



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

MODELO MATEMATICO DE LA DIFUSIÓN DEL IÓN Ca^{2+} EN
CELULAS DE CANCER DE COLÓN ANTE TERAPIA
FOTODINAMICA (PDT)

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

OSVALDO JIMENEZ MONTIEL

DIRECTORES: DR. JORGE VELAZQUÉZ CASTRO
DR. FABIÁN GALINDO RAMÍREZ

Noviembre 2019



AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jorge Velázquez de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas por haberme tenido la paciencia para desarrollar este trabajo. Por haberme dejado entrar de oyente a sus clases, por su conocimiento, su completa atención y su impecable profesionalismo, le agradezco muchísimo.

Al Dr. Fabián, del Instituto de Fisiología por abrirnos las puertas de su laboratorio y mostrarse accesible a la colaboración para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Norma Caballero de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme el espacio de trabajar en su laboratorio y brindarme más herramientas para seguir entendiendo el proceso de la fototerapia.

Agradezco también a mis amigos de "Isildur" y de "Los Frankis", Richard, Martin, Pepe y Luisito, por haber hecho agradable toda mi carrera y encontrar entre ellos una escapada para hacer música. En especial agradezco a Miguel "el punk" por brindarme su amistad y tenderme la mano cada que lo necesité.

Agradezco a mis padres, por todas las lecciones de vida que me dieron, que siempre su constante ejemplo fue el del trabajo constante, que siempre estuvieron apoyándome y que sin ustedes no habría sido posible esto

Agradezco también al Movimiento Estudiantil Espartaco, por su compañerismo, porque gracias a ellos pude replantear (y seguir replanteando) varias cosas de mi vida, tener e intentar ver con más claridad mi día a día.

Agradezco a mis amigos y amigas de generación, Sergio, Javi, Arelee, Mayra, Luzheli, su amistad fue y sigue siendo muy importante para mí.

Y le doy las gracias infinitas a mi novia Itzel, que fue la que me hizo continuar cuando ya no podía, que cuando decidía ya no seguir, ella siempre se opuso a ello. Que cada momento de pláticas, risas y reflexiones hicieron que yo pudiera tener un respiro y no rendirme. Te agradezco Itzel que veas cosas en mí que yo no veo, que creas en mi cuando yo no creo y sobre todo te agradezco infinitamente que me hiciste ser cuando ya solo estaba.

A mis padres:

Cariño y confianza que siempre me brindaron.

Gilberto Montiel Hernández:

Un referente. Disculpa por no haberme apresurado abuelito.

Movimiento Estudiantil Espartaco

Por enseñarme el significado de la ciencia.

Itzel Lizbeth Castillo Sánchez.

Te amo y agradezco infinitamente. Mi alma gemela

ÍNDICE

RESUMEN	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 El cáncer	7
2.1.1 Desarrollo y causas.....	8
2.1.2 Tratamientos	8
2.2. Terapia fotodinamica (PDT)	8
2.2.1 Mecanismos moleculares.....	9
2.3 Dinámica de p53 en procesos cancerígenos.....	10
2.3.1 Actividad frente a terapias tumorales	12
2.4 Homeostasis de Ca ²⁺	12
2.4.1 Ca ²⁺ RE – mitocondria.....	15
2.5 Modelos matemáticos como herramienta.....	17
2.5.1 Modelos matemáticos para simular la dinámica de Ca intracelular:	18
2.6. Modelo CICR:.....	20
2.6.1 Otras manifestaciones de CICR.....	21
3. Objetivos:	23
3.1 Objetivos particulares:	23
4. Metodología.....	23
4.1 Modelo Goldbeter (1986) para describir osilaciones de Ca ²⁺	24
4.1.1 Primera ecuación para describir dinámica Ca ²⁺ intracelular.....	24
4.1.2 Segunda ecuación para describir dinámica de Ca ²⁺ en reservorios de Ca ²⁺	25
5. Sistemas de ecuaciones diferenciales para modelar células acopladas y aisladas.	27
5.1 Sistema de ecuaciones diferenciales para modelar una célula aislada.....	27
5.2 Sistema de ecuaciones diferenciales para dos células acopladas	31
5.3 Sistema de ecuaciones diferenciales para ocho células acopladas con p53 no mutado	34
6. Conclusiones.....	42
7. Discusión.....	43
7.1 p53 citosolico y su papel como regulador de calcio en la apoptosis.....	43
7.2. Dinamica de Ca y su importancia en el proceso apoptotico y efecto observador	44
7.3. Importancia de las uniones tipo GAP en el efecto observador.	45

8. BIBLIOGRAFIA.	46
9. Anexo.	52
Tabla 1	52
Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de una celula aisladas en lenguaje Python.....	53
Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de dos células acopladas en lenguaje Python.....	56
Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de ocho células acopladas en lenguaje Python	58

RESUMEN.

Las terapias para combatir el cáncer han ido cambiando y evolucionando al paso del tiempo, con el fin de obtener mejores resultados y evitar dañar a las células sanas. La terapia fotodinámica es una aproximación a ello. Es una terapia que usa la combinación de un agente fotosensibilizador más luz. Al activarse el fotosensibilizador se liberan especies reactivas de oxígeno que generan estrés dentro de la célula y provocan la activación de p53 citosólico que permite el acarreo de iones calcio hacia el retículo endoplásmico y después a la mitocondria, que la lleve a una saturación de calcio que la lleve a su lisis y liberación de citocromo C, elemento para comenzar la vía de muerte celular inducida.

Se realizó un modelo de ecuaciones diferenciales que simulan la actividad de la terapia fotodinámica en:

- 1- Una célula aislada
- 2- Dos células acopladas
- 3- Ocho células acopladas

De las variables dentro de los sistemas de ecuaciones, la que fue del interés en este trabajo fue p53, puesto que se buscaba demostrar el papel que tiene p53 en sus dos estados posibles (mutado y no mutado) como regulador de Ca^{2+} dentro de una célula cancerígena tratada con terapia fotodinámica.

Los resultados mostraron que ante la generación de estrés celular, el papel que tiene p53 citosólico dentro de la regulación de Ca^{2+} es muy importante, ya que si el valor numérico de p53 tiende a cero (valor que simula p53 en estado mutado dentro del sistema de ecuaciones) la toma de Ca^{2+} del citosol hacia el retículo endoplásmico se vuelve baja, por lo que la mitocondria no se satura y con ello el proceso de muerte celular programada no sería posible. Por lo contrario, al asignarle a p53 un valor numérico mayor, en el sistema comienza a haber un recambio de Ca^{2+} entre la mitocondria, interpretando que la mitocondria se lisó y hubo liberación de citocromo c para llevar a cabo el proceso de apoptosis.

ANTECEDENTES.

El cáncer.

La proliferación, diferenciación y supervivencia de células individuales en los organismos pluricelulares se regulan cuidadosamente para atender los requerimientos del organismo como un todo (Cooper, & Hausman, 2011).

Esta regulación no existe en las células cancerosas y la principal alteración que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua y descontrolada de las células. Son células que en vez de responder apropiadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, crecen y se dividen de manera descontrolada, invadiendo tejidos y órganos sanos que en última instancia se propagan por todo el cuerpo e interfieren con la función de los tejidos de los órganos sanos. La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células cancerosas es el resultado de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula.

El cáncer se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo. (Cooper, & Hausman, 2011)

Es estimado que nuestros cuerpos hay alrededor de 200 diferentes tipos de células somáticas, que tienen una capacidad de proliferación limitada. In vitro las células somáticas dirigen la multiplicación de la población de 50 a 60 veces antes de entrar a un arresto de su crecimiento que no es reversible llamado senescencia. En contraste, las células madre y células cancerígenas evitan esa barrera replicativa y adquieren la habilidad para dividirse indefinidamente cuando se cultivan bajo condiciones específicas *in vitro* (Hanahan, & Weinberg, 2000).

El desarrollo del carácter maligno de un tumor es un complejo proceso multietapa, son muchos los factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer y en la mayoría de los cánceres es simplista hablar de una única causa. De todas maneras, se han encontrado muchos agentes que disparan la generación de tumores, como la exposición a radiación, productos químicos y virus. (Cooper, & Hausman, 2011)

Desarrollo y causas

Se han descrito y caracterizado los elementos genéticos que son necesarios para la oncogénesis. Células somáticas humanas pueden volverse cancerígenas por la activación de elementos genéticos definidos tales como la introducción de un RAS oncogénico, activación de las telomerasas y bloqueo de las rutas p53/Rb. (Hahn et al. 1999). Es importante mencionar que en algunos tumores su proliferación y supervivencia depende de la actividad constitutiva de una o pocas mutaciones, llevando a la inhibición de las vías que ocasionan muerte celular, fenómeno conocido como “*adicción a oncogenes*” (Brunton, et al 2011).

Tratamientos

La práctica de la medicina contra el cáncer ha cambiado conforme se han desarrollado tratamientos que han sido eficaces para el tratamiento exitoso de cánceres que años atrás eran letales, como el testicular, los linfomas y la leucemia. (Brunton, et al 2011). Ejemplos de ello son la quimioterapia adyuvante y el tratamiento hormonal, estos nuevos medicamentos oncológicos pueden prolongar la vida del paciente y evitar la recurrencia neoplásica después de la resección quirúrgica de cánceres localizados, ya sean de origen mamario, colorrectal, pulmonar, etc. Así también, la quimioterapia se utiliza como parte del tratamiento multimodal de cánceres localmente avanzados de cabeza, cuello, mama, pulmón y esófago, así como sarcomas de tejidos blandos y tumores pediátricos sólidos, con lo que se permite realizar cirugías más eficientes y así mejorar los resultados para eliminar las masas tumorales que en tiempos pasados eran incurables (Brunton, et al 2011).

TERAPIA FOTODINAMICA (PDT)

La terapia fotodinámica (PDT por sus siglas en inglés “photodynamic therapy”) es un tratamiento que utiliza una droga sensible a la luz llamada “fotosensibilizador” o “fotosensor” que al ser expuesta a luz a una longitud de onda apropiada, transmite la energía captada de la emisión lumínica y la transmite al oxígeno molecular intracelular generando así la formación de especies reactivas de oxígeno y otras especies moleculares reactivas también relacionadas a mecanismos de muerte

celular programada. Múltiples cascadas de señalización y organelos celulares son afectados concomitantemente en las células expuestas al estrés fotodinámico, vías como las de adenilato ciclasa (AC), receptor tirosina cinasa (RTKs), MAP cinasas (MAPK/ERK), fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K/Akt), varias proteínas fosfatasas, factores de transcripción, organelos como la membrana plasmática, mitocondria y el retículo endoplásmico también se ven afectados, todo esto con la intención de llevar a la célula cancerígena a un proceso apoptótico.

La fuente de luz usada para la PDT puede venir de un láser u otras fuentes de luz. La luz puede ser dirigida a través de cables de fibra óptica (fibras delgadas que transmiten luz) para lanzar luz al área dentro del cuerpo. Por ejemplo, un cable de fibra óptica puede ser insertado a través de un endoscopio (un delgado tubo luminoso usado para mirar en tejidos dentro del cuerpo) dentro de los pulmones o esófago para tratar cáncer en esos órganos. Otras fuentes de luz incluyen los diodos emisores de luz (LEDs) que podrían ser usados para tumores superficiales como cáncer de piel.

Siendo además que la terapia fotodinámica no solo tiene la cualidad de eliminar las células cancerígenas actuando directamente sobre el tumor sólido, sino que también puede actuar en la vascularización dentro del tumor, afectando así la angiogénesis tumoral y evitando que la misma masa de células malignas obtenga nutrientes para su crecimiento. También se ha reportado su papel coadyuvante en la respuesta de células inmunes contra células cancerígenas, puesto que ante la presencia del fotosensor dentro de la masa tumoral se han reportado acumulaciones de neutrófilos que genera una baja en el crecimiento del tumor. ("Photodynamic Therapy for Cancer", 2019)

Mecanismos moleculares

Como primer paso de la PDT para tratamiento de cáncer, un agente sensibilizador es inyectado dentro del torrente sanguíneo para que el agente es absorbido por las células del cuerpo tanto sanas como malignas. Aproximadamente 24 a 72 horas después de la inyección el tumor es expuesto a luz haciendo que el agente químico absorba los fotones emitidos a la correcta longitud de onda, cambiando la

multiplicidad electrónica de la droga fotosensora, pasándola de su estado basal a uno singlete y posterior a un estado de triplete, siendo en este estado donde el fotosensor comienza la generación de las especies reactivas de oxígeno ya sea donando electrones a moléculas celulares que se convertirán en radicales y estos a su vez interactúen con moléculas de oxígeno, o que el fotosensor en su estado de triplete pueda interactuar directamente con el oxígeno y comience a generarse el estado de estrés dentro de la célula para así desencadenar las vías apoptóticas que se necesitan para eliminar las células tumorales. (Dolmans,2003)

Dinámica de p53 en procesos cancerígenos

P53 es el elemento antitumoral más estudiado, es el eje de numerosas rutas de señalización mediadas por estrés que controlan el destino celular y procesos apoptóticos, es un factor de transcripción y transactiva numerosos genes involucrados en la inducción al arresto del ciclo celular y/ o apoptosis (Lacroix, et al 2006) (Green, & Kroemer 2009). Bajo condiciones normales, p53 es expresado a un nivel bajo, causado por una degradación proteosomal mediada por una proteína ubiquitinadora ligasa conocida como MDM2, manteniendo a p53 como una forma funcionalmente latente (Kubbutat et al 1997) (Honda et al 1997). p53 cumple su papel ante estrés celular o daño al DNA, es inducido a acumularse en el núcleo celular a través de modificaciones post-traduccionales como fosforilación y acetilación que hacen que p53 pase de una forma latente a una forma activa, llevándolo a la disociación de MDM2 de p53 (Sionov & Haupt 1999) (Lacroix, et al 2006). Cuando p53 está funcionalmente activo, transactiva un conjunto apropiado de genes objetivo para inducir el arresto del ciclo celular o apoptosis, estos comportamientos celulares son dependientes del grado y del tipo de daño celular (El-Deiry, 2003). Así p53 media el arresto del ciclo celular y permite que las células reparen su DNA dañado. Cuando la reparación del ADN es completa, la célula regresa al ciclo celular normal. Por otro lado, cuando las células tienen un daño serio al DNA o se genere estrés celular que ponga en riesgo el funcionamiento de la célula, p53 ejecuta sus mecanismos proapoptóticos para eliminar células con graves alteraciones en su material genético o y así inhibir la transferencia de DNA dañado a las células hijas. (Ozaki, & Nakagawara 2011). Por lo tanto queda claro

su papel en la regulación celular y que su mal funcionamiento es un aspecto importante para la formación de tumores en diferentes tipos de cánceres humanos.

Su actividad es crucial para regular una eficiente muerte celular en células cancerígenas bajo estrés celular (Green & Kroemer, 2009) evocado por drogas quimioterapéuticas o radiación. Muchas células cancerígenas sin embargo contienen genes mutantes de p53 o p53 no funcionales y son incapaces de responder eficazmente a los tratamientos, en efecto 50% de cánceres humanos albergan mutaciones somáticas en genes de p53 (Vousden & Lane 2007). Sin embargo, el mecanismo por el que WTp53 suprime el crecimiento tumoral e influye en la respuesta a drogas para mediar apoptosis no son aun completamente entendidas. (Giorgi et al. 2015)

Dentro de la célula se reconocen dos reservorios de p53, una citoplásmica y otra nuclear, ambas responden de forma dependiente al estrés (Marchenko et al 2007). Estas piscinas coexisten trabajando mediante mecanismos de transcripción y mecanismos independientes a transcripción (Haupt, 2003) (Moll, et al 2005). Ambas son regulados por modificaciones postraduccionales que permiten su acumulación y permiten la activación completa de funciones proapoptóticas (Sorrentino, et al 2013).

De las piscinas mencionadas, el citoplasma es la principal fuente de p53 involucrada en la ruta no transcripcional a través de translocación mitocondrial, mientras que la piscina nuclear es responsable de los mecanismos dependientes de transcripción. Siendo ambos regulados por modificaciones postraduccionales que permiten su acumulación y la completa activación de sus funciones proapoptóticas. (Moll, et al 2005). (Sorrentino, et al 2013)

Recientes estudios han sugerido que p53 participa en la inducción a apoptosis actuando directamente en la mitocondria debido a que p53 puede mediar apoptosis sin su dominio de unión a DNA (el dominio propuesto por ser fundamental para la orientación de p53 a la mitocondria) y la localización mitocondrial de p53 probablemente no sea el único mecanismo independiente de transcripción por el que p53 promueva apoptosis (Haupt, et al 1995)

Actividad frente a terapias tumorales

En el trabajo de Giorgi. et al. investigaron si una localización extra nuclear de p53 podría mediar la función supresora de tumores a través de una ruta no transcripcional. Lograron ver cómo era la acumulación de p53 en los compartimentos retículo / mitocondria después de tratamientos anticancerígenos que potencian la muerte celular. Para establecer si otro aspecto de p53 no mitocondrial podría estar involucrado en una ruta proapoptótica no transcripcional verificaron la localización de p53 usando técnicas bioquímicas y de inmunofluorescencia. Purificaron fracciones de retículo endoplásmico y MAM (mitochondria associates membranes) de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y del cáncer de colon humano (HCT -115p53 +/-). P53 fue localizado en el retículo endoplásmico y MAMs así como la fracción citosólica bajo condiciones sin tratamiento; mostrando así la relación de p53 en el movimiento de flujos de Ca^{2+} en el complejo mitocondria/ RE. (Giorgi. et al. 2015).

Homeostasis de Ca^{2+}

En el curso de la evolución, Ca^{2+} ha sido seleccionado como un portador universal de señales. La selección ocurrió en el tiempo de la transición de vida unicelular a una forma multicelular, cuando la división de tareas entre las células de los organismos trajo con ella la necesidad de intercambiar señales. La selección de Ca^{2+} como un portador de información celular fue apropiada por su coordinación química dentro de los sitios de la geometría irregular que tienen las complejas moléculas celulares, (proteínas) (Carafoli, 2002) (Carafoli, 2003). La importancia del control de Ca^{2+} intracelular es reflejada por la multitud de sistemas dependientes de este ion, desarrollados a lo largo de la evolución para cumplir distintas tareas de señalización intracelular. Estos sistemas trabajan ya sea transportando Ca^{2+} a través de la membrana o acomodándolo reversiblemente en el citosol o en el lumen de los organelos. (Prins, & Michalak 2011).

El arreglo de los procesos que son controlados por Ca^{2+} comienza con el origen de una célula viva en la fertilización, y termina con el proceso de muerte programada

que termina la vida una vez que las células han alcanzado el fin de su ciclo de vida. Su actividad descontrolada podría dañar la célula irreversiblemente, eventualmente terminando con su muerte. En ese sentido, al haberse seleccionado en el proceso evolutivo a Ca^{2+} como un determinante para funcionar, las células son forzadas a vivir en un estado de permanente riesgo controlado, en el que la posibilidad de una catástrofe por una incorrecta regulación de Ca^{2+} es siempre constante. Como sucede en la muerte de células necróticas debida por la sobrecarga masiva de Ca^{2+} citosolico, por ello siempre existe un riesgo constante dentro del ambiente celular. La muerte celular regulada por Ca^{2+} también es resultado de procesos controlados por parte de las mismas células para llevar un correcto funcionamiento tisular. Este es el proceso de apoptosis, que es una de las principales formas en que las células procesan señales de Ca^{2+} mediante la interacción con organelos como el retículo endoplásmico y la mitocondria para controlar procesos esenciales como regeneración de tejidos y en la modelación de órganos. (Prins, & Michalak 2011)

Las mitocondrias son organelos intracelulares dotados con dos membranas con propiedades de permeabilidad de iones: la membrana mitocondrial más externa (OMM) es libremente permeable a iones y pequeñas moléculas, mientras que la membrana interior de la mitocondria (IMM) se encuentra doblada dentro de la invaginación interna llamada "cristate" que contiene complejos multienzimáticos de la cadena respiratoria de la ATP sintasa y los sistemas transportadores de Ca^{2+} .

El transporte mitocondrial de Ca^{2+} tiene características únicas. La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria no necesita hidrólisis de ATP pero utiliza el sistema uniportador de membrana mitocondrial y el potencial de membrana (negativo por dentro) mantenido a través de la membrana interna por la cadena respiratoria que sirve como fuerza motriz. Además de que la compuerta uniportador mitocondrial ha sido propuesta por ser una compuerta altamente selectiva de iones. (Kirichok, et al 2004). (Saris & Allshire 1989).

Bajo condiciones de reposo, las tasas del influjo y eflujo de Ca^{2+} son lentas y aseguran el mantenimiento de una baja concentración de calcio en la matriz mitocondrial. El equilibrio cinético entre influjo y eflujo en consecuencia resulta en

un estéril ciclo de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial interna (Carafoli, 1979). Cuando Ca^{2+} citoplasmático incrementa sobre un límite dado (mayor que 10 micromoles) la rápida acumulación de Ca^{2+} por la mitocondria es iniciada y el Ca^{2+} de la matriz mitocondrial incrementa dramáticamente. Finalmente, el exceso de la acumulación de Ca^{2+} por la mitocondria (sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} . MMO) podría resultar en la apertura de un gran canal no selectivo en la membrana interna de la mitocondria, el poro mitocondrial de transición permeable (mPTP) que colapsa el potencial de membrana, induce la hinchazón de la membrana interna y la ruptura de la membrana externa, y la liberación de proteínas del espacio intramembranal (IMS) en el citoplasma.

Y gracias a los descubrimientos de los mecanismos de respiración de la mitocondria, se fue capaz de comprender otros procesos, como en este caso el de la dinámica de Ca^{2+} mitocondrial; así estos mecanismos de flujo iónico fueron clarificados. Así fue establecido que la toma de Ca^{2+} es un proceso electrogénico. (Vasington & Murphy 1962). (DeLuca, & Engstrom 1961).

Al final del día, tanto la liberación de Ca^{2+} del RE y el influjo capacitivo de Ca^{2+} que atraviesa por los canales mitocondriales activados por la liberación del mismo ion son mostrados como apoptogénicos (Wertz & Dixit 2000) (Jiang, et al 1994). Consecuentemente la inducción a apoptosis en células tumorales es uno de los principales objetivos de las terapias anticancerígenas. Estudios durante la pasada década han remarcado la importancia de la señalización de Ca^{2+} en la regulación de aspectos claves en la muerte celular. En particular la modulación de señales de Ca^{2+} pueden cambiar la sensibilidad a señales apoptóticas como agentes quimioterapéuticos. (Leonard & Salpeter 1979).

Varios estudios han indicado que el contenido de Ca^{2+} del retículo endoplásmico determina la sensibilidad celular a estrés apoptótico y que la perturbación de la homeostasis de Ca^{2+} parece ser un componente clave en el desarrollo de muchas patologías. Por lo tanto los cambios en el flujo de Ca^{2+} son regulados por la liberación de más Ca^{2+} proveniente de retículo endoplásmico hacia el citosol. Además que la mitocondria puede promover la supervivencia de células

cancerígenas, reduciendo la sensibilidad a señales apoptóticas. (Schanne, et al 1979)

Ca²⁺ RE – mitocondria

Por más de medio siglo, la mitocondria ha sido conocida por participar activamente en la compartimentalización de Ca²⁺ intracelular. La mitocondria toma el calcio electroforéticamente del citosol a través del compartimento uniportador y pueden liberarlo de nuevo a través de diferentes rutas.

La afinidad a Ca²⁺ por parte del compartimento uniportador es baja y el tamaño de la piscina de Ca²⁺ mitocondrial es pequeña bajo condiciones fisiológicas normales (sin estímulos estresantes). Sin embargo, grandes cantidades de Ca²⁺ pueden acumularse en la mitocondria bajo condiciones patológicas, cuando las concentraciones de Ca²⁺ se elevan (Thor, et al 1984).

Por muchos años la toma de Ca²⁺ mitocondrial fue considerada principalmente como un dispositivo de seguridad en situaciones temporales de sobrecarga de Ca²⁺ intracelular. Pero esa perspectiva cambio, gracias a las nuevas técnicas con nuevos indicadores que pueden censar cambios en la concentración de Ca²⁺ y en específico los cambios dentro de los compartimentos intracelulares. Como resultado de tal tecnología, se ha vuelto aparente que los flujos de Ca²⁺ a la mitocondria son partes integradas de señalización celular. La baja afinidad de la mitocondria para importar Ca²⁺ es superado por la proximidad de la mitocondria al RE y la creación de “puntos calientes” en la boca de los canales de liberación de Ca²⁺ (Hajnóczky et al 1995). Ca²⁺ parece regular un segundo mecanismo que es el responsable de la permeabilización del poro externo de la mitocondria (OMM) y la liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas, que se acoplan a la respuesta de estrés y forman el complejo conocido como la inner – membrane permeability transition. Esto involucra la apertura de un poro permeable de transición (PTP) que consiste en un gran complejo proteico que comprende un canal aniónico voltaje dependiente (VDAC), el translocador nucleótido adenina (ANT), ciclofilina mitocondrial D y muchas otras proteínas. (Halestrap, et al 1998) (Crompton, 1999).

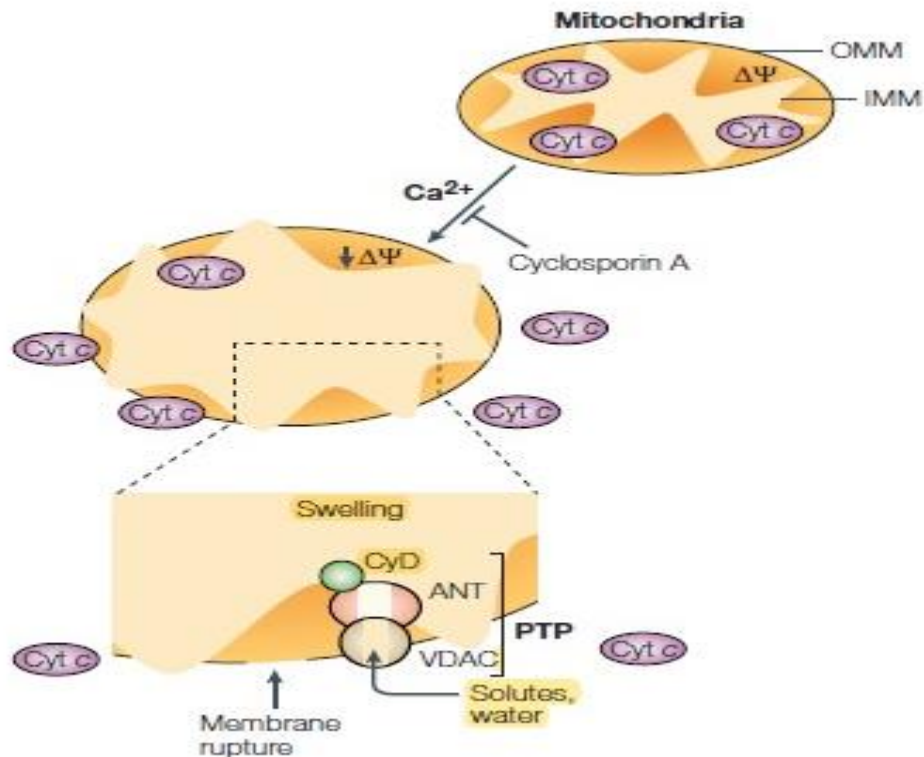


Figura 1. Mecanismo de la liberación de proteínas espacio intramembranal de la mitocondria. Este proceso involucra la apertura del poro de transición permeable (PTP), que consiste de un canal anionico voltaje dependiente (VDAC), translocador nucleótido de adenina (ANT) y ciclofilina (CyD) así como otras varias proteínas. La apertura del poro es seguida por la inchazón de la matriz mitocondrial, la ruptura de la membrana mitocondrial exterior (OMM) y la liberación de citocromo c (Cyt c) y otras proteínas del espacio intermembranal. (Orrenius. S 2003)

El complejo poro de transición permeable ha sido localizado por los sitios de contacto entre la membrana mitocondrial interna y la membrana mitocondrial externa. El poro se comporta como un canal operado por voltaje que se vuelve activo por una alta concentración de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial.

Además, la actividad que tiene Ca²⁺ sobre la liberación de Ca²⁺ está dada por la interacción de Ca²⁺ con Cardiolipina. Citocromo C se une a la IMM por su asociación con Cardiolipina. La cardiolipina es única para mitocondria y está presente predominantemente, sino exclusivamente en el IMM. Evidencia indica que la

disociación de citocromo c de la cardiolipina es un paso crucial para la liberación de citocromo se en el citosol y para la inducción de apoptosis (Ott, 2002).

Varios tratamientos han sido encontrados para disparar apoptosis a través de la permeabilidad mitocondrial de Ca^{2+} en varios tipos celulares. Sucesivamente, este rearreglo dirige una producción incrementada de ROS por la cadena respiratoria que promueve la oxidación de la fosforilación de lípidos de membrana y proteínas, y como resultado un incremento en la permeabilidad de la membrana. De hecho, la interacción Ca^{2+} -cardiolipina podría ser un paso crucial en la secuencia de eventos por la que Ca^{2+} dispara la permeabilización de la membrana mitocondrial.

Además de esto, Ca^{2+} es muy importante para la activación de apoptosis, pues no solamente interviene en la apertura de la IMM sino que hay otros objetivos potenciales de Ca^{2+} para dirigir a la célula a procesos de apoptosis

Ca^{2+} como molécula direccionadora puede activar distintas partes del programa de muerte celular programada, que pueden funcionar solas o en conjunción con otros subprogramas para matar a la célula. Gracias al desarrollo de nuevas metodologías, se puede apreciar la importancia de los flujos de Ca^{2+} en el complejo mitocondria-retículo endoplásmico en las señalizaciones apoptóticas y la función central que tiene calcio en la mitocondria para originar la muerte celular. (Orrenius, et al 2003).

Modelos matemáticos como herramienta.

El uso en la investigación por análisis de modelos matemáticos que imitan el comportamiento de las redes intercelulares ha sido muy utilizado en los últimos años. Tales modelos son abstracciones de la realidad. Estos son diseñados para enfocarse en ciertos aspectos del objeto de estudio. Por ejemplo, el famoso modelo de esferas y barras para modelar la estructura química, que se enfoca justamente en las uniones de moléculas químicas. Este modelo no captura, por ejemplo el resultado de la polaridad en los átomos de la molécula.

Los biólogos regularmente hacen uso de modelos tangibles del “mundo real”. Estas pueden ser simples, tales como los modelos de esferas y barras, o complejos como modelos de organismos o modelos de enfermedades animales. Los biólogos

también usan modelos conceptuales. Estos típicamente toman la forma de las descripciones verbales de los sistemas y son comunicados por diagramas que ilustran un paquete de componentes y las formas en las que ellas interactúan. Estos diagramas de interacción o “modelos caricatura” juegan un papel central en la representación de nuestro conocimiento en los procesos celulares. (Ingalls, 2012).

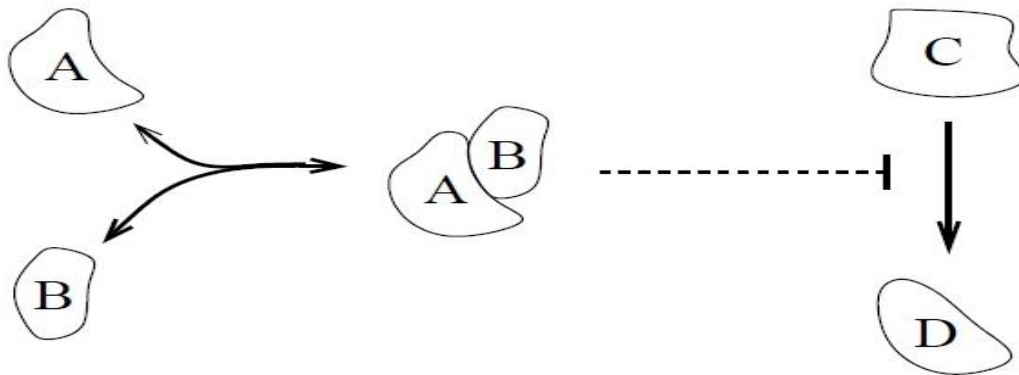


Figura 2. Esquema que ejemplifica un “modelo conceptual” de un proceso reactivo molecular, donde dos moléculas (A y B) se unen en una interacción ligando/receptor que forma el complejo “AB”. Esta nueva molécula (AB) inhibe la tasa en la que C se convierte a D (Ingalls, B. 2012).

Modelos matemáticos para simular la dinámica de Ca intracelular

Debido a que la dinámica de la concentración del ion Ca^{2+} muestra un comportamiento complejo, muchos especialistas en modelos matemáticos se han interesado en su estudio. Además muchos tipos celulares responden a las estimulaciones agonistas con oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} . (Keener, & Sneyd, 2009).

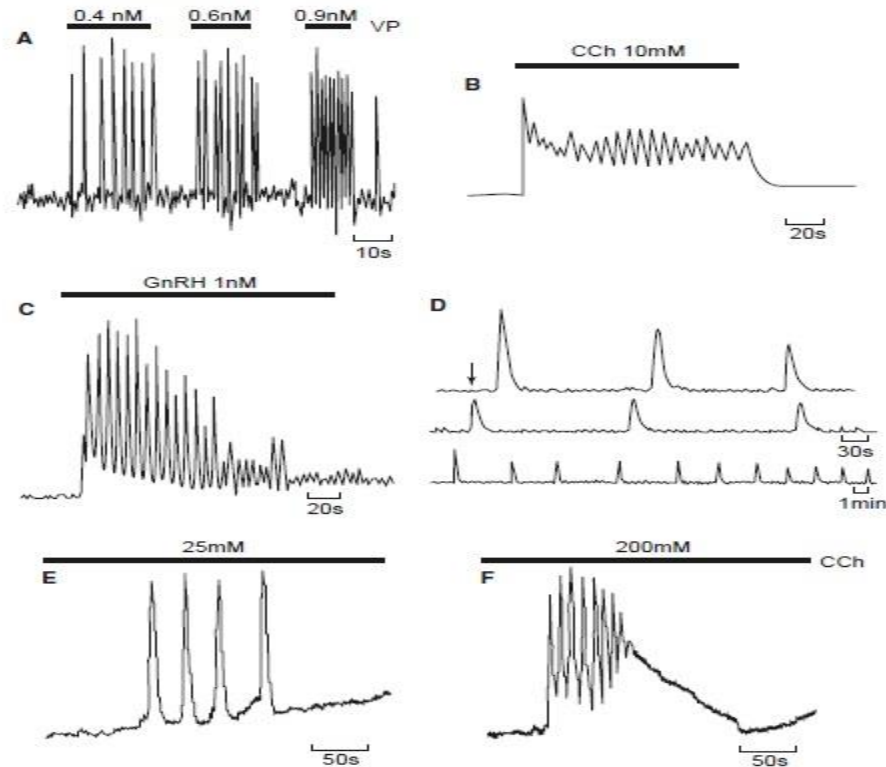


Figura 3. Oscilaciones típicas de Ca^{2+} en variedades de tipos celulares. A: Hepatocitos estimulados con vasopresina. B: Glándula parótida de rata estimulada con carbacol. C: Gonadotropinas estimulada con hormona liberadora de gonadotropina. D: Huevos de hámster después de la fertilización. E y F: Insulinomas estimuladas con diferentes concentraciones de Carbacol (Berridge and Galione, 1988, Fig. 2.)

Las oscilaciones de calcio han sido implicadas en una vasta cantidad de control de procesos celulares. Como la activación de los oocitos en la fertilización, crecimiento axonal, migración celular, expresión genética, formación de nódulos en pelos radiculares, desarrollo muscular y liberación de citosinas de las células epiteliales. En muchos casos, las oscilaciones son de una frecuencia con señal codificada que permite a la célula usar Ca^{2+} como un segundo mensajero mientras evitan los efectos tóxicos de una prolongada alta concentración de Ca^{2+} . (Berridge, et al 2003)

En una gran variedad de células, la estimulación por una señal extracelular dirige el comienzo de picos repetitivos de Ca^{2+} . [1-4. 7] (Berridge & Irvine 1989) (Tsunoda 1991). Algunos modelos teóricos para el fenómeno de oscilación han sido también

propuestos (Dupont & Goldbeter 1992) (Goldbeter et al 1990). Uno de los varios mecanismos que han sido formulados matemáticamente están basados en el modelo llamado "Calcio induce liberación de Calcio" o CICR (Calcium Induces Calcium Release) por sus siglas en inglés: Ca^{2+} citosolico es asumido para activar su propia liberación de los compartimentos intracelulares después de un incremento inicial.

El viaje y la propagación de las ondas de Ca^{2+} son propagadas entre las células formando ondas intracelulares que pueden viajar a lo largo de muchas células. Tales ondas han sido observadas en hígados intactos, cortes cerebral hipo campal, y cultivos celulares epiteliales y gliales. (Sanderson et al 1990) (Charles et al., 1991) (Cornell-Bell et al 1990)(Kim et al., 1994) (Robb-Gaspers and Thomas, 1995).

Modelo CICR

El modelo CICR por el acrónimo en inglés CICR (Calcium Induces Calcium Reléase) describe un proceso biológico por el cual calcio promueve su propia liberación de los compartimentos de calcio intracelular. La difusión de calcio dentro de las células es grandemente retrasada por amortiguadores o buffers. CICR por lo tanto provee un medio de amplificación de iniciación de eventos microscópicos en la propagación de señales de calcio. El calcio para control de actividades celulares tiene que alcanzar objetivos que podrían ser distantes de los sitios de iniciación. Sin CICR, las células tendrían que relegarse a una lenta difusión de calcio.

Los sitios de unión a calcio que son mediados por CICR han sido encontrados primariamente en receptores a rianodina e IP3. Estos canales estructuralmente relacionados son ampliamente expresados y median la liberación de calcio en músculos, neuronas y en células no excitables. CICR por lo tanto ocurre vía la unión directa de calcio a los canales.

El mecanismo CICR ocurre durante los latidos del corazón, cuando los influjos de calcio pasan a través de los canales tipo L operados por voltaje que subsecuentemente proveen la señal para inducir al proceso de la siguiente liberación de calcio de los receptores yuxtapuestos de rianodina encontrados en el retículo sarcoplasmático o endoplásmico, resultando en la contracción muscular

cardiaca. Ejemplos de CICR en células no eléctricamente excitables que incluyen a IP3 y la inducción de oscilaciones y ondas de calcio son, la fertilización de huevos de mamíferos, y el esparcimiento de ondas de calcio en células acinares pancreáticas que subyace gránulos zimógenos y secreción de fluidos.

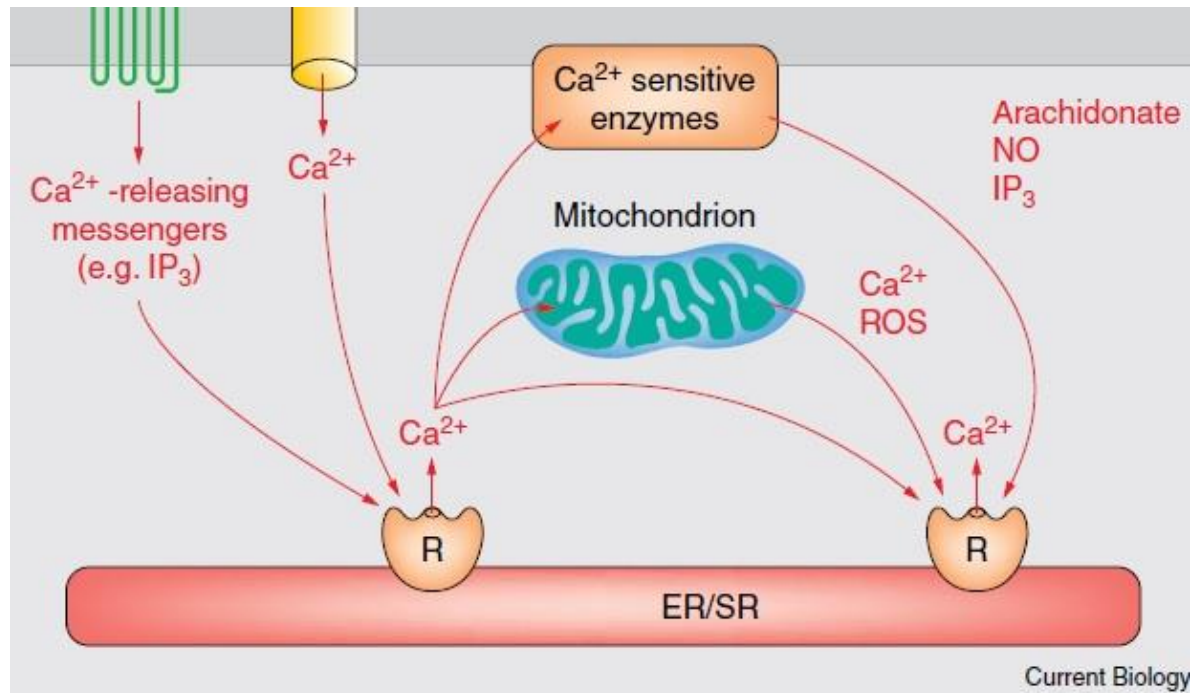


Figura 4. La imagen representa como el mecanismo de CICR amplifica las señales de Ca. Comenzando de izquierda a derecha, la figura ilustra la iniciación de una señal de calcio vía canal intracelular. Esto dirige la directa liberación de calcio de los canales vecinos o la producción de mensajeros liberadores de Ca. (Berridge, 2003).

Otras manifestaciones de CICR.

Aunque los receptores de IP3 y rianodina son considerados como los primeros canales CICR, otras pocas formas de CICR han sido reportadas. Por ejemplo, se demostró que la proteína plicistina 2, mutada en la enfermedad poliquística hepática autosómica dominante (ADPCLD) puede operar mediante canales CICR. También el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial puede abrirse en respuesta a elevados niveles de calcio en la matriz celular. Este resulta en la rápida liberación

de calcio de la mitocondria, que puede afectar a las mitocondrias vecinas dirigiendo una señal propagadora.

El término CICR es más comúnmente usado para implicar la activación de la liberación de canales por la directa unión de calcio. (Roderick, et al 2003).

El cáncer se ha vuelto una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. En 2012, 14.1 millones de nuevos casos diagnosticados y 8 millones de muertes alrededor del mundo estuvieron relacionados con el cáncer. (Ferlay et al 2015). Y aunque con un diagnóstico temprano vía programas de ocultaciones y mejores modalidades de tratamiento han resultado en el decremento en las tasas de mortalidad por cáncer aún existe el reto en términos de morbilidad y mortalidad. (Bray, et al 2012). Muchos y muy especializados tratamientos están disponibles dependiendo el tipo de cáncer, etapa y localización del tumor primario; radio y quimioterapia y en recientes años inmunoterapia son los tratamientos más conocidos, otras opciones son usadas o combinadas, como terapias génicas y terapia fotodinámica (PDT).

La resistencia a las terapias es un problema emergente que para resolver hay que desentrañar las propiedades del mecanismo adyacente tumoral y las consecuencias de todos los tipos de tratamientos, esto es importante para acertar en el objetivo específico de las células tumorales y así eliminarlo de forma eficaz (Nelson, et al 1990). Ante una gran cantidad de terapias, existe la terapia fotodinámica donde la implementación de elementos no tóxicos: luz y fotosensibilizador generan formas reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas de oxígeno singlete, moléculas que subsecuentemente infligen daño a las células tumorales o a la vasculatura tumoral, que podría resultar en la muerte celular además de potenciar una respuesta inmune antitumoral, todo en dirección a la destrucción del tumor. (Castano, 2004).]La finalidad es potenciar la señalización de calcio mediante producción de ROS para ocasionar la muerte celular, por lo que es evidente que la señalización de Ca^{2+} ha sido el tema de interés con relación al efecto de PDT. Finalmente, las señales de Ca^{2+} generadas por la terapia fotodinámica

pueden ser propagadas a las células que rodean a la célula tratada como ondas intercelulares de Ca, el llamado, efecto observador.

Esta terapia a pesar de ser innovadora cuenta con ciertas limitantes, una de ellas es la dificultad de irradiar la luz a tumores internos y la otra está relacionada con la difusión de Ca^{2+} a las células vecinas, siendo que la onda tiene un límite, pues Ca^{2+} no se propaga en su totalidad dentro de la masa tumoral.

La tarea es determinar cuál es lo que frena la propagación de Ca^{2+} dentro del tumor mediante el uso de modelado matemático, para esto se propone un modelo matemático para poder proponer que es lo que causa este fenómeno.

Objetivos:

- Plantear un modelo matemático que describa el proceso de difusión del ion Ca^{2+} en células de cáncer de colon.

Objetivos particulares:

- Plantear un sistema de ecuaciones diferenciales que describa las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial en una célula no acoplada tratada con terapia fotodinámica ante la presencia del fotosensibilizador activado por luz.
- Plantear un sistema de ecuaciones, que describa la dinámica de Ca en una célula tratada con terapia fotodinámica y la dinámica de Ca en la célula adyacente con efecto observador con actividad de p53 citosólico en estado salvaje
- Plantear un sistema de ecuaciones que describa la dinámica de Ca^{2+} en una célula tratada con terapia fotodinámica y la dinámica de Ca^{2+} en la célula adyacente con efecto observador con actividad de p53 citosólico en estado mutado

Metodología:

Para la realización de esta tesis se utilizó el modelo de Goldbeter (1986) que describe las oscilaciones de Ca^{2+} en la célula. En el modelo se plantean dos

ecuaciones. La primera describe la dinámica de Ca^{2+} en el citosol de la célula. La segunda ecuación describe la dinámica de Ca^{2+} dentro de los reservorios celulares.

Modelo Goldbeter (1986) para describir oscilaciones de Ca^{2+}

Primera ecuación para describir dinámica Ca^{2+} intracelular.

Este es el modelo que plantea Goldbeter (1986), para simular la dinámica de Ca^{2+} dentro de la célula.

En la primera ecuación se simula la dinámica del ion Ca^{2+} en el ambiente citosolico.

$$\frac{\Delta Z}{\Delta t} = v_0 + v_1\beta - v_2 + v_3 + k_f Y - kZ,$$

Donde:

v_0	Influjos de Ca^{2+} extra celular a el citosol (Termino linealizado)
β	Función de saturación de los receptores a IP3
$v_1\beta$	Determina cada nivel de IP3 que controla un flujo constante de Ca^{2+} con origen de piscinas sensibles a IP3 en el citosol.
v_2	Transferencia de Ca^{2+} de citosol a piscinas insensibles a IP3 (Mitocondria)
v_3	Transferencia de Ca^{2+} de piscinas insensibles a IP3 a citosol
k_f	Fuga pasiva de Y a Z (no esencial para que haya oscilaciones, pero si para controlar la amplitud de las ondas)
k	Salida de Ca^{2+} del citosol (Termino linealizado)
Z	Concentración de Ca^{2+} en el citosol

Y	Concentración de Ca^{2+} en el citosol
-----	--

Segunda ecuación para describir dinámica de Ca^{2+} en reservorios de Ca^{2+}

En la segunda ecuación, modela la dinámica de Ca^{2+} dentro de los reservorios de Ca^{2+} sensibles a Ca^{2+} (CICR).

$$\frac{\Delta Y}{\Delta t} = v_2 - v_3 - k_f Y$$

En donde:

v_2	Transferencia de Ca^{2+} de citosol a piscinas
v_3	Transferencia de Ca^{2+} de piscinas a citosol
k_f	Fuga pasiva de Y a Z
Y	Concentración de Ca^{2+} en el citosol

En su modelo usa dos ecuaciones para describir el proceso de bombeo de Ca^{2+} hacia los reservorios celulares (v_2) y la liberación de Ca^{2+} de los reservorios celulares hacia el citosol (v_3)

$$v_2 = V_{M2} \frac{Z^n}{K_2^n + Z^n}$$

Donde:

V_{M2} = Máxima tasa de bombeo de Ca^{2+} hacia el citoplasma

Z =Concentración de Ca^{2+} en citosol

n = Coeficiente de Hill,

K_2 =Constantes de bombeo

$$v_3 = V_{M3} \left(\frac{Y^m}{K_R^m + Y^m} \right) \left(\frac{Z^p}{K_A^p + Z^p} \right)$$

Donde:

V_{M3} = Máxima tasa de bombeo fuera del citoplasma

m = Coeficiente de Hill,
 ρ = Denota grado de cooperatividad del proceso de activación.
 K_R = Constantes de liberación
 K_A = Constante de activación

El modelo de Golbeter para simular las oscilaciones de Ca^{2+} y su frecuencia se utilizó para poder construir el modelo de esta tesis, para poder simular como es la dinámica de Ca^{2+} mediada por p53 citosolico salvaje y mutado ante la presencia de agentes de estrés generados por la presencia de luz más un fotosensor (terapia fotodinámica)

Las ecuaciones que se construyeron para la simulación de la dinámica de Ca^{2+} en una terapia fotodinámica

Los supuestos para la construcción de cada ecuación fueron los siguientes:

- a. Ca^{2+} sale de las piscinas de forma instantánea ante la presencia del fotosensibilizador + luz.
- b. Ca^{2+} difunde de manera libre entre el espacio extracelular.
- c. Ca^{2+} pasa libremente entre las membranas de las células vecinas.

Se tomaron distintas situaciones para modelar.

1. De primera instancia se construyó un modelo de dos ecuaciones diferenciales para simular la actividad de Ca^{2+} en una célula aislada a nivel intracelular y su saturación de Ca^{2+} en la mitocondria por la actividad de p53 no mutado.
2. Se simulo la actividad de Ca^{2+} en una célula aislada a nivel intracelular y su saturación de Ca^{2+} en la mitocondria por la actividad de p53 mutado
3. Se simuló simular la actividad de Ca^{2+} en una célula acopada a otra para simular la actividad de Ca^{2+} en la célula irradiada y en la célula acoplada por la actividad de p53 no mutado.

4. Se simuló la actividad de Ca^{2+} en una célula acoplada a otra para simular la actividad de Ca^{2+} en la célula irradiada y en la célula acoplada por la actividad de p53 mutado
5. Se simuló la actividad de Ca^{2+} de tres células acopladas a nivel intracelular y su saturación de Ca^{2+} en la mitocondria por la actividad de p53 mutado y no mutado.

Los modelos matemáticos se resolvieron numéricamente utilizando el lenguaje de programación Python. (ver 3.6)

Sistemas de ecuaciones diferenciales para modelar células acopladas y aisladas.

Sistema de ecuaciones diferenciales para modelar una célula aislada.

$$\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_1 * v_2 + v_3 + k_f Y - kZ$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_m}{\Delta t} = \alpha_2 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

Donde:

$$\alpha_n = p53_w$$

$$\alpha_n = p53_m$$

α_n	p53 normal o mutado
pdt	Actividad de luz + fotosensor
v_0	Influjo de Ca^{2+} extra celular a el citosol (Termino linealizado)
β	Función de saturación de los receptores a IP3

$v_1\beta$	Determina cada nivel de IP3 que controla un flujo constante de Ca^{2+} con origen de piscinas sensibles a IP3 en el citosol.
v_2	Transferencia de Ca^{2+} de citosol a piscinas insensibles a IP3 (Mitocondria)
v_3	Transferencia de Ca^{2+} de piscinas insensibles a IP3 a citosol
k_f	Fuga pasiva de Y a Z (no esencial para que haya oscilaciones, pero si para controlar la amplitud de las ondas)
k	Salida de Ca^{2+} del citosol (Termino linealizado)
Z	Concentración de Ca^{2+} en el citosol
$fuga$	Salida de Ca^{2+} por las uniones tipo GAP
D	Termino de difusión

Este modelo es una modificación del modelo de Goldbeter et.al (1986), que incluye variables para la simulación de la dinámica de Ca^{2+} ante la presencia de un fotosensor más luz y la actividad de p53 en estado mutado y salvaje. Las variables agregadas a la ecuación fueron “pdt” y “alfa”, que puede ser p53 salvaje o p53 mutado

A partir de la gráfica de la función de la ecuación que modela la actividad de p53 no mutado ante terapia fotodinámica en una célula aislada se observó que la concentración de calcio en el RE aumenta, mientras que la concentración de calcio citosolico se mantiene a niveles bajos, hasta que en el RE llega a un punto máximo donde hay un recambio de calcio entre RE/ citoplasma como se observa en la figura 1.

Los valores de las variables están en el Anexo de esta tesis.

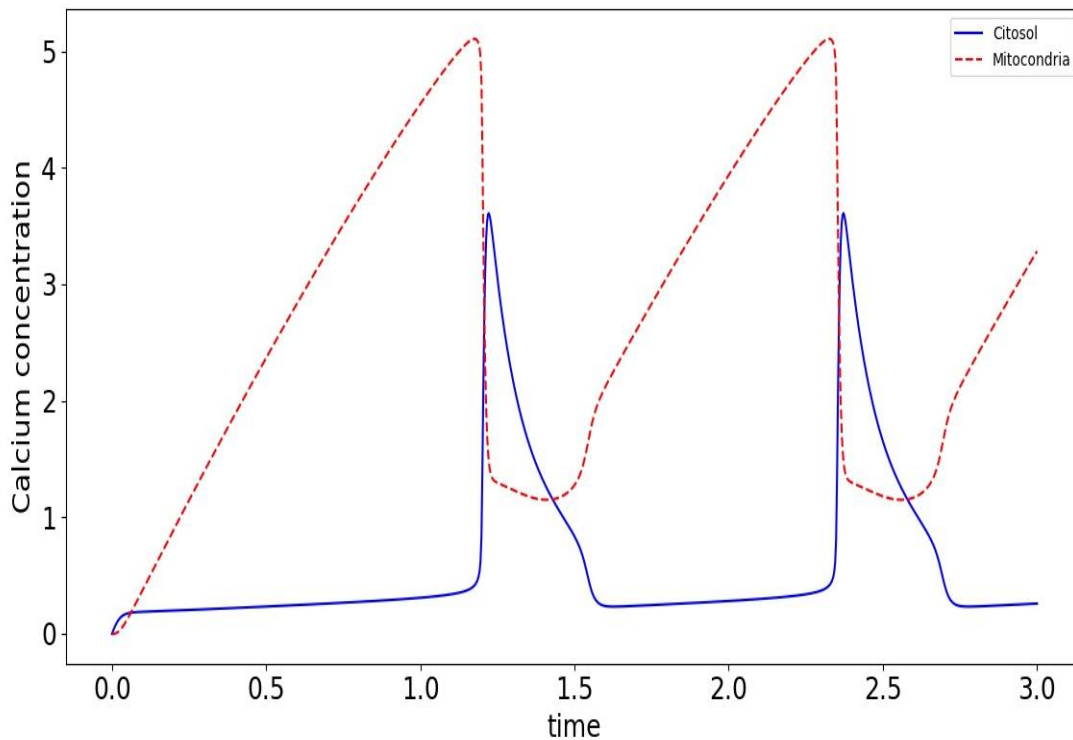


Figura 1. Grafica de la función que simula la dinámica de Ca^{2+} (alfa=p53w) ante terapia fotodinámica en una célula aislada.

Por otro lado en la gráfica obtenida cuando el valor de alfa es p53 mutado, el comportamiento es muy diferente, notando un incremento de la concentración de calcio en citosol mientras que en el retículo endoplásmico la concentración se mantiene a valores de casi cero como se puede ver en la figura 2. Esto es debido a la baja actividad de p53 en estado mutado, pues su capacidad para hacer llegar Ca^{2+} citosolico hacia el RE es muy baja, por lo que no se ve que exista un intercambio de concentraciones de Ca^{2+} .

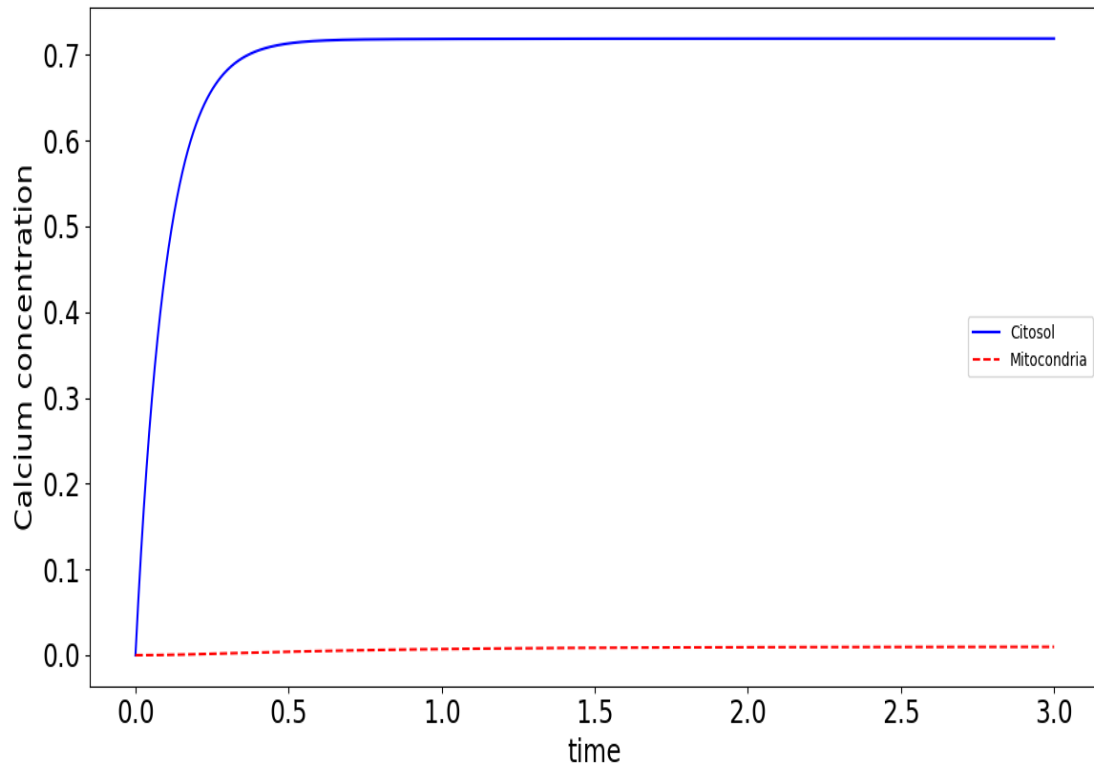


Figura 2. Grafica de la función que simula la dinámica de Ca^{2+} (alfa=p53m) ante terapia fotodinámica en una célula aislada

Sistema de ecuaciones diferenciales para dos células acopladas

$$\frac{d[Ca^{2+}]_1}{dt} = pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_1 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ + D * ([Ca^{2+}]_2 - [Ca^{2+}]_1)$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_1 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_2}{dt} = v_0 + v_1\beta - \alpha_2 * v_2 + v_3 + k_f Y - kZ$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_2 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

Donde:

$$\alpha_n = p53_w$$

$$\alpha_n = p53_m$$

En el sistema de ecuaciones se modela como es la interacción entre dos células acopladas. En este modelo de dos células acopladas se añaden nuevos términos de los ya añadidos en el modelo de una célula aislada. El término “fuga” y “D” como termino de difusión. “Fuga” es la variable que simula la salida de Ca^{2+} de las células después de que es liberado completamente de la mitocondria. “D” es la variable que simula la difusión en las células vecinas.

En el primer caso ambas células tienen valor de p53 no mutado, y con una primera ecuación con la constante “PDT” que simula la terapia fotodinámica, además se le añade un término de difusión “D”, para simular el paso de Ca^{2+} de la célula irradiada y la entrada de calcio al citosol de la segunda célula acoplada. La grafica de las funciones del sistema de ecuaciones se puede apreciar en la figura 3. Muestra como hay un incremento en los niveles de Ca^{2+} en RE, llega a un punto máximo y comienza a haber un intercambio rápido de Ca^{2+} del RE al citosol. Se ve que la segunda célula tiene concentraciones más bajas en el RE

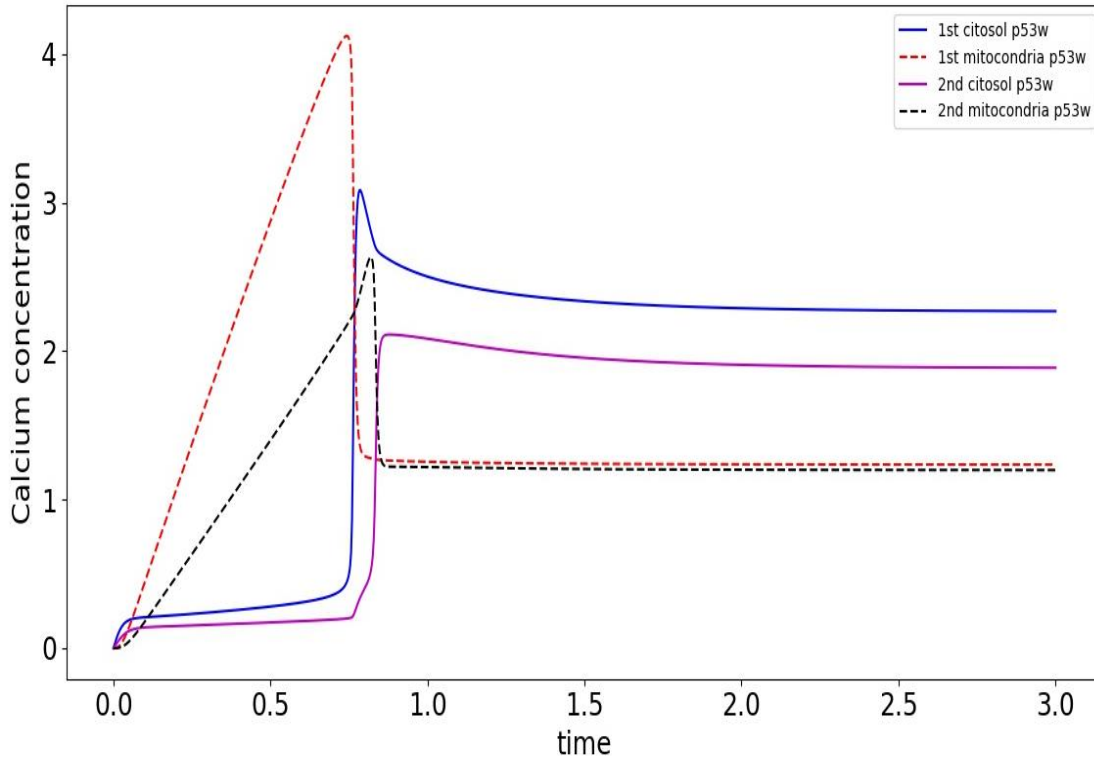


Fig 3. Grafica de las funciones que simulan el efecto de la terapia fotodinámica en el comportamiento de Ca^{2+} de dos células acopladas con p53w.

En el segundo caso se cambió en la segunda célula a p53 salvaje por p53 mutado. Se puede notar en la gráfica de la figura 4 que el calcio citosolico de la primera célula (con p53 salvaje) aumenta de manera muy lenta, mientras que la concentración de calcio en el RE aumenta más rápido, llega a un punto máximo y baja de manera brusca y la concentración de calcio citosolico crece también muy rápidamente. Mientras la simulación de la segunda célula, el calcio citosolico aumenta y la concentración de calcio del RE, se mantiene en niveles bajos.

En el último caso ambas células p53 salvaje fue cambiado por p53 mutado, por lo que las gráficas de las funciones de ambas ecuaciones muestran que las concentraciones de Ca^{2+} citosolico se eleven mientras que las concentraciones en el retículo endoplásmico se mantengan en niveles bajos como se muestra en la figura 5

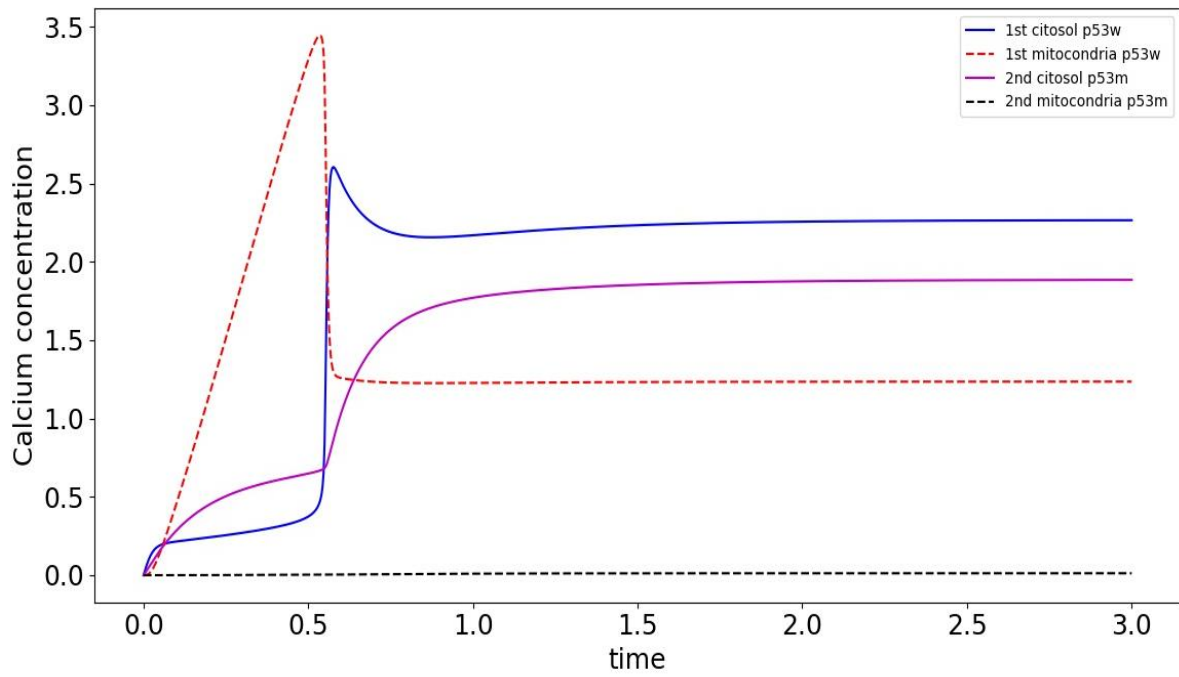


Fig 4. Grafica de las funciones que simulan el efecto de la terapia fotodinámica en el comportamiento de Ca^{2+} de dos células acopladas con p53 salvaje y mutado, respectivamente.

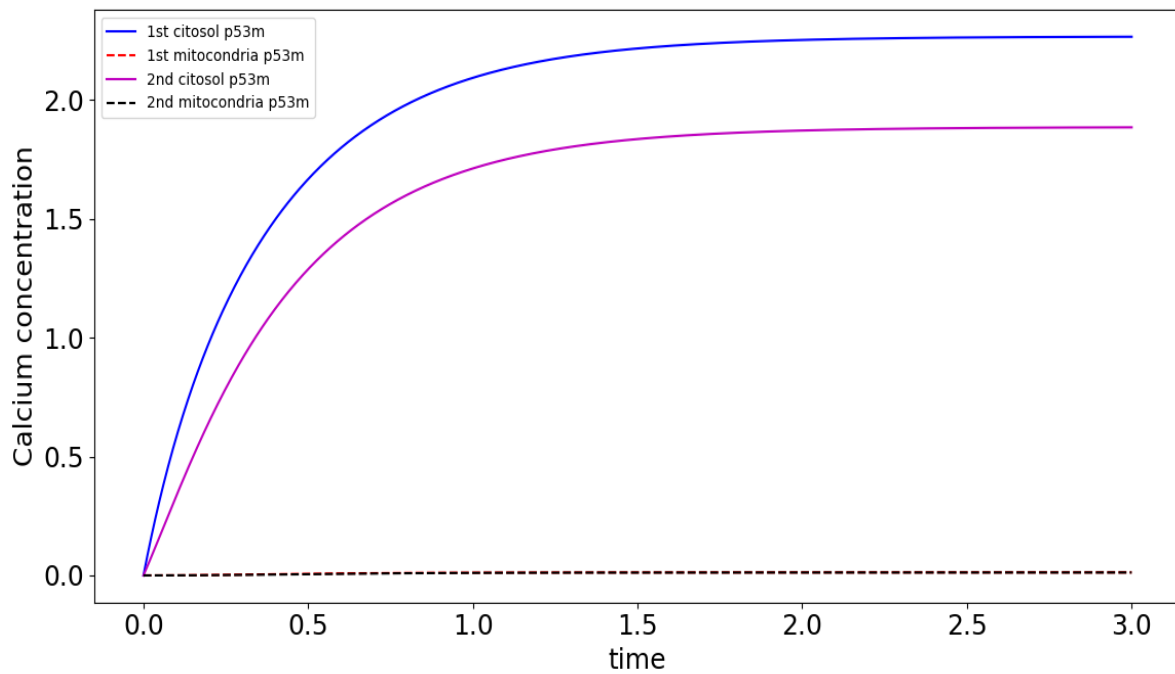


Fig. 5 Gráficas de las funciones que simulan el efecto de la terapia fotodinámica en el comportamiento de Ca^{2+} de dos células acopladas con p53m.

Sistema de ecuaciones diferenciales para ocho células acopladas con p53 no mutado

$$\begin{aligned} \frac{d[Ca^{2+}]_1}{dt} = & pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_1 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ + D \\ & * (v_0 * [Ca^{2+}]_2 - [Ca^{2+}]_1) + (v_0 * [Ca^{2+}]_3 - [Ca^{2+}]_2) \\ & + (v_0 * [Ca^{2+}]_4 - [Ca^{2+}]_3) + (v_0 * [Ca^{2+}]_5 - [Ca^{2+}]_4) \\ & + (v_0 * [Ca^{2+}]_6 - [Ca^{2+}]_5) + (v_0 * [Ca^{2+}]_7 - [Ca^{2+}]_6) \\ & + (v_0 * [Ca^{2+}]_8 - [Ca^{2+}]_7) \end{aligned}$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_1 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ca^{2+}]_2}{dt} = & pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_2 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_2 \\ & - [Ca^{2+}]_1) \end{aligned}$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_2 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ca^{2+}]_3}{dt} = & pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_3 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_3 \\ & - [Ca^{2+}]_2) \end{aligned}$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_3 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ca^{2+}]_4}{dt} = & pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_4 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_4 \\ & - [Ca^{2+}]_3) \end{aligned}$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_4 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\begin{aligned} \frac{d[Ca^{2+}]_5}{dt} = & pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_5 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_5 \\ & - [Ca^{2+}]_4) \end{aligned}$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_5 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_6}{dt} = pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_6 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_6 - [Ca^{2+}]_5)$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_6 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_7}{dt} = pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_7 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_7 - [Ca^{2+}]_6)$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_7 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_8}{dt} = pdt + v_0 + v_1\beta - \alpha_8 * v_2 + v_3 + k_f Y - fuga * kZ - D * ([Ca^{2+}]_8 - [Ca^{2+}]_7)$$

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_{ER}}{\Delta t} = \alpha_8 * v_2 - v_3 - k_f Y$$

Donde:

$$\alpha_n = p53_w$$

$$\alpha_n = p53_m$$

Todas las células tienen a p53 salvaje. Se puede apreciar en la figura 6 el incremento en la concentración de Ca^{2+} del RE hasta llegar a un punto máximo y descender rápidamente (sin llegar a cero), al contrario con la concentración de calcio en citosol, que crece de manera lenta para después incrementar rápidamente.

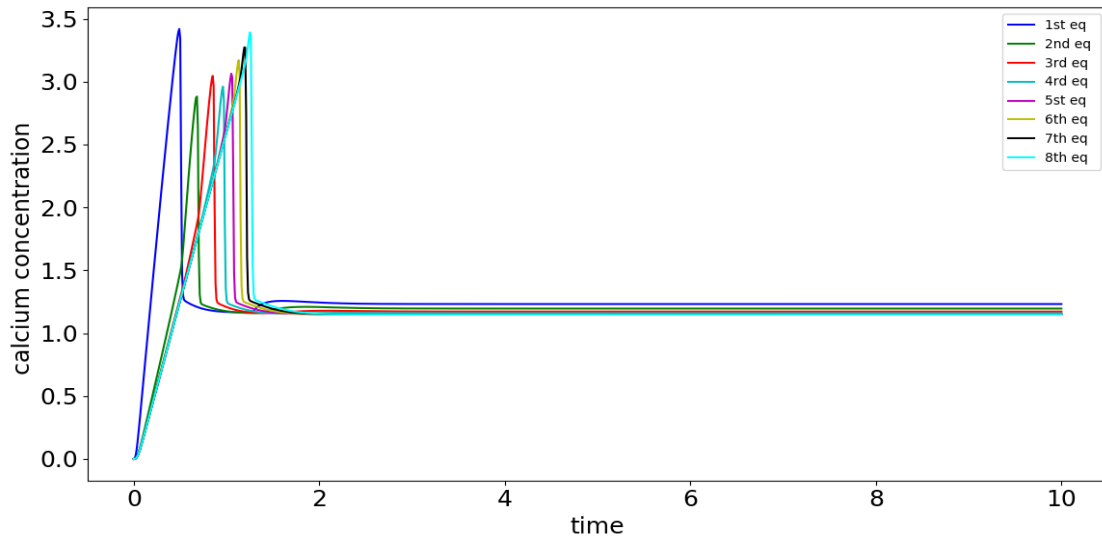


Figura 6. Gráficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} en RE con p53w ante terapia fotodinámica en ocho células acopladas.

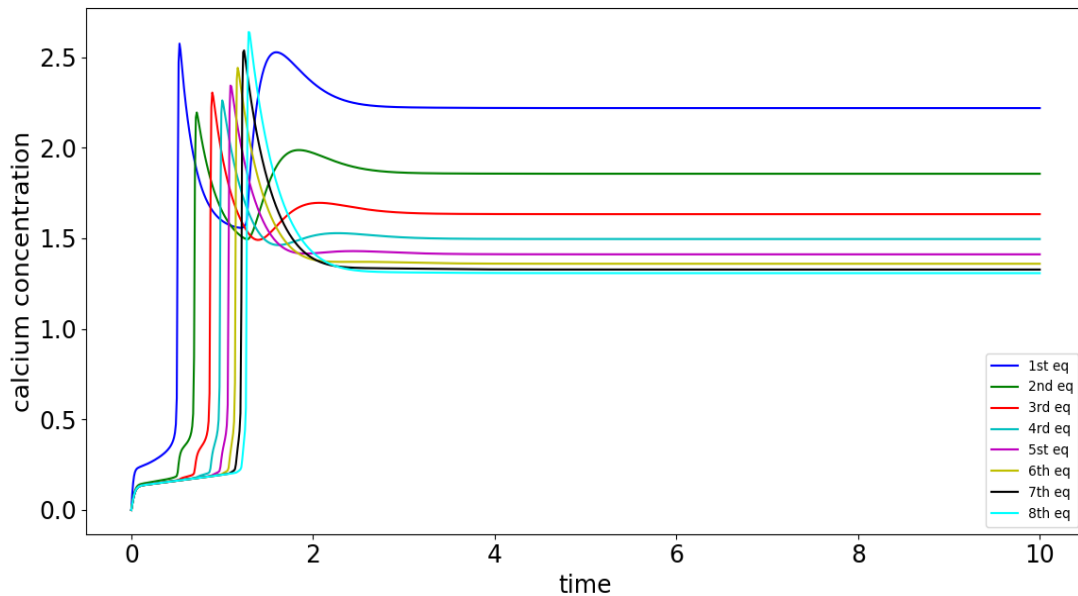


Figura 7. Gráficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} citosol con p53w ante terapia fotodinámica en ocho células acopladas

Esto muestra como es el intercambio de calcio de citosol a retículo por la actividad de p53.

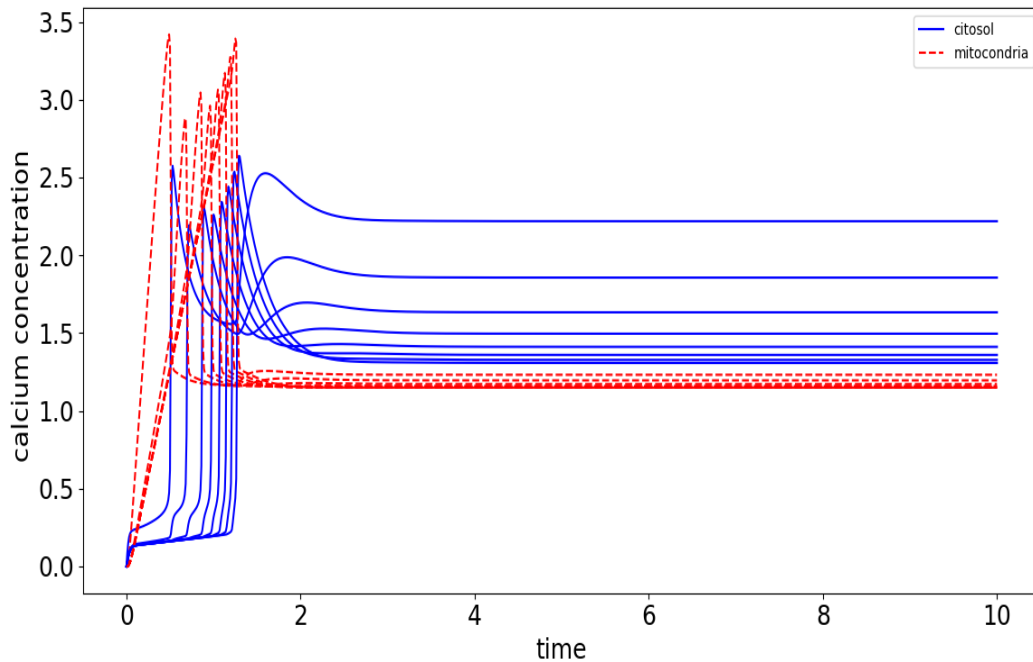


Figura 8. Gráficas de las funciones que simula la dinámica de Ca^{2+} en citosol/RE con p53w ante terapia fotodinámica en una célula aislada.

En la figura 8 están las gráficas de las ocho células con p53 salvaje, donde el intercambio de concentraciones de calcio entre el retículo endoplásmico y el citosol se aprecia con claridad

En la figura 11 se muestra el resultado de cambiar p53 en estado salvaje a p53 en estado mutado en las células 2,5 y 7. Esto generó que dichas ecuaciones tuvieran un comportamiento de altas concentraciones de calcio en el citosol mientras que en el retículo endoplásmico las concentraciones se encontraban en niveles bajos. Por lo contrario, las ecuaciones restantes mantienen el comportamiento “normal” de p53 en estado salvaje, teniendo el intercambio de calcio entre citosol/retículo.

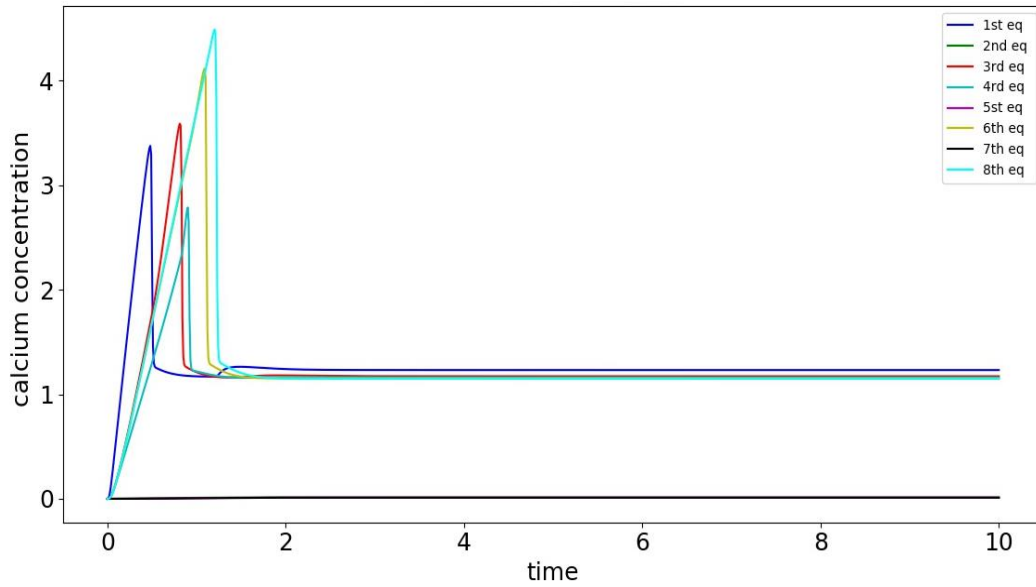


Figura 9. Gráficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} en RE con p53w y p53 m ante terapia fotodinámica en ocho células acopladas

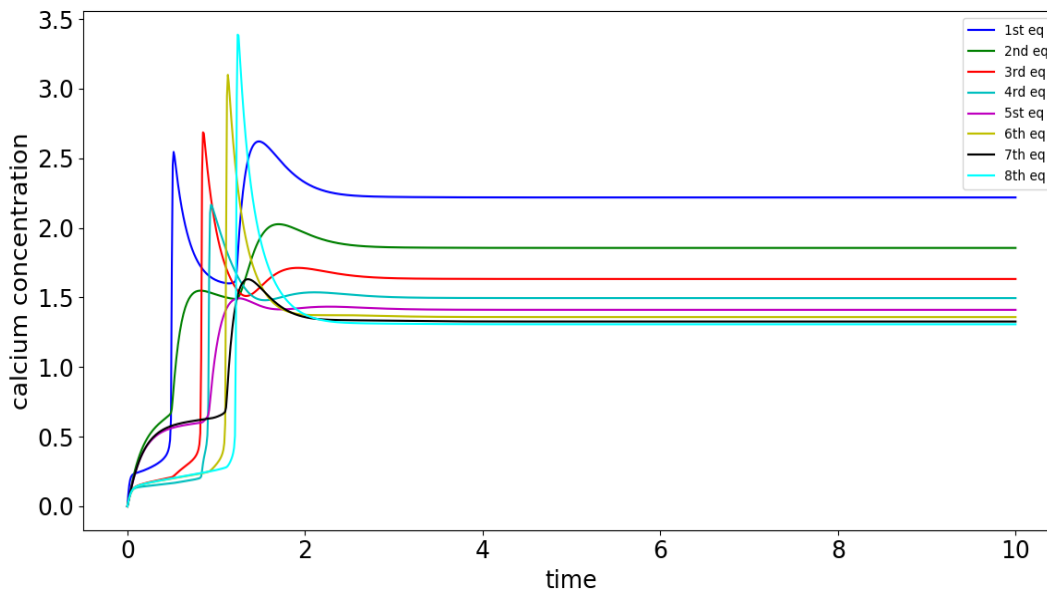


Figura 10. Gráficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} en citosol con p53w y p53 m ante terapia fotodinámica en ocho células acopladas

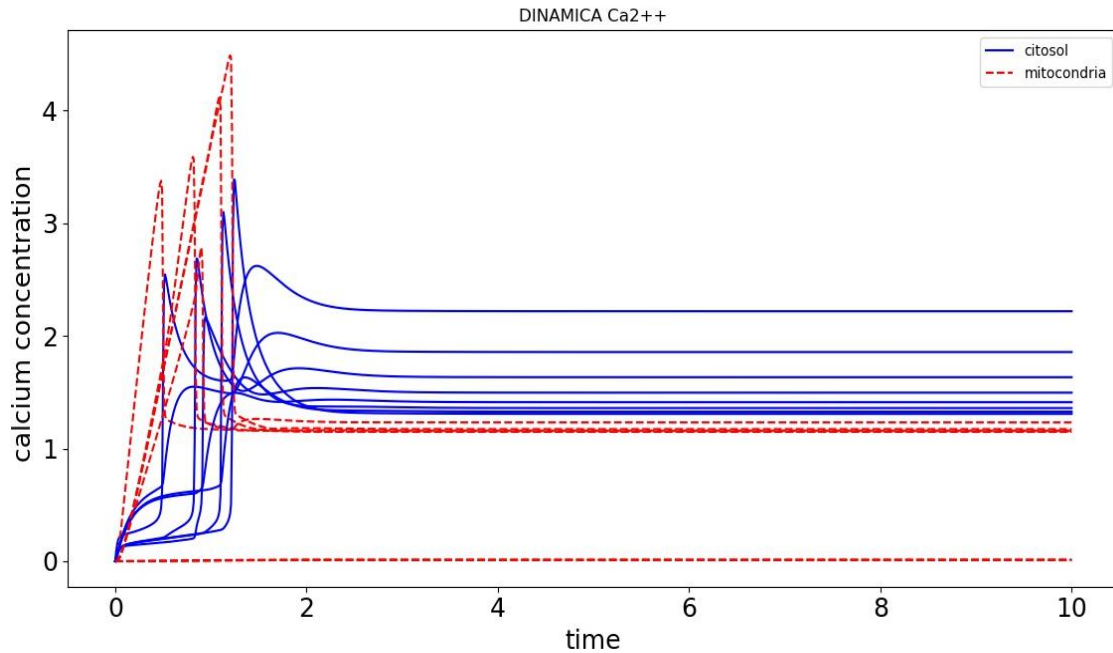


Figura 11. Graficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} en la célula con p53w y p53 m ante terapia fotodinámica en ocho células acopladas

Para finalizar, en todas las células fue cambiado el valor de alfa, de un valor que simula a p53 en estado salvaje a otro que simula p53 mutado. Lo que se ve en las gráficas de la figuras 12 y 13 son los comportamientos por la baja actividad de p53 en el sistema, mostrando un crecimiento elevado en la concentración de calcio citosolico, que va disminuyendo al paso de cada célula, mientras que en la concentración de calcio en el retículo endoplásmico se ve también que hay un leve incremento en la concentración de calcio que de igual forma al paso de cada célula, la concentración de calcio haciendo más pequeña.

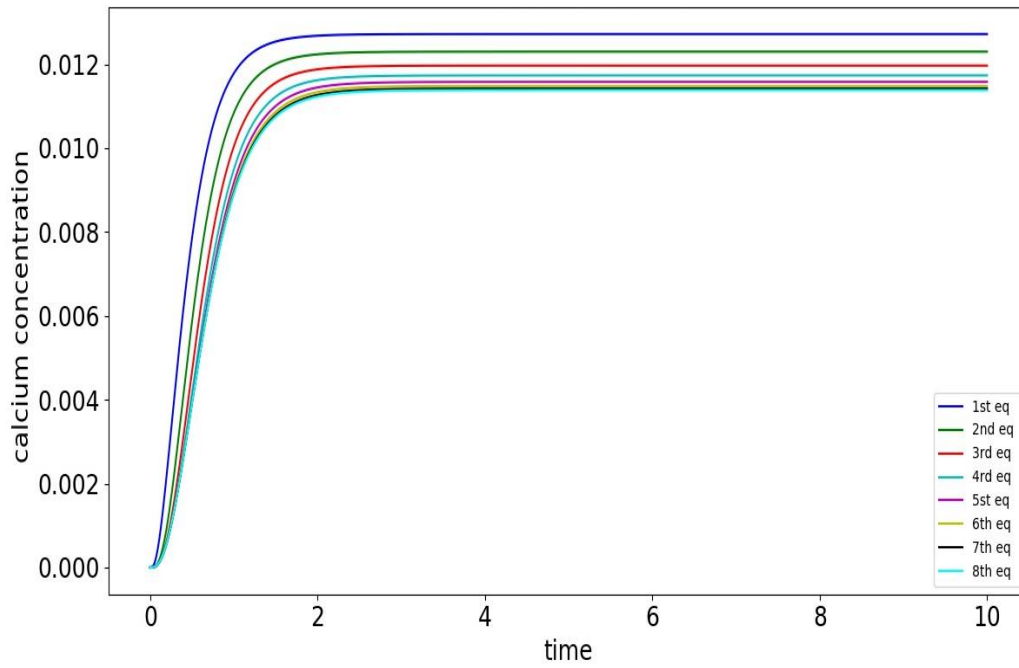


Figura 12. Graficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca en retículo endoplásmico de ocho células acopladas con p53m ante terapia fotodinámica

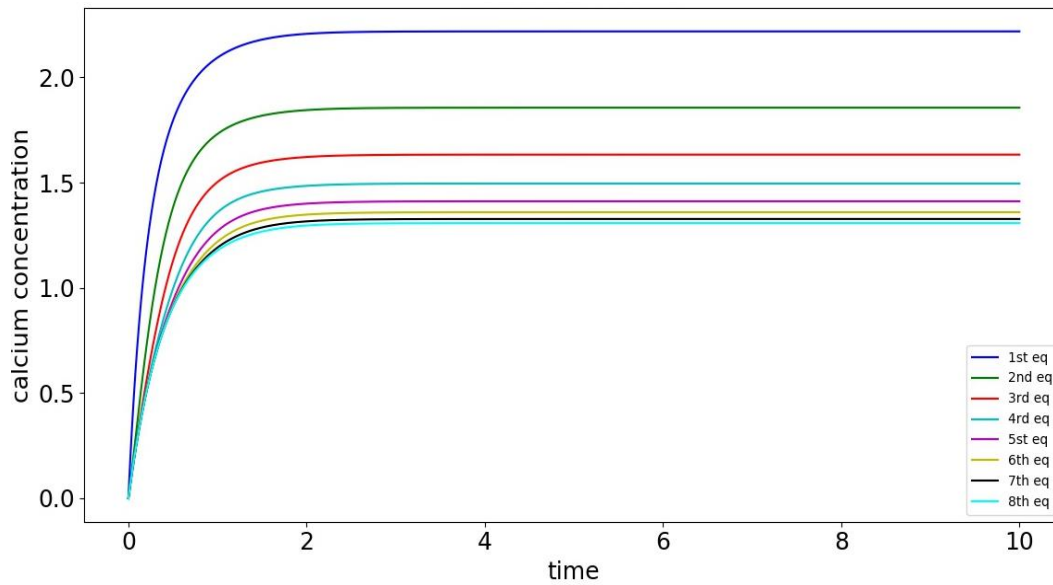


Figura 13. Graficas de las funciones que simulan la dinámica de Ca^{2+} en el citosol de ocho células acopladas con p53m ante terapia fotodinámica

Para hacerlo más visible, la figura 14 muestra las gráficas de las concentraciones que simulan la concentración de calcio en citosol y en el retículo endoplásmico. Se ve la diferencia entre los niveles de calcio entre estos dos sitios, mientras calcio citosolico crece de manera notoria, calcio del retículo endoplásmico se mantiene en niveles bastantes bajos para no hacer el recambio de calcio que se ve cuando hay p53 salvaje.

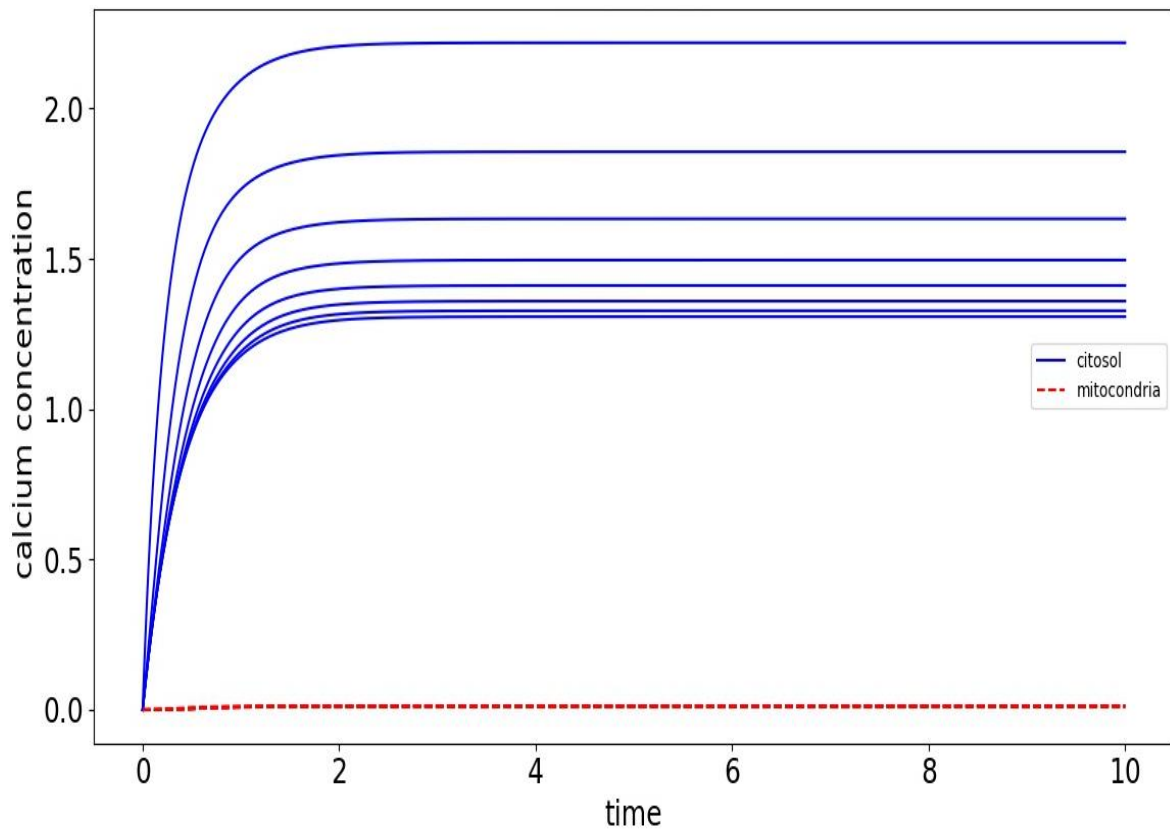


Figura 14. Graficas de las ocho ecuaciones que simulan la dinámica de calcio en el citosol y RE con p53 mutado ante terapia fotodinamica

Conclusiones:

De las simulaciones se observa el efecto de la actividad de p53 citosólico en estado no mutado ante la terapia fotodinámica (PD tiene una función importante en la propagación de la señal de calcio intracelular entre el citosol y la mitocondria. La literatura menciona la importancia de p53 citosólico en dos tareas fundamentales. La primera es que p53 hace que se lleve Ca^{2+} del citosol hacia el retículo mediante la interacción con la bomba SERCA, llevándola de un estado inactivo a un estado activo, potenciando la entrada del ion al organelo. La segunda función es la interacción que tienen en el complejo ER/MAM, acumulándose en los dominios especializados del complejo para modular la homeostasis de Ca^{2+} del RE hacia la mitocondria que la lleva a la sobrecarga de Ca^{2+} , liberación de citocromo C y un posterior proceso apoptótico.

Se puede ver en el modelo que la célula blanco tratada con terapia fotodinámica tiene un intercambio de Ca^{2+} del citosol a la mitocondria, que al saturarse colapsa y el Ca^{2+} almacenado pasa de nuevo al citosol que difunde a las células vecinas por las uniones tipo GAP que existen entre ellas en la masa tumoral. La entrada de Ca^{2+} al citosol de las células vecinas con presencia de p53 en estado salvaje lleva al mismo proceso de intercambio entre concentraciones del citosol y la mitocondria, lo que lleva a la saturación de Ca^{2+} en el organelo como sucedió en la célula blanco, lo que conlleva a procesos de muerte celular en cadena dentro del tumor, lo que es el llamado proceso observador.

De manera contraria, en las simulaciones de células que contienen p53 mutado, el crecimiento en niveles de Ca^{2+} citosólico ocurre pero no hay un aumento considerable en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial, lo que indica que desencadenar un proceso apoptótico se dificulta.

Así, estas simulaciones dan más evidencia sobre el papel de p53 en el proceso del efecto observador ante terapia fotodinámica y las consecuencias de tener p53 mutado en este proceso.

DISCUSIÓN:

La dinámica del ion calcio juega un papel determinante en las células en todas las etapas del desarrollo (Clapham, D. E. 2007.) Por lo que abunda la existencia de una amplia bibliografía sobre experimentos y modelados matemáticos de la dinámica del ion calcio en diferentes tipos tisulares. Sin embargo los estudios *in vitro* e *in vivo* que se tienen de la dinámica de calcio en células cancerígenas son muy escasos.

p53 citosolico y su papel como regulador de calcio en la apoptosis.

La actividad de p53 citosolico en el proceso de apoptosis es demostrada en los dos trabajos de Carlota G y colaboradores. En el primer trabajo publicado, demuestran la actividad que tiene p53 citosolico en la regulación de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y la mitocondria, como es su unión en los complejos formados entre ambos organelos y como se ve afectado este comportamiento en p53 mutado. Todo esto fue estudiado mediante fármacos y sustancias (H_2O_2) para la generación de estrés celular. Los resultados muestran como es p53 el encargado de llevar a cabo el proceso de apoptosis mediante el acarreo de calcio desde el retículo hacia la mitocondria para su sobrecarga y posterior liberación de citocromo c.

En un trabajo posterior del mismo equipo de trabajo, pero ahora en un experimento *in vivo* en un modelo murino con el uso de un fotosensor y luz se verificó lo mismo que en el anterior trabajo; la actividad de p53 en estado salvaje es el responsable de la liberación de calcio intracelular y de su acarreamiento hacia la mitocondria, su lisis y la liberación de citocromo c, necesario como “disparador” de las señales apoptóticas. De la misma manera, en el modelado matemático realizado en este trabajo para simular la dinámica de calcio ante terapia fotodinámica, también se pudo notar el papel que tiene p53 en el comportamiento de las curvas de las concentraciones de calcio citosolico, su importancia en la regulación de calcio dentro de los organelos intracelulares, pues los cambios en los niveles de calcio citosolico y de retículo/mitocondria con valores de p53 mutado y no mutado eran bastante notorias

Dinámica de Ca y su importancia en el proceso apoptótico y efecto observador

El trabajo de B. Cali y colaboradores es importante pues no solamente ve la dinámica del ion calcio en una célula aislada, sino que plantea el efecto observador generado por la absorción de luz por una molécula fotosensor (AIClpc), donde también señala la importancia de las uniones tipo GAP para que se sea posible tal efecto, dando como resultado la difusión de calcio a las células vecinas.

Sus resultados sobre el daño focal que provoca la terapia fotodinámica con el uso del fotosensor con centro aluminio/cloro muestran que en la célula irradiada el incremento de calcio intracelular se eleva mostrando un pico que llega casi a los 0.4 moles de calcio, después en las células ubicadas a una distancia de 22 micrómetros se eleva un poco más que en la célula irradiada para que después a distancia cada vez más alejada de la célula irradiada, las concentraciones de calcio van disminuyendo cada vez más. Estos resultados comparados con los resultados obtenidos con la simulación de este trabajo muestran una amplia similitud en el comportamiento de calcio que obtuvieron en el trabajo de B. Cali y colaboradores. Muestra similitud en términos cualitativos, es decir, en los comportamientos que tienen las curvas, pues aunque se asignaron valores propuestos en el modelo de Golbetter, cuantitativamente los resultados fueron diferentes.

Estas diferencias en los valores que se obtuvieron en este trabajo y los encontrados en el trabajo de B. Cali pueden deberse a que no todos los parámetros que se encuentran en una célula cancerígena son usados como variables dentro de las ecuaciones. Valores no tomados en cuenta como el potencial de membrana y el intercambio de los iones de calcio, la tasa en que se forma IP3 mediante su precursor PIP2, la densidad de poros de transición mitocondriales para la entrada de Ca^{2+} , la transición del cambio de actividad de la bomba SERCA del retículo endoplásmico, la velocidad en la que viaja el calcio en el ambiente intracelular y la cantidad de células que están acopladas unas con otras dentro de un tumor.

Importancia de las uniones tipo GAP en el efecto observador.

Como ya se había mencionado con anterioridad, las uniones tipo GAP en las células son de gran importancia para el intercambio iónico (Gulistan Mese. 2007). Así, la experimentación en el bloqueo de tales canales muestra que juegan un papel importante dentro de la terapia fotodinámica, pues al inhibir el flujo de calcio a las células vecinas por el bloqueo farmacológico de las uniones tipo GAP, el efecto observador se vería completamente mermado, como se vio también en el trabajo de B. Cali. Por lo que aunque p53 estuviera en estado salvaje, la terapia fotodinámica sería ineficaz.

Aunque el objetivo del presente trabajo fue la de observar cualitativamente el comportamiento de calcio por la actividad de p53 en sus estados mutados y salvaje, también se pueden simular otros fenómenos, como la inhibición de las GAP junction mediante el cambio de valor a cero en el término de difusión. También dando valores distintos a la constante PDT, que simula la actividad del fotosensor, aumentando dicho valor, se podría simular un mejor efecto del fotosensor dentro de la terapia.

BIBLIOGRAFIA.

1. Berridge, M. J. and A. Galione (1988) Cytosolic calcium oscillators, *FASEB Journal*. 2: 3074–3082.
2. Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4: 517–529.
3. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The lancet oncology*, 13(8), 790-801.
4. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The lancet oncology*, 13(8), 790-801.
5. Brunton, L., Chabner, B., Higuera Murilo, A., Knollmann, B., & Pérez Tamayo Ruíz, A. (2011). Las bases farmacológicas de la terapéutica (12th ed., pp. 1667-1670). México D.F. (México): McGraw Hill Educación.
6. Carafoli, E. (1979). The calcium cycle of mitochondria. *FEBS letters*, 104(1), 1-5.
7. Carafoli, E. (2002). Calcium signaling: A tale for all seasons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(3), 1115-1122. doi: 10.1073/pnas.032427999 (5,1)
8. Carafoli, E. (2003). The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(4), 326-332. doi: 10.1038/nrm1073 (5,2)
9. Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293.
10. Charles, A. C., J. E. Merrill, E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate, *Neuron*. 6: 983–992.
11. Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.
12. Cooper, G., & Hausman, R. (2011). La célula (pp. 725, 726, 729). Madrid: Marbán.

13. Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling, *Science*. 247: 470–473.
14. Crompton, M., Virji, S., Doyle, V., Johnson, N., & Ward, J. M. (1999, September). The mitochondrial permeability transition pore. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 66, pp. 167-179). Portland Press Limited.(6,37)
15. DeLuca, H. F., & Engstrom, G. W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(11), 1744.
16. Dupont G. Goldbeter A. (1992) Oscillations and waves cytosolic Ca²⁺: Insights from theoretical models. *BioEssays*, 14,485-493.
17. El-Deiry, W. (2003). The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*, 22(47), 7486-7495. doi: 10.1038/sj.onc.1206949
18. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
19. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
20. Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., Missiroli, S., Poletti, F., & Suski, J. et al. (2015). p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(6), 1779-1784. doi: 10.1073/pnas.1410723112 (4.)
21. Goldbeter A. Dupont G. Betrldge MJ. (1990) Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc.*
22. Green, D., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. *Nature*, 458(7242), 1127-1130. doi: 10.1038/nature07986

23. Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, *400*(6743), 464.
24. Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, *82*(3), 415-424.(6,32)
25. Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, *82*(3), 415-424.
26. Halestrap, A. P., Kerr, P. M., Javadov, S., & Woodfield, K. Y. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1366*(1-2), 79-94.(6,36)
27. Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
28. Haupt, S. (2003). Apoptosis - the p53 network. *Journal Of Cell Science*, *116*(20), 4077-4085. doi: 10.1242/jcs.00739
29. Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K., & Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes & Development*, *9*(17), 2170-2183. doi: 10.1101/gad.9.17.2170 (4,18)
30. Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, *420*(1), 25-27.
31. Ingalls, B. (2012). Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction. *Applied Mathematics, University of Waterloo*. [7]
32. Ingalls, B. (2012). Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction. *Applied Mathematics, University of Waterloo*.
33. Jiang, S., Chow, S. C., Nicotera, P., & Orrenius, S. (1994). Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca²⁺-ATPase inhibitor thapsigargin. *Experimental cell research*, *212*(1), 84-92.
34. Keener, J., & Sneyd, J. (2009). *Mathematical physiology*. New York, NY: Springer-Verlag New York.
35. Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, *427*(6972), 360.

36. Kubbutat, M. H., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), 299.
37. Lacroix, M., Toillon, R., & Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 293-325. doi: 10.1677/erc.1.01172
38. Leonard, J. P., & Salpeter, M. M. (1979). Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *The Journal of cell biology*, 82(3), 811-819.(6,2)
39. Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM (2007) Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J* 26(4):923–934.
40. Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2516-2524.
41. Moll, U., Wolff, S., Speidel, D., & Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current Opinion In Cell Biology*, 17(6), 631-636. doi: 10.1016/j.ceb.2005.09.007 (4,6)
42. Nelson, K. R., Ray, J. M., Wilson, D., & Davis, D. G. (1990). Motor unit potential analysis in carnitine palmitoyl transferase deficiency. *Journal of child neurology*, 5(4), 350-351.
43. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Calcium: Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552.
44. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1259-1263.(6.55)
45. Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, 3(1), 994-1013. doi: 10.3390/cancers3010994
46. Photodynamic Therapy for Cancer. (2019). Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/photodynamic-fact-sheet>
47. Prins, D., & Michalak, M. (2011). Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 3(3), a004069-a004069. doi: 10.1101/cshperspect.a004069 (5,3)

48. Robb-Gaspers, L. D. and A. P. Thomas (1995) Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver, *Journal of Biological Chemistry*. 270: 8102–8107.
49. Roderick, H. L., Berridge, M. J., & Bootman, M. D. (2003). Calcium-induced calcium release. *Current Biology*, 13(11), R425.
50. Sanderson, M. J., A. C. Charles and E. R. Dirksen (1990) Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca²⁺ in epithelial cells, *Cell Regulation*. 1: 585–596.
51. Saris, N. E. L., & Allshire, A. (1989). [8] Calcium ion transport in mitochondria. In *Methods in enzymology* (Vol. 174, pp. 68-85). Academic Press.
52. Schanne, F. A., Kane, A. B., Young, E. E., & Farber, J. L. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 206(4419), 700-702. (6,3)
53. Sionov, R., & Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18(45), 6145-6157. doi: 10.1038/sj.onc.1203130
54. Sorrentino, G., Mioni, M., Giorgi, C., Ruggeri, N., Pinton, P., Moll, U., ... & Del Sal, G. (2013). The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53. *Cell death and differentiation*, 20(2), 198.
55. Thor, H., Hartzell, P., & Orrenius, S. (1984). Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6612-6615. (6,29)
56. Tsunoda Y. (1991) Oscillatory Ca²⁺ signaling and its cellular function. *New Biol.*, 3.3-17.
57. Vasington, F. D., & Murphy, J. V. (1962). Ca⁺⁺ uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 237(8), 2670-2677.
58. Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-310. doi: 10.1038/35042675
59. Vousden, K., & Lane, D. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 275-283. doi: 10.1038/nrm2147

60. Wertz, I. E., & Dixit, V. M. (2000). Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11470-11477.

9. Anexo.

Tabla 1

α_n p53 salvaje	2.5
p53 mutado	0.0006
pdt	2
v_0	1
β	0.3
$v_1\beta$	7.3
v_2	65
v_3	500
k_f	1
k	5
Z	0
$fuga$	0.5
D	2

Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de una celula aisladas en lenguaje Python.

```
from scipy.integrate import odeint
import numpy as np
from pylab import * # for plotting commands
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
matplotlib.rc('xtick', labels=18)
matplotlib.rc('ytick', labels=18)
matplotlib.rc('axes', labels=18)

#Parametros:
Vm2 = 65
Vm3 = 500
ni0 = 1.
ni1 = 7.3
beta = .30
n = 2.
m = 2.
p = 4
k = 10.
kf = 1.
K2 = 1.
KR = 2.
KA = 0.9
PDT=2
p53w=2.5
p53m=.0006
```

#Condiciones iniciales

Zi = 0

Yi = 0.

Z2i= 0

Y2i= 0.

#El sistema

def system(y,t):

 Z1=y[0]

 Y1=y[1]

 Z2=y[2]

 Y2=y[3]

 def ni2(Z):

 return Vm2*(pow(Z,n)/(pow(K2,n) + pow(Z,n)))

 def ni3(Z,Y):

 return

Vm3*(pow(Y,m)/(pow(KR,m)+pow(Y,m)))*pow(Z,p)/(pow(KA,p)+pow(Z,p))

dZ1 = PDT+ni0 + ni1 *beta - p53w* ni2(Z1) + ni3(Z1,Y1) + kf*Y1- k*Z1

dY1 = p53w*ni2(Z1) - ni3(Z1,Y1) - kf*Y1

dZ2 = PDT+ ni0 + ni1 *beta - p53m*ni2(Z2) + ni3(Z2,Y2) + kf*Y2- k*Z2 #- (Z2
- Z1)

dY2 = p53m*ni2(Z2) - ni3(Z2,Y2) - kf*Y2

return np.array([dZ1,dY1,dZ2,dY2])

```
time = np.linspace(0.0,3.0,1000)
y1=odeint(system,[ Zi, Yi, Z2i, Y2i],time)
```

```
plt.figure(1)
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('Calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,0],'b',label='Citosol')
plt.plot(time,y1[:,1],'--r',label='Mitochondria')
plt.legend()
```

```
plt.figure(2)
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('Calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,2],'b',label='Citosol')
plt.plot(time,y1[:,3],'--r',label='Mitochondria')
plt.legend()
```

```
plt.show()
```

Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de dos células acopladas en lenguaje Python.

```
from scipy.integrate import odeint
import numpy as np
from pylab import * # for plotting commands
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
matplotlib.rc('xtick', labelsize=18)
matplotlib.rc('ytick', labelsize=18)
matplotlib.rc('axes', labelsize=18)

#Parametros:
p53w =2.5
p53m = 0.0006
Vm2 = 65 # Maxima taza de bombeo de Ca al los reservorios!!!!
Vm3 = 500 # Maxima taza de bombeo de Ca al citosol
ni0 = 1. # Entrada de Ca extraceluar a el citosol
ni1 = 7.3 # Liberacion de Ca al citosol por modulacion de IP3 en picinas sensibles
a IP3
beta = .30 # Funcion de saturacion de los receptores a IP3
n = 2. #Coeficiente de Hill
m = 2 #Coeficiente de Hill
p = 4 #Grado de cooperatividad en proceso de activacion
k = 5 # 10. #Salida de Ca del citosol
ku =20
kf = 1 # Fuga pasiva de Y a Z
K2 = 1. #Constante de bombeo
KR = 2. # Constante de liberacion
KA = 0.9 # Constane de activacion
```

```

D=2      #Termino de difusion
TFD = 2
fuga=0.5  #Salida de Ca2+ despues de su salida de la mticondria por las GAP
#Condiciones iniciales
Zi = 0.
Yi = 0.
Z2i= 0
Y2i= 0.
#El sistema
def system(y,t):
    Z1=y[0]
    Y1=y[1]
    Z2=y[2]
    Y2=y[3]

    def ni2(Z):
        return Vm2*(pow(Z,n)/(pow(K2,n) + pow(Z,n)))
    def ni3(Z,Y):
        return
Vm3*(pow(Y,m)/(pow(KR,m)+pow(Y,m)))*pow(Z,p)/(pow(KA,p)+pow(Z,p))

    dZ1 = TFD + ni0 + ni1 * beta - p53w*ni2(Z1) + ni3(Z1,Y1) + kf*Y1 - fuga*k *Z1
+D*(ni0*(Z2-Z1))
    dY1 = p53w*ni2(Z1) - ni3(Z1,Y1) - kf*Y1

    dZ2 = ni0 + ni1 *beta - p53w*ni2(Z2) + ni3(Z2,Y2) + kf*Y2- fuga* k*Z2 -
D*(ni0*(Z2 - Z1))
    dY2 = p53w*ni2(Z2) - ni3(Z2,Y2) - kf*Y2

    return np.array([dZ1,dY1,dZ2,dY2])

```

```
time = np.linspace(0.0,3.0,1000)
y1=odeint(system,[ Zi, Yi, Z2i, Y2i],time)
```

```
plt.figure(1)
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('Calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,0],'b',label='Citosol')
plt.plot(time,y1[:,1],'--r',label='ER')
plt.legend()
```

```
plt.figure(2)
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('Calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,2],'b',label='Citosol')
plt.plot(time,y1[:,3],'--r',label='ER')
plt.legend()
```

```
plt.figure(3)
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('Calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,0],'b',label='1st citosol p53w')
plt.plot(time,y1[:,1],'--r',label='1st mitocondria p53w')
plt.plot(time,y1[:,2],'m',label='2nd citosol p53w')
plt.plot(time,y1[:,3],'--k',label='2nd mitocondria p53w')
plt.legend()
```

```
plt.show()
```

Código utilizado para resolver numéricamente el sistema de ecuaciones del modelo de ocho células acopladas en lenguaje Python.

```

from scipy.integrate import odeint
import numpy as np
from pylab import * # for plotting commands
import matplotlib
import matplotlib.pyplot as plt
from mpl_toolkits.mplot3d import Axes3D
matplotlib.rc('xtick', labelsizes=18)
matplotlib.rc('ytick', labelsizes=18)
matplotlib.rc('axes', labelsizes=18)

#Parametros:
p53w = 2.5
p53m = 0.0006
Vm2 = 65 # Maxima tasa de bombeo de Ca al los reservorios!!!!
Vm3 = 500 # Maxima tasa de bombeo de Ca al citosol
ni0 = 1. # Entrada de Ca extracelular a el citosol
ni1 = 7.3 # Liberacion de Ca al citosol por modulacion de IP3 en picinas sensibles
a IP3
beta = .30 # Funcion de saturacion de los receptores a IP3
n = 2. #Coeficiente de Hill
m = 2 #Coeficiente de Hill
p = 4 #Grado de cooperatividad en proceso de activacion
k = 5. # 10. #Salida de Ca del citosol
ku =20
kf = 1 # Fuga pasiva de Y a Z
K2 = 1.2 #Constante de bombeo
KR = 1. # Constante de liberacion
KA = 0.9 # Constane de activacion
D=2 #5
D1=11
D2=10

```

D3=8
TFD = 2
fuga = .5

#Condiciones iniciales

Zi = 0

Yi = 0

Z2i= 0.

Y2i= 0.

Z3i = 0

Y3i = 0

Z4i= 0.

Y4i= 0.

Z5i= 0

Y5i= 0

Z6i= 0

Y6i= 0

Z7i= 0

Y7i= 0

Z8i= 0

Y8i= 0

#El sistema

def system(y,t):

 Z1=y[0]

 Y1=y[1]

 Z2=y[2]

 Y2=y[3]

 Z3=y[4]

 Y3=y[5]

 Z4=y[6]

 Y4=y[7]

Z5=y[8]
 Y5=y[9]
 Z6=y[10]
 Y6=y[11]
 Z7=y[12]
 Y7=y[13]
 Z8=y[14]
 Y8=y[15]

```
def ni2(Z):
    return Vm2*(pow(Z,n)/(pow(K2,n) + pow(Z,n)))
```

```
def ni3(Z,Y):
    return
```

```
Vm3*(pow(Y,m)/(pow(KR,m)+pow(Y,m)))*pow(Z,p)/(pow(KA,p)+pow(Z,p))
```

```
dZ1 = TFD + ni0 + ni1 *beta - p53w * ni2(Z1) + ni3(Z1,Y1) + kf*Y1- fuga*k*Z1 +
D*(ni0*(Z2 - Z1) + (ni0*(Z3-Z2)) + (ni0*(Z4-Z3))+ (ni0*(Z5 - Z4)) + (ni0*(Z6-Z5)) +
(ni0*(Z7-Z6))+(ni0*(Z8-Z7)))
```

#V0 + V1B - Z2 + z3 +kfy - kz +difusion

```
dY1 = p53w*ni2(Z1) - ni3(Z1,Y1) - kf*Y1
```

```
dZ2 = ni0 + ni1 * beta - p53w *ni2(Z2) + ni3(Z2,Y2) + kf*Y2- fuga*k*Z2 - D*ni0*(Z2
- Z1)
```

```
dY2 = p53w*ni2(Z2) - ni3(Z2,Y2) - kf*Y2
```

```
dZ3 = ni0 + ni1 * beta - p53w * ni2(Z3) + ni3(Z3,Y3) + kf*Y3- fuga*k*Z3 - D*ni0*(Z3-
Z2)
```

```
dY3 = p53w*ni2(Z3) - ni3(Z3,Y3) - kf*Y3
```

```
dZ4 = ni0 + ni1 * beta - p53w*ni2(Z4) + ni3(Z4,Y4) + kf*Y4- fuga*k*Z4 - D*(ni0*(Z4-
Z3))
```

```
dY4 = p53w*ni2(Z4) - ni3(Z4,Y4) - kf*Y4
```

```

dZ5 = ni0 + ni1 *beta - p53w *ni2(Z5) + ni3(Z5,Y5) + kf*Y5- fuga*k*Z5 - D*(ni0*(Z5
- Z4))

```

```

#V0 + V1B - Z2 + z3 +kfy - kz +difusion

```

```

dY5 = p53w*ni2(Z5) - ni3(Z5,Y5) - kf*Y5

```

```

dZ6 = ni0 + ni1 *beta - p53w * ni2(Z6) + ni3(Z6,Y6) + kf*Y6- fuga*k*Z6 - D*(ni0*(Z6
- Z5))

```

```

dY6 = p53w*ni2(Z6) - ni3(Z6,Y6) - kf*Y6

```

```

dZ7 = ni0 + ni1 *beta - p53w * ni2(Z7) + ni3(Z7,Y7) + kf*Y7- fuga*k*Z7 - D*(ni0*(Z7-
Z6))

```

```

dY7 = p53w*ni2(Z7) - ni3(Z7,Y7) - kf*Y7

```

```

dZ8 = ni0 + ni1 *beta - p53w * ni2(Z8) + ni3(Z8,Y8) + kf*Y8- fuga*k*Z8 - D*(ni0*(Z8-
Z7))

```

```

dY8 = p53w *ni2(Z8) - ni3(Z8,Y8) - kf*Y8

```

```

return

```

```

np.array([dZ1,dY1,dZ2,dY2,dZ3,dY3,dZ4,dY4,dZ5,dY5,dZ6,dY6,dZ7,dY7,dZ8,dY8]
)

```

```

time = np.linspace(0.0,2.0,1000)

```

```

y1=odeint(system,[Zi,Yi,Z2i,Y2i,Z3i,Y3i,Z4i,Y4i,Z5i,Y5i,Z6i,Y6i,Z7i,Y7i,Z8i,Y8i],time
)

```

```

plt.figure(9)

```

```

plt.title("DINAMICA Ca2++ MITOCONDRIA")

```

```

plt.xlabel('time')

```

```

plt.ylabel('calcium concentration ')

```

```

plt.plot(time,y1[:,1],"b",label= "1st eq")
plt.plot(time,y1[:,3],'g',label= '2nd eq ')
plt.plot(time,y1[:,5],'r',label= '3rd eq ')
plt.plot(time,y1[:,7],'c',label= '4rd eq ')
plt.plot(time,y1[:,9],"m",label= "5st eq ")
plt.plot(time,y1[:,11],'y',label= '6th eq ')
plt.plot(time,y1[:,13],'k',label= "7th eq ")
plt.plot(time,y1[:,15],'cyan',label= '8th eq')
plt.legend()

```

```

plt.figure(10)
plt.title("DINAMICA Ca2++ CITOSOL7")
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('calcium concentration')
plt.plot(time,y1[:,0],"b",label="1st eq")
plt.plot(time,y1[:,2],'g',label='2nd eq')
plt.plot(time,y1[:,4],'r',label='3rd eq')
plt.plot(time,y1[:,6],'c',label='4rd eq')
plt.plot(time,y1[:,8],"m",label="5st eq")
plt.plot(time,y1[:,10],'y',label='6th eq')
plt.plot(time,y1[:,12],'k',label= "7th eq")
plt.plot(time,y1[:,14],'cyan',label='8th eq')
plt.legend()

```

```

plt.figure(11)
plt.title("DINAMICA Ca2++")
plt.xlabel('time')
plt.ylabel('calcium concentration ')
plt.plot(time,y1[:,0],"b",label="citosol")
plt.plot(time,y1[:,1],'-r',label="mitocondria")
plt.plot(time,y1[:,2],'b')

```

```
plt.plot(time,y1[:,3], '--r')
plt.plot(time,y1[:,4], "b")
plt.plot(time,y1[:,5], '--r')
plt.plot(time,y1[:,6], 'b')
plt.plot(time,y1[:,7], '--r')
plt.plot(time,y1[:,8], "b")
plt.plot(time,y1[:,9], '--r')
plt.plot(time,y1[:,10], 'b')
plt.plot(time,y1[:,11], '--r')
plt.plot(time,y1[:,12], "b")
plt.plot(time,y1[:,13], '--r')
plt.plot(time,y1[:,14], 'b')
plt.plot(time,y1[:,15], '--r')
```

```
plt.legend()
```

```
plt.show()
```