

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Modelado Computacional del Ciclo Celular de
Schizosaccharomyces pombe Mediante Modelado
Basado en Agentes

TESIS PRESENTADA POR
CARLOS ALBERTO CASTRO ESTRADA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA

Directora: Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Co-Directora: Dra. Eunice Vargas Viveros

Ensenada, México, junio de 2018

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

**Modelado computacional de ciclo celular de
Schizosaccharomyces pombe mediante modelado basado en
agentes**

TESIS

que para obtener el grado de MAESTRÍA EN INGENIERÍA

Presenta

Carlos Alberto Castro Estrada

Aprobada por:

Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Directora de Tesis

Dra. Eunice Vargas Viveros
Co-Directora de Tesis

Dr. David Cervantes Vásquez
Miembro del Comité

Dr. Efrén Delgado
Miembro del Comité

Dra. Carelia Guadalupe Gaxiola Pacheco
Miembro del Comité

Ensenada, Baja California, Junio del 2018.

A mi familia

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis abuelos María de los Ángeles Robles Drew y Oscar Estrada Morales, que han estado para mí en todas las etapas de mi vida; apoyándome, alimentándome y ayudándome cuando lo necesité. A mis padres Perla Estrada Robles y Carlos Alberto Castro Morales, por haberme criado de la manera que lo hicieron, tal vez con errores, pero con mucho amor, consejo y nutriéndome con un constante deseo de siempre seguir superándome, razón de lo que soy ahora. A mi novia Bere, que ha sido mi compañera, amor y soporte durante mis dos años de maestría. Al resto de mi familia más cercana por siempre ser unidos y brindar un poco de su ser a mi persona.

También doy gracias a mi directora de tesis, la Dra. Dora Luz Flores, quien ha sido una guía y ejemplo a seguir desde hace 4 años. No tengo palabras para describir todo el apoyo que me ha brindado, tanto en la licenciatura como en la maestría, usted fue clave para poder iniciar y terminar mis estudios. Es un honor poder trabajar al lado de una persona increíblemente trabajadora y que siempre busca superarse, sin duda alguna me llevo eso como aprendizaje para seguir mejorando en la academia y en la vida. Su guía y confianza han hecho posible este trabajo de tesis.

Además agradezco a los miembros de mi comité de tesis quienes con su guía y consejo me han ayudado bastante a mejorar y pulir detalles de mi proyecto y escrito de tesis. Gracias

a la Dra. Eunice Vargas por las clases impartidas que ampliaron mi visión sobre el estudio de cinética y reacciones con enzimas. Gracias al Dr. David Cervantes por su constante preocupación sobre el avance del proyecto, cosa que me mantuvo siempre adelante con la tesis. Gracias al Dr. Efrén Delgado que me permitió entender las implicaciones de los modelos realizados. Y gracias a la Dra. Carelia Gaxiola que me ayudo a mejorar bastante las secciones que involucraban el modelado basado en agentes.

Muchas gracias a la UABC y a la FIAD por brindarme de material, recursos y espacio para trabajar de manera adecuada con este trabajo de tesis.

Resumen

El objetivo de este trabajo de tesis es desarrollar un modelo computacional utilizando modelado basado en agentes (MBA) del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), para estudiar la secuencia y tiempos de las fases del ciclo celular de la levadura (MC2Sp), bajo la acción de las proteínas que regulan su ciclo. Adicionalmente, se realizó un modelo de la ruta de la fermentación maloláctica de esta misma levadura (MFmSp). Los modelos se desarrollaron haciendo uso del enfoque basado en agentes, en donde el modelo está formado por agentes, un ambiente y diferentes interacciones entre ellos las cuales permiten que se generen comportamientos emergentes durante la simulación. La abstracción de los modelos se hizo a nivel celular y los agentes se definieron a nivel molecular; en el modelo del ciclo celular los agentes representan las proteínas reguladoras, mientras que el modelo de la fermentación maloláctica representan metabolitos, enzimas y otras moléculas. Las interacciones representaron modificaciones moleculares o reacciones bioquímicas, mientras que el espacio fue definido como el espacio intracelular de la levadura. Una vez construidos los modelos, se realizaron diferentes experimentos como parte del análisis, así como una verificación y validación para determinar si el diseño de los modelos se hizo de la forma correcta y si la programación del modelo representa correctamente el fenómeno biológico. Como parte de los resultados, el MC2Sp pudo reproducir el comportamiento biológico al medir los tiempos de las fases del ciclo celular, así como representar su secuencia, lo que le da una ventaja sobre el modelo de redes booleanas debido a que ese modelo solo tiene la capacidad de representar la secuencia

del ciclo celular, pero sin poder medir los tiempos de las fases de éste, que es habitual en los modelos matemáticos. Esta similitud entre el comportamiento biológico y del modelo permite afirmar que el MC2Sp tiene la capacidad de reproducir en cierto nivel el fenómeno biológico real, además de que los tiempos obtenidos tienen un nivel de parecido con otros modelos de la bibliografía. De la misma manera con el MFmSp se obtuvieron resultados que se asemejan al proceso biológico de la ruta metabólica de la producción de etanol a partir de ácido málico. En general, el MBA representa un ahorro de recursos económicos y de tiempo, al igual que otras técnicas de modelado computacional. Al cambiar los experimentos *in vivo*, que necesitan del uso de insumos, organismos y tiempo en el laboratorio, por otros experimentos *in silico* donde se pueden realizar los análisis de forma más rápida en comparación con su equivalente biológico.

Palabras clave: Ciclo celular, Modelado basado en agentes, *Schizosaccharomyces pombe*, Fermentación maloláctica.

Abstract

The objective of this thesis is to develop a computational model of the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle using agent-based modeling (MBA), to study the sequence of events and time of the cell cycle phases (MC2Sp), under the action of proteins that regulate the its cycle. In addition, a model of the malolactic fermentation pathway of the same yeast (MFmSp) was created. The models were developed using the agent based modeling technique, where a model is formed by agents, an environment and different interactions among agents and environment. This technique allows the creation of emergent behavior while the simulation occurs. Models abstraction was set at a cellular level and agents were defined at a molecular level; agents represent regulatory proteins in the cell cycle model, and metabolites, enzymes and other molecules in the malolactic fermentation pathway model. The interactions represented molecular modifications, or biochemical reactions, while the environment was defined as the intracellular space of the yeast. Once the models were built, several experiments were performed as part of the analysis, as well as a verification and validation of the models to determine if model design process was made correctly and if the model programming is able of reproduce the biological phenomenon. For the results, the MC2Sp was able to measure cell cycle phase time, as well as reproduce the biological sequence, a clear advantage against the boolean network model, that is only capable of reproduce the sequence of the cell cycle and not the cell cycle phase times, often focused by mathematical model research. This similarity between model and biological behavior, allows to validate the capability of the MC2Sp to

reproduce biological phenomenon at a certain level, also phase time had similarity to other models from the bibliography. In the same way, the MFmSp had expected results according to the biological process of the metabolic pathway where ethanol is produced while malic acid is consumed. In general, ABM represents a saving of economic resources and time, as well as other computational modeling techniques. By changing the *in vivo* experiments, which require the use of supplies, organisms and laboratory time, by other *in silico* experiments where the analysis can be performed more quickly compared to their biological equivalents.

Keywords: Cell cycle, Agent based modeling, *Schizosaccharomyces pombe*, malolactic fermentation.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	v
Abstract	VII
Índice de tablas	XI
Índice de figuras	XIII
Lista de abreviaciones	XV
Estructura de la tesis	XVI
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
1.2. Ciclo celular de la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
1.3. Casos de estudio	5
1.3.1. Cáncer y levaduras	5
1.3.1.1. Cáncer	5
1.3.1.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en el estudio del cáncer	5
1.3.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en la fermentación de vinos	7
	X

1.3.2.1. Ruta de la fermentación maloláctica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	8
1.4. Modelado basado en agentes	8
1.5. Justificación	10
1.6. Estado del arte	11
1.7. Preguntas de investigación	14
1.8. Objetivos	15
1.8.1. Objetivo general	15
1.8.2. Objetivos específicos	15
1.9. Hipótesis	15
2. Metodología	16
2.1. Simulación como método de investigación	16
2.2. Creación de modelos basados en agentes	16
2.2.1. Diseño del modelo	17
2.2.2. Componentes del modelo	19
2.2.2.1. Agentes	19
2.2.2.2. Ambiente	20
2.2.2.3. Interacciones	21
2.2.3. Construcción del modelo	21
2.2.4. Análisis de un modelo basado en agentes	22
2.3. Modelo del ciclo celular	23
2.3.1. Diseño del modelo basado en agentes del ciclo celular	23
2.3.2. Construcción del modelo basado en agentes del ciclo celular	25
2.3.3. Análisis del modelo basado en agentes del ciclo celular	25
2.4. Modelo basado en agentes de la ruta de la fermentación maloláctica	27
2.4.1. Diseño del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica	27

2.4.2. Construcción del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica	29
2.4.3. Análisis del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica	29
3. Resultados	30
3.1. Resultados del modelo basado en agentes del ciclo celular de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	30
3.1.1. Modelo en NetLogo del ciclo celular	31
3.1.2. Tiempos de las fases del modelo del ciclo celular	33
3.1.3. Comportamiento del modelo basado en agentes del ciclo celular	36
3.2. Resultados del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	39
3.2.1. Modelo en NetLogo de la ruta de fermentación maloláctica	40
3.2.2. Metabolitos de la ruta de fermentación maloláctica	42
4. Discusiones	47
4.1. Modelo basado en agentes del ciclo celular de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	47
4.2. Modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	50
4.3. Discusión general	51
5. Conclusiones y trabajo futuro	53
5.1. Conclusiones	53
5.2. Trabajo a futuro	54
Bibliografía	56

Índice de tablas

TABLA	Página
1.1. Estado del arte de los diferentes tipos de modelos del ciclo celular de <i>S. pombe</i>	13
1.2. Estado del arte del uso de <i>S. pombe</i> en la fermentación de vinos	14
3.1. Resultados de tiempos y porcentajes de duración de las fases del ciclo celular de diferentes modelos.	34
3.2. Secuencia de los estados de las proteínas obtenidos con el MC2Sp	37
3.3. Estados estacionarios obtenidos en el MC2Sp	38

Índice de figuras

FIGURA	Página
1.1. Publicaciones sobre la levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
1.2. Ciclo celular de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
1.3. Ruta metabólica de la fermentación maloláctica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	9
2.1. Diagrama de la simulación como un método de investigación	17
2.2. Red de interacción de las proteínas que regulan el ciclo celular. Tomada de (Davidich and Bornholdt, 2008)	24
3.1. Mundo de la interfaz del modelo del ciclo celular	31
3.2. Entradas de la interfaz del modelo del ciclo celular	32
3.3. Monitores de la interfaz del modelo del ciclo celular	33
3.4. Porcentaje de duración de las fases del ciclo celular	35
3.5. Mundo y entradas de la interfaz del modelo de la ruta de fermentación maloláctica	40
3.6. Gráficas de la interfaz del modelo de la ruta de fermentación maloláctica	41
3.7. Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 70 % en PD y 70 % en ED.	43
3.8. Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 10 % en MD, 70 % en PD y 70 % en ED.	44

3.9. Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 10 % en PD y 70 % en ED.	45
3.10. Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 70 % en PD y 10 % en ED.	46

Lista de abreviaciones

<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
CDK	<i>cinasas dependientes de ciclinas</i>
NAD	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido</i>
MBA	<i>Modelado basado en agentes</i>
EDO	<i>Ecuaciones diferenciales ordinarias</i>
MC2Sp	<i>Modelo basado en agentes del ciclo celular de S. pombe</i>
MFmSp	<i>Modelo basado en agentes de la ruta de la ruta de fermentación maloláctica de S. pombe</i>
MD	<i>Ácido málico descarboxilasa</i>
PD	<i>Piruvato descarboxilasa</i>
ED	<i>Etanol deshidrogenasa</i>
CO₂	<i>Dióxido de carbono</i>

Estructura de la tesis

En el Capítulo 1 se proporciona una introducción a los temas principales relacionados a la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y al modelado basado en agentes. En este capítulo se describe la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y su importancia en el estudio de procesos celulares y de crecimiento de la célula. También se describen los dos casos de estudio de esta tesis; el principal, el cual consiste en un estudio del ciclo celular de la levadura y cómo las levaduras se relacionan con los estudios de desarrollo de tratamientos para el cáncer; el segundo caso de estudio describe el funcionamiento de la ruta de fermentación maloláctica, con información de las consideraciones que se toman en los vinos de alta calidad. Además se describe la justificación de la importancia de los casos de estudio y una descripción del estado del arte para cada uno de ellos. Por último se encuentran los objetivos principales y específicos, las preguntas de investigación y la hipótesis.

En el Capítulo 2 se describe la metodología indicando todos los pasos que son necesarios seguir para la creación de un modelo basado en agentes, primero para su diseño y la definición de un modelo conceptual que servirá de base para realizar la programación del modelo. Por último se mencionan los tipos de análisis que se pueden realizar para examinar un modelo. Todo esto se definió para ambos casos de estudio.

En el Capítulo 3 se encuentran los resultados obtenidos después de seguir la metodología.

La información obtenida se presenta en forma de tablas o gráficas, las cuales muestran la información más relevante para poder examinar a profundidad los modelos y determinar su capacidad de representar el fenómeno real.

En el Capítulo 4 se presenta una discusión acerca de los resultados obtenidos y las implicaciones de cada uno de ellos. Qué significa que se hayan obtenido, cómo se comparan con otras fuentes y qué es lo que se puede lograr con ellos son los temas que se describen a profundidad en este capítulo.

En el Capítulo 5 se concluye el proyecto realizado explicando sí se cumplieron los objetivos definidos y dando una proyección a futuro de los productos obtenidos en este trabajo.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*

El uso de levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) en la investigación genética y molecular se remonta hasta 1946, año en que Urs Leopold obtuvo en sus manos su primera cepa para utilizar como objeto de estudio para su tesis de doctorado. El trabajo de Leopold y publicaciones posteriores a éste, convirtieron a la levadura a mediados de los 80's en el centro de atención en la investigación de su ciclo sexual y procesos de crecimiento y división; teniendo un aumento significativo de publicaciones entre 1985 y 1999, comportamiento que puede observarse claramente en la Figura 1.1 (Fantes and Hoffman, 2016; Hoffman et al., 2015).

Es importante destacar que en el año 2001 le fue otorgado a Paul Nurse el premio Nobel en fisiología o medicina con su estudio de los reguladores del ciclo celular de *S. pombe*. Esta levadura ha sido de gran interés, llevándola a ser el sexto organismo eucariota en tener la totalidad de su genoma secuenciado (Fantes and Hoffman, 2016). *S. pombe* tiene un genoma



Figura 1.1: Publicaciones sobre la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

de alrededor de 13.8 Mpb un tamaño similar al de la levadura en ciernes *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), pero teniendo una diferencia en sus cromosomas, donde *S. pombe* tiene tres de gran tamaño, uno de 5.7, otro de 4.6 y el más chico de su genoma de 3.5 Mpb, mientras que *S. cerevisiae* tiene 16 cromosomas pequeños siendo el más grande de todos de 1.5 Mpb, menos de la mitad del cromosoma más chico de *S. pombe* (Hoffman et al., 2015).

Respecto a sus proteínas expresadas, se conocen 5054 de las cuales 2154 tienen asociada una función biológica, además de que 2050 tienen un rol inferido experimentalmente por un ortólogo, siendo comúnmente *S. cerevisiae*, en el caso contrario, 850 no tienen un rol biológico conocido aunque un gran número de esas proteínas sin caracterizar se han conservado fuera del género *Schizosaccharomyces* con 182 proteínas conservadas en mamíferos, de las cuales, el 40% no tiene un ortólogo en *S. cerevisiae* (Hoffman et al., 2015). Además, *S. pombe* ha

llegado a ser uno de los modelos eucarióticos mejor caracterizados para estudiar la biología celular a un nivel molecular (Fantes and Hoffman, 2016).

Debido a estas razones y a que es un hongo relativamente simple con un ciclo celular muy común, *S. pombe* se ha convertido en un organismo de gran interés en la biología celular, junto con el estudio de sus ciclos celulares y procesos de crecimiento y división que son parte de su ciclo celular así como los reguladores de éste (Egel, 2010; Fantes and Hoffman, 2016).

1.2. Ciclo celular de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*

El ciclo celular es el proceso fundamental en el que se involucran el crecimiento y reproducción biológica de una célula, este proceso está mediado por una secuencia de eventos donde la célula duplica su tamaño, sintetizando diferentes componentes celulares como ribosomas, membranas, enzimas y más importante, cromosomas; finalmente dividiéndose en dos células hijas con la completa capacidad de cumplir el mismo proceso. Para que la secuencia de eventos que rigen el ciclo celular se lleven a cabo apropiadamente existen diferentes mecanismos reguladores (Novak et al., 1998).

Murdoch Mitchison fue quien empezó a utilizar en los 50's a *S. pombe*, para el desarrollo de modelos experimentales para estudiar el ciclo celular de organismos eucariotas, empezando con el estudio del crecimiento de las células durante el ciclo celular, debido a que la edad de las células de *S. pombe* se puede estimar directamente midiendo su largo ya que su ancho no cambia durante su crecimiento celular (Hoffman et al., 2015; Nurse, 2002).

La secuencia de eventos en células eucariotas está controlada por diferentes proteínas cuyas interacciones, concentraciones y propiedades moleculares guiarán a la célula para lograr un ciclo celular completo correcto (Csikász-Nagy, 2009). Este ciclo mostrado en la Figura 1.2 está dividido en cuatro fases descritas a continuación: G1, donde la célula crece hasta alcanzar las condiciones necesarias para comenzar el ciclo celular; S, donde el ácido desoxirribonucleico (ADN) se sintetiza y los cromosomas se replican; G2 la cual funciona como un espacio entre las fases S y M donde los otros componentes necesarios para pasar a la fase M se sintetizan; y por último, M, donde la célula entra en la mitosis y se divide a sí misma. Después de esto, la célula ingresa al estado estacionario G1 completando un ciclo y esperando las condiciones necesarias para tener una nueva división celular. Éste ciclo está mediado por proteínas ciclinas y por cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Davidich and Bornholdt, 2008).

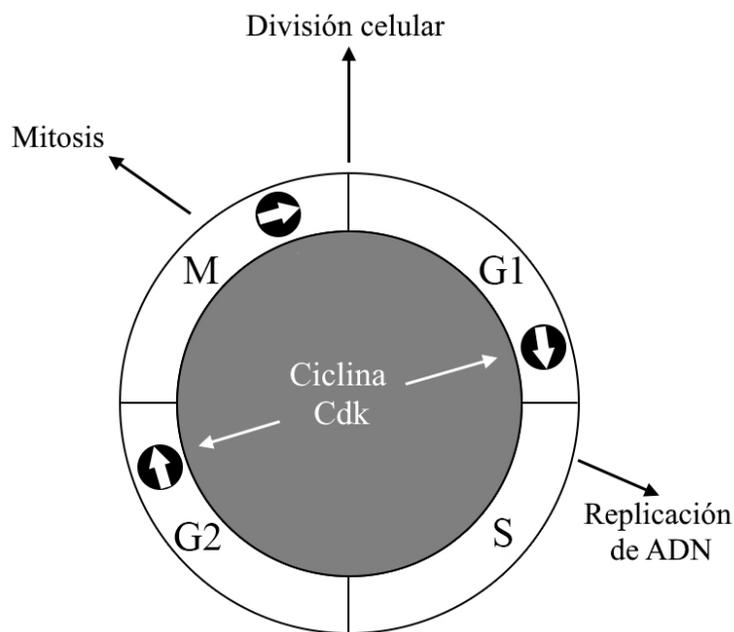


Figura 1.2: Ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*.

1.3. Casos de estudio

1.3.1. Cáncer y levaduras

Debido a la similitud del funcionamiento de los mecanismos del ciclo celular de *S. pombe* al de los humanos, esta levadura ha ido ganando su lugar como modelo biológico para estudiar procesos de células humanas usando a *S. pombe* como objeto de estudio. Generando un interés particular en el estudio del cáncer, su naturaleza y métodos de combatirlo eficientemente.

1.3.1.1. Cáncer

La principal razón de la inestabilidad genética de las células cancerosas se debe a fallas en la maquinaria del ciclo celular, reparación de ADN o puntos de control del ciclo celular. Entre esos tres procesos, los más conocidos son la reparación de ADN y los puntos de control del ciclo celular, o que los hace objetivos en el estudio de los cambios genéticos generados en estos procesos que llevan a la célula a perder sus funciones normales y la convierten en una célula cancerosa (Hartwell, 2005). El profundo entendimiento de los defectos de estos procesos es una puerta de entrada para el desarrollo de agentes externos que se enfoquen en esas fallas para eliminar las células cancerosas.

1.3.1.2. *Schizosaccharomyces pombe* en el estudio del cáncer

El estudio del control genético de la división celular permitió forjar un hecho muy relevante dentro de la biología celular y molecular; la conservación de proteínas y sus funciones a través de la evolución. Donde los genes que codifican a proteínas quinasas, miosinas o antranilato sintasas de nuevos organismos son similares a los genes de esas proteínas en orga-

nismos más simples. Aunque la conservación molecular de las proteínas que participan en los mecanismos del ciclo celular no se mantiene entre eucariotas y procariotas, entre las mismas eucariotas la similitud es increíblemente significativa. Los principales organismos estudiados en relación al ciclo celular son *Xenopus*, *S. pombe* y *S. cerevisiae*, los cuales tienen claras diferencias pero se asemejan en que codifican las mismas proteínas quinasas dependientes de ciclinas, moléculas muy importantes en la regulación del ciclo celular (Hartwell, 2005).

Un enfoque para identificar fármacos con ventajas terapéuticas para tipos específicos de cáncer en humanos es construyendo células de levadura las cuales contengan mutaciones características de tumores de cáncer específicos (modificando alguno de los procesos característicos de ese tipo de cáncer). El siguiente paso es probar diferentes fármacos en la levadura mutada y en un control que se trata de la levadura normal, para identificar el fármaco que actuó más rápidamente en la levadura mutada que en la normal (Hartwell, 2005).

Una de las fallas de las células cancerosas está relacionada con el funcionamiento de las proteínas ciclinas que regulan el ciclo celular, por lo que un modelo computacional del ciclo celular basado en la red de regulación del ciclo celular, mediado por las interacciones de proteínas ciclinas, podría ser usado como una base para modelos que faciliten la identificación de fármacos específicos basándose en el método de Hartwell *et al.* (Hartwell, 2005) mencionado anteriormente.

Uno de las situaciones donde las proteínas ciclinas toman un papel importante es en el tratamiento de células cancerosas de leucemia mieloide aguda y adenocarcinoma. En las que la combinación del ADN dañado y una alta acumulación de Cdc25 es capaz de activar el complejo Cdc2 ocasionando que la célula entre a la mitosis de forma prematura, saltándose el punto de control de la transición de G2 a M, llevando a la célula cancerosa a la apoptosis

(Nitiss and Heitman, 2007).

1.3.2. *Schizosaccharomyces pombe* en la fermentación de vinos

Por otro lado, el mercado de vinos ha experimentado un incremento en el interés por vinos novedosos con nuevos sabores y propiedades únicas; por esto, se ha procurado la experimentación para tratar de encontrar levaduras poco convencionales en el mundo de los vinos y así obtener nuevos productos de interés. Particularmente, la atención se ha puesto en levaduras fuera del género *Saccharomyces* como lo es *Schizosaccharomyces*, levaduras que llevan a cabo un metabolismo maloláctico en lugar de alcohólico (Mylona et al., 2016).

Es importante destacar que la producción de vinos de calidad depende principalmente de la uva, de los microorganismos involucrados en la fermentación y de en las habilidades y experiencia del enólogo que lo fabrica. Es esencial además, la reducción de la acidez en el mosto de la uva para obtener vinos bien balanceados (Husnik et al., 2006).

El uso del género *Schizosaccharomyces* ha sido recomendado por el Código Internacional de Prácticas Enológicas (Benito et al., 2014a) y ha sido aprobado por la Organización Internacional de Vid y el Vino (Benito et al., 2016). Se ha demostrado que el uso de *Schizosaccharomyces* durante la fermentación, evita la aparición de aminas biogénicas producidas por bacterias ácido lácticas, además reduce la acidez general del vino bajo condiciones de laboratorio (Benito et al., 2014b).

S. pombe es una de las especies de *Schizosaccharomyces* que ha sido estudiada ampliamente en su uso en la fermentación de vinos. Teniendo un consumo completo del ácido málico

durante la fermentación, con baja producción de ácido acético, alta actividad de ureasa, alta producción de ácido pirúvico y una alta producción de glicerol que es una de las moléculas que tiene un mejor efecto al paladar, así como un aumento de hasta más del 14 % de etanol final (Benito et al., 2016).

1.3.2.1. Ruta de la fermentación maloláctica de *Schizosaccharomyces pombe*

El género *Schizosaccharomyces* es anaerobio facultativo y tiene la capacidad de metabolizar hexosas como fructosa y glucosa, y disacáridos como la sacarosa. Teniendo como productos principales de la fermentación, etanol y dióxido de carbono (Benito et al., 2016).

Durante la fermentación maloláctica la enzima ácido málico descarboxilasa transforma el ácido málico a piruvato con ayuda de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Después, el piruvato es descarboxilado a acetaldehído el cual finalmente es reducido a etanol (Benito et al., 2016). La ruta metabólica se muestra en la Figura 1.3.

1.4. Modelado basado en agentes

El modelado basado en agentes (MBA) es un paradigma de modelado computacional el cuál se representa por medio de agentes autónomos, que son entidades con diferentes capacidades y propiedades, siendo su característica más importante la capacidad de tomar sus propias decisiones. Estos agentes son programas de computadora, que además de tomar decisiones, tienen un conjunto de reglas y tienen la posibilidad de interactuar con otros agentes en el modelo, sin importar lo que éstos representen. Las reglas que tendrán los agentes dependerán de la naturaleza del modelo y de la parte específica de la que formen parte en

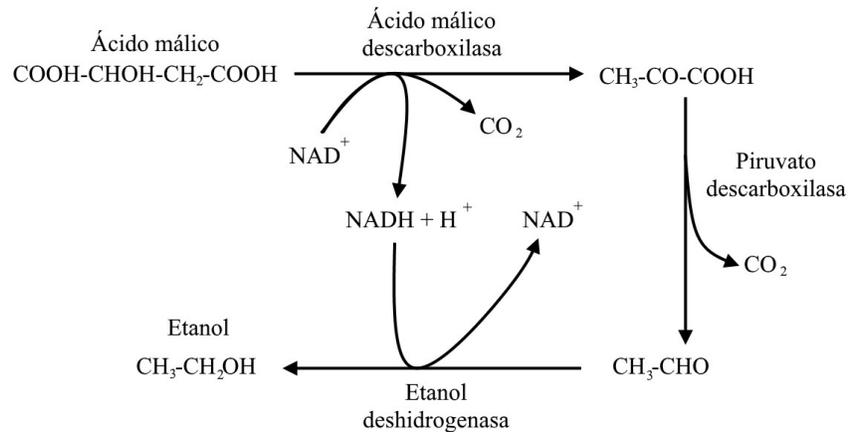


Figura 1.3: Ruta metabólica de la fermentación maloláctica de *Schizosaccharomyces pombe*.

el fenómeno. Las interacciones de los agentes ocurren para hacer posible la exploración de comportamientos emergentes y de la dinámica del modelo, cosa que no es posible en el caso de modelos matemáticos. La apropiada definición de las reglas e interacciones permitirán que los agentes, y por lo tanto el modelo, pueda representar de manera precisa el fenómeno real que se va a modelar (Bonabeau, 2002).

El MBA es una técnica computacional que ha aumentado su uso en el estudio de sistemas biológicos y se destaca por su capacidad al momento de integrar distintos tipos de información, haciendo posible de manera sencilla la adición de conocimiento cualitativo y datos cuantitativos mientras se explica la estocasticidad del sistema (Bayrak et al., 2016). En el caso de los sistemas biológicos, lo anterior es de gran ayuda, debido a que en un gran número de casos no se tiene acceso a todos los datos cuantitativos de un sistema, debido a la dificultad de obtener parámetros físicos mediante experimentación, ya sea por la complejidad de las técnicas a utilizar o a la inaccesibilidad del objeto de estudio.

Otra de las capacidades del MBA se basa en el supuesto de que cualquier fenómeno se puede modelar si éste se puede abstraer en términos de agentes, un ambiente e interacciones presentes entre los agentes entre sí o con el ambiente mismo (Wilensky and Rand, 2015). Siendo así, el MBA, basado en las capacidades mencionadas anteriormente, ha logrado satisfactoriamente el estudio de diferentes sistemas biológicos en una variedad de áreas (Bauer et al., 2009; Bayrak et al., 2016; Khataee et al., 2011; Manzanarez-Ozuna et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2009).

1.5. Justificación

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* es un organismo que ha sido de gran importancia por su biología celular, su ciclo sexual y los procesos de crecimiento, división y regulación que son parte de su ciclo celular (Novak et al., 1998). Entre 1885 y 1999 se publicaron aproximadamente 400 artículos científicos teniendo como caso de estudio a la levadura de fisión (Fantes and Hoffman, 2016). A partir de ese momento, la realización de modelos matemáticos y computacionales han permitido una facilidad en el estudio de esta levadura, en particular sobre el estudio de su ciclo celular y sus reguladores.

Por otro lado, la experimentación *in silico* permite en la mayoría de los casos, realizar estudios de manera mas rápida y sencilla en comparación con la experimentación *in vivo*. Es por esto la importancia que toma la realización de modelos computacionales más complejos que sean elaborados con herramientas más eficientes, impulsando el estudio del ciclo celular de la levadura de fisión, con herramientas que permitan complementar y servir como apoyo al momento de realizar experimentos en el laboratorio, teniendo un ahorro de materiales y

equipo (Rajendran, 2008).

Esto también aplica en el caso de estudio de la fermentación de vino tinto, con el modelo computacional de la fermentación maloláctica llevada a cabo por esta misma levadura. Siendo relevante destacar la importancia económica y cultural del Valle de Guadalupe en la región de Ensenada, Baja California, en términos de producción de vinos de alta calidad (Sánchez Zepeda and Mungaray Lagarda, 2010).

1.6. Estado del arte

Debido a la importancia de *S. pombe* esta levadura ha sido caso de estudio en una variedad de artículos que involucran algún tipo de modelado matemático o computacional con distintos tipos de enfoques mostrados en la Tabla 1.1. La gran mayoría de los modelos utilizan ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), basadas en diferentes consideraciones biológicas del ciclo celular de la levadura de fisión, empezando con el primer trabajo de Novak *et al.* (Novak and Tyson, 1995) en el cual realizaron un modelo de EDO basado en hechos e ideas presentes en estudios experimentales sobre el ciclo celular de la levadura de fisión. Después Novak *et al.* (Novak and Tyson, 1997) agregó el concepto del mecanismo *checkpoint* denominado *Start* el cual dicta el inicio del ciclo celular. Su último trabajo permitió un estudio más completo en el que se añadieron dos *checkpoints* adicionales en el trabajo de Novak *et al.* (Novak et al., 1998).

Después Sveiczer *et al.* (Sveiczer et al., 2000) realizó un modelo basado en los trabajos mencionados anteriormente, en el cual se centraron en las interacciones antagonistas de los reguladores negativos de Cdc2/Cdc13. Además, en la investigación de Novak *et al.* (Novak et al., 2001) realizaron un modelo proponiendo un sistema de 14 ecuaciones las cuales fueron

estudiadas con simulación numérica y teoría de bifurcación. Csikasz-Nagy *et al.* (Csikász-Nagy *et al.*, 2007) modelaron la red de inicio del septo basándose en la cinética bioquímica de los sistemas reguladores, además en Li *et al.* (Li *et al.*, 2010) realizaron un modelo para estudiar el control del tamaño celular de la levadura de fisión durante el ciclo celular. Por último en el trabajo de Anbumathi *et al.* (Anbumathi *et al.*, 2011) se realizó un estudio del ciclo celular con un modelo matemático basado en las interacciones moleculares de las proteínas que regulan el ciclo celular. Otro acercamiento combinando algunas características estocásticas con fórmulas matemáticas se realizó por Vasireddy *et al.* (Vasireddy and Biswas, 2004) haciendo uso de redes de Petri híbridas de los mecanismos de regulación.

También se han trabajado algunos modelos estocásticos en los que se pueden investigar las diferencias en comportamientos de algunas células, en particular, en comparación con el comportamiento promedio de la población, ideal al estudiar células mutantes con características muy definidas. Primero, con el modelo estocástico de Sveiczzer *et al.* (Sveiczzer *et al.*, 2001) basado en un modelo determinístico de EDO, agregando la estocasticidad en la creación de células hijas de distintos tamaños así como diferente volumen de su núcleo. Steuer (Steuer, 2004) agregó fluctuaciones dinámicas en forma de ruido a la definición del sistema mientras que en el trabajo de Lygeros *et al.* (Lygeros *et al.*, 2008) se modeló la replicación de ADN durante la fase S iniciando en un momento determinado estocásticamente.

Otro enfoque de modelado utilizado fue el de las redes booleanas, las cuales se caracterizan por integrar información cualitativa y permitir una representación de los mecanismos moleculares sin necesidad de agregar información cinética, muy necesaria en modelos de EDO. En el caso de Davidich *et al.* (Davidich and Bornholdt, 2008) realizaron un modelo de red booleana de la red de proteínas reguladoras del progreso del ciclo celular; además, en la investigación de Chasapi *et al.* (Chasapi *et al.*, 2015) trabajaron un modelo booleano para

estudiar las relaciones de los genes involucrados en la regulación la red de inicio del septo.

Tabla 1.1: Estado del arte de los diferentes tipos de modelos del ciclo celular de *S. pombe*

Booleano	EDO	Estocástico
(Davidich and Bornholdt, 2008) (Chasapi et al., 2015)	(Novak and Tyson, 1995) (Novak and Tyson, 1997) (Novak et al., 1998) (Sveiczzer et al., 2000) (Novak et al., 2001) (Vasireddy and Biswas, 2004) (Csikász-Nagy et al., 2007) (Li et al., 2010) (Anbumathi et al., 2011)	(Sveiczzer et al., 2001) (Steuer, 2004) (Lygeros et al., 2008)

En cuanto a la fermentación, hay evidencia reciente (Tabla 1.2) sobre los beneficios del uso de la levadura *S. pombe* para producir vinos de calidad similar o mayor a aquellos producido por *S. cerevisiae*. En los trabajos de Benito *et al.* (Benito et al., 2012, 2014a) se analizó una gran variedad de cepas de *S. pombe* en procesos de fermentación para distinguir las cualidades del vino producido por éstas, llegando a la conclusión de que unas cepas son mejores productoras de vino que otras. Por otro lado, se ha estudiado la fermentación mixta y secuencial, primero por Benito *et al.* (Benito et al., 2014b) utilizando *S. pombe* y *S. cerevisiae*, y después por Loira *et al.* (Loira et al., 2015) usando *S. pombe* en conjunto con *Torulaspora delbrueckii*. Además, en el trabajo de Mylona *et al.* (Mylona et al., 2016) se estudió la fermentación mixta llevada a cabo por *S. pombe* y *S. cerevisiae* a diferencia del trabajo de Benito *et al.* (Benito et al., 2015) donde se realizó fermentación secuencial de *S. pombe* con *Lachancea thermotolerans*.

Tabla 1.2: Estado del arte del uso de *S. pombe* en la fermentación de vinos

Normal	Mixta	Secuencial
(Benito et al., 2012)	(Benito et al., 2014b)	(Benito et al., 2014b)
(Benito et al., 2014a)	(Loira et al., 2015)	(Loira et al., 2015)
	(Mylona et al., 2016)	(Benito et al., 2015)

1.7. Preguntas de investigación

A continuación se muestran las preguntas de investigación que dan pie al trabajo de esta tesis, sobre el uso del modelado basado en agentes para representar fenómenos biológicos de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*).

¿El modelo basado en agentes será una técnica capaz de representar el ciclo celular biológico de *S. pombe*?

¿Cuántos y cuáles agentes serán necesarios para diseñar al modelo basado en agentes del ciclo celular de *S. pombe*?

¿El modelado basado en agentes será capaz de representar el caso de estudio de la ruta de fermentación maloláctica por *S. pombe*?

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo general

Desarrollar un modelo computacional mediante el enfoque basado en agentes del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) bajo la acción de las proteínas que regulan su ciclo; para estudiar la secuencia del ciclo celular, así como los tiempos de las fases de éste.

1.8.2. Objetivos específicos

- Determinar los componentes que se utilizarán como agentes en el modelo del ciclo celular de *S. pombe*.
- Construir el modelo del ciclo celular de *S. pombe*.
- Realizar la validación del modelo del ciclo celular de *S. pombe*.
- Construir el modelo del caso de estudio de la ruta de fermentación maloláctica de *S. pombe*.
- Validar el modelo del caso de estudio de la ruta de fermentación maloláctica de *S. pombe*.

1.9. Hipótesis

El modelado basado en agentes es un enfoque de modelado computacional que permitirá el estudio *in silico* de la secuencia y tiempos de las fases del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Simulación como método de investigación

En la Figura 2.1 se puede ver un diagrama con el proceso que se debe seguir para utilizar la lógica de la simulación como un método planteada por Gilbert y Troitzsch (Gilbert and Troitzsch, 1999). La primera parte a definir es el fenómeno que se va a estudiar, el cual debe someterse a un proceso de abstracción para poder desarrollar un modelo conceptual que servirá de base para el modelo computacional que se usará para simular el fenómeno. Los datos obtenidos en las simulaciones deben ser comparados con los datos reales del fenómeno para determinar si el modelo es capaz de representar el fenómeno real.

2.2. Creación de modelos basados en agentes

La creación de modelos mediante MBA es un basto proceso en el que se deben definir apropiadamente las partes del modelo así como las metas y procesos que éstas llevarán a cabo para lograr esas metas. Cabe destacar que un mismo fenómeno puede ser atacado de

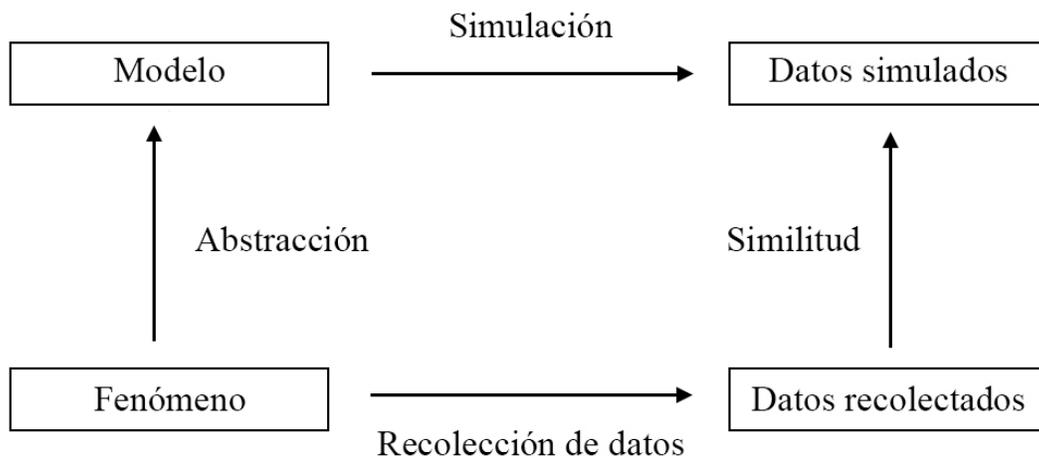


Figura 2.1: Diagrama de la simulación como un método de investigación

distintas maneras y todas ellas tienen validez. A continuación se explicarán, las distintas consideraciones que se pueden llevar a cabo en el proceso de creación de un modelo basado en agentes, tomando como referencias los trabajos de Gilbert *et al.* (Gilbert and Troitzsch, 1999) y Wilensky *et al.* (Wilensky and Rand, 2015) utilizando exclusivamente el software NetLogo (Wilensky, 1999) para implementar los modelos.

2.2.1. Diseño del modelo

El MBA puede ser un modelo conceptual en el que se describen los componentes y procesos del fenómeno mediante diagramas, texto, o una descripción descrita en un programa, el cual incorpora los componentes y procesos mediante código que ejecuta esos procesos para obtener una simulación del fenómeno estudiado. Existen diferentes consideraciones para diseñar modelos, las cuales son llamadas dimensiones del modelo, la más importante se divide en las siguientes dos:

- **Modelado basado en fenómenos.** Este proceso se inicia con un patrón de referencia que es una característica típica del fenómeno, la cual será el objetivo final del modelo, y se creará específicamente para representar el patrón de referencia. Ya que se cuenta con un modelo capaz de representar ese patrón, se tiene la posibilidad de cambiar los valores de entrada para estudiar distintos comportamientos que podrían o no surgir con esos cambios a los parámetros iniciales del modelo. Este enfoque puede combinarse con los modelos basados en ecuaciones, donde se usan representaciones matemáticas para obtener el patrón de referencia.
- **Modelado explicativo.** Este tipo de modelado se empieza definiendo un grupo de agentes y su comportamiento, para después analizar qué tipos de comportamientos emergentes se generan al correr el modelo. Es importante destacar que, para que un modelo sea considerado como tal, éste debe tener similitudes a un fenómeno real; por lo que es necesario encontrar algún tipo de convergencia entre el modelo creado y el sistema estudiado.

Otra dimensión que se puede tomar para diseñar apropiadamente un modelo se relaciona con la pregunta o preguntas de investigación que se desea resolver al implementar el modelo. Por ejemplo, ¿Cómo una célula cancerosa prolifera?; o por el contrario, se puede empezar queriendo que el modelo tenga el comportamiento de una célula cancerosa, sin tener una pregunta de investigación específica a responder.

Por último, existe otra dimensión que se relaciona con el modelo conceptual y cómo éste coexiste con la programación de ese modelo, esta dimensión incluye:

- **Diseño *top-down*.** En este tipo de diseño se define primero el modelo conceptual definiendo los agentes, el ambiente y las interacciones que éstos tendrán, para después empezar a programar basándose en esas definiciones planteadas con anterioridad.
- **Diseño *bottom-up*.** De forma contraria, en este diseño se empieza a programar sin definir un modelo conceptual, sólo basándose en el fenómeno que se quiere representar. Durante el proceso pueden surgir nuevos agentes, propiedades e interacciones que sean necesarias para que el modelo alcance su objetivo.

Estas dimensiones pueden combinarse de cualquier forma al momento de diseñar un MBA; además, las definiciones del modelo pueden cambiar en cualquier momento en caso de ser necesario. También, es importante que el fenómeno se aborde de forma simple y de ser necesario se aumente la complejidad de la abstracción del modelo para hacer más simple el proceso.

2.2.2. Componentes del modelo

Otra de las partes fundamentales del diseño de MBA es la definición de los distintos componentes del modelo para hacer más explicativo el modelo conceptual del fenómeno a estudiar.

2.2.2.1. Agentes

Los agentes son las partes fundamentales del MBA, tienen atributos específicos que proporcionarán el sentido de autonomía de estos.

- **Propiedades.** Son las características definidas en los agentes, las cuales pueden ser

representadas por características cualitativas (color, tamaño, forma, etc.) o por datos cuantitativos (variable física). Muchas de estas propiedades vienen agregadas de forma nativa pero cualquier propiedad puede añadirse a un agente.

- **Acciones.** Son los comportamientos que los agentes ejecutan, como creación, muerte, movimiento, etc. También pueden ser acciones que cambien el estado de las propiedades de los agentes.
- **Tipos de agentes.** Los agentes pueden tener movimientos (tortugas), ser estacionarios (parcelas) o pueden representar uniones entre agentes (enlaces). Entro los agentes tortuga existen subgrupos de agentes llamados razas, que se definen para diferenciar distintos grupos de agentes (perros, gatos, etc.), cada raza cuenta con sus atributos base, comunes entre todas las razas, y aquellos atributos definidos para cada una de ellas.

Una de las consideraciones de gran importancia al definir los agentes, es el nivel de abstracción con el que participan en el modelo. En el caso de un organismo, los agentes podrían representar los sistemas, órganos, células, moléculas, etc., lo que está ligado al nivel en el que el fenómeno existe. Los agentes pueden representar distintos niveles físicos y un mismo modelo puede diseñarse desde diferentes niveles así como con diferentes agentes.

2.2.2.2. Ambiente

El ambiente es el lugar donde los agentes existen. El ambiente puede tener propiedades y acciones a ejecutar en el modelo, además de que puede ser de distintos tipos, pudiendo representar localizaciones geográficas explícitas o ser una representación abstracta del espacio en el que existe el fenómeno a estudiar, o incluso un objeto 3D en caso de ser necesario. El espacio tiene condiciones a la frontera que permiten que el mundo en NetLogo sea considerado

como cuadro cercado o un toroide, en el que los agentes al llegar a la frontera derecha, siguen su camino en la frontera izquierda.

2.2.2.3. Interacciones

Las interacciones son otra de las partes más importantes del modelo, ya que permiten traer la realidad del fenómeno estudiado al diseño conceptual y su programación en el software. Estas interacciones pueden ser:

- **Agente-con él mismo.** Es cuando un agente cambia una propiedad o toman una acción específica al considerar una propiedad de él mismo.
- **Ambiente-con él mismo.** Cuando una parte del ambiente reacciona basándose solamente en sus propiedades.
- **Agente-agente.** Las más importantes, cuando un agente interactúa con otro para que uno o los dos cambien y tomen decisiones que afecten a ambos.
- **Ambiente-ambiente.** Probablemente las menos comunes, cuando una parte del ambiente reacciona a otra parte independiente del mismo.
- **Agente-ambiente.** Estas interacciones ocurren cuando un agente cambia sus propiedades o acciones al analizar el espacio en el que está situado.

2.2.3. Construcción del modelo

Esta parte involucra el transporte del conocimiento real del fenómeno a un lenguaje de programación, como NetLogo, trabajando en paralelo con el modelo conceptual o codificando

todo, después de haber definido por completo el modelo conceptual y los componentes del modelo. Es necesario que el proceso de construcción se mantenga simple, al igual que el diseño y de ser necesario es pertinente que se programen partes individuales del modelo de forma separada para comprobar que se modelaron de forma correcta para posteriormente ir juntando esas partes para tener un modelo completo. Este proceso permite la verificación constante de que el modelo hace lo que debería, basado en el modelo conceptual.

2.2.4. Análisis de un modelo basado en agentes

Cuando un modelo tiene componentes que son estocásticos es necesaria la ejecución de múltiples corridas para caracterizar correctamente el comportamiento del fenómeno, ya que al correr el modelo una sola vez, es posible que se obtenga un caso atípico (comportamiento anómalo que no explica correctamente el fenómeno). Para lograr esto, es necesario correr el modelo en varias ocasiones y de ser necesario, modificar los parámetros de entrada. NetLogo cuenta con una herramienta llamada *BehaviorSpace* la cual permite definir diferentes valores iniciales para las entradas del modelo y correr esas configuraciones el número de veces deseado de forma automática.

Los gráficos también son una buena opción para plasmar resultados de un modelo y para analizar estos resultados de forma visual. Además es posible hacer diferentes análisis estadísticos para comparar las diferencias estadísticas entre diferentes configuraciones iniciales del modelo o los resultados del modelo con otras referencias para poder validar la capacidad del modelo en cuestión para representar el fenómeno real.

2.3. Modelo del ciclo celular

2.3.1. Diseño del modelo basado en agentes del ciclo celular

El modelo conceptual del modelo basado en agentes del ciclo celular de *S. pombe* (MC2Sp) se diseñó de acuerdo a la red de proteínas reguladoras del ciclo celular propuesta por Davidich *et al.* (Davidich and Bornholdt, 2008) la cual se muestra en la Figura 2.2. Ésta propuesta fue construida usando como referencia los trabajos de Sveiczzer *et al.*, Novak *et al.* y Tyson *et al.* (Novak *et al.*, 2001; Sveiczzer *et al.*, 2000; Tyson *et al.*, 2002). En esta red se muestran las interacciones moleculares de las proteínas reguladoras las cuáles están representadas por los nodos, teniendo dos estados posibles: 0 (ausente) y 1 (presente) atribuidos a mecanismos biológicos, como la expresión de genes, la fosforilación de proteínas, cambios en la concentración, etc. De esta forma, se tiene un modelo basado en fenómenos, debido a que se busca que el MC2Sp reproduzca el fenómeno del ciclo celular, además de estar bajo la categoría de *top-down*, empezando con la definición de un modelo conceptual, agentes, propiedades e interacciones para después realizar la programación de esos componentes.

Cdc2/Cdc13 y Cdc2/Cdc13* son dos estados diferentes de la misma proteína. Del mismo modo, Cdc2/Cdc13 es la proteína primaria implicada en el control del ciclo celular. Las proteínas restantes se clasifican en dos grupos. Los reguladores positivos incluyen *Start* que funciona como un indicador de la masa celular; SK que representa las quinasas iniciales (Cdc2/Cig1, Cdc2/Cig2 y Cdc2/Puc1) y la fosfatasa Cdc25. Por otro lado, están Slp1, Rum1, Ste9, la proteína fosfatasa (PP) y Wee1 y Mik1, los cuales son antagonistas e influyen de manera negativa en el complejo Cdc2/Cdc13. Sin embargo, tanto Wee1 como Mik1 están agrupados en un mismo complejo como Wee1/Mik1, ya que tienen la misma función. Cada complejo será representado como un agente que a su vez pertenece a una raza diferente. Por lo tanto, el modelo tiene un total de diez agentes (*Start*, SK, Cdc2 / Cdc13, Ste9, Rum1, Slp1,

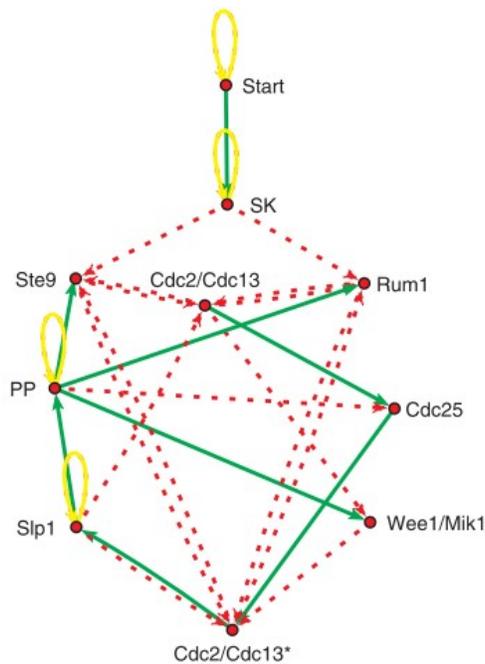


Figura 2.2: Red de interacción de las proteínas que regulan el ciclo celular. Tomada de (Davidich and Bornholdt, 2008)

Cdc2/Cdc13*, Wee1/Mik1, Cdc25 y PP) que existen dentro de la levadura.

Cada agente tiene la propiedad de ser activo (1) o inactivo (0), lo que implica que podría estar disponible para su función biológica dentro del ciclo celular; además, teniendo una característica estocástica introducida en su movimiento, lo que significa que el movimiento intercelular de los agentes se basa en una función aleatoria que elige una de las 8 orientaciones posibles (parcelas vecinas) para moverse hacia adelante en cada paso de la simulación.

Las interacciones agente-agente pueden ser de activación, inhibición o activación e inhibición. Un proceso de activación generará un cambio de 0 a 1 en la propiedad de otra proteína, mientras que un proceso de inhibición generará un cambio de 1 a 0. La autodegradación es una interacción de agente con él mismo, donde se genera un cambio de 1 a 0 en la propiedad

de la misma proteína; es importante destacar que para que una proteína genere un cambio en otra, la primera debe estar activa. En este modelo no es necesario contemplar interacciones donde participe el ambiente. En la Figura 2.2 se muestran todas las interacciones posibles. Las flechas verdes representan un proceso de activación y las flechas rojas representan un proceso de inhibición mientras que las flechas amarillas representan un proceso de autoinhibición. El objetivo del modelo es reproducir la secuencia de las fases del ciclo celular así como su duración además de que sea capaz de llegar al estado estacionario G1 (estado final del ciclo celular cuando la célula está esperando el inicio de otro ciclo).

2.3.2. Construcción del modelo basado en agentes del ciclo celular

En este paso se realizó la programación del MC2Sp usando como referencia el modelo conceptual y los componentes definidos la cual se llevará a cabo en el software NetLogo versión 6.1 (Wilensky, 1999). Primero, se hizo un entorno de *setup* para definir los agentes y sus características haciendo uso de la función *set*, que permite definir los valores de las propiedades de los agentes. Las interacciones se llevan a cabo cuando dos proteínas que están conectadas en la red se encuentran en el mismo espacio físico (por ejemplo, SK con Rum1, PP con Ste9). En éste caso se hizo uso de la función *let* para crear una variable local llamada *react* que representa la proteína que está siendo afectada.

2.3.3. Análisis del modelo basado en agentes del ciclo celular

Los modelos con propiedades estocásticas deben simularse en varias ocasiones, con la finalidad de eliminar la variabilidad inherente, para identificar adecuadamente su comportamiento. Si un modelo se ejecuta sólo una vez, será difícil determinar si los resultados de

esa ejecución indican un comportamiento normal o un caso atípico. Los estados iniciales para las proteínas fueron *Start* (1), SK (0), Cdc2 / Cdc13 (0), Ste9 (1), Rum1 (1), Slp (0), Cdc2/Cdc13* (0), Wee1/Mik1 (1), Cdc25 (0) y PP (0). Estos estados iniciales son los estados de las proteínas en la célula antes de que comience el ciclo celular, lo que significa que la célula tiene los requisitos necesarios para comenzar el ciclo en espera de la activación de SK por “Start”. Para medir las duraciones de fase, se realizaron 100 simulaciones de ejecución con los estados iniciales mencionados anteriormente. Se medirá el tiempo en cada ejecución y calculará el promedio de todas las ejecuciones, para calcular los porcentajes de duración de cada fase para comparar los resultados del MC2Sp con los datos encontrados por Sveiczer *et al.* (Sveiczer *et al.*, 2000) y Novak *et al.* (Novak *et al.*, 2001), referencias que sirvieron de base para la realización de la red de interacciones usada como modelo conceptual para el MC2Sp. De igual manera se compararán con los resultados obtenidos por Novak *et al.* (Novak and Tyson, 1995) y Anbumathi *et al.* (Anbumathi *et al.*, 2011).

Para comprender el comportamiento del MC2Sp, se realizaron tres conjuntos de experimentos similares descritos en Davidich *et al.* (Davidich and Bornholdt, 2008). Los experimentos se establecieron y ejecutaron utilizando la herramienta *Behavior Space* de NetLogo. Para el primer experimento, los estados iniciales se establecieron como se mencionó anteriormente. Para descartar un comportamiento anómalo se realizaron 100 corridas para analizar los estados de las proteínas durante la simulación del ciclo celular hasta alcanzar la fase estacionaria G1. En esta fase, Ste9, Rum y Wee1/Mik1 deben tener un valor de actividad de 1, mientras que las otras proteínas tienen un valor de actividad de 0.

El segundo experimento se realizó ejecutando el modelo de las $2^{10} = 1024$ combinaciones, que son los estados iniciales posibles de las proteínas. El objetivo era verificar si se alcanzaron los diferentes estados estacionarios (donde se detiene el modelo) y calcular el porcentaje

de casos en que se alcanzó el estado estacionario G1. Esto permitió determinar si la célula se estaba encaminando hacia el resultado biológico esperado. Finalmente, se realizaron 512 ejecuciones más en las configuraciones iniciales donde “Start” está activo. El propósito de este experimento es calcular el porcentaje de casos en el que el ciclo terminó en el estado estacionario G1 para analizar cómo se comporta el modelo cuando la célula comienza el ciclo en momentos diferentes al estado inicial normal.

2.4. Modelo basado en agentes de la ruta de la fermentación maloláctica

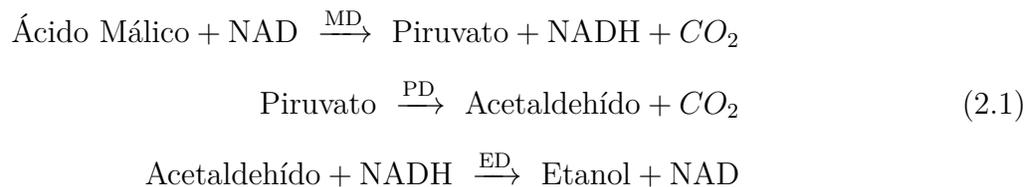
Aunque este modelo es más pequeño en comparación con el del ciclo celular, tienen que tomarse en cuenta todas las consideraciones de diseño de MBA para intentar que el modelo represente de mejor manera posible el fenómeno real.

2.4.1. Diseño del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica

El MBA de la ruta de fermentación maloláctica de *S. pombe* (MFmSp) se diseñó en forma de modelo explicativo, donde se definieron los agentes del modelo junto con sus características para después analizar los comportamientos que pudieran surgir y decidir si el modelo tuvo la capacidad de reproducir el fenómeno de manera correcta. Aún así, se siguió el enfoque *top-down* procurando definir la totalidad de los componentes del modelo para finalizar con su programación.

La ruta metabólica modelada la ruta metabólica de la fermentación maloláctica de *Schizosaccharomyces pombe*, en esta ruta existen tres tipos de componentes: los metabolitos, conformados por ácido málico, piruvato, acetaldehído y etanol; las enzimas, que son ácido málico descarboxilasa (MD), piruvato descarboxilasa (PD) y etanol deshidrogenasa (ED); además, de las moléculas como dióxido de carbono (CO_2) y NAD. De forma adicional, se utilizó como base la información de Maconi *et al.* (Maconi *et al.*, 1984) para entender de la manera más completa los mecanismo e interacciones que forman parte de la ruta metabólica, y ser una referencia más para comprobar si la simulación del MFmSp tiene un comportamiento similar al fenómeno biológico real.

Un agente representa un mol de materia, los agentes que representan los metabolitos cuentan con una variable que contiene su masa molecular, para hacer posible el cálculo de la cantidad en masa, de cada metabolito de interés que hay al final de la simulación. La NAD tiene incluida una propiedad que define si éste se encuentra hidrogenizado o no. Los agentes tienen un movimiento estocástico dentro del ambiente que representa la célula. Las interacciones se llevan a cabo cuando dos o más agentes con capacidad de reaccionar se encuentran en el mismo espacio llevando a cabo una reacción, aquí sucede un proceso de muerte de un agente y creación de otro el cual es el producto de esa reacción. En la Ecuación 2.1 se muestran las reacciones balanceadas que forman parte de la ruta de la fermentación maloláctica de la levadura y que son las que se llevan a cabo durante la simulación.



2.4.2. Construcción del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica

La construcción del MFmSp es similar a la del MC2Sp, haciendo uso de la función *let* para crear una variable local llamada *react* que represente la proteínas que está siendo afectada, sólo que en este caso existen situaciones donde la reacción se lleva a cabo entre tres agentes y no entre dos. Este proceso representa la reacción enzimática que ocurre cuando una enzima y su coenzima (en caso de ser necesaria) reaccionan con un metabolito para transformarlo en otro.

2.4.3. Análisis del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica

Al ejecutar el modelo, las cantidades de los metabolitos cambian con el tiempo debido a que son degradados o sintetizados, por lo que es pertinente un análisis de su variación respecto al tiempo. Para esto se hicieron gráficas para ácido málico, piruvato, acetaldehído y etanol, en las que se muestra su variación en masa respecto al transcurso de tiempo del modelo. También es importante conocer qué es lo que sucede cuando una de las enzimas del modelo no existe, ya que es necesario conocer el comportamiento del modelo en distintas configuraciones para poder entenderlo y determinar si representa de manera correcta el fenómeno biológico.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Resultados del modelo basado en agentes del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*

A continuación se muestran los resultados obtenidos de construir el MC2Sp, después de haber realizado los distintos experimentos para simular el ciclo celular de la célula de la levadura. Los resultados de las corridas fueron generados por el *Behavior Space*, en el que se encuentran los estados de las proteínas durante el transcurso del ciclo celular, además de los tiempos obtenidos en cada una de las fases. En el caso del análisis de los comportamientos, se contaron la cantidad de veces que se repiten los estados estacionarios dentro de las 2014 corridas, además de las veces que se obtiene el estado estacionario G1 en todos los casos en los que es relevante. Estos resultados permitirán entender cómo es la representación del ciclo celular en un entorno de simulación *in silico*, y de cómo es posible interpretar los resultados de éstas simulaciones para poder determinar que efectivamente representan el fenómeno biológico real.

3.1.1. Modelo en NetLogo del ciclo celular

En la Figura 3.1 se muestra el mundo, que es el ambiente en el que se lleva a cabo la simulación, conteniendo las proteínas reguladoras que forman parte de la red de interacciones del ciclo celular. Aquí es donde las proteínas llevan a cabo su movimiento estocástico durante la simulación, y es el espacio en donde éstas deben juntarse para llevar a cabo sus procesos de activación e desactivación. Cada uno de los agentes tiene como etiqueta el nombre de la proteína que está representando. Del lado izquierdo se encuentran tres botones; uno para inicializar el modelo, creando todos los agentes que participan y definiendo sus propiedades y valores de éstas; los otros dos son para ejecutar el modelo, uno de forma cíclica y otro para ejecutar un paso de tiempo individual.

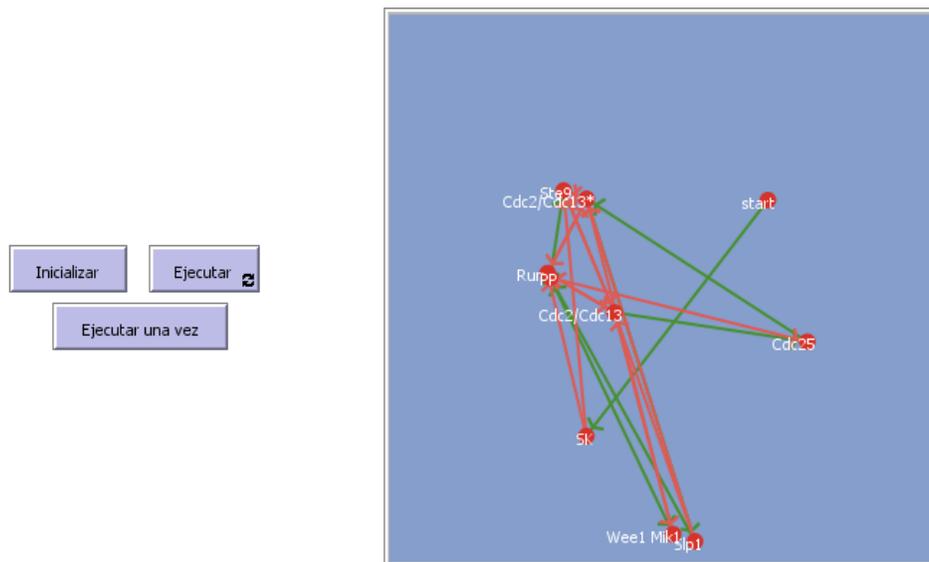


Figura 3.1: Mundo de la interfaz del modelo del ciclo celular

Para que una proteína ejecute un cambio en otra, éstas deben estar en el mismo espacio en el mundo donde la proteína que genera el cambio debe tener un valor de actividad de 1, cuando esto sucede, la proteína que está siendo afectada es asignada a una variable local,

mientras está en esa variable es posible realizar cambios en sus propiedades (generando el cambio en actividad) de acuerdo a las reglas determinadas en la red de interacciones.

En la Figura 3.2 se muestran los controles para definir el valor inicial de actividad de cada proteína, en este caso se muestra la configuración la cual representa las condiciones biológicas al momento de iniciar el ciclo, además, contiene botones de activación y desactivación de proteínas para modificar sus valores en tiempo real durante la simulación.

start-actividad 1	SK-actividad 0	Cdc2/Cdc13-actividad 0	Ste9-actividad 1	Rum1-actividad 1
Slp1-actividad 0	Cdc2/Cdc13*-actividad 0	Wee1/Mik1-actividad 1	Cdc25-actividad 0	PP-actividad 0
activar start	activar SK	activar Cdc2/Cdc13	activar Ste9	activar Rum1
inhibir start	inhibir SK	inhibir Cdc2/Cdc13	inhibir Ste9	inhibir Rum1
activar Slp1	activar Cdc2/Cdc13*	activar Wee1/Mik1	activar Cdc25	activar PP
inhibir Slp1	inhibir Cdc2/Cdc13*	inhibir Wee1/Mik1	inhibir Cdc25	inhibir PP

Figura 3.2: Entradas de la interfaz del modelo del ciclo celular

Por último, en la Figura 3.3 se muestran los monitores incluidos en la interfaz; uno que contiene la fase del ciclo en la que se encuentra el modelo; y otros que muestran el tiempo de las cuatro fases, además del porcentaje de duración respecto al tiempo total. Debajo de los monitores con el porcentaje de duración se encuentra el valor de la propiedad de actividad para cada una de las proteínas. En la Figura 3.3, el MC2Sp alcanzó el estado estacionario G1, obteniendo un porcentaje de 10 % para G1, 8 % para S, 70 % para G2 y 12 % para M.

Para evitar problemas posteriores a la construcción del modelo es necesario realizar

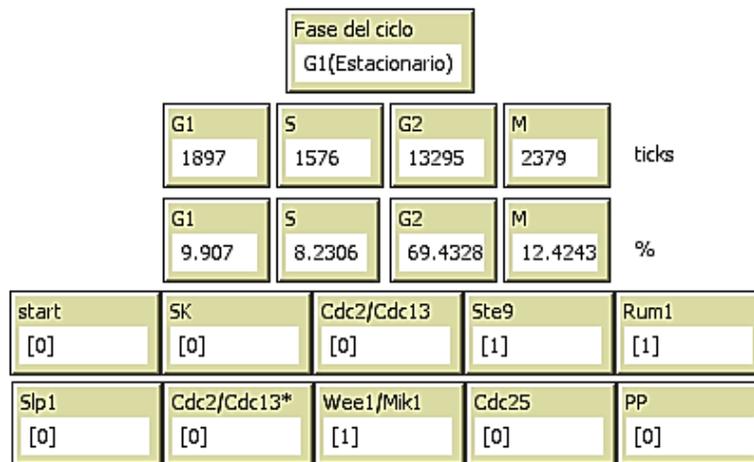


Figura 3.3: Monitores de la interfaz del modelo del ciclo celular

la verificación de éste, donde se debe asegurar que todas las partes implementadas en la programación del modelo se ejecuten de la forma en que se plasmó en el modelo conceptual. Durante la construcción se fue programando cada proceso de interacción de forma individual para asegurar que ocurría de la manera que se definió. Después de programar todas las partes individuales, éstas se juntaron para identificar fallos que pudieran existir al momento de ejecutar todos los procesos de interacción en un solo modelo. Al ejecutar el modelo final no se encontraron errores atribuidos a la extrapolación del modelo conceptual al entorno de programación de NetLogo.

3.1.2. Tiempos de las fases del modelo del ciclo celular

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de tiempo en ticks (iteraciones del código durante la simulación) obtenidos por el modelo así como el porcentaje de duración de cada fase respecto al tiempo total de duración del ciclo celular, que se calculó para poder comparar los resultados con los de otros modelos, que corresponde al promedio de 100 simulaciones bajo

las mismas condiciones para el valor de actividad inicial de las proteínas; los cuales son *Start* (1), *SK* (0), *Cdc2 / Cdc13* (0), *Ste9* (1), *Rum1* (1), *Slp* (0), *Cdc2/Cdc13** (0), *Wee1/Mik1* (1), *Cdc25* (0) y *PP* (0). Además, se muestran los resultados obtenidos en los modelos de (Novak and Tyson, 1995), (Sveiczer et al., 2000), (Novak et al., 2001) y (Anbumathi et al., 2011) en forma de porcentaje o tiempo en caso de estar disponible. Se puede observar que aunque existen diferencias en los resultados arrojados por los modelos, éstos tienen un comportamiento similar, pudiendo capturar la esencia de la predominancia de la duración de la fase G2 sobre las demás fases del ciclo celular de *S. pombe*, como se menciona en (Novak et al., 1998).

Tabla 3.1: Resultados de tiempos y porcentajes de duración de las fases del ciclo celular de diferentes modelos.

Modelo \ Fase	G1	S	G2	M
(Novak and Tyson, 1995)	NE 14 %	NE 10 %	NE 68 %	NE 8 %
(Sveiczer et al., 2000)	38 min 25 %	17 min 11 %	78 min 52 %	17 min 11 %
(Novak et al., 2001)	19 min 13 %	12 min 8 %	113 min 75 %	6 min 4 %
(Anbumathi et al., 2011)	30 min 20 %	15 min 10 %	85 min 57 %	20 min 13 %
MC2Sp (2018)	6264 ticks 26 %	1833 ticks 8 %	11239 ticks 46 %	4944 20 %

^{NE} No especificado.

En la Figura 3.4 se muestra una gráfica en la que se incluyen las barras de error obtenidas al comparar cada fase del ciclo entre los modelos mencionados anteriormente. Al comparar el MC2Sp con el modelo de (Anbumathi et al., 2011) se puede observar que no hay diferencia significativa entre sus fases G1 y G2, similitud que se mantiene al comparar los resultados con los obtenidos por Sveiczer *et al.* (Sveiczer et al., 2000). De forma contraria, existen diferencias

directas entre los resultados del MC2Sp y los publicados por Novak *et al.* (Novak and Tyson, 1995; Novak *et al.*, 2001). A pesar de las diferencias que existen entre las simulaciones de los modelos, estos tienen un comportamiento general muy similar al que sucede de forma biológica en las células de la levadura.

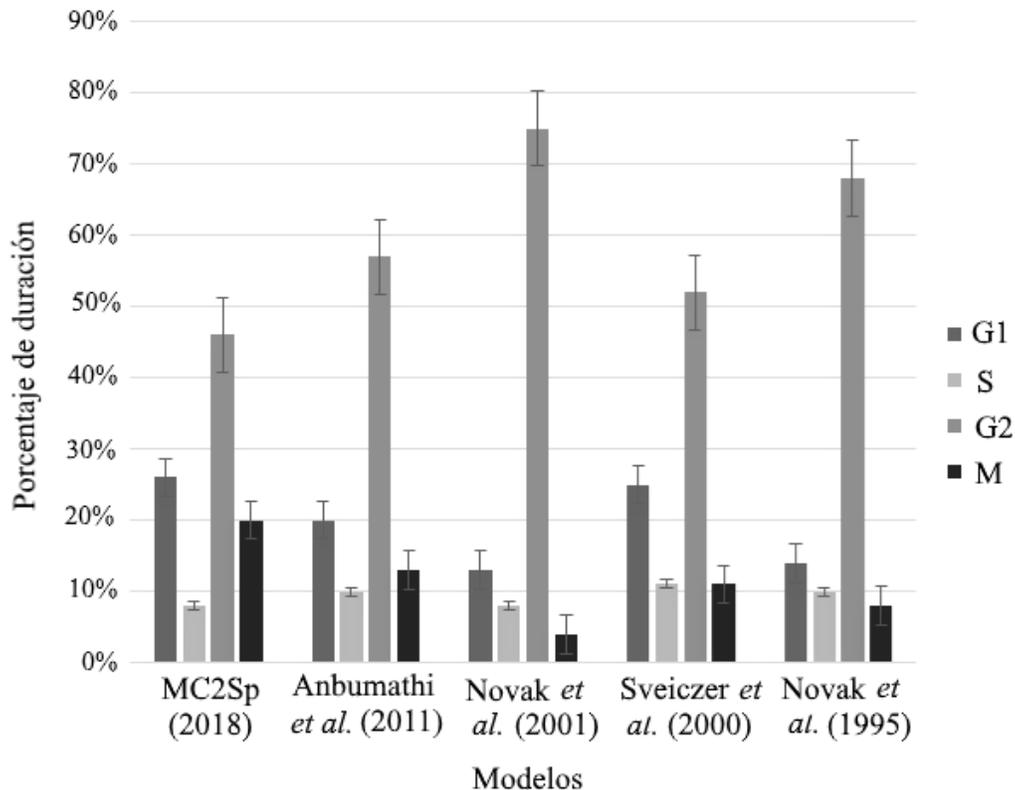


Figura 3.4: Porcentaje de duración de las fases del ciclo celular

Es importante destacar que los tiempos obtenidos por los modelos son resultado de un modelo matemático que es determinístico, por lo que sus resultados siempre son los mismos cuando las entradas son las mismas, debido a que al hacer uso de EDO no existe una forma de contemplar ningún tipo de aleatoriedad o azar. A diferencia del MC2Sp el cual tiene introducida una propiedad de estocasticidad que dota al modelo de un comportamiento

aleatorio el cual puede generar resultados diferentes aún cuando las entradas del sistema se mantengan sin cambios. Por lo que al tener desviaciones estándar de 14 % para G1, 8 % para S, 17 % para G2 y 14 % para M, hay ocasiones en las que el modelo obtiene resultados similares a los otros cuatro modelos. Aun así, su comportamiento característico está determinado por el promedio obtenido de las 100 simulaciones, el cual sigue teniendo un valor de G2 mayor a las otras fases.

3.1.3. Comportamiento del modelo basado en agentes del ciclo celular

Otra parte importante del análisis del MC2Sp es confirmar que éste tenga un comportamiento similar al que sucede de manera natural. En la Tabla 3.2 se muestra la secuencia general de los estados de la propiedad de actividad de las proteínas durante la progresión del ciclo celular, la cual sucede de la misma manera que en las simulaciones obtenidas por Davidich *et al.* (Davidich and Bornholdt, 2008), ambas representando fielmente el fenómeno biológico de *S. pombe* terminando el ciclo en el estado estacionario G1. Es importante destacar que ésta secuencia no ocurrió en la totalidad de las simulaciones pero si en el 94 % de los casos, lo que significa que la célula llegó al estado estacionario G1 la mayoría de las veces que se hizo la simulación. Este porcentaje permite comprobar una característica muy importante del MC2Sp, la capacidad que tiene la célula para llegar al estado final deseado aun con la existencia de una propiedad estocástica que evita que el modelo tenga un comportamiento determinístico.

Esta secuencia es resultado propio de las simulaciones del modelo, debido a que en la red de interacciones de las proteínas reguladoras que sirvió como modelo conceptual, sólo se atribuyen relaciones que pueden existir entre los agentes pero de ninguna manera se

Tabla 3.2: Secuencia de los estados de las proteínas obtenidos con el MC2Sp

Start	SK	Cdc2/ Cdc13	Ste9	Rum1	Slp1	Cdc2/ Cdc13*	Wee1/ Mik1	Cdc25	PP	Fase
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	Inicio
0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	G1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	S
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	G2
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	G2
0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	G2
0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	G2
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	M
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	M
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	G1

delimita un orden en el que éstas interacciones deben ocurrir. Por lo que, la secuencia del ciclo celular es una comportamiento emergente del modelo, que está relacionado con el fenómeno biológico real. Y que además, confirma la robustez de la red y la capacidad de la célula para llegar al resultado deseado a causa de que solo existen las interacciones que pueden ocurrir en ella.

Aunque ya se mencionó que en la mayoría de los casos la célula fue capaz de llegar al estado estacionario G1, hay ocasiones en las que las interacciones de las proteínas no suceden en la secuencia adecuada y hacen que la célula llegue a resultados donde no se ha podido completar el ciclo celular, haciendo que la ésta eventualmente muera. Estas situaciones se conocen como estados estacionarios donde ya no existen interacciones que puedan ocurrir, y que son ocasionadas por retrasos en interacciones o interacciones que no deberían suceder antes que otras causadas por las propiedades estocásticas del modelo y por la propia naturaleza de la red.

En la Tabla 3.3 se muestran los 14 diferentes estados estacionarios obtenidos por el MC2Sp al hacer las 1024 corridas de las posibles configuraciones de inicio. Hubo un estado

estacionario que predominó el 87% de los casos, el cual resultó ser el estado estacionario G1 (Tabla 3.2). De esta manera, este estado estacionario es el atractor dominante de la dinámica estocástica de la red de interacciones, lo que significa que la célula llegará a este resultado aun cuando existan perturbaciones en el sistema que puedan afectar a una o más proteínas (generando cambios en su actividad,) de la misma manera que una célula biológica es capaz de completar un ciclo a pesar de perturbaciones en el sistema.

Tabla 3.3: Estados estacionarios obtenidos en el MC2Sp

Start	SK	Cdc2/Cdc13 Cdc13	Ste9	Rum1	Slp1	Cdc2/Cdc13* Cdc13*	Wee1/ Mik1	Cdc25	PP	Tamaño
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	892
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	27
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	22
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	19
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	14
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	13
0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	12
0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	9
0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	9
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2
0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

Otro de los casos que se examinó, fueron las configuraciones existentes en las que *Start* se encuentra activa, representando las situaciones en las que una célula inicia un ciclo aunque las otras proteínas no estén en su estado biológico inicial. Al hacer esas 100 corridas, la célula modelada tuvo la capacidad de ir hacia el estado estacionario G1, esta vez en el 91% de los casos. Lo que significa que la probabilidad de que una célula pueda completar un ciclo sólo cumpliendo la condición de inicio es bastante alta, comprobando de nuevo la capacidad de la red para que los eventos resultantes de ésta sucedan de manera similar al fenómeno biológico.

Estos análisis permitieron entender el comportamiento completo del MC2Sp, en el que al representarse la célula en su estado biológico ideal para iniciar el ciclo, ésta pasó por las fases del ciclo de forma ordenada, además de que fue posible medir los tiempos de las fases como una característica extra del modelo. Con estas dos características se comprueba que el modelo representa en cierta medida el comportamiento de la levadura *S. pombe* durante el proceso biológico del ciclo celular. Otra parte importante, radica en la existencia de la propiedad estocástica del modelo, donde éste tuvo una variación en los posibles estados resultantes, pero que aun así la célula tuvo la capacidad de resolverse hacia el resultado biológico esperado, completando exitosamente el ciclo celular en la mayoría de los casos.

3.2. Resultados del modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica de *Schizosaccharomyces pombe*

A continuación se muestran los resultados del MFmSp, tanto su construcción en NetLogo como los resultados cuantitativos obtenidos en su simulación, midiendo la variación de los distintos metabolitos en el tiempo, haciendo énfasis en la producción final de etanol variando las condiciones iniciales de las enzimas de la ruta metabólica.

3.2.1. Modelo en NetLogo de la ruta de fermentación maloláctica

La interfaz de NetLogo del MFmSp de igual manera se diseñó siguiendo los lineamientos para el buen diseño de una interfaz en NetLogo. En la Figura 3.5 se muestran los controles para definir el valor inicial de gramos o moles según sea el caso para los agentes presentes al inicio de la simulación, ahí mismo se encuentran los botones para inicializar y ejecutar el modelo; así como una etiqueta con la descripción de qué representa cada figura dentro del modelo. A su lado se puede ver el mundo del modelo, que es el ambiente en el que se lleva a cabo la simulación, conteniendo los metabolitos, enzimas y moléculas que forman parte de la ruta metabólica.

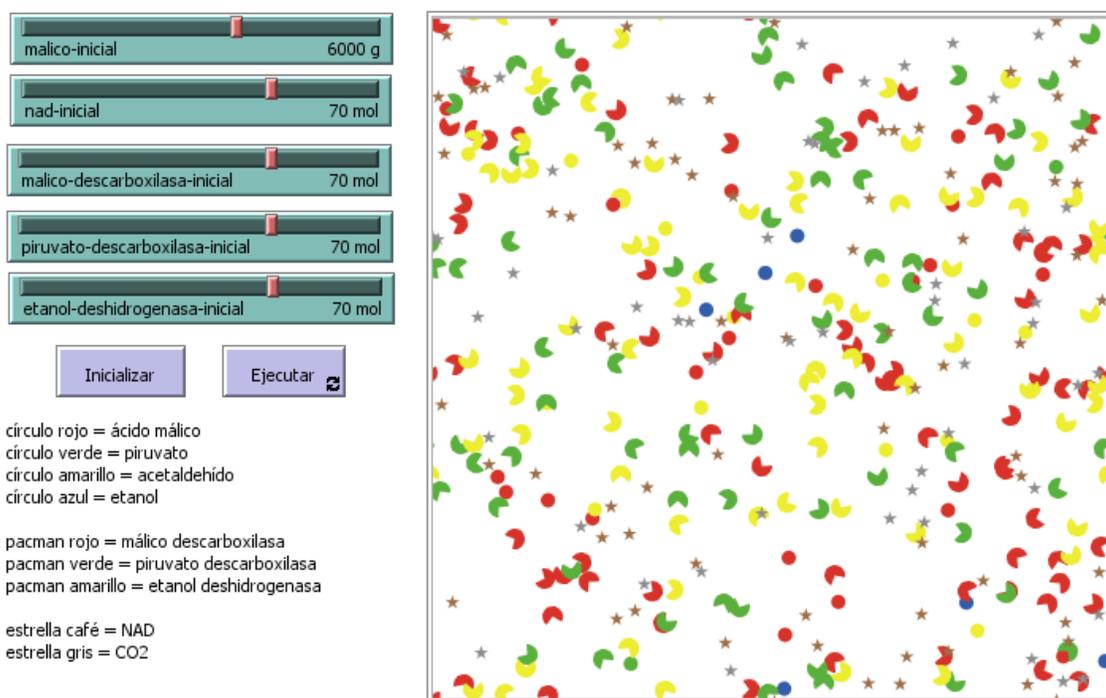


Figura 3.5: Mundo y entradas de la interfaz del modelo de la ruta de fermentación maloláctica

Por otro parte en la Figura 3.6 se pueden observar cuatro gráficas que muestran el comportamiento de ácido málico, piruvato, acetaldehído y etanol, así como unos monitores

con los valores en tiempo real de esos agentes y de CO_2 . Aquí se puede observar el consumo progresivo de ácido málico durante la fermentación para gradualmente producir etanol.

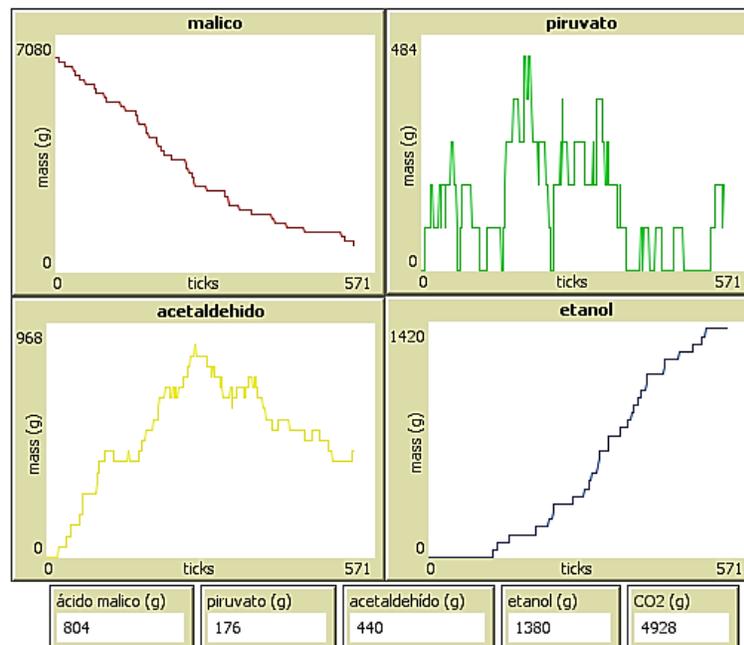


Figura 3.6: Gráficas de la interfaz del modelo de la ruta de fermentación maloláctica

El proceso en el que se llevan a cabo las reacciones del MFmSp funciona de manera similar al MC2Sp. En una reacción en la que sólo están involucrados el metabolito y la enzima cuando estos se encuentran en el mismo espacio del mundo se utilizó una función para asignar el metabolito a un variable local la cual pasa por un proceso de muerte para formar el metabolito resultante de esa reacción. De manera similar, en el caso en el que la reacción enzimática necesita la participación de la coenzima NAD, primero la enzima y la NAD se deben encontrar en el mismo espacio, y este conjunto debe encontrarse en ese momento con el metabolito, el cual tiene el mismo proceso de transformación para que se obtenga el metabolito producto de la reacción. Además, se crean otras moléculas co-

mo CO_2 en caso de que así suceda en la ruta y la NAD sufre los cambios por los que debe pasar.

Paso seguido, también se realizó la verificación del MFmSp. Durante su construcción se programaron las reacciones individuales de la ruta metabólica para asegurar que las reacciones ocurrieran como se describieron en el modelo conceptual, las cuales produjeron correctamente los productos que debían. Después de programar todas las reacciones individuales éstas se juntaron en un mismo modelo para identificar fallos que pudieran existir al momento de ejecutar todos los procesos de interacción en un solo modelo. Al ejecutar el modelo final no se encontraron errores atribuidos a la extrapolación del modelo conceptual al entorno de programación de NetLogo.

3.2.2. Metabolitos de la ruta de fermentación maloláctica

Una vez obtenido el MFmSp se realizaron diferentes simulaciones para examinar el comportamiento de la producción de etanol bajo diferentes condiciones de entrada. Para esto se corrió el modelo en condiciones donde las tres enzimas (MD, PD y ED) existen en: a) la misma proporción de moles, b) cuando PD existe en una proporción menor, c) cuando MD existe en una proporción menor y d) cuando ED existe en una proporción menor; manteniendo la misma cantidad inicial de ácido málico. El producto al que se le prestó mayor atención fue al etanol, metabolito final producido por las reacciones enzimáticas de la ruta de la fermentación maloláctica.

En la Figura 3.7 se observan los resultados del caso del inciso a) donde todas las enzimas se encuentran en la misma proporción, teniendo un valor de 70 % del máximo inicial posible, aquí se puede observar que a medida que transcurre el tiempo se va degradando gradualmente

la cantidad de ácido málico y ésta no aumenta en ningún momento debido a que no existe otra fuente que genere este metabolito en el modelo. De manera contraria, como es esperado, se puede observar que se fue generando etanol, metabolito que es el producto final de esta ruta metabólica. Sin embargo, cada uno de los dos metabolitos intermediarios de la ruta se encuentra variando alrededor de un mismo nivel, debido a que en el momento en que estos se generan y se encuentran con su enzima se transforman de piruvato y acetaldehído, a acetaldehído y etanol respectivamente.

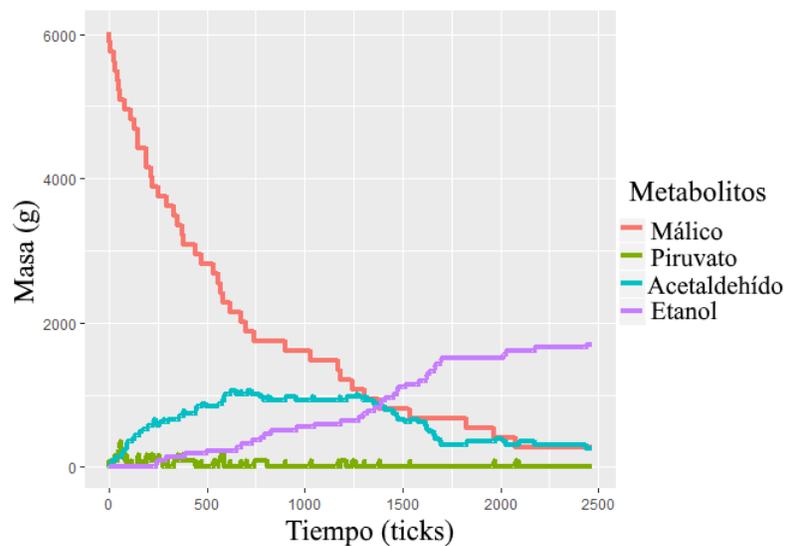


Figura 3.7: Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 70 % en PD y 70 % en ED.

De manera similar, en la Figura 3.8 la cual representa el caso del inciso c) en el que la proporción de MD es del 10 %, existe un comportamiento similar en los valores individuales de los cuatro metabolitos, pero existe una diferencia muy grande en el tiempo transcurrido para llegar a los mismos niveles de etanol, siendo esta diferencia de casi tres veces más para el caso b). La causa de esta diferencia se puede atribuir a la menor razón de conversión de ácido málico a piruvato debido a los bajos niveles que existen de MD, enzima que cataliza es-

ta reacción, ocasionando un retraso en las reacciones que le siguen en la ruta de la fermentación.

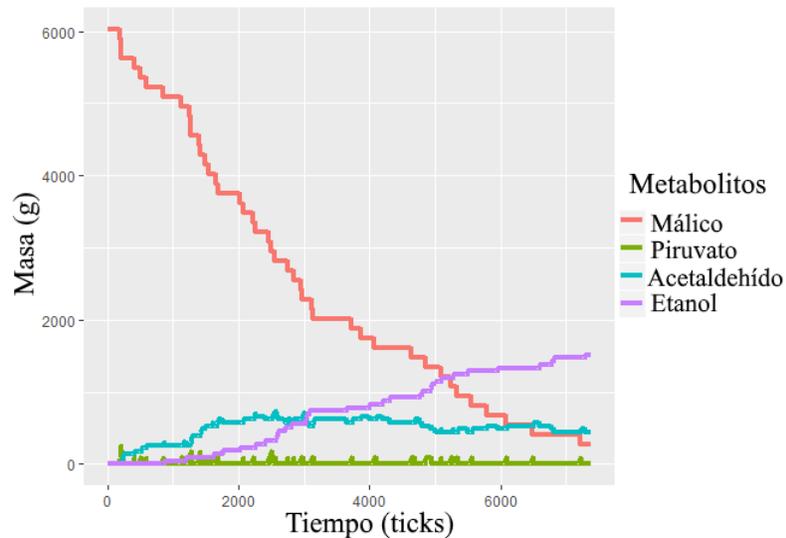


Figura 3.8: Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 10 % en MD, 70 % en PD y 70 % en ED.

El caso del inciso c) se muestra en la Figura 3.9 donde los niveles de PD son menores que los que tuvieron las otras enzimas. Ésta simulación obtuvo un tiempo muy similar para alcanzar los mismos niveles de etanol que el caso a). La diferencia más apreciable es en los niveles de los dos metabolitos intermedios piruvato y acetaldehído, los cuales tuvieron más variaciones en el tiempo; además de que los niveles de acetaldehído son menores durante toda la simulación, comportamiento que se atribuye a la menor disponibilidad de PD, enzima que se encarga de convertir el piruvato a acetaldehído. Sin embargo, al parecer este cambio en las reacciones intermedias no afectó el comportamiento del etanol, metabolito principal de la ruta.

Por último, en la Figura 3.10 se muestra el caso del inciso d) en el que el nivel de ED se inicializó con un valor mucho menor que MD y PD, en este caso se observa de

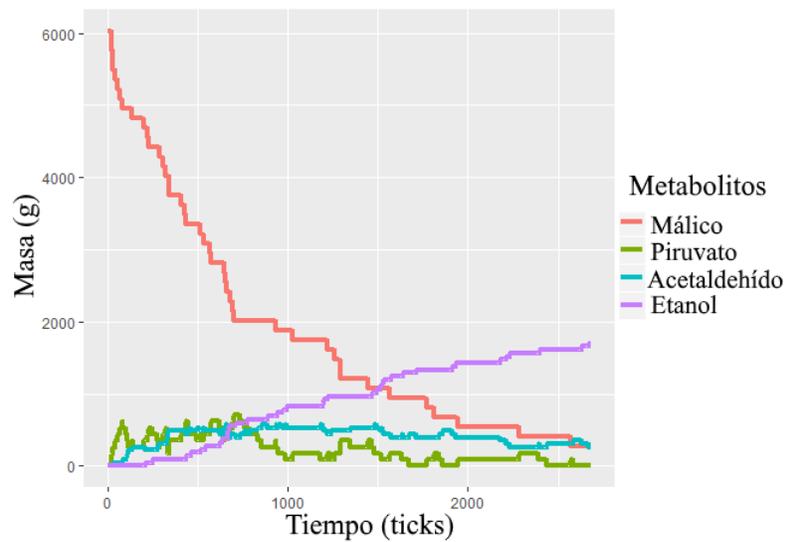


Figura 3.9: Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 10 % en PD y 70 % en ED.

nuevo un comportamiento muy similar en todos los metabolitos comparándolo con el caso a), pero de nuevo el tiempo para alcanzar los mismo niveles de etanol aumentó, incluso más que en el caso del inciso b). Este es un comportamiento general esperado debido a que la producción depende enormemente de la disponibilidad de la enzima que cataliza su reacción.

Aunque estos comportamientos iniciales pudieran no suceder de manera real, es necesario que se realicen debido a la naturaleza del diseño del modelo, que fue como modelo explicativo, y por lo tanto deben hacerse la mayor cantidad de experimentos posibles para abarcar todas las situaciones que pudieran ocurrir y así conocer los comportamientos emergentes que puedan suceder. Con estos experimentos se tiene un visión más amplia del modelo que permite afirmar que si se reproduce en cierta manera el fenómeno biológico, ya que se mantienen los dos principales comportamientos que le dan sentido a la ruta de la fermentación maloláctica, el consumo de ácido málico y la producción final de etanol.

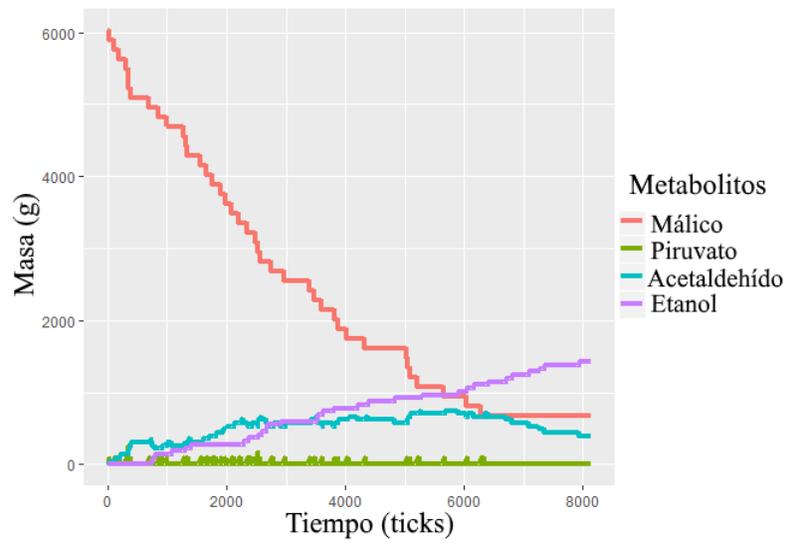


Figura 3.10: Niveles de los diferentes metabolitos con valores iniciales de 70 % en MD, 70 % en PD y 10 % en ED.

Capítulo 4

Discusiones

4.1. Modelo basado en agentes del ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*

Se realizó un modelo del ciclo celular de la levadura *S. pombe* utilizando el enfoque de modelado basado en agentes. El modelo conceptual del MC2Sp se diseñó usando la red de interacciones de las proteínas que regulan el ciclo celular de *S. pombe* la cual fue tomada de Davidich *et al.* (Davidich and Bornholdt, 2008) y que fue construida utilizando los conocimientos y modelos realizados principalmente por Sveiczer *et al.* (Sveiczer et al., 2000), Novak *et al.* (Novak et al., 2001) y Tyson *et al.* (Tyson et al., 2002). Esta red contempla las interacciones bioquímicas que ocurren entre las proteínas sin hacer uso de las ecuaciones cinéticas de estos procesos; esta característica se heredó al MC2Sp y por lo tanto tampoco fue necesario tomar en cuenta las ecuaciones o parámetros cinéticos que están involucrados en las reacciones de la red.

El proceso para transferir el conocimiento del fenómeno plasmado en el modelo concep-

tual al entorno de programación se comprobó mediante verificación de las partes programadas, las cuales fueron segmentadas en códigos cortos fáciles de analizar y comprobar que reproducían la parte del modelo que representaban. Todas las partes del modelo se programaron haciendo uso de las funciones adecuadas que mejor capturaran la naturaleza del proceso que se quería reproducir.

Al comparar los tiempos de cada una de las fases obtenidos por el MC2Sp con otros modelos basados en ecuaciones, se obtuvieron resultados prometedores. Entre todos los modelos se encontró que la fase G2 tenía una mayor proporción en su duración que las otras tres fases. Resulta interesante que esta característica, presente en todos los modelos se asemeja al comportamiento del ciclo celular de la levadura *S. pombe* de tipo silvestre. Esta similitud en el comportamiento, permite afirmar que el MC2Sp tiene la capacidad de reproducir en cierto nivel el fenómeno biológico real, además de que los tiempos obtenidos tienen un nivel de parecido con los otros modelos. Como es de esperarse, existen diferencias entre los modelos debido a la propia naturaleza de cada uno de ellos, destacando la diferencia de los modelos basados en ecuaciones los cuales se hicieron bajo un concepto determinístico haciendo uso de diferentes EDO que explican las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo durante el ciclo celular, mientras que en este trabajo de tesis se optó por un enfoque booleano con características estocásticas.

También es importante destacar la similitud entre los resultados del MC2Sp con los del modelo de Sveiczer *et al.* (Sveiczer *et al.*, 2000), y que además fue la fuente principal de información teórica y experimental que se utilizó en el modelo de redes booleanas para definir y diseñar la red de interacciones moleculares, que sirvió de base para la parte del diseño del modelo conceptual de esta tesis. Lo anterior es un indicio de que el modelo conceptual implementado se programó de manera adecuada debido a que genera resultados que reproducen el

fenómeno de referencia. Esto ayuda a comprobar la verificación y validación del MC2Sp.

Otro punto que se debe mencionar, es la similitud que existe en los resultados obtenidos en el análisis del comportamiento del modelo al realizar los mismos experimentos que se realizaron en el modelo de redes booleano. Al hacer las simulaciones en las condiciones biológicas iniciales la célula llevó a cabo su ciclo celular de manera correcta pasando por todas las fases y terminando el ciclo en el estado estacionario G1 al igual que en el modelo booleano; y aunque la programación del modelo es una parte importante del éxito de este modelo, la gran capacidad que tienen ambos modelos para reproducir el fenómeno de la secuencia del ciclo de forma correcta, se atribuye totalmente al enorme detalle en la creación de la red de interacciones bioquímicas, por lo que es apropiado destacar la importancia del proceso de creación del modelo conceptual que se usará de base para cualquier tipo de modelo.

Por otra parte, es necesario mencionar el tema de la propiedad estocástica en el MC2Sp, que aunque integra todo un proceso aleatoria en el modelo, la célula aun así tiene la capacidad para llegar al estado objetivo a pesar de la existencia de perturbaciones en los valores de actividad de las proteínas. Esto se muestra claramente en el análisis de los estados estacionarios obtenidos en el modelo, siendo que dan una visión a los diferentes patrones que se pueden seguir en la simulación; pero que aun así el estado estacionario G1 es el que predomina en la célula, tal como se espera de forma biológica.

Además al hacer las simulaciones bajo condiciones biológicas, no se obtuvo en todos los casos el estado estacionario G1, lo que permite descartar cualquier tipo de comportamiento determinístico donde siempre se obtienen los mismos resultados; como es conocido en la naturaleza, existen diferentes procesos que se ven influenciados por perturbaciones aleatorias. Esta propiedad aleatoria permite estudiar comportamientos emergentes como los estados

estacionarios sin necesidad de que sean programados de forma previa.

Una de las capacidades más notorias del MC2Sp es que puede reproducir el comportamiento biológico, tanto en la parte de los tiempos de las fases del ciclo celular, como en su secuencia, lo que le da una ventaja sobre el modelo de redes booleanas debido a que ese modelo solo tiene la capacidad de representar la secuencia del ciclo celular, pero sin poder medir los tiempos de las fases de éste, como se hace en los modelos matemáticos. Otra ventaja del MC2Sp es que no fue necesario considerar los parámetros cinéticos para los procesos moleculares, valores que son estrictamente necesarios para poder desarrollar un modelo que esté basado en EDO, los cuales no siempre son posibles de conocer debido a la complejidad de los experimentos que se deben realizar para poder medirlos. Estas son las dos ventajas principales del MC2Sp sobre otros modelos.

4.2. Modelo basado en agentes de la ruta de fermentación maloláctica *Schizosaccharomyces pombe*

Se realizó un modelo basado en agentes de la ruta de la fermentación maloláctica de *S. pombe*. El diseño del modelo se realizó haciendo uso de la ruta metabólica de este proceso como base, para definir el modelo conceptual y los componentes que formaron parte del modelo. La construcción se hizo siguiendo la misma lógica en las funciones de NetLogo que en el modelo del ciclo celular. Los resultados muestran que tanto el diseño como su programación se realizaron de manera adecuada y por lo tanto esta metodología se puede utilizar para modelar otras rutas metabólicas, siempre y cuando se desarrolle un modelo conceptual adecuado.

Esto se confirma con la verificación del modelo donde cada reacción de la ruta metabólica se programó de forma separada revisando que su funcionamiento fuera correcto de forma individual, para después integrar cada ruta modelada en un mismo modelo que represente la totalidad del modelo conceptual. Además, se presentaron resultados que permiten validar el modelo debido a su similitud entre el comportamiento simulado y las reacciones bioquímicas biológicas.

Cuando se analizó el modelo en diferentes condiciones para poder entender de forma general el comportamiento de éste, se obtuvieron resultados positivos, ya que no surgió ningún comportamiento que no pudiera ser explicado con los conocimientos existentes de cómo funcionan las reacciones catalizadas por enzimas. De esta forma, se puede decir que el MFmSp reproduce de forma adecuada el fenómeno de la fermentación maloláctica llevada a cabo por *S. pombe*.

4.3. Discusión general

Todo el proceso seguido en la metodología debe llevarse a cabo de una manera muy cuidadosa para garantizar que el MBA que se quiera realizar pueda representar el fenómeno que se desee. Todas las partes (diseño, construcción y análisis) tienen sus consideraciones que deben entenderse y resolverse de manera robusta, ya que un mal diseño puede causar que un modelo no sea representativo aún cuando la programación se haga de forma adecuada; de la misma manera que un mal análisis puede llevar a que un modelo bien implementado se descarte o que uno pobremente implementado se tome como funcional al interpretar mal los resultados obtenidos.

Una de las ventajas del MBA es la gran capacidad que tiene como técnica de modelado para estudiar una gran cantidad de fenómenos complejos sin necesidad de tener conocimientos avanzados de programación y sin necesidad de conocer EDO, sistemas de ecuaciones y otras cuestiones de modelado matemático, haciendo del MBA una técnica relativamente sencilla de implementar y disminuyendo la probabilidad de equivocaciones por el simple uso de la técnica; enfocando el conocimiento y el pensamiento científico en el entendimiento del fenómeno.

En general, el MBA representa un ahorro de recursos económicos y de tiempo, al igual que otras técnicas de modelado computacional. Al cambiar los experimentos *in vivo*, que necesitan del uso de insumos, organismos y tiempo en el laboratorio, por otros experimentos *in silico*. Sin embargo, estos modelos no pretenden reemplazar los experimentos realizados en laboratorio sino servir como una herramienta guía para disminuir el número de experimentos que se deban realizar.

Capítulo 5

Conclusiones y trabajo futuro

5.1. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un modelo basado en agentes del ciclo celular de la levadura *S. pombe*. Este modelo tuvo la capacidad de representar el fenómeno biológico al tener la capacidad de reproducir la secuencia de las fases del ciclo celular además del tiempo que cada fase dura en el ciclo. El modelo se verificó analizando paso a paso la programación del modelo conceptual y se validó comparando los resultados con otros modelos publicados anteriormente.

Para lograr los objetivos se siguió la metodología descrita en el Capítulo 2, empezando por el diseño del modelo conceptual para después programarlo y analizarlo. De esta manera se comprueba la hipótesis de que el modelado basado en agentes es una herramienta apropiada para estudiar el ciclo celular de la levadura *S. pombe* y probablemente, otros fenómenos biológicos basados en interacciones bioquímicas entre proteínas.

Por otra parte, también se realizó un modelo basado en agentes de la ruta de la fermentación maloláctica de *S. pombe*. De igual manera este modelo pudo reproducir el fenómeno

biológico al modelar las reacciones enzimáticas presentes en esta ruta. La verificación y validación también fue necesaria. La verificación se llevó a cabo de la misma manera que el modelo del ciclo celular, mientras que la validación se hizo analizando los resultados y comprobando con los conocimientos generales de reacciones enzimáticas.

En ambos casos existe la ausencia de parámetros cinéticos introducidos en los modelos, por lo que existe una ventaja sobre el uso de esta metodología contra técnicas de modelado matemático que usan EDO ya que las ecuaciones deben incluir estos valores cinéticos para poder representar el fenómeno biológico. De la misma manera estos modelos muestran una ventaja sobre el uso de experimentos en el laboratorio debido a que no es necesario hacer uso de materiales que cuestan dinero, necesitan de conocimiento técnico específico y generan residuos.

5.2. Trabajo a futuro

Una vez comprobada la capacidad del modelo para reproducir el ciclo celular, es necesario pensar las aplicaciones en las que puede ser utilizado, ya sea en su forma original o usándolo como base para otros procesos más complejos al hacerle modificaciones apropiadas para el problema que se quiera resolver. Una de las proyecciones es en el tema del uso de levaduras para desarrollar tratamientos específicos para distintos tipos de cáncer. Para poder realizar esto se tiene la opción de agregar un agente o agentes que tengan un comportamiento específico y que actúen sobre una de las proteínas, de forma que el modelo tenga un comportamiento final diferente. Como se mencionó anteriormente una de las formas de actuar sobre una célula cancerosa es entender su funcionamiento y analizar cual es la mejor forma para que un fármaco actúe y mate a la célula. De esta forma, un agente externo que tenga efecto sobre una proteína

de la red puede hacer que la célula no llegue al estado estacionario G1 haciendo que otro estado estacionario predomine, evitando que la célula se siga reproduciendo.

En cuanto al modelo de la fermentación, de la misma manera que se modelaron las reacciones individuales, se puede escalar de forma que se modelen otras rutas metabólicas que son de importancia en la fermentación de *S. pombe* para después ser integradas todas en un modelo más completo. Las rutas que se pueden tomar en cuenta son aquellas en las que se sintetizan otros metabolitos que son importantes en la fermentación de vinos, como ácido acético, ureasa, glicerol, etc. Debido al éxito obtenido al modelar la ruta metabólica, se puede utilizar la misma metodología para modelar las otras rutas metabólicas.

Otro enfoque que se puede realizar sobre los modelos es cambiar la abstracción en la que los agentes están definidos, cambiando el enfoque intracelular donde los agentes son moléculas, a otros concepciones donde las entidades principales sean las células de la levadura que lleven a cabo los fenómenos descritos en el modelo, ya sea con células que lleven a cabo el ciclo celular, se dividan y hereden esa capacidad a las células hijas. O células que lleven a cabo la fermentación completa, una vez que se han tomado en cuenta todas las rutas que participan, para estudiar la fermentación incluso a escalas industriales.

Por último, sería interesante la aplicación de la metodología aplicada en esta tesis para modelar otros procesos celulares que involucren interacciones entre proteínas de la levadura *S. pombe* u otros organismos. Generalizando el uso de MBA y otras técnicas computacionales en el estudio de los sistemas biológicos.

Bibliografía

- P. Anbumathi, S. Bhartiya, and K. V. Venkatesh. Mathematical modeling of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle: Exploring the role of multiple phosphatases. *Systems and Synthetic Biology*, 5(3-4):115–129, 2011. ISSN 18725325. doi: 10.1007/s11693-011-9090-7.
- A. L. Bauer, C. A. A. Beauchemin, and A. S. Perelson. Agent-based modeling of host-pathogen systems: The successes and challenges. *Information Sciences*, 179(10):1379–1389, 2009. ISSN 00200255. doi: 10.1016/j.ins.2008.11.012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ins.2008.11.012>.
- E. S. Bayrak, T. Wang, M. Jerums, M. Coufal, C. Goudar, A. Cinar, and C. Undey. In Silico Cell Cycle Predictor for Mammalian Cell Culture Bioreactor Using Agent-Based Modeling Approach. *IFAC-PapersOnLine*, 49(7):200–205, 2016. ISSN 24058963. doi: 10.1016/j.ifacol.2016.07.249. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405896316304566>.
- Á. Benito, F. Calderón, F. Palomero, S. Benito, S. Ebeler, and H. Hopfer. Combine Use of Selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. *Molecules*, 20(October 2016):9510–9523, 2015. ISSN 1420-3049. doi: 10.3390/molecules20069510. URL www.mdpi.com/journal/molecules.
- Á. Benito, F. Calderón, and S. Benito. New Trends in *Schizosaccharomyces* Use for Winemaking. *Grape and Wine Biotechnology*, (November), 2016. doi: 10.5772/64807. URL <http://www.intechopen.com/books/grape-and-wine-biotechnology/new-trends-in-schizosaccharomyces-use-for-winemaking>.
- S. Benito, F. Palomero, A. Morata, F. Calderón, and J. A. Suárez-Lepe. New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10):2101–2108, 2012. ISSN 09505423. doi: DOI10.1111/j.1365-2621.2012.03076.x. URL <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84866156770&partnerID=40&md5=2cbf0462fab510785bd651774ef74855%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2621.2012.03076.x/asset/j.1365-2621.2012.03076.x.pdf?v=1&t=hrvpd3j3&s=a9c7962f9e09661b4>.
- S. Benito, F. Palomero, F. Calderón, D. Palmero, and J. A. Suárez-Lepe. Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiology*, 42:218–224, 2014a. ISSN 10959998. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.014>.

- S. Benito, F. Palomero, L. Gálvez, A. Morata, F. Calderón, D. Palmero, and J. A. Suárez-Lepe. Quality and composition of red wine fermented with *Schizosaccharomyces pombe* as sole fermentative yeast, and in mixed and sequential fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 52(3):376–382, 2014b. ISSN 13342606.
- E. Bonabeau. Agent-based modeling: methods and techniques for simulating human systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(suppl. 3):7280–7287, 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.082080899. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011407>.
- A. Chasapi, P. Wachowicz, A. Niknejad, P. Collin, A. Krapp, E. Cano, V. Simanis, and I. Xenarios. An extended, boolean model of the septation initiation network in *S. pombe* provides insights into its regulation. *PLoS ONE*, 10(8):1–22, 2015. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0134214.
- A. Csikász-Nagy. Computational systems biology of the cell cycle. *Briefings in Bioinformatics*, 10(4):424–434, 2009. ISSN 14675463. doi: 10.1093/bib/bbp005.
- A. Csikász-Nagy, O. Kapuy, B. Giorffy, J. J. Tyson, and B. Novák. Modeling the septation initiation network (SIN) in fission yeast cells. *Current Genetics*, pages 245–255, 2007. doi: 10.1007/s00294-007-0123-4.
- M. I. Davidich and S. Bornholdt. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PLoS ONE*, 3(2), 2008. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0001672.
- R. Egel. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces Pombe*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. ISBN 978-3-662-10360-9. doi: 10.1007/978-3-662-10360-9. URL <http://www.springer.com/us/book/9783540006930>.
- P. A. Fantes and C. S. Hoffman. A Brief History of *Schizosaccharomyces pombe* Research: A Perspective Over the Past 70 Years. *Genetics*, 203(2):621–629, 2016. ISSN 0016-6731. doi: 10.1534/genetics.116.189407. URL <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.116.189407>.
- N. Gilbert and K. G. Troitzsch. *Simulation for the Social Scientist*. 1999. ISBN 0335216005. URL <http://cress.soc.surrey.ac.uk/s4ss/>.
- L. H. Hartwell. Yeast and cancer. *Bioscience Reports*, 24(4-5):525–544, 2005. ISSN 01448463. doi: 10.1007/s10540-005-2743-6.
- C. S. Hoffman, V. Wood, and P. A. Fantes. An Ancient Yeast for Young Geneticists : A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, 201(October):403–423, 2015. doi: 10.1534/genetics.115.181503.
- J. I. Husnik, H. Volschenk, J. Bauer, D. Colavizza, Z. Luo, and J. J. Vuuren. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*, 8(4):315–323, 2006. ISSN 10967176. doi: 10.1016/j.ymben.2006.02.003.
- H. R. Khataee, T. N. M. Aris, and M. N. Sulaiman. An agent-based model of muscle contraction process as a bio-robotic process. *2011 5th Malaysian Conference in Software Engineering, MySEC 2011*, pages 55–60, 2011. doi: 10.1109/MySEC.2011.6140643.

- B. Li, B. Shao, C. Yu, Q. Ouyang, and H. Wang. A mathematical model for cell size control in fission yeast. *Journal of Theoretical Biology*, 264(3):771–781, 2010. ISSN 00225193. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.03.023. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.03.023>.
- I. Loira, A. Morata, P. Comuzzo, M. J. Callejo, C. González, F. Calderón, and J. A. Suárez-Lepe. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76:325–333, 2015. ISSN 09639969. doi: 10.1016/j.foodres.2015.06.030. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>.
- J. Lygeros, K. Koutroumpas, S. Dimopoulos, I. Legouras, P. Kouretas, C. Heichinger, P. Nurse, and Z. Lygerou. Stochastic hybrid modeling of DNA replication across a complete genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34):12295–300, 2008. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.0805549105. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2527905&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- E. Maconi, P. L. Manachini, F. Aragozzini, C. Gennari, and G. S. Ricca. A study of the maloalcoholic fermentation pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical Journal*, 217:585–588, 1984. ISSN 0264-6021.
- E. Manzanarez-Ozuna, D. L. Flores, C. M. Gómez-Gutiérrez, A. Abaroa, C. Castro, and R. A. Castañeda-Martínez. Modelo basado en agentes de la vía MAPK con NetLogo. *Memorias del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica*, (October):5–10, 2015. doi: 10.13140/RG.2.1.4179.6244.
- A. E. Mylona, M. Del Fresno, F. Palomero, I. Loira, M. A. Bañuelos, A. Morata, F. Calderón, S. Benito, and J. A. Suárez-Lepe. Use of *Schizosaccharomyces* strains for Wine Fermentation—Effect on the Wine Composition and Food Safety –. *International Journal of Food Microbiology*, 232:63–72, 2016. ISSN 01681605. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023>.
- J. L. Nitiss and J. Heitman. *Yeast as tool in cancer research*. Springer Netherlands, 2007. ISBN 978-1-4020-5963-6. doi: 10.1007/978-1-4020-5963-6. URL <https://www.springer.com/us/book/9781402059629>.
- B. Novak and J. J. Tyson. Quantitative analysis of a molecular model of mitotic control in fission yeast. *Journal of Theoretical Biology*, 173(3):283–305, 1995. ISSN 10958541. doi: 10.1006/jtbi.1995.0063.
- B. Novak and J. J. Tyson. Modeling the control of DNA replication in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(August):9147–9152, 1997. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.94.17.9147.
- B. Novak, A. Csikasz-Nagy, B. Gyorffy, K. Chen, and J. J. Tyson. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1 / S , G2 / M and metaphase / anaphase transitions. *Biophysical Chemistry*, 72:185–200, 1998.
- B. Novak, Z. Pataki, A. Ciliberto, and J. J. Tyson. Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos*, 11(1):277–286, 2001. ISSN 10541500. doi: 10.1063/1.1345725.

- P. Nurse. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (Nobel lecture). *ChemBioChem*, 3(7):596–603, 2002. ISSN 14394227. doi: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<596::AID-CBIC596>3.0.CO;2-U.
- B. Rajendran. *3D Agent Based Model of Cell Growth*. PhD thesis, 2008.
- L. Sánchez Zepeda and A. Mungaray Lagarda. Vino de calidad : Base de desarrollo endógeno en el Valle de Guadalupe , Baja California Quality Wine : A Basis of Endogenous Development in the Guadalupe Valley region of Baja California. *Frontera Norte*, 22(44):109–132, 2010. URL <http://www.colef.mx/fronteranorte/articulos/FN44/4-f44.pdf>.
- R. Steuer. Effects of stochasticity in models of the cell cycle: From quantized cycle times to noise-induced oscillations. *Journal of Theoretical Biology*, 228(3):293–301, 2004. ISSN 00225193. doi: 10.1016/j.jtbi.2004.01.012.
- A. Sveiczer, A. Csikasz-Nagy, B. Gyorffy, J. J. Tyson, and B. Novak. Modeling the fission yeast cell cycle: quantized cycle times in wee1- cdc25Delta mutant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14):7865–70, 2000. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.97.14.7865. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- A. Sveiczer, J. J. Tyson, and B. Novak. A stochastic, molecular model of the fission yeast cell cycle: Role of the nucleocytoplasmic ratio in cycle time regulation. *Biophysical Chemistry*, 92(1-2):1–15, 2001. ISSN 03014622. doi: 10.1016/S0301-4622(01)00183-1.
- J. J. Tyson, A. Csikasz-Nagy, and B. Novak. The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays*, 24(12):1095–1109, 2002. ISSN 02659247. doi: 10.1002/bies.10191.
- R. Vasireddy and S. Biswas. Modeling Gene Regulatory Network in Fission Yeast Cell Cycle Using Hybrid Petri Nets. *Lecture Notes in Computer Science*, 3316, 2004. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-30499-9_204.
- Z. Wang, J. D. Butner, R. Kerketta, V. Cristini, and T. S. Deisboeck. Simulating cancer growth with multiscale agent-based modeling. *Seminars in Cancer Biology*, 30:70–78, 2015. ISSN 10963650. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.001>.
- U. Wilensky. NetLogo. *Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL*, 1999. URL <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>.
- U. Wilensky and W. Rand. *An Introduction to Agent-Based Modeling*. MIT Press, 2015. ISBN 9780262731898. URL <https://mitpress.mit.edu/books/introduction-agent-based-modeling>.
- L. Zhang, Z. Wang, J. A. Sagotsky, and T. S. Deisboeck. Multiscale agent-based cancer modeling. *Journal of Mathematical Biology*, 58(4-5):545–559, 2009. ISSN 03036812. doi: 10.1007/s00285-008-0211-1.