un punto de mejora del modelo para una posterior calibración.

**A**

1	Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
2	1	0	0	1	0	1	0	0
3	1	0	1	1	0	1	0	0
4	1	1	0	1	0	1	0	0
5	1	1	1	1	0	1	0	0

**B**

1	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing	
2	0	1	0	0	0	0	Transiciones
3	0	1	0	1	0	0	
4	0	1	1	1	0	0	
5	0	0	1	1	1	0	
6	0	0	1	0	1	0	
7	0	0	0	0	1	0	
8	0	1	0	0	0	0	
9	0	1	0	1	0	0	
10	0	1	1	1	0	0	
11	0	1	1	1	1	0	
12	0	0	1	1	1	0	
13	0	0	0	1	1	0	
14	0	0	0	0	1	0	

**Figura 25.** Condiciones iniciales y ciclo atractor de comportamiento osteolítico en Logic.Ly. A) Se enlistan las 4 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Ciclo atractor de grado 7 (correspondiente al número de transiciones) resultante. El orden de transiciones es de la fila 2 a la 7, una vez en la fila 8 el sistema continúa las transiciones hasta llegar a la fila 14, donde se repiten las transiciones (de fila 8 a 14) en un ciclo indeterminado en el tiempo

En la Figura 26 A se muestran las condiciones iniciales que dieron lugar al ciclo atractor que posee ciclos de remodelado óseo, con establecimiento y crecimiento del cáncer (Figura 26 B). En este conjunto de 4 condiciones iniciales se mantiene la vía canónica del TGF- $\beta$  activa, además del estado alto de OCp y SDF1. En la Figura 26 B se puede apreciar que existen transiciones en las salidas del sistema que indican un desbalance en la resorción y formación del hueso siendo esta última la favorecida, sin embargo, eventualmente llega a un ciclo atractor donde se tienen 4 tiempos de destrucción con 4 tiempos de formación. Durante estos ciclos se logra la regulación genética positiva de CXCR4 por TGF- $\beta$ , el cuál en conjunto con la entrada SDF1 en estado alto favorecen el establecimiento del cáncer. Una vez que se tienen las condiciones adecuadas se activa la salida de crecimiento del cáncer. Pese a que cuenta con la presencia de cáncer y la vía canónica del TGF- $\beta$  activa, no se observa un comportamiento osteolítico dominante, lo que pudiera deberse a la falta de la regulación de Wnt-3a.

**A**

1	Ocp	S. Cel.	PTH	T $\beta$ R-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
2	1	0	0	1	0	1	0	1
3	1	0	1	1	0	1	0	1
4	1	1	0	1	0	1	0	1
5	1	1	1	1	0	1	0	1

**B**

	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing	
2	0	1	0	0	0	0	Transiciones
3	0	1	0	1	0	0	
4	0	1	1	1	0	0	
5	0	0	1	1	1	0	
6	0	0	1	1	1	1	
7	0	0	1	0	1	1	
8	0	0	0	0	1	1	
9	0	1	0	0	0	1	
10	0	1	0	0	0	0	
11	0	1	0	1	0	0	
12	0	1	1	1	0	0	
13	0	1	1	1	1	0	
14	0	0	1	1	1	1	
15	1	0	1	1	1	1	
16	1	0	0	1	1	1	
17	0	0	0	0	1	1	
18	0	1	0	0	0	1	

**Figura 26.** Condiciones iniciales y ciclo atractor de crecimiento de cáncer en Logic.Ly. A) Se enlistan las 4 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Ciclo atractor de grado 9 (correspondiente al número de transiciones) resultante. El orden de transiciones es de la fila 2 a la 9, una vez en la fila 10 el sistema continúa las transiciones hasta llegar a la fila 18, donde se repiten las transiciones (de fila 10 a 18) en un ciclo indeterminado en el tiempo.

El siguiente conjunto de condiciones iniciales (Figura 27 A) tiene como constante el estado alto de OCp, vía canónica del TGF- $\beta$  (TBRIL y SMAD4) y Wnt-3a. El resultado mostrado en la Figura 27 B es un estado atractor en el cual se tiene una constante destrucción del hueso sin formación, este efecto se debe a la actividad en conjunto de TBRIL, SMAD4 y Wnt-3a. Nuevamente el comportamiento del TGF- $\beta$  no debería favorecer este resultado ya que el cáncer no está presente, no obstante, queda claro que estas dos vías de señalización son necesarias para obtener un comportamiento osteolítico en la metástasis ósea de cáncer de mama.

A								
1	Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
2	1	0	0	1	0	1	1	0
3	1	0	1	1	0	1	1	0
4	1	1	0	1	0	1	1	0
5	1	1	1	1	0	1	1	0

B						
1	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing
2	0	1	0	0	0	0
3	0	1	0	1	0	0
4	0	1	1	1	0	0
5	0	1	1	1	1	0
6	0	1	0	1	1	0

**Figura 27.** Condiciones iniciales y estado atractor de comportamiento osteolítico en Logic.Ly. A) Se enlistan las 4 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Estado atractor (ciclo de grado 1) resultante, el orden de transiciones es de la fila 2 a la 6, una vez en la fila 6 el sistema activamente mantiene esa última transición en un ciclo indeterminado en el tiempo.

El último conjunto de condiciones en la Figura 28 A muestra como constante las entradas OCp, TBRIL, SMAD4, Wnt-3a, y SDF1 en estado alto. Con los comportamientos anteriormente vistos, es lógico el estado atractor obtenido (Figura 28 B), ya que OCp inicia el ciclo de remodelado óseo. Además, en el estado atractor pasado se observó cómo TBRIL, SMAD4 y Wnt-3 promueven la destrucción del hueso e inhiben la formación. Finalmente, se observa que SDF-1 con CXCR4 regulado por la misma vía del TGF- $\beta$  permite el establecimiento y posterior crecimiento del cáncer. Analizando a detalle lo que está sucediendo en estas simulaciones, Wnt-3a favorece la eventual síntesis de PTHrP que promueve el incremento de RANKL, el cual a su vez permite la activación de OCp aumentando el número de OC activos que destruyen el hueso.

Con esto se activa la liberación de calcio (Ca) y TGF- $\beta$ . Además, gracias a que las entradas TBR11 y SMAD4 se encuentran activas se lleva a cabo la regulación genética de CXCR4 y, dado que SDF1 también se encuentra como entrada activa, se favorece el establecimiento del cáncer, el cual en conjunto con el Ca liberado promueve el crecimiento del cáncer. Por último, la regulación genética por TGF- $\beta$  en presencia del cáncer promueve la síntesis de IL11 el cual también favorece la síntesis de RANKL, pero inhibe la actividad de osteoblastos, es decir, la formación de hueso.

A								
1	Ocp	S. Cel.	PTH	TBR-II	SMAD 6/7	SMAD4	Wnt-3a	SDF-1
2	1	0	0	1	0	1	1	1
3	1	0	1	1	0	1	1	1
4	1	1	0	1	0	1	1	1
5	1	1	1	1	0	1	1	1

B							
1	Cancer Growth	Resorption	Formation	Notch Factors	G. Reg. Factors	Cancer Homing	
2	0	1	0	0	0	0	Estado atractor
3	0	1	0	1	0	0	
4	0	1	1	1	0	0	
5	0	1	1	1	1	0	
6	0	1	1	1	1	1	
7	1	1	1	1	1	1	
8	1	1	0	1	1	1	

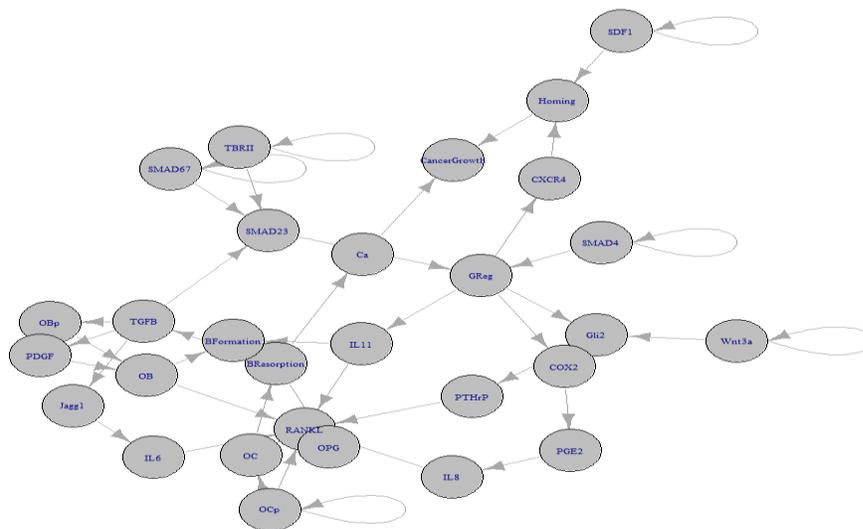
**Figura 28.** Condiciones iniciales y estado atractor de crecimiento de cáncer en Logic.Ly. A) Se enlistan las 4 condiciones iniciales de las 8 entradas del sistema que dieron lugar al comportamiento en B, los cambios de color sirven para distinguir entre una fila y la siguiente. B) Estado atractor (ciclo de grado 1) resultante, el orden de transiciones es de la fila 2 a la 8. Una vez en la fila 8 el sistema activamente mantiene esa última transición en un ciclo indeterminado en el tiempo.

Es importante resaltar que, al momento de analizar algunos de los procesos implicados en este sistema, comenzaron a ser notables las limitaciones del *software*. Es muy probable que el hecho de agregar nuevos elementos haya desacoplado los tiempos por el trayecto largo de la señal en algunos procesos y corto en otros. Por ello se utilizó una paquetería de R llamada BoolNet, la cual es una herramienta para el diseño, simulación y análisis de modelos de redes booleanas. Si bien esta herramienta sigue desplegando los cambios de todos los elementos del sistema como lo hacía GINsim, esta paquetería presenta solo los estados y ciclos atractores, de una manera aislada al resto de los cambios del sistema. Además, posee funciones como distintos métodos de actualización del sistema, seguimiento de los estados antecesores a

los estados y ciclos atractores, algoritmos de perturbación del sistema para pruebas de robustez, herramientas de visualización, inhibición de moléculas, entre otras. Sin embargo, la librería BoolNet establece como límite un sistema con no más de 29 moléculas, por lo que se requirió de una simplificación. Si bien el objetivo de estos modelos cualitativos es incrementar el número de elementos considerados del sistema biológico para tener un panorama más amplio de su dinámica, esta reducción sigue contemplando más elementos que un sistema cuantitativo y la posibilidad de utilizar nuevas herramientas de análisis.

### 3.3.3. Paquetería BoolNet de R

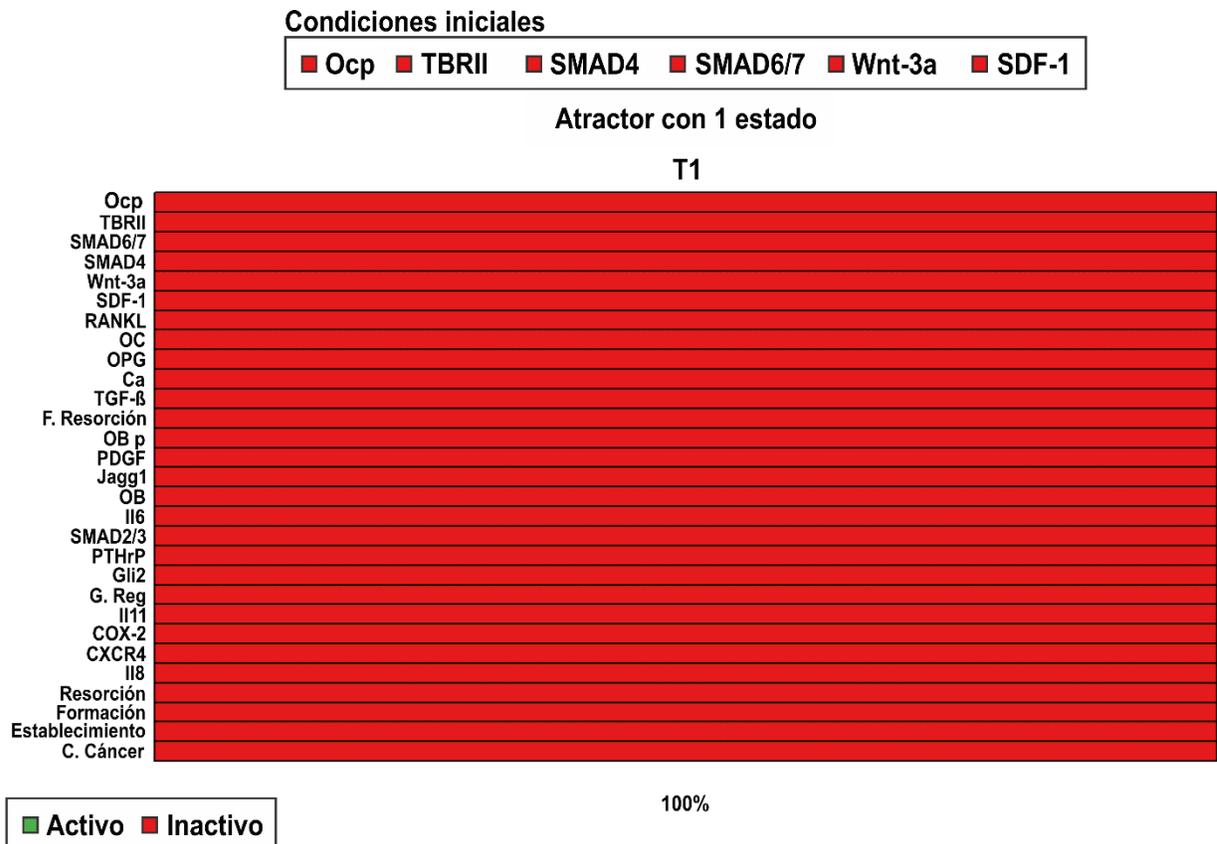
Para la simulación en la paquetería de R llamada BoolNet, el diseño del modelo booleano se realizó de una manera diferente a los *softwares* anteriores. En esta paquetería lo que se hizo fue vaciar todas las reglas como en la Tabla 2 en un blog de notas, pero todas las interacciones relacionadas a una molécula se detallan en una sola línea (Figura 11) donde los operadores lógicos AND, OR y NOT son representados con los símbolos &, | y !, respectivamente. La visualización del modelo en BoolNet se puede apreciar en la Figura 29.



**Figura 29.** Diagrama de modelo generado con BoolNet. Las flechas indican la existencia y sentido de una relación entre moléculas y procesos.

A simple vista se aprecia que BoolNet relaciona los elementos del sistema directamente. Sin considerar las operaciones AND, OR y NOT como nodos, de igual manera que en GINsim, y a diferencia de Logic.Ly.

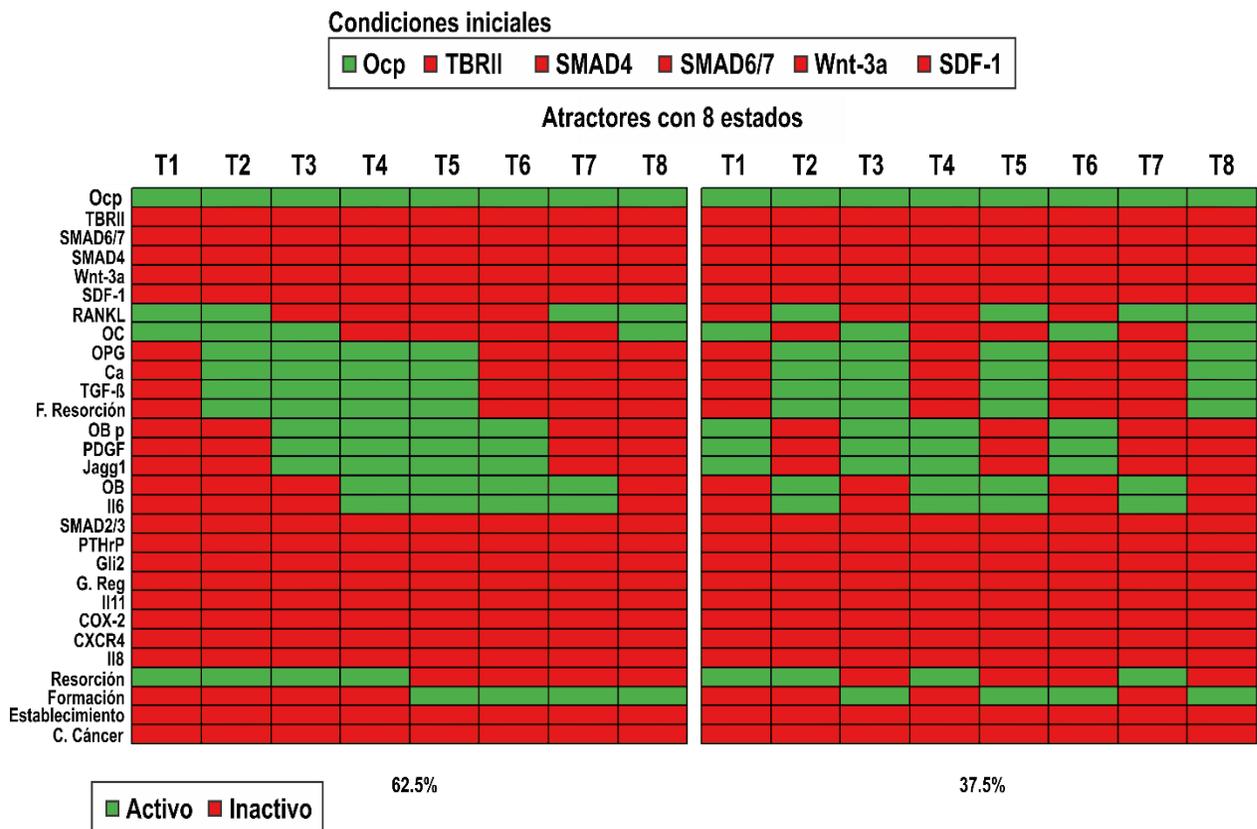
Las simulaciones se realizaron considerando las condiciones iniciales usadas en Logic.Ly pero en la paquetería de R llamada BoolNet. En la Figura 30 se puede observar el resultado de simular con las entradas fijas en estado bajo, logrando el resultado esperado como en la Figura 22.



**Figura 30.** Estado atractor de BoolNet con entradas en estado bajo (OFF). Los colores en los espacios representan el estado de las moléculas o procesos. El color rojo para los elementos inactivos y los verdes para elementos activos. El porcentaje indica la fracción de transiciones de estado que llevaron a el estado representado en la tabla. T1 significa transición 1 y sirve para diferenciar entre los distintos estados del sistema, aunque en este caso solo exista un estado.

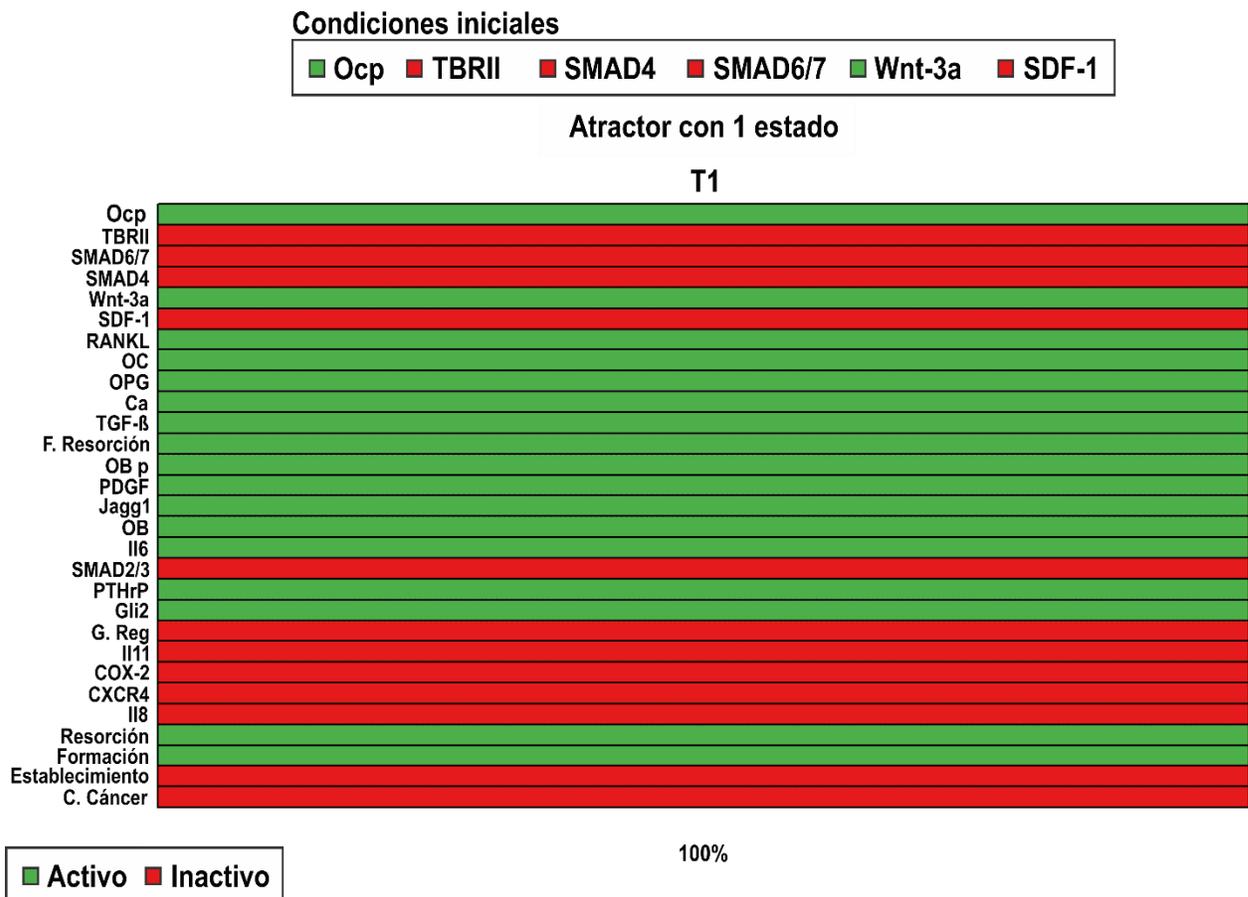
Posteriormente, se procedió a simular las condiciones iniciales que llevaron al primer ciclo atractor de Logic.Ly (Figura 21), donde solo se fijó en estado alto OCp, mientras que el resto de las entradas permaneció en estado bajo (TBR11, SMAD4, SMAD6/7, Wnt-3a y SDF-1). El comportamiento se relacionó con la remodelación ósea también inferido por Logic.Ly. Sin embargo, en BoolNet se observaron dos comportamientos distintos, siendo el del lado izquierdo de la Figura 31 el más recurrente, en el cual se tienen 4 unidades de destrucción del hueso sin formación, seguido de 4 unidades de formación de hueso sin destrucción. Estos resultados pese a que no son iguales a los obtenidos en la Figura 31 B, muestran una similitud en cuanto al equilibrio del remodelado óseo, causado por la sola presencia de la entrada OCp.

Analizando más a detalle este comportamiento, se pueden apreciar distintos retardos de acción de las moléculas y procesos. Por ejemplo, en T1 se tiene OC y resorción de hueso activo lo cual una unidad de tiempo después libera OPG, Ca, TGF- $\beta$  y otros factores de resorción ósea (BMP's, IL-1, IL-2, TNF, Int-y). En la transición T3 OPG tiene efecto e inhibe la acción de RANKL, y con esto, en T4 se inhibe la presencia de OC's, por lo que a partir de T5 se observa la ausencia de resorción ósea. Además, a través de una vía no canónica TGF- $\beta$  se ha favorecido a PDGF y OBp's los cuales se muestran activos en T3 y en conjunto con algunos factores de la resorción ósea regulan positivamente la formación de OB's para comenzar la formación de hueso de T5 hasta T8.



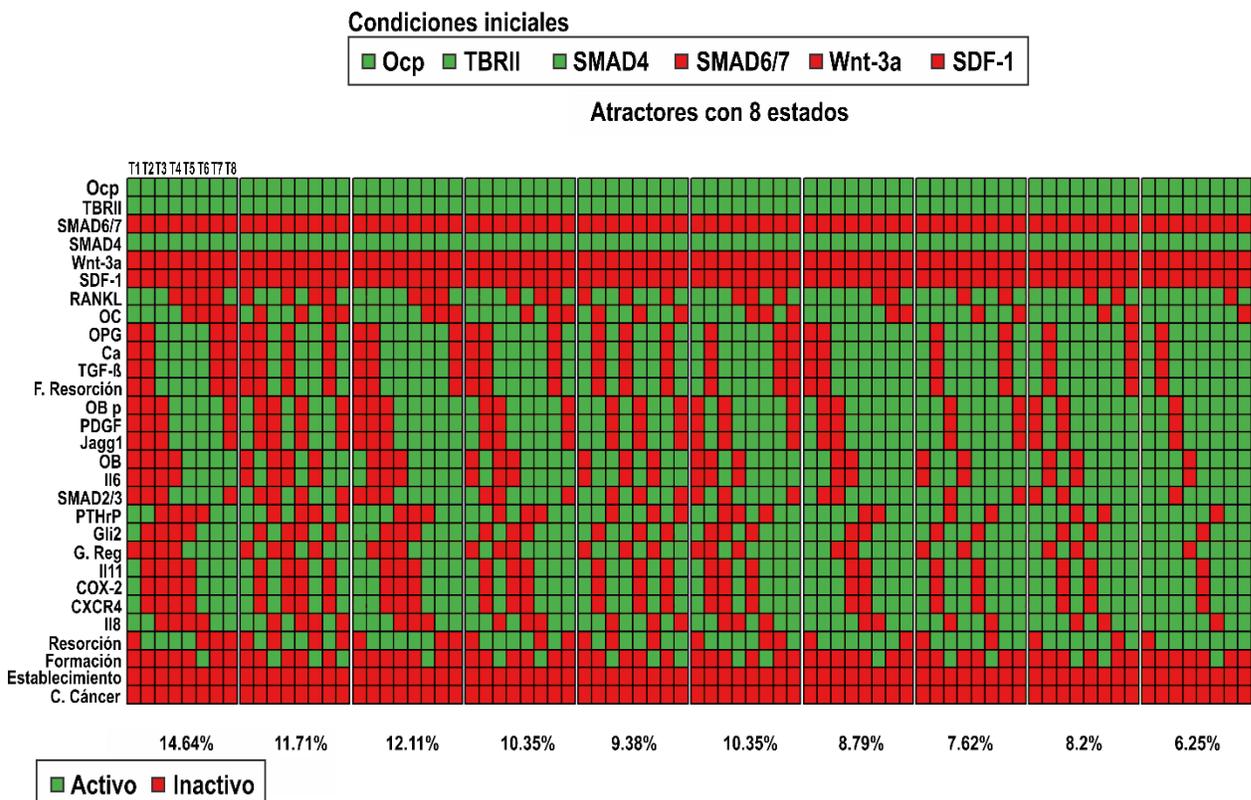
**Figura 31.** Ciclos atractores de BoolNet (solo entrada OCp ON). La entrada OCp fue la única activa, mientras que el resto (TBRll, SMAD6/7, SMAD4, Wnt3a y SDF1) se mantuvieron constantemente inactivas. Los colores en los espacios representan el estado de las moléculas o procesos. El color rojo para los elementos inactivos y los verdes para elementos activos. 62.5% de los estados del sistema llevaron al ciclo atractor del lado izquierdo donde se tienen 4 estados de destrucción de hueso y 4 unidades de formación, mientras que solo el 37.5% de esos estados llevó al ciclo atractor de la derecha donde también se pueden apreciar cambios simétricos en la destrucción y formación del hueso. Las transiciones de estado del sistema van desde T1 hasta T8.

Por otro lado, en la simulación de la Figura 32 también se obtuvo el mismo resultado de las salidas que en Logic.Ly (Figura 24), donde OCp y Wnt-3a fueron las únicas entradas activas y los procesos de destrucción y formación del hueso se constituyeron como las únicas salidas activas en un estado atractor (ciclo de grado 1). Este resultado implica que no importa en qué estado inicie el resto del sistema, por lo que si solo se tienen estas dos entradas activas el resultado será inevitablemente el mismo. Nuevamente las simulaciones se llevaron a cabo de manera síncrona (y de igual manera para el resto de las simulaciones), es decir, todos los elementos del sistema son actualizados simultáneamente, aplicando sus reglas de regulación considerando el estado actual de las moléculas que afectan a tal elemento. En este caso en particular OCp comienza el ciclo de remodelación de hueso, sin embargo, Wnt-3a mantiene la producción constante de Gli2, el cuál regula positivamente a PTHrP, inhibiendo OPG (el único regulador negativo en la remodelación de hueso para este modelo), por lo que se mantienen los procesos de destrucción y formación de hueso activos, y se pierden las oscilaciones entre ambas.



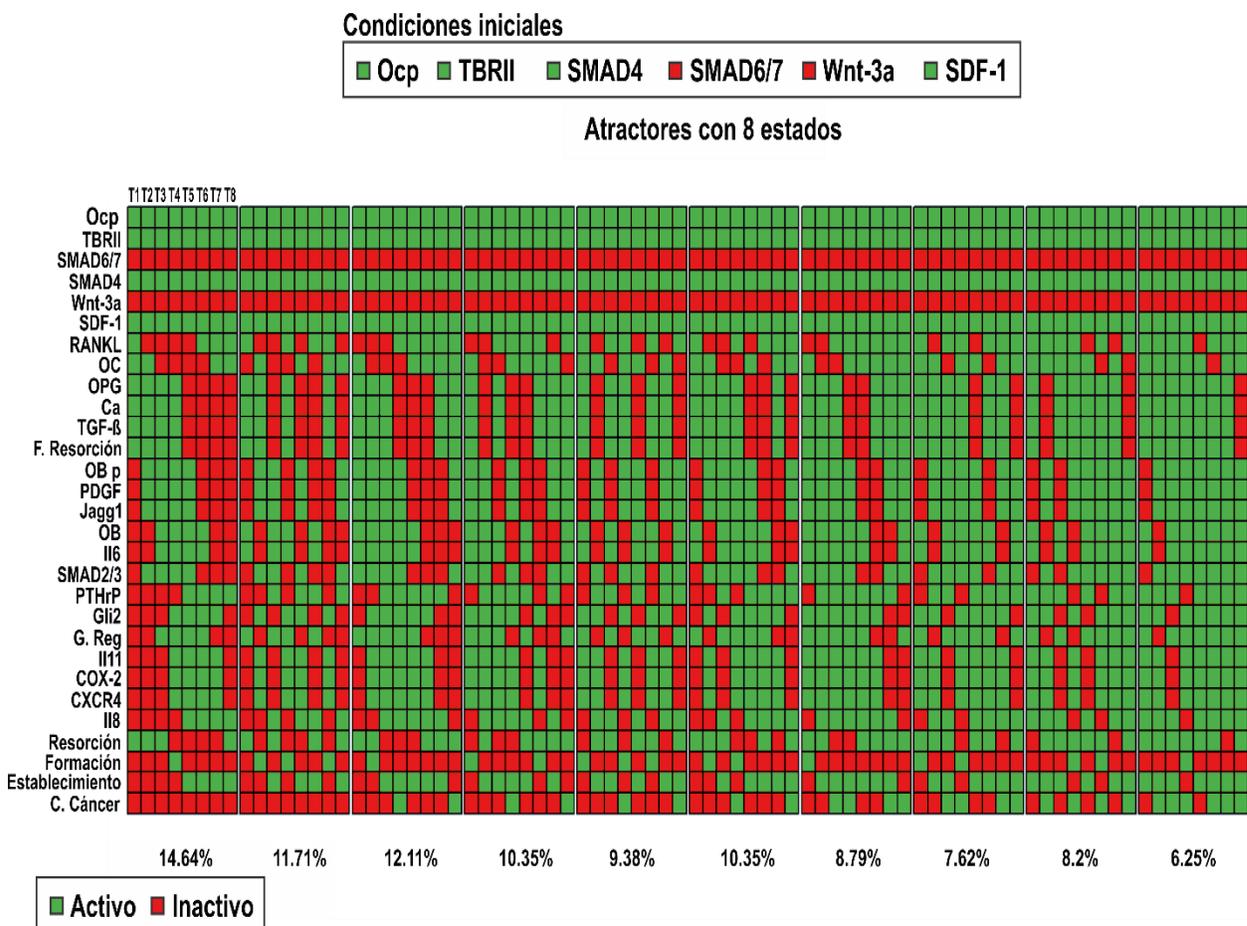
**Figura 32.** Estado atractor de BoolNet (solo OCp y Wnt-3a ON). Es posible notar que solo las salidas formación y destrucción de hueso están activas, entre otros elementos del sistema.

De la simulación correspondiente al segundo ciclo atractor en Logicl.Ly (Figuras 22 y 25), donde OCp y los elementos de la vía canónica del TGF- $\beta$  (TBR11 y SMAD4 sin inhibidor) son las únicas entradas activas, se obtuvieron 10 comportamientos (Figura 33) cuyos porcentajes de distribución en las simulaciones no es muy distante uno de otro (se acercan todos al 10%). Pese a que los resultados difieren de los de Logicl.Ly, ambos concuerdan en que se favorece la destrucción del hueso, y no así la formación. De acuerdo con el ciclo atractor más recurrente (14.64% de las 8,388,608 simulaciones), en la transición T1 se encuentran los OCs en estado alto, lo que permite tener resorción en T2. Derivado de esta destrucción de hueso se liberan OPG, Ca, TGF- $\beta$ , entre otros factores de resorción. Posteriormente los osteoblastos son activados, sin embargo, al encontrarse la vía del TGF- $\beta$  canónica activa se promueve IL-11 el cual inhibe la formación del hueso y promueve la activación de OC. Por lo anterior, al aparecer la interleucina en T6 interrumpe la formación a partir de la siguiente transición. De la misma vía del TGF- $\beta$  se promueve RANKL a través de PTHrP, con lo que el ciclo se repite. Con estos resultados se sugiere que la formación de hueso se encuentra desfavorecida respecto a la destrucción, pero en los demás comportamientos existen casos contrarios donde la destrucción de hueso se encuentra favorecida y la formación desfavorecida.



**Figura 33.** Ciclos atractores de BoolNet (solo entradas OCp, TBR11 y SMAD4 ON). El color rojo para los elementos inactivos y los verdes para elementos activos. La distribución de transiciones de estado que dieron lugar a los distintos ciclos atractores tiende a ser equitativa, sin embargo, el primer ciclo atractor con el 14.64% es el líder, donde existen ciclos de 4 estados de resorción y un solo estado de formación del hueso.

De igual manera, el resultado en BoolNet de la Figura 34 difiere del ciclo atractor de Logic.Ly (Figura 26). En ambos las entradas OCp, TBR11, SMAD4 y SDF-1 estuvieron en estado alto, y lo único que comparten ambas simulaciones es la tendencia a presentar establecimiento y crecimiento del cáncer, desregulando los ciclos de destrucción y formación del hueso. Los resultados de esta simulación indican la importancia del *timing* en las señales, ya que las condiciones iniciales que llevaron a una pronta destrucción de hueso y activación de genes regulados por TGF- $\beta$ , particularmente CXCR4, permitieron el establecimiento y una unidad de tiempo después crecimiento del cáncer. La excepción fueron los conjuntos de 9.38% y 10.35% en los que la intermitencia en la liberación de Ca retrasó una unidad de tiempo más el crecimiento del cáncer.



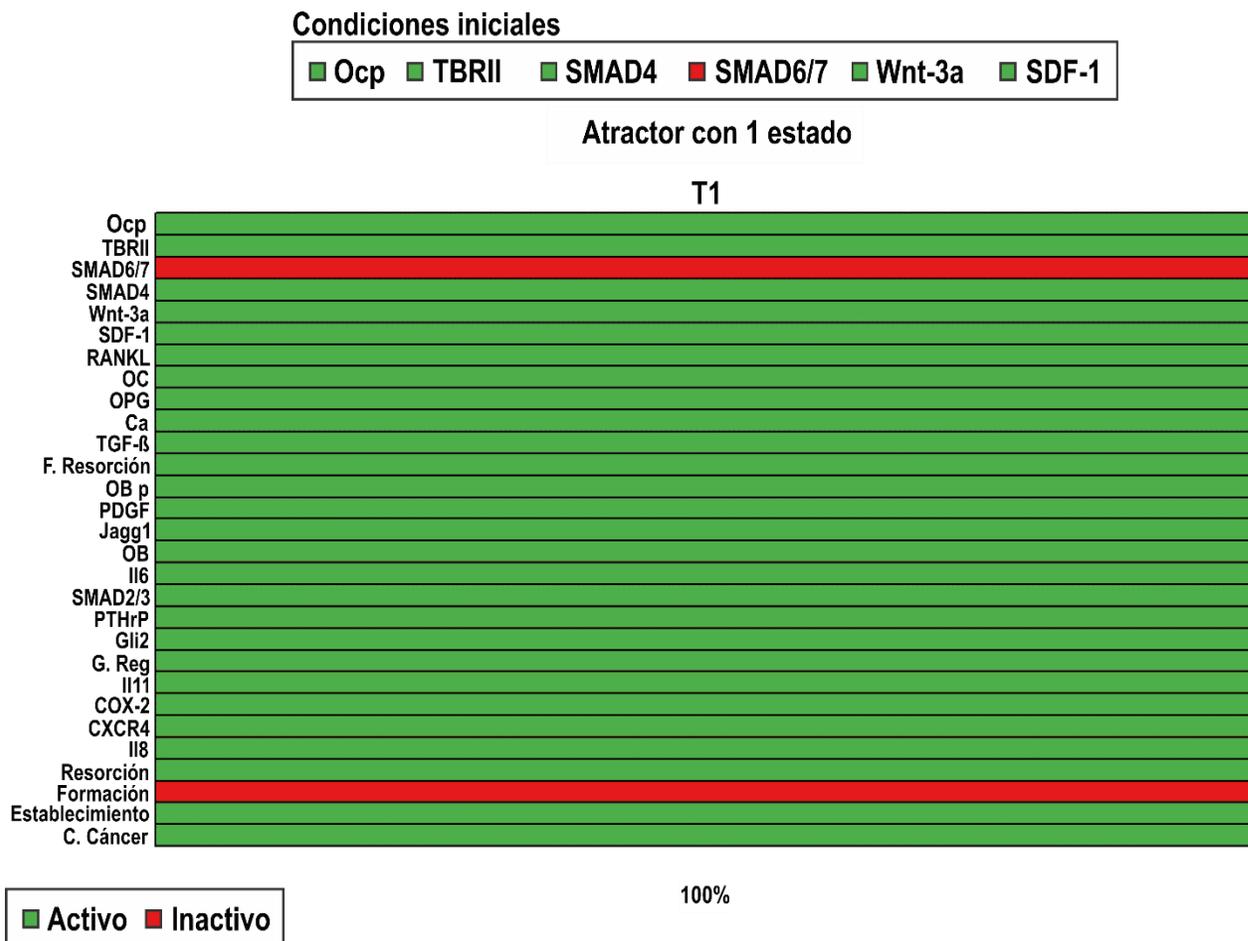
**Figura 34.** Ciclos atractores de BoolNet (solo entradas OCp, TBR11, SMAD4 y SDF1 ON). La distribución de transiciones de estado que dieron lugar a los distintos ciclos atractores es la misma de los resultados en la Figura 25. El establecimiento y crecimiento de cáncer son elementos activos.

Al simular en BoolNet las condiciones iniciales que dieron lugar al tercer estado atractor de Logic.Ly (Figura 22 y 27), se obtuvo el mismo resultado (Figura 35), al menos en cuanto a las salidas ya que el único elemento activo resultó ser la destrucción del hueso. Al igual que en el estado atractor anterior, el 100% de las simulaciones llevadas a cabo bajo esas entradas en estado fijo llevaron al mismo ciclo de grado 1. En este caso en particular, mientras que IL-11 es encendido por la vía canónica del TGF- $\beta$ , inhibiendo la actividad de OB's, Wnt-3a mantiene constante la activación de PTHrP mediante Gli-2, inhibiendo OPG y permitiendo una constante activación de OC's. De esta manera se infiere que la inhibición de la formación del hueso y su destrucción es invariante.



**Figura 35.** Estado atractor de BoolNet (solo entradas Ocp, TBR11, SMAD4, Wnt3a ON). De las salidas solo la destrucción del hueso se encuentra activa.

Finalmente, el conjunto de condiciones iniciales que resultaron en el último estado atractor en Logic.Ly (Figuras 22 y 28), también lo generaron en BoolNet (Figura 36). Este estado atractor se puede asociar fácilmente al tipo de enfermedad que se está simulando, ya que el cáncer de mama tiende a ser osteolítico, favoreciendo la destrucción del hueso y consecuentemente el establecimiento y crecimiento del cáncer. Los efectos de la vía canónica del TGF- $\beta$  mediante IL-11, y Wnt-3a por Gli2 ya se discutieron en la figura anterior, la diferencia en este caso es la presencia de SDF-1 en conjunto con CXCR4 (regulado por TGF- $\beta$ ), al haber una constante destrucción de hueso y activación de la vía canónica del TGF- $\beta$ . Así mismo, el establecimiento y crecimiento del cáncer resulta también constante.



**Figura 36.** Estado atractor de BoolNet (solo entradas Ocp, TBR11, SMAD4, Wnt3a y SDF1 ON). Respecto a las salidas, solo formación de hueso se encuentra inactiva, mientras que la destrucción del hueso, el establecimiento y crecimiento del cáncer permanecen activos.

La constante en los distintos estados atractores obtenidos en Logic.Ly (Figuras 22, 24, 27 y 28) es la ausencia o inhibición de OPG, lo cual remarca la importancia de los reguladores negativos en los modelos para obtener comportamientos oscilatorios. Una oportunidad de mejora en este modelo podría incluir más vías de señalización con sus correspondientes reguladores negativos.

Las salidas de los 4 estados atractores resultantes de BoolNet (Figuras 30, 32, 35, 36) corresponden exactamente a las obtenidas con Logic.Ly (Figura 22, 24, 27 y 28). Pero no así en los ciclos atractores (Figuras 23, 25, 26 de Logic.Ly y Figuras 31, 33 y 34). Esto podría deberse en parte a la reducción del modelo para su análisis en BoolNet, pero también porque esta paquetería a diferencia de Logic.Ly, no toma en cuenta los operadores lógicos como nodos a los cuales alcanzar retrasando aún más la señal. Por otro lado, esta herramienta especializada realiza distintas simulaciones para las mismas condiciones de entrada, variando las condiciones iniciales de todo el sistema, mientras que en la simulación por Logic.Ly, solo se realiza una simulación con los valores de entrada establecidos y el resto del sistema en estado bajo desde un comienzo. Sin embargo, pese a que los resultados no son iguales en los ciclos atractores, la información que uno puede obtener de ambos es similar, aunque en Logic.Ly es difícil seguir el flujo de la información nodo a nodo, mientras que en BoolNet resulta más sencillo de visualizar.

### **3.4. Validación del modelo**

#### **3.4.1. Inhibición de PTHrP**

Para validar computacionalmente el modelo, se realizaron simulaciones con las condiciones iniciales que favorecieron el crecimiento del cáncer, pero a través de la inhibición de PTHrP que en el trabajo de Käkönen et al. (2002) se demostró que inhibía el crecimiento de cáncer de mama osteolítico dependiente del TGF- $\beta$ . Tanto en la simulación de Logic.Ly (Figura 37) como en BoolNet (Figura 38) se inhibió el crecimiento del cáncer, sin embargo, solo en el primer *software* se observa un equilibrio entre la resorción y formación del hueso, mientras que en BoolNet se sigue favoreciendo un desbalance en la dinámica de remodelado óseo.

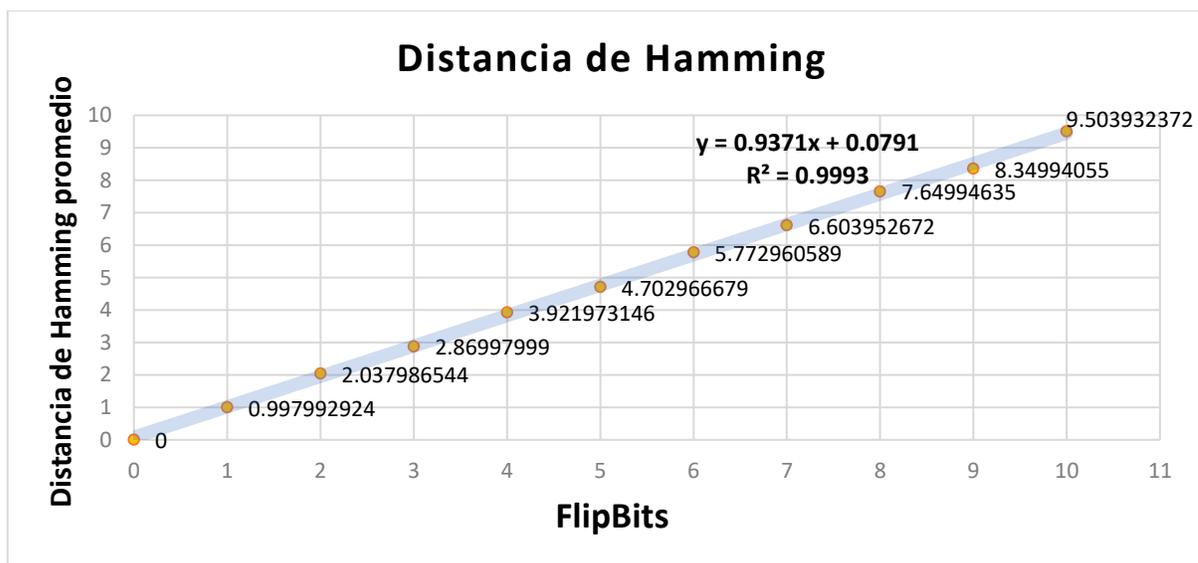


11 en la Figura 38 (derecha) se asemeja más a lo mostrado en Logic.Ly respecto a la formación y destrucción de hueso.

Si ponemos atención a la dinámica del sistema, lo destacable de estos resultados es que se convirtieron de estados atractores donde solo existía destrucción de hueso, establecimiento y crecimiento de cáncer, a ciclos atractores donde resaltan las transiciones entre destrucción y formación de hueso, sin crecimiento de cáncer. A nivel del modelo booleano, es notable el efecto oscilatorio que confiere OPG al no ser inhibido por PTHrP.

### 3.4.2. Prueba de robustez

Para las pruebas de robustez en el modelo desarrollado, se utilizó la función “perturbar trayectorias” de BoolNet, implementando de 1 hasta 10 cambios aleatorios en 1000 condiciones iniciales, evaluándose la robustez mediante el cálculo de la distancia de Hamming entre las 1000 simulaciones bajo condiciones iniciales aleatorias y sus correspondientes simulaciones con condiciones iniciales perturbadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39.



**Figura 39.** Distancia de Hamming promedio entre estados y ciclos atractores de simulaciones y sus copias perturbadas. En el eje Y se encuentra la distancia de Hamming promedio entre el estado o ciclo atractor obtenido de la simulación original y sus simulaciones correspondientes perturbadas. En el eje X se muestra el número de perturbaciones aplicadas para cada caso. Los *FlipBits* son cambios de ciertos valores en las condiciones iniciales por sus valores opuestos, es decir, intercambia 1's por 0's y viceversa.

En la gráfica anterior se puede observar que los resultados muestran un comportamiento lineal, sin embargo, la pendiente indica que la distancia de Hamming de los estados y ciclos atractores obtenidos tiende a ser ligeramente menor que el número de *FlifBits* en las condiciones iniciales. Cabe mencionar que los estados y ciclos atractores que pueden resultar son finitos. Además, pese a que existen elementos en el sistema que activan múltiples nodos, se mantiene esta linealidad en los promedios obtenidos. Pese a que los valores disminuidos ligeramente en la distancia de Hamming podrían indicar que el sistema no es muy sensible a las perturbaciones en las condiciones iniciales, el valor de la pendiente indica que no se puede determinar si el sistema es robusto con los datos actuales.

## Capítulo 4. Conclusiones

---

De la búsqueda de literatura sobre metástasis ósea de cáncer de mama se encontraron 81,278 resultados de los cuales solo se consultaron 52, estos últimos se obtuvieron mediante un filtro inclusivo (preferencialmente trabajos en líneas celulares MDA-MB-231) y uno exclusivo (trabajos que no tengan que ver con cáncer de mama) realizado manualmente al leer los títulos, resúmenes y metodología de los trabajos. Además, se hicieron consultas adicionales para modelar la dinámica de remodelación del hueso. Después se extrajo el aporte de los artículos y revisiones. Posteriormente, la construcción del modelo se realizó interpretando los aportes de cada trabajo consultado mediante la lógica del álgebra booleana, es decir, con el uso de operadores lógicos AND, OR y NOT de manera individual y en arreglos para representar las interacciones de activación e inhibición.

Los resultados obtenidos con el *software* GINsim no fueron adecuados para su posterior análisis por lo que se optó por Logic.ly, un *software* que no es especializado en modelos booleanos, pero fue de utilidad como un primer acercamiento al modelado de la dinámica molecular. Las limitaciones de este *software* no permitieron simular todas las combinaciones de estado del sistema completo. Sin embargo, aun considerando que todos los nodos a excepción de las entradas inician en estado bajo, se obtuvieron estados y ciclos atractores interesantes, los cuales no difirieron mucho del *software* usado posteriormente.

Con respecto a las simulaciones realizadas con Logic.Ly se obtuvieron ciclos atractores que pueden asociarse a la dinámica de remodelado óseo, de lesiones osteolíticas, y de remodelado óseo con establecimiento y crecimiento de cáncer. También se encontraron estados atractores fácilmente asociables con lesiones osteolíticas y crecimiento de cáncer. Además, al probar la inhibición de PTHrP y tomando en cuenta los cambios de estado de las salidas del sistema, se obtuvieron comportamientos reportados en la literatura.

Finalmente se trasladó el sistema a una paquetería especializada de R llamada BoolNet, el cual posee más herramientas de manejo, sin embargo, fue necesario reducir el modelo a 29 elementos por limitaciones de la misma paquetería. Lo anterior provocó cambios en los ciclos atractores, pero no así en los estados atractores comparando contra Logic.Ly. Al tratarse de simulaciones con actualización de nodos síncrona, las reducciones en los nodos del sistema causaron un efecto en la propagación de la señal. Además, esta nueva herramienta reduce aún más este tiempo al no tomar en cuenta los operadores lógicos como nodos, a diferencia del modelo en Logic.Ly. En contraste, BoolNet simula para cada condición inicial de las

entradas (6 entradas), el resto de sus posibles combinaciones ( $2^{23}$  nodos) como condiciones iniciales del sistema.

La medición de la robustez del sistema se hizo mediante el cálculo de la distancia de Hamming entre los estados y ciclos atractores de simulaciones con condiciones iniciales aleatorias y sus copias con distintos números de cambios (de 1 a 10) en las condiciones iniciales. Los resultados obtenidos muestran que, conforme se incrementan los cambios de *bits*, se reduce sutilmente la distancia de Hamming, por lo que podría inferirse que el modelo no es muy sensible a las perturbaciones y a que el posible número de comportamientos del sistema es finito. Sin embargo, el valor de la pendiente obtenida indica que no se puede determinar si el sistema es robusto.

Aunque las limitaciones de las herramientas utilizadas no permiten analizar una gran cantidad de elementos, se pudo simular un poco de la dinámica de la metástasis ósea de cáncer de mama.

Este es el primer trabajo donde se estudia la dinámica de la metástasis ósea de cáncer de mama mediante el uso de modelos booleanos. Si bien la extracción de reglas y construcción del modelo booleano se llevó a cabo con éxito, se requiere de más trabajo para poder condensar en un modelo todo el conocimiento que se tiene sobre esta enfermedad y así obtener un mejor acercamiento al sistema real.

La simplificación del modelo no hizo variar drásticamente los resultados, y debido a ello se pudo utilizar Logic.Ly y BoolNet con lo que se obtuvo un primer acercamiento a la dinámica del sistema y acceso a diferentes herramientas de análisis de modelos booleanos.

Los resultados de las simulaciones tienen en su mayoría una explicación biológica, además, los ciclos atractores obtenidos de la inhibición de PTHrP ayudan a confirmar que no se trata de comportamientos aleatorios. Sin embargo, se requieren de más pruebas que satisfagan la evidencia experimental para otorgarle más robustez al modelo y obtener un modelo predictivo.

Para continuar con este trabajo y poder obtener un modelo predictivo con mayor robustez, se podría ampliar el modelo y buscar que satisfaga más comportamientos experimentales, como por ejemplo la inhibición de RANKL por denosumab (Casas et al., 2013), o el uso de bifosfonatos para desacelerar la actividad de OCs (Hiraga et al., 2001). También, mejoraría la simulación cambiar el método de actualización de síncrono a asíncrono, para que, en lugar de actualizar todos los nodos al mismo tiempo,

se actualicen de manera independiente y aleatoria, y de esta manera evitar el problema de propagación de señal.

Cada trabajo consultado se realizó bajo sus propias condiciones controladas *in vitro* e *in vivo*, lo cual complica acoplar la información de distintos trabajos y representar toda la dinámica implicada, es posible que un modelo semi cuantitativo pueda ayudar no solo a compatibilizar la información, sino a representar efectos con distintos niveles discretos, es decir, no solo un modelo binario sino de umbrales discretos de activación e inhibición. También, para evitar la limitante de nodos en algunas herramientas de modelado, se podrían sustituir los nodos de elementos moleculares, por nodos de vías de señalización con sus efectos directos sin moléculas intermediarias.

## Literatura citada

---

- Abou-Jaoudé, W., Traynard, P., Monteiro, P. T., Saez-Rodriguez, J., Helikar, T., Thieffry, D., Chaouiya, C. 2016, mayo 31. Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Frontiers in Genetics*, Vol. 7. doi:10.3389/fgene.2016.00094
- Attisano, L., Wrana, J. L. 2002. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily. *Science*. doi:10.1126/science.1071809
- Attisano, L., Wrana, J. L., López-Casillas, F., Massagué, J. 1994. TGF- $\beta$  receptors and actions. *BBA - Molecular Cell Research*. doi:10.1016/0167-4889(94)90026-4
- Ayati, B. P., Edwards, C. M., Webb, G. F., Wikswo, J. P. 2010. A mathematical model of bone remodeling dynamics for normal bone cell populations and myeloma bone disease. *Biology Direct*. doi:10.1186/1745-6150-5-28
- Bibi, Z., Ahmad, J., Siddiqa, A., Paracha, R. Z., Saeed, T., Ali, A., Janjua, H. A., Ullah, S., Abdallah, E. Ben, Roux, O. 2017. Formal modeling of mTOR associated biological regulatory network reveals novel therapeutic strategy for the treatment of cancer. *Frontiers in Physiology*. doi:10.3389/fphys.2017.00416
- Bilandzic, M., Stenvers, K. L. 2011. Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 339(1–2), 180–189. doi:10.1016/j.mce.2011.04.014
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brown, J. E., Cook, R. J., Major, P., Lipton, A., Saad, F., Smith, M., Lee, K.-A., Zheng, M., Hei, Y.-J., Coleman, R. E. 2005. Bone Turnover Markers as Predictors of Skeletal Complications in Prostate Cancer, Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 97(1), 59–69. doi:10.1093/jnci/dji002
- Buijs, J. T., Stayrook, K. R., Guise, T. A. 2011, diciembre. TGF- $\beta$  in the bone microenvironment: Role in breast cancer metastases. *Cancer Microenvironment*, Vol. 4. doi:10.1007/s12307-011-0075-6
- Canalis, E. 2009, noviembre 1. Growth factor control of bone mass. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 108. doi:10.1002/jcb.22322
- Casas, A., Llombart, A., Martín, M. 2013, octubre. Denosumab for the treatment of bone metastases in advanced breast cancer. *The Breast*, Vol. 22. doi:10.1016/j.breast.2013.05.007
- Chaffer, C. L., Weinberg, R. A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, Vol. 331. doi:10.1126/science.1203543

- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., Ten Dijke, P., Iwata, K. K., Massagué, J. 1990. Distinct transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- $\beta$  isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20533–20538. de <http://www.jbc.org/>
- Chiechi, A., Waning, D. L., Stayrook, K. R., Buijs, J. T., Guise, T. A., Mohammad, K. S. 2013. Role of TGF- $\beta$  in breast cancer bone metastases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 04(10), 15–30. doi:10.4236/abb.2013.410a4003
- Coleman, R. E. 1997. Skeletal complications of malignancy. *Cancer*, 80(S8), 1588–1594. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19971015)80:8+<1588::AID-CNCR9>3.0.CO;2-G
- Duivenvoorden, W. C. M., Hirte, H. W., Singh, G. 1999. Transforming growth factor  $\beta$ 1 as an inducer of matrix metalloprotease expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 17(1), 27–34. doi:10.1023/A:1026404227624
- Dunn, L. K., Mohammad, K. S., Fournier, P. G. J., McKenna, C. R., Davis, H. W., Niewolna, M., Peng, X. H., Chirgwin, J. M., Guise, T. A. 2009. Hypoxia and TGF- $\beta$  drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. *PLoS ONE*, 4(9). doi:10.1371/journal.pone.0006896
- Fauré, A., Naldi, A., Chaouiya, C., Thieffry, D. 2006. Dynamical analysis of a generic boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *En Bioinformatics*, 2006, 22(14), pp. 124–131. doi:10.1093/bioinformatics/btl210
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. 2019, abril 15. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, Vol. 144. doi:10.1002/ijc.31937
- Guise, T. A., Kozlow, W. M., Heras-Herzig, A., Padalecki, S. S., Yin, J. J., Chirgwin, J. M. 2005. Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clinical breast cancer*, Vol. 16. doi:10.3816/CBC.2005.s.004
- Guise, Theresa A., Chirgwin, J. M. 2003. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *En Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2003, (415 SUPPL.). doi:10.1097/01.blo.0000093055.96273.69
- Guise, Theresa A. 2002. The vicious cycle of bone metastases. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2(August), 570–572.
- Guise, Theresa A, Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., Mundy, G. R. 1996. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *Journal of Clinical Investigation*, 98(7), 1544–1549. doi:10.1172/JCI118947
- Guo, L. J., Xie, H., Zhou, H. De, Luo, X. H., Peng, Y. Q., Liao, E. Y. 2004. Stimulation of RANKL and inhibition of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by parathyroid hormone in normal

- human osteoblasts. *Endocrine Research*, 30(3), 369–377. doi:10.1081/ERC-200033719
- Hart, R. T., Davy, D. T., Heiple, K. G. 1984. Mathematical modeling and numerical solutions for functionally dependent bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 36(1 Supplement). doi:10.1007/BF02406142
- Hayashi, N., Iwamoto, T., Qi, Y., Niikura, N., Santarpia, L., Yamauchi, H., Ueno, N. T. 2017. Bone metastasis-related signaling pathways in breast cancers stratified by estrogen receptor status. *Journal of cancer*. doi:10.7150/jca.13690
- Heymann, D. 2014. Bone cancer: Primary bone cancers and bone metastases: Second edition. In *Bone microenvironment and bone cancer*, 17. doi:10.1016/C2013-0-00144-2
- Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M. E., Yoshikawa, H., Yoneda, T. 2006. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer research*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2012
- Hiraga, T., Williams, P. J., Mundy, G. R., Yoneda, T. 2001. The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Research*, 61(11), 4418–4424.
- Iqbal, J., S., Un, L., Zaidi, M. 2009. Coupling bone degradation to formation. *Nature Medicine*. doi:10.1038/nm0709-729
- Jakowlew, S. B., Band, A., Laiho, M. 2008. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Cancer Therapy. In *Transforming Growth Factor- $\beta$  in Cancer Therapy, Volume I*. doi:10.1007/978-1-59745-292-2\_15
- Jerez, S., Camacho, A. 2018. Bone metastasis modeling based on the interactions between the BMU and tumor cells. *Elsevier*, 866–876. doi:10.1016/j.cam.2016.12.026
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Manolagas, S. C. 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*. doi:https://science.sciencemag.org/content/257/5066/88.short
- Johnson, R. W., Merkel, A. R., Page, J. M., Ruppender, N. S., Guelcher, S. A., Sterling, J. A. 2014. Wnt signaling induces gene expression of factors associated with bone destruction in lung and breast cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, 31(8), 945–959. doi:10.1007/s10585-014-9682-1
- Johnson, R. W., Nguyen, M. P., Padalecki, S. S., Grubbs, B. G., Merkel, A. R., Oyajobi, B. O., Matrisian, L. M., Mundy, G. R., Sterling, J. A. 2011. TGF- $\beta$  promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer Research*, 71(3), 822–831. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2993
- Käkönen, S. M., Selander, K. S., Chirgwin, J. M., Yin, J. J., Burns, S., Rankin, W. A., Grubbs, B. G., Dallas, M., Cui, Y., Guise, T. A. 2002. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates parathyroid hormone-related

- protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24571–24578. doi:10.1074/jbc.M202561200
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G. P., Serganova, I., Chen, C. R., Massagué, J. 2005. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.0506517102
- Katsuno, Y., Hanyu, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Akiyama, F., Iwase, T., Imamura, T. 2008. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Nature*. doi:10.1038/onc.2008.232
- Kingsley, L. A., Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M., Guise, T. A. 2007. Molecular biology of bone metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0234
- Kitano, H. 2002. Systems biology: A brief overview. *Science*. doi:10.1126/science.1069492
- Klipp, E., Liebermeister, W., Wierling, C., Kowald, A. 2016. Modeling biochemical systems. In *Systems biology: a textbook*. de <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=xzsJDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Systems+biology:+a+textbook&ots=m9zF029ITt&sig=jpi3p7wjxMxcrNKAA8EE-PHDe1A>
- Komarova, S. V., Smith, R. J., Dixon, S. J., Sims, S. M., Wahl, L. M. 2003. Mathematical model predicts a critical role for osteoclast autocrine regulation in the control of bone remodeling. *Bone*. doi:10.1016/S8756-3282(03)00157-1
- Kondo, H., Guo, J., Bringhurst, F. R. 2002. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(9), 1667–1679. doi:10.1359/jbmr.2002.17.9.1667
- Kozlow, W., Guise, T. A. 2005. Breast cancer metastasis to bone: Mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. doi:10.1007/s10911-005-5399-8
- Lemaire, V., Tobin, F. L., Greller, L. D., Cho, C. R., Suva, L. J. 2004. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *Elsevier*. doi:10.1016/j.jtbi.2004.03.023
- López, F., Payne, H. M., Andres, J. L., Massagué, J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signaling receptors: Mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *Journal of Cell Biology*, 124(4), 557–568. doi:10.1083/jcb.124.4.557
- Machado, D., Costa, R. S., Rocha, M., Ferreira, E. C., Tidor, B., Rocha, I. 2011. Modeling formalisms in systems biology. *AMB Express*, Vol. 1. doi:10.1186/2191-0855-1-45
- Massagué, J. 1990. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annual Review of Cell Biology*, 6, 597–641. doi:10.1146/annurev.cb.06.110190.003121

- Massagué, Joan, Gomis, R. R. 2006, mayo 22. The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS Letters*, Vol. 580. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.033
- Miyazono, K. 2000. Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *Journal of Cell Science*, Vol. 113. pp. 1101–1109.
- Miyazono, K., Heldin, C. H. 2008. Latent forms of TGF- $\beta$ : molecular structure and mechanisms of activation. In *Proceedings of Ciba Foundation Symposium*. de [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=KlhAo9WKpoAC&oi=fnd&pg=PA81&dq=Latent+forms+of+TGF-\(3:+molecular+structure+and+mechanisms+of+activation&ots=zvT2Yi4aKj&sig=F61NibwSE\\_ynkMLW8erYYVhvLrE](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=KlhAo9WKpoAC&oi=fnd&pg=PA81&dq=Latent+forms+of+TGF-(3:+molecular+structure+and+mechanisms+of+activation&ots=zvT2Yi4aKj&sig=F61NibwSE_ynkMLW8erYYVhvLrE)
- Morinaga, Y., Fujtta, N., Ohishi, K., Tsuruo, T. 1997a. Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor- $\beta$  and tumor cell factors. *International Journal of Cancer*. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970502)71:3<422::AID-IJC20>3.0.CO;2-G
- Morinaga, Y., Fujtta, N., Ohishi, K., Tsuruo, T. 1997b. Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor- $\beta$  and tumor cell factors. *International Journal of Cancer*, 71(3), 422–428. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970502)71:3<422::AID-IJC20>3.0.CO;2-G
- Müssel, C., Hopfensitz, M., Kestler, H. A. 2010. BoolNet—An R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/btq124
- Naldi, A., Berenguier, D., Fauré, A., Lopez, F., Thieffry, D., Chaouiya, C. 2009. Logical modelling of regulatory networks with GINsim 2.3. *Biosystems*, 97(2), 134–139. doi:10.1016/j.biosystems.2009.04.008
- Naldi, A., Remy, E., Thieffry, D., Chaouiya, C. 2009. A reduction of logical regulatory graphs preserving essential dynamical properties. Springer. doi:10.1007/978-3-642-03845-7\_18
- Nathan, C., Sporn, M. 1991. Cytokines in context. *Journal of Cell Biology*, Vol. 113. doi:10.1083/jcb.113.5.981
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., de Gramont, A. 2015. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. Elsevier. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001
- Pal, R., Ivanov, I., Datta, A., Bioinformatics, M. B., 2005, U. 2005. Generating boolean networks with a prescribed attractor structure. *Bioinformatics*, 21, 4021–4025. doi:10.1093/bioinformatics/bti664
- Pepper, M. S. 1997. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. Elsevier. doi:10.1016/S1359-6101(96)00048-2
- Pepper, M. S., Vassalli, J. D., Orci, L., Montesano, R. 1993. Biphasic effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 on in vitro angiogenesis. Elsevier. doi:10.1006/excr.1993.1043

- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Meyers, C. A., Lehrman, S. R., Smith, J. M., Lamb, L. C., Sporn, M. B., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y. C. E., Stein, S. 1983. Purification and Properties of a Type  $\beta$  Transforming Growth Factor from Bovine Kidney. *Biochemistry*, 22(25), 5692–5698. doi:10.1021/bi00294a002
- Rodan, G. A. 1998. Bone homeostasis. *National Acad Sciences*. de <https://www.pnas.org/content/95/23/13361.short>
- Sahin, Ö., Fröhlich, H., Löbke, C., Korf, U., Burmester, S., Majety, M., Mattern, J., Schupp, I., Chaouiya, C., Thieffry, D., Poustka, A., Wiemann, S., Beissbarth, T., Arlt, D. 2009. Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance. *BMC Systems Biology*, 3(1), 1. doi:10.1186/1752-0509-3-1
- Samaga, R., Saez-Rodriguez, J., Alexopoulos, L. G., Sorger, P. K., Klamt, S. 2009. The logic of EGFR/ErbB signaling: Theoretical properties and analysis of high-throughput data. *PLoS Computational Biology*, 5(8). doi:10.1371/journal.pcbi.1000438
- Schlatter, R., Schmich, K., Vizcarra, I. A., Scheurich, P., Sauter, T., Borner, C., Ederer, M., Merfort, I., Sawodny, O. 2009. ON/OFF and beyond - A Boolean model of apoptosis. *PLoS Computational Biology*, 5(12). doi:10.1371/journal.pcbi.1000595
- Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G., Kang, Y. 2011. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. Elsevier. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.022
- Shi, Y., Massagué, J. 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. Elsevier. doi:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
- Stark, A. M., Anuszkiewicz, B., Mentlein, R., Yoneda, T., Mehdorn, H. M., Held-Feindt, J. 2007. Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Neuro-Oncology*. doi:10.1007/s11060-006-9207-0
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. doi:10.1126/science.289.5484.1504
- Tenazinha, N., Vinga, S. 2011. A survey on methods for modeling and analyzing integrated biological networks. *Bioinformatics*. doi:10.1109/TCBB.2010.117
- Thomas, R. J., Guise, T. A., Yin, J. J., Elliott, J., Horwood, N. J., Martin, T. J., Gillespie, M. T. 1999. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology*, 140(10), 4451–4458. doi:10.1210/endo.140.10.7037
- Tian, M., Neil, J. R., Schiemann, W. P. 2011. Transforming growth factor- $\beta$  and the hallmarks of cancer. Elsevier. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.015
- Vasaikar, S. V., Ghosh, S., Narain, P., Basu, A., Gomes, J. 2015. HSP70 mediates survival in apoptotic cells—Boolean network prediction and experimental validation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*,

9(AUGUST). doi:10.3389/fncel.2015.00319

- Wahl, S. M. 1992. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in inflammation: A cause and a cure. *Journal of Clinical Immunology*, 12(2), 61–74. doi:10.1007/BF00918135
- Wakefield, L. M., Hill, C. S. 2013. Beyond TGF $\beta$ : Roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/nrc3500
- Wang, R. S., Saadatpour, A., Albert, R. 2012, octubre. Boolean modeling in systems biology: An overview of methodology and applications. *Physical Biology*, Vol. 9. doi:10.1088/1478-3975/9/5/055001
- Weigelt, B., Peterse, J. L., Van't Veer, L. J. 2005. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nature*. doi:10.1038/nrc1670
- Wolkenhauer, O. 2001. Systems biology: The reincarnation of systems theory applied in biology? *Bioinformatics*, 2, 258–270. doi:10.1093/bib/2.3.258
- Yan, X., Chen, Y.-G. 2011. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- $\beta$  signalling. *Biochemical Journal*, 434, 1–10. doi:10.1042/BJ20101827
- Yoneda, T., Hiraga, T. 2005. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. Elsevier. de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X04026440>
- yWorks. 2019. yEd. de <https://www.yworks.com/>
- Zhang, Z., Wang, H., Ikeda, S., Fahey, F., Bielenberg, D., Smits, P., Hauschka, P. V. 2010. Notch3 in human breast cancer cell lines regulates osteoblast-cancer cell interactions and osteolytic bone metastasis. Elsevier. doi:10.2353/ajpath.2010.090476