



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

**“Estudio de la cinética de las
reacciones de fosforilación-desfosforilación
en redes de control celular”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO**

P R E S E N T A :

VLADIMIR GOMEZ DIAZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. GUILLERMO RAMIREZ SANTIAGO



México, D. F.

Junio 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Agradezco al Dr. Guillermo Ramírez Santiago por toda la paciencia, el apoyo y toda la dedicación mostrada para la realización de este proyecto. Así también, la oportunidad brindada para realizarlo.

Agradezco a cada uno de los sinodales, por los comentarios y sugerencias durante la culminación del mismo.

Agradezco a mis padres y a mi familia, quienes a pesar del tiempo y esfuerzo consumido durante mi estancia en la escuela y la realización de este trabajo, me apoyaron y supieron comprender en todo momento.

Agradezco a la UNAM por haberme brindado una formación académica y profesional e inculcarme diversos valores y principios éticos.

Este proyecto fue parcialmente financiado con el proyecto CONACYT 43596-F.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	2
Planteamiento del problema	3
Objetivos	5
Marco Teórico	6
1. Conceptos biológicos fundamentales	6
1.1 Metabolismo	6
1.2 Utilización de energía por las células	7
1.3 Proteínas	9
1.3.1 Estructura	9
1.3.2 Propiedades físicas	13
1.3.3 Funciones	13
1.4 Enzimas	14
1.4.1 Propiedades	15
1.4.2 Estructura	15
1.4.3 Mecanismo de acción	16
1.4.4 Nomenclatura	18
2. Cinética Química	22
2.1 Energía libre	22
2.2 Catálisis	22
2.3 Energía de activación	23
2.4 Modelos de reacciones químicas	24
2.4.1 Ley de acción de masas	25
2.4.2 Velocidad de reacción	25
2.4.3 Estequiometría, mecanismo y orden de reacción	26
2.4.4 Análisis de datos experimentales	29
2.4.5 Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción	31
2.5 Equilibrio químico	32
3. Cinética enzimática	35
3.1 Mecanismo de Michaelis-Menten	35
3.1.1 Significado de las constantes cinéticas	38
3.1.2 Factores que afectan la cinética enzimática	38
3.2 Regulación enzimática	39
3.2.1 Inhibición enzimática	40
3.2.2 Regulación alostérica	43
3.2.3 Modificación covalente	44
3.3 Modelos de redes bioquímicas	47
3.3.1 La aproximación cuasi-estacionaria QSSA	49
3.3.2 La aproximación total cuasi-estacionaria tQSSA	49

4. Aplicaciones	51
4.1 Biobaterías	51
4.2 Inmovilización covalente de enzimas	52
4.3 Nanotecnología	55
4.4 Biosensores	57
4.5 Fabricación de Biochips	59
4.6 Tecnología enzimática	60
Resultados y discusión	61
Conclusiones	90
Bibliografía	91
Anexo	92

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

Figura 1.1 Ejemplo de vía metabólica	6
Figura 1.2 Orden celular	8
Figura 1.3.A Estructura de un aminoácido	10
Figura 1.3.B Enlace peptídico	10
Figura 1.3.C Estructura secundaria de las proteínas	12
Figura 1.3.D Estructura terciaria de las proteínas	12
Figura 1.4.A Representación esquemática de una reacción catalizada por enzima	16
Figura 1.4. B Ejemplo de sitio activo para la enzima <i>lisozima</i>	17
Figura 2.1.A Energía de activación de una reacción química	23
Figura 2.1.B Energía de activación de una reacción enzimática	24
Figura 2.2 Perfiles de concentración para cinéticas de orden cero y uno	30
Figura 2.3 Relación entre k y la temperatura T	32
Figura 2.4 Equilibrio químico para una reacción bimolecular	33
Figura 3.1 Velocidad de una reacción enzimática	37
Figura 3.2 Temperatura y pH óptimos de una enzima	39
Figura 3.3 Fenómeno de inhibición enzimática	41
Figura 3.4 Efecto de los inhibidores en la velocidad de reacción	42
Figura 3.5 Regulación alostérica	43
Figura 4.1 Biobaterías	52
Figura 4.2 Inmovilización covalente de enzimas y componentes	55
Figura 4.3 Componentes de un biosensor	58
Figura 4.4 Proceso esquemático de obtención de enzimas	60
Figura 5.1.A Diagrama esquemático del modelo G-K	61
Figura 5.1.B Solución del modelo G-K con aproximante Padé	65

Figura 5.1.C Solución del modelo G-K con la aproximación tQSSA	66
Figura 5.2 Comparación entre QSSA y tQSSA para el modelo G-K	68
Figura 5.3 Diagrama esquemático de dos módulos de reacciones G-K (caso monoestable)	72
Figura 5.4 Diagrama esquemático con dos módulos de reacciones G-K (caso biestable)	75
Figura 5.5 Diagramas de bifurcación y plano-fase para las figuras 5.3 y 5.4	79
Figura 5.6 Diagrama esquemático con tres módulos de reacciones G-K	81
Figura 5.7 Comparación entre QSSA y tQSSA para tres módulos de reacciones G-K	85

TABLAS:

Tabla 1.1. Velocidad y orden de reacción para algunas reacciones	28
Tabla 1.2 Resumen de velocidades de reacción	30
Tabla 2.1 Ecuaciones para el modelo de la figura 5.1	67
Tabla 2.2 Parámetros utilizados en el modelado de los procesos	67
Tabla 2.3 Ecuaciones para el modelo de la figura 5.3	74
Tabla 2.4 Ecuaciones para el modelo de la figura 5.4	77
Tabla 2.5 Ecuaciones para el modelo de la figura 5.6	84

Resumen.

En el presente trabajo se obtuvieron una serie de modelos matemáticos que permiten describir el comportamiento cinético de los procesos de fosforilación-defosforilación de enzimas implicadas con el control de la actividad de proteínas. Este estudio se realizó resolviendo numéricamente las ecuaciones cinéticas de las reacciones químicas que se presentan en los mecanismos de reacción sugeridos utilizando el software MATLAB 7.0. Esto permite diseñar un programa en dicho lenguaje para investigar las propiedades intrínsecas y las soluciones a los modelos matemáticos que pueden llegar a presentarse en ellos. De los resultados obtenidos se concluye que existen fenómenos no lineales como las bifurcaciones, histéresis y la sensibilidad a las condiciones iniciales subyacentes en los mecanismos de reacción que comprenden dichos procesos.

Introducción.

Los sistemas biológicos involucran una diversidad de fenómenos físicos, químicos y físico-químicos muy complejos, y requieren de estudios cuantitativos detallados para su mejor comprensión. Es por ello que como campo de estudio o de investigación constituyen un reto que necesita de la participación interdisciplinaria.

Como ejemplo de tales sistemas, el proceso de control del ciclo celular ha sido estudiado recientemente con el fin de revelar los mecanismos que desencadenan la maquinaria de la regulación celular y construir las bases sobre las cuales las células sustentan su comportamiento.

Para contribuir con un mejor entendimiento del proceso de control del ciclo celular en las células eucariotas, se han obtenido y construido modelos cuantitativos basados en la cinética de las reacciones bioquímicas clave en el caso particular del ciclo celular de los embriones de huevo de rana *Xenopus*. Experimentalmente se tiene evidencia de que existen bifurcaciones en la dinámica del sistema así como ciclos de histéresis asociadas a los cambios en los distintos estados estacionarios ^[15]. Este comportamiento puede ser modelado matemáticamente mediante el análisis de los sistemas dinámicos, es por esto la importancia de estudiar tales sistemas.

El modelado matemático de los sistemas de control del ciclo celular, no solo ha confirmado algunas de las nociones aceptadas sobre el funcionamiento del ciclo celular, sino que también brinda una idea intuitiva acerca del proceso de fosforilación y defosforilación de proteínas, proceso intrínseco en estos sistemas. Conforme los modelos cinéticos sean más elaborados se espera reproducir mejor las observaciones experimentales ^[18]. Por lo tanto, entender cuantitativamente los mecanismos moleculares y las propiedades dinámicas de la cinética de estos procesos es un reto actual de la biología celular.

El objetivo del modelado cuantitativo con relación al proceso de fosforilación-defosforilación de proteínas es analizar en detalle algunos fenómenos no-lineales que se observan experimentalmente, tales como la biestabilidad, la ultrasensitividad a los cambios en las condiciones iniciales de las redes, la presencia de histéresis, etc.

Planteamiento del problema

Para entender la maquinaria de los procesos de control celulares, es esencial entender la cinética enzimática. En este contexto, una suposición fundamental denominada *aproximación cuasi-estacionaria* (en inglés, QSSA) ha probado ser muy útil para analizar las ecuaciones de la cinética enzimática. Sin embargo, otra aproximación llamada *aproximación total cuasi-estacionaria* (tQSSA por sus siglas en inglés) extiende el régimen de parámetros para los cuales resulta válida la descripción de la cinética enzimática ^[6]. Estas consideraciones son importantes para obtener los modelos de la cinética implicada en los procesos bajo estudio.

Para realizar el análisis y obtener modelos matemáticos que representen la dinámica de estas reacciones, es preciso mencionar algunas consideraciones.

La aproximación básica tiene su origen en la física estadística, que describe las propiedades microscópicas de los sistemas. Esta aproximación supone que la velocidad de cambio de una especie química en una reacción química está relacionada con el número promedio de colisiones moleculares llevadas a cabo dentro del volumen de reacción considerado.

Las fluctuaciones térmicas --debidas a que los fenómenos de interés ocurren a temperatura ambiente, es decir, 298° K o temperaturas mayores-- se suponen pequeñas en comparación a esta media por lo que no se consideran explícitamente en el modelo. Esto es equivalente a suponer que las fluctuaciones en las concentraciones de los componentes químicos son pequeñas y sus valores están representados solamente por su valor promedio. En este sentido, las ecuaciones cinéticas describen apropiadamente los cambios macroscópicos de las concentraciones de cada uno de los componentes.

Las reacciones químicas que intervienen en los procesos de regulación de los sistemas biológicos son llevadas a cabo por enzimas que actúan como catalizadores en estas reacciones. La catálisis tiene lugar en un medio homogéneo en el cual las enzimas se hallan en disolución.

Las reacciones químicas en disolución se pueden dividir en (a) *reacciones controladas químicamente*, en las cuales la velocidad de la reacción entre las moléculas de reactivos en el seno del disolvente es mucho menor que la velocidad con que los reactivos se difunden una hacia el otro a través del disolvente; (b) *reacciones controladas por difusión*, en las que la velocidad de difusión es mucho menor que la velocidad de la reacción química; y (c) *reacciones de control mixto*, en las que las velocidades de difusión y de la reacción química son del mismo orden de magnitud ^[13].

Debido a que la difusión celular es lo bastante rápida como para facilitar el mezclado uniforme de proteínas ^[24], se considera que las reacciones bioquímicas intracelulares están controladas únicamente por la velocidad de reacción. De esta forma, el problema se simplifica al considerar solamente ecuaciones diferenciales ordinarias para describir el cambio en las concentraciones de las especies químicas.

Puesto que estas reacciones ocurren a temperatura y presión constantes, las distintas constantes de velocidad de reacción utilizadas en este análisis no muestran variación con tales variables. Los parámetros necesarios para resolver los modelos cinéticos planteados se obtuvieron de datos experimentales reportados en la literatura y corresponden a una presión constante de 1 atm. y temperatura fija de 23° C ^[6] ^[17]. Para simplificar el planteamiento de los modelos cinéticos, se utilizarán aproximaciones estacionarias que conducen a un ajuste de las diferentes escalas de tiempo en que se llevan a cabo tales reacciones, permitiendo percibir mucho mejor la dinámica del sistema. Cabe recalcar, que estas aproximaciones cuasi-estacionarias se fundamentan en bases teóricas y experimentales, las cuales ayudan a simplificar los distintos modelos de la cinética enzimática.

Objetivos

El objetivo general planteado en este trabajo de investigación es el de diseñar y escribir un programa en MATLAB que permita describir los fenómenos de bifurcación, bi-estabilidad e histéresis que se presentan en las reacciones implicadas con el proceso de fosforilación-defosforilación de enzimas presentes en el control del ciclo celular.

Los objetivos específicos son:

- Obtener los modelos cinéticos que describan cuantitativamente el comportamiento no-lineal de las reacciones involucradas con el proceso de fosforilación-defosforilación de enzimas.
- Analizar cualitativamente la validez de los modelos cinéticos mediante la comparación con las aproximaciones estacionarias QSSA y tQSSA.
- Describir las repercusiones que conlleva el uso de aproximaciones estacionarias para simplificar los modelos cinéticos planteados.
- Analizar los fenómenos no-lineales que se presentan en la solución a los modelos cinéticos y por tanto describir la dinámica del sistema.

Marco Teórico.

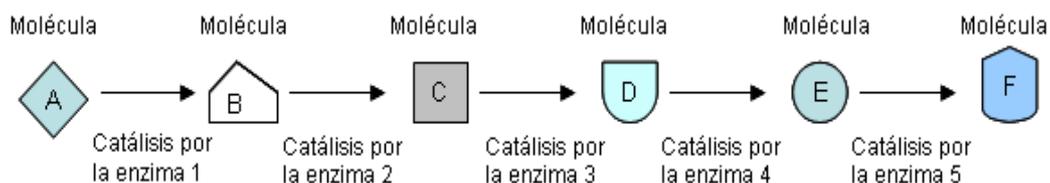
1. Conceptos biológicos fundamentales.

Los organismos vivos constituyen un sistema termodinámico fuera de equilibrio que requiere de un intercambio continuo de energía. Para que este intercambio de energía tenga lugar es necesario que ocurra una red compleja de reacciones bioquímicas a nivel celular. Los conceptos más importantes son los siguientes.

1.1. Metabolismo.

El metabolismo representa la suma de todas las reacciones químicas que ocurren en la célula. Consiste en una gran cantidad de reacciones bioquímicas en las que intervienen las enzimas como catalizadores y reguladores de las mismas. Un conjunto determinado de reacciones catalizadas por enzimas da lugar a una vía metabólica, donde cada enzima cataliza una etapa individual cuyo producto final es el sustrato en la siguiente etapa del ciclo de reacciones. En la siguiente figura se muestra esquemáticamente un proceso de reacciones en serie en las que se convierte la molécula 'A' en la molécula 'F', mediante la acción catalítica de enzimas, constituyendo con ello una vía metabólica.

Figura 1.1. Ejemplo de vía metabólica.



Tomado de: Alberts, B. (2006) p. 84

El metabolismo tiene dos propósitos fundamentales: la generación de energía para poder realizar funciones vitales para el organismo y la síntesis de moléculas biológicas. Para conseguirlo, el metabolismo consiste en dos procesos, el *anabolismo* y el *catabolismo*. Los procesos anabólicos son los que por regla general requieren del consumo de energía y cuyas reacciones se denominan *endergónicas*, mientras que los procesos catabólicos son aquellos que aportan energía, en cuyo caso, las reacciones se llaman *exergónicas* ^[1].

1.2. Utilización de energía por las células.

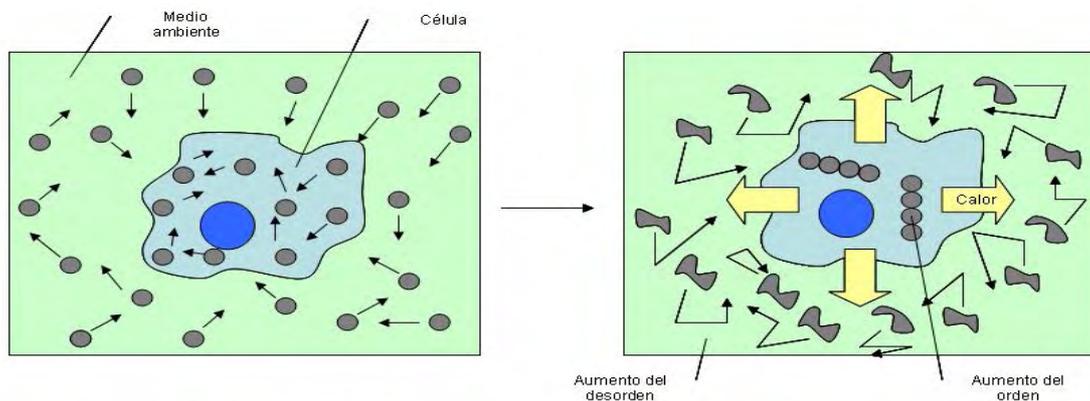
La tendencia universal de los objetos a desorganizarse está expresada en la segunda ley de la termodinámica --una de las leyes fundamentales de la física-- que sostiene que en el universo, o en cualquier sistema aislado (un conjunto de materia completamente aislado del resto del universo), el estado de equilibrio termodinámico se alcanza maximizando su grado de desorden. Esta ley, expresada en términos de probabilidades afirma que los sistemas se modificarán espontáneamente con alta probabilidad hacia estados de mayor desorganización (menor orden). Además, como la tendencia hacia el desorden es un proceso espontáneo se requiere de un trabajo para revertirlo. La cantidad de desorden en un sistema puede cuantificarse y la propiedad que mide esta cantidad se denomina *entropía*, cuanto mayor es el desorden, mayor es la entropía. Por esa razón, otra manera de expresar la segunda ley de la termodinámica es: Los sistemas se modifican espontáneamente hacia configuraciones con mayor entropía. Esta ley tiene implicaciones profundas en los sistemas biológicos como se expresa a continuación.

Las células vivas -mientras sobreviven, crecen y forman organismos complejos- generan un orden interno y puede parecer que ello desafía la segunda ley de la termodinámica. No obstante, este no es el caso debido a que una célula no es un sistema aislado: incorpora energía de sus alrededores -en forma de nutrientes o fotones provenientes del sol (o incluso, en el caso de ciertas bacterias quimio-sintéticas, solo a partir de moléculas inorgánicas)- y luego utiliza esta energía --denominada energía libre-- para generar orden en su interior, forjando nuevos enlaces químicos o construyendo macromoléculas de gran tamaño. Al producir las reacciones químicas, la energía del enlace químico se transforma en energía calorífica. Como la célula no es un sistema aislado, la energía calorífica que producen sus reacciones se dispersa rápidamente en su entorno. Allí el calor aumenta la intensidad del movimiento térmico de las moléculas residentes, aumentando de esta manera, la entropía del medio ambiente ^[1].

La cantidad de calor liberada por la célula debe ser tal que el orden generado dentro de la célula se vea compensado por un desorden mayor aún en el medio ambiente. Solo en este caso se cumple la segunda ley de la termodinámica, porque la entropía total del sistema -la de la célula más la de sus alrededores- aumenta como resultado de las reacciones químicas intracelulares.

En la Figura 1.2 se muestra la relación existente entre la célula y el orden del sistema en conjunto, donde las moléculas de una célula y las del resto del universo (el medio ambiente) están representadas en un estado de orden relativo. En el diagrama de la derecha la célula ha incorporado energía de las moléculas de alimento y libera calor por una reacción que ordena las moléculas en el interior de la célula. Como el calor aumenta el desorden en el medio que rodea a la célula (representado por las flechas quebradas y la deformación de las moléculas exteriores, con lo que se indica el aumento del movimiento molecular), se cumple la segunda ley de la termodinámica, a pesar de que la célula crezca y se divida.

Figura 1.2. Orden celular.



Tomado de Alberts, B. (2006) p. 86

Por otra parte, la primera ley de la termodinámica dice que la energía se puede transformar de una forma a otra, pero no puede ser creada ni destruida. La cantidad de energía en formas diferentes (química, calórica, eléctrica, solar, etc.) se modifica como resultado de las reacciones químicas dentro de la célula, pero la primera ley dice que la cantidad total de energía en el universo debe ser siempre la misma.

Por ejemplo, una célula animal incorpora alimentos y transforma parte de la energía presente en los enlaces químicos entre los átomos de las moléculas de estos alimentos (energía química) en un movimiento térmico aleatorio de las moléculas (energía calórica). Esta transformación, de energía química en energía calórica es esencial para que las reacciones intracelulares aumenten la entropía del universo, de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica ^[1].

Sin embargo, la célula no puede obtener ningún beneficio de la energía calórica que produce, a menos que las reacciones que generan calor en su interior estén directamente vinculadas con los procesos que inducen el orden molecular. Este estrecho acoplamiento entre la producción de entropía y el aumento del orden molecular es lo que hace diferente el metabolismo de una célula del derroche que representa quemar combustible en una llama. Por lo tanto, es necesario un vínculo directo de la “combustión” de “moléculas alimenticias” con la generación de orden biológico para que las células sean capaces de crear y mantener un islote de orden en un universo que tiende hacia el caos.

Todos los organismos viven de la energía almacenada en los enlaces químicos de moléculas orgánicas que producen otros seres vivos y que ingieren en forma de alimentos. Con pocas excepciones, la energía radiante de la luz del sol mantiene toda la vida alrededor nuestro. Captada por las plantas y algunos microorganismos por el proceso de fotosíntesis, la luz del sol es, en última instancia, la fuente de energía para los seres vivos^[1].

1.3. Proteínas.

Las *proteínas* son macromoléculas que tienen múltiples funciones en el organismo; controlan las condiciones fisicoquímicas dentro de la célula, forman parte de las estructuras celulares y catalizan prácticamente todas las reacciones que tienen lugar en la célula, en este caso se les denomina *enzimas*. La presencia de una enzima y su concentración en un compartimiento biológico dado, determina la capacidad de llevar a cabo una reacción bioquímica y la velocidad a la cual tiene lugar en ese compartimiento.

Se conoce a detalle la estructura de varias proteínas, así como la relación que existe entre esa estructura y la función de varias de ellas. Se conoce también la cinética y los mecanismos de un número considerable de reacciones enzimáticas^[1].

1.3.1. Estructura.

Las unidades estructurales de las proteínas son los aminoácidos y están construidas a partir de los 20 aminoácidos que se describen abajo^[4]. En estos últimos, el carbono alfa, (enmarcado en la fig. 1.3.A) presenta un grupo amino (H_3N^+), un grupo carboxilo (COO^-) y el residuo característico, R, de cada aminoácido.

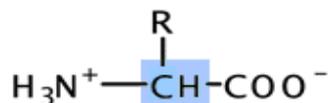


Fig. 1.3. A. Estructura de un aminoácido.

Los residuos R tienen diferente forma, carga, tamaño, reactividad química y capacidad de formar puentes de hidrógeno. El residuo es una cadena alifática, en el caso de los aminoácidos **glicina** (Gli), **alanina** (Ala), **valina** (Val), **leucina** (Leu), **isoleucina** (Ile) y **prolina** (Pro). En la **serina** (Ser) y **treonina** (Thr) el residuo es una cadena hidroxialifática. En los aminoácidos **triptofano** (Tri), **tirosina** (Tir) y **fenilalanina** (Phe) el residuo es una cadena aromática. La **lisina** (Lis), **arginina** (Arg) y la **histidina** (His) tienen residuos básicos y en el ácido **aspártico** (Asp) y el ácido **glutámico** (Glu) el residuo es un ácido carboxílico. En la **asparagina** (Asn) y en la **glutamina** (Gln) el residuo tiene una función amida y en la **cisteína** (Cis) y en la **metionina** (Met) contiene un átomo de azufre.

Los aminoácidos se unen uno al otro, vía los grupos alfa amino de un aminoácido con el grupo alfa carboxilo de otro aminoácido. A esta unión se le denomina enlace peptídico y al producto se le denomina péptido.

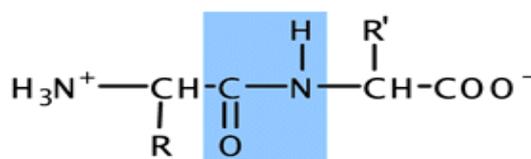


Figura 1.3.B. Enlace Peptídico.

Si se unen dos aminoácidos la macromolécula que se obtiene se denomina dipéptido, y si se unen más de dos, a la macromolécula que resulta se le llama polipéptido ^[4]. Las proteínas están formadas por uno o más polipéptidos. En algunas ocasiones los polipéptidos están formados por más de 100 uniones peptídicas, es decir, son cadenas largas integradas por un número relativamente grande de aminoácidos.

La estructura de las proteínas presenta cuatro niveles ^[4]:

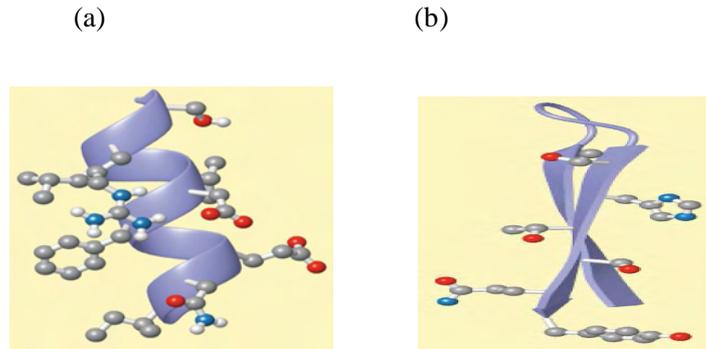
- *Estructura primaria*: es la secuencia lineal de aminoácidos que conforman una proteína.
- *Estructura secundaria*: se refiere a la ordenación regular y periódica de partes de la estructura primaria a lo largo de una dirección.
- *Estructura terciaria*: disposición espacial (en las tres dimensiones) de una secuencia polipeptídica.
- *Estructura cuaternaria*: conformación en el espacio de dos o más secuencias polipeptídicas que se asocian para formar algunas proteínas que constan de más de una cadena.

A la secuencia en la cual están acomodados los aminoácidos en una cadena peptídica se le denomina estructura primaria y se determina genéticamente. La estructura primaria determina la estructura tridimensional de la proteína, la que a su vez determina sus funciones que son esenciales para los seres vivos.

Las proteínas adquieren una estructura que la mayoría de las veces resulta muy compleja. Esto es debido a las cargas eléctricas que tienen los radicales de los aminoácidos y a la rigidez del enlace peptídico. Las cargas eléctricas generan las propiedades en las proteínas. La estructura de las proteínas nos sirve para confeccionar una clasificación de estas moléculas complejas. El primer aminoácido tiene siempre libre el grupo amina (NH_3^+), por lo que se le da el nombre de aminoácido N-terminal, mientras que el último aminoácido siempre tiene libre el grupo carboxilo, por lo que se denomina aminoácido C-terminal ^[4].

La estructura secundaria de una proteína es el nivel de organización que adquiere la molécula dependiendo de cómo sea la secuencia de aminoácidos que la componen. El plegamiento de la molécula sobre sí misma está determinado por la rigidez del enlace peptídico, la capacidad de giro de los enlaces establecidos con el carbono asimétrico y la interacción de los radicales de los aminoácidos con la disolución en la que se encuentra. Las conformaciones resultantes que se muestran en la siguiente figura son: estructura α -hélice o β -laminar.

Figura 1.3.C. Estructura secundaria de las proteínas. (a) α -hélice, (b) β -laminar.

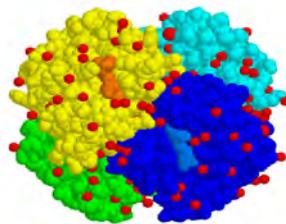


Tomado de: <http://recursos.cnice.mec.es>

La estructura terciaria está relacionada con la forma tridimensional en la que se manifiesta la proteína en el espacio y depende de la estructura de los niveles de organización inferiores. Puede ser una conformación redondeada y compacta, adquiriendo un aspecto globular o bien puede presentar una conformación fibrosa y alargada. La conformación espacial de la proteína determina su función biológica (Figura 1.3.D).

Cuando varias proteínas se unen entre sí, forman una organización superior, denominada estructura cuaternaria. Cada una de las proteínas que se forma de esta unión o asociación conserva su estructura terciaria. La asociación se realiza mediante un gran número de enlaces débiles en la forma de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.

Figura 1.3.D. Estructura terciaria de una proteína en el espacio.



Tomado de: <http://recursos.cnice.mec.es>

1.3.2. Propiedades Físicas de las Proteínas.

Las propiedades físicas que manifiestan las proteínas dependen de los grupos radicales R de los aminoácidos que las componen. Algunas de ellas son ^[21]:

- *Solubilidad*: los radicales de los aminoácidos permiten a las proteínas interactuar con el agua. Si abundan radicales hidrófobos, la proteína será poco o nada soluble en agua, mientras que si predominan los radicales hidrófilos, la proteína será soluble en agua.
- *Especificidad*: aparece como consecuencia de la estructura tridimensional de la proteína. La especificidad puede ser de función, si la función que desempeña depende de esta estructura, o de especie, que hace referencia a la síntesis de proteínas exclusivas de cada especie.
- *Desnaturalización*: la conformación de una proteína depende del pH y de la temperatura de la disolución en la que se encuentre. Este cambio en la conformación estructural natural se denomina desnaturalización. El cambio de pH produce cambios en las interacciones electrostáticas entre las cargas de los radicales de los aminoácidos. La modificación de la temperatura puede romper puentes de hidrógeno o facilitar su formación. Si el cambio de estructura es reversible, el proceso se llama re-naturalización (capítulo 3).

1.3.3. Funciones de las proteínas

- *Función estructural*: forman estructuras capaces de soportar tensión continua, como un tendón o el armazón proteico de un hueso o un cartílago. También pueden soportar tensión de forma intermitente, como la elastina de la piel o de un pulmón. Además, forman estructuras celulares, como la membrana plasmática o los ribosomas.
- *Movimiento y contracción*: las proteínas *actina* y *miosina* forman estructuras que producen movimiento. Mueven los músculos estriados y lisos. La *actina* genera movimiento de contracción en muchos tipos de células animales.
- *Transporte*: algunas proteínas tienen la capacidad de transportar sustancias, como oxígeno o lípidos, o electrones.
- *Reserva energética*: proteínas grandes, generalmente con grupos fosfato, sirven para acumular y producir energía, si se necesita.

- *Función homeostática*: consiste en regular las constantes del medio interno, tales como pH o cantidad de agua.
- *Función defensiva*: las *inmunoglobulinas* son proteínas producidas por linfocitos B, moléculas implicadas en la defensa del organismo.
- *Función hormonal*: algunas proteínas funcionan como mensajeros de señales hormonales, generando una respuesta en los órganos blanco.
- *Función enzimática*: las enzimas funcionan como biocatalizadores, ya que controlan las reacciones metabólicas, disminuyendo la energía de activación de estas reacciones ^[21].

La interrelación de la estructura con la función es evidente en todos los niveles de organización biológica, desde el molecular hasta el de organismos. Las proteínas poseen una estructura tridimensional que depende de la presencia de residuos de aminoácidos particulares en las posiciones correctas precisas. Las enzimas son un grupo particular de proteínas cuya compleja estructura les confiere la capacidad de aumentar en grado notable la velocidad de las reacciones biológicas como se verá más adelante.

1.4. Enzimas.

Las *enzimas* son los mediadores del metabolismo, encargados de todas las reacciones que ocurren en una célula. Sin las enzimas, las reacciones metabólicas se producirían con tanta lentitud que serían imperceptibles y muy probablemente los procesos metabólicos tal como los conocemos no estarían presentes. Desde un punto de vista químico, las enzimas están formadas de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre combinados, pero siempre con peso molecular bastante elevado y con propiedades catalíticas específicas, es decir, las enzimas en su mayoría son proteínas. Son extraordinariamente eficaces, y ejercen su acción sobre una molécula específica, denominada *sustrato* de la enzima.

Su importancia es tal que puede considerarse la vida como un “orden sistemático de enzimas funcionales”. Cuando este orden y su sistema funcional son alterados de algún modo, cada organismo sufre más o menos gravemente y el trastorno puede ser motivado por la falta de acción como por un exceso de actividad de la enzima ^[1].

1.4.1. Propiedades de las enzimas.

Como sucede con todos los catalizadores, las enzimas tienen las siguientes propiedades: a) sólo están presentes en pequeñas cantidades; b) no sufren cambios irreversibles durante la reacción, por lo que cada molécula de enzima puede participar de manera repetida en reacciones individuales; y c) no tienen efecto en la termodinámica de la reacción.

Las enzimas son catalizadores muy eficientes. Los catalizadores inorgánicos que se emplean en el laboratorio casi siempre aceleran las reacciones en un factor de 100 a 1000 veces. En contraste, en la mayoría de los casos, las enzimas incrementan la velocidad de una reacción por un factor de entre 10^4 a 10^{13} veces. Esto último demuestra la superioridad catalítica de las enzimas por encima de cualquier catalizador inorgánico. Con base en estas cifras, las enzimas pueden hacer en un segundo lo que tardaría de tres a miles de años si no las hubiera ^[1].

Un hecho aún más notable es que realizan esta hazaña a temperatura ambiente y en el *pH* interior de la célula. Además, a diferencia de los catalizadores inorgánicos que emplean los químicos, las enzimas son muy específicas en relación con los reactivos a los que se unen y la reacción que catalizan. Este tipo de especificidad entre enzimas y sustratos o entre otros tipos de proteínas y las sustancias con las que se unen, es crucial para que ocurra el metabolismo en los seres vivos. De no ser por la especificidad y eficiencia catalítica de las enzimas, las células quedarían rápidamente inmersas en un conjunto de reacciones laterales y productos secundarios.

1.4.2. Estructura de las enzimas.

Muchas enzimas sólo pueden realizar su función catalítica en asociación con otra molécula no proteica, de tamaño relativamente pequeño, denominada *coenzima*. Las coenzimas pueden estar firmemente unidas a la enzima por uniones covalentes u otro tipo de enlace fuerte, formando complejos difíciles de separar. Las dos porciones, proteica y no proteica, son indispensables para la actividad de la enzima. El sistema completo se llama *holoenzima* y está constituido por la proteína, designada *apoenzima* y la *coenzima*. Por lo que



En algunas enzimas, la presencia de iones metálicos es indispensable para la acción catalítica. Los iones metálicos contribuyen al proceso catalítico por su capacidad para atraer o donar electrones. La eliminación del componente metálico determina pérdida de actividad de la enzima ^[3].

1.4.3. Mecanismo de acción.

Las enzimas aumentan la velocidad de reacción disminuyendo la energía de activación (E_A). De esta manera, un mayor número de moléculas alcanza el estado intermedio o de transición, acelerando con ello la transformación química. Las enzimas aumentan enormemente la velocidad de reacción y, como todo catalizador, no modifican en absoluto el cambio neto de energía (ΔG) ni la constante de equilibrio (K_{eq}).

Durante el curso de la reacción, una enzima cataliza la transformación del sustrato S en un producto P , sin embargo, el mecanismo de reacción es el siguiente: primero se unen la enzima y el sustrato para formar el complejo enzima-sustrato, el cual posteriormente se disocia en la enzima y el producto.

La formación del complejo, inicialmente propuesta bajo bases teóricas, ha sido demostrada experimentalmente. En el transcurso de la reacción, la enzima se une efectivamente al sustrato. Al final, la enzima no muestra cambio alguno y puede unirse nuevamente a otra molécula de sustrato. Ello explica por qué pequeñas cantidades de enzima aceleran enormemente la reacción, debido a que la molécula de enzima es reutilizada muchísimas veces. Para formar el complejo enzima-sustrato, el sustrato se fija a un lugar definido de la enzima. Esta región de la molécula recibe el nombre de sitio activo y es donde se efectúa la acción catalítica (Fig. 1.4.A) ^[3].

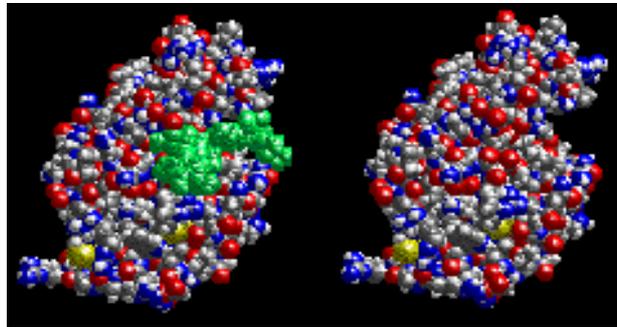
Figura 1.4.A. Representación esquemática de una reacción catalizada por enzima.



Tomado de: Blanco, A. (2000) p. 127

Las enzimas se unen a sus sustratos en los centros activos. El centro activo es un lugar sobre la superficie de la enzima donde tiene lugar la catálisis de la reacción. En la figura de la enzima *lisozima* que se muestra en la Figura 1.4. B, el panel de la izquierda muestra un carbohidrato (coloreado de verde), unido en el centro activo de la *lisozima*. El panel de la derecha muestra el centro activo vacío. Se observa que el centro activo forma una hendidura sobre la superficie de la enzima, diseñada para interactuar específicamente con el sustrato. Esta última característica da lugar a la especificidad de la enzima por ciertos sustratos únicamente ^[20].

Figura 1.4. B Ejemplo de sitio activo para la enzima *lisozima*.



Tomado de: <http://www.biologia.arizona.edu>

El sitio activo es una agrupación de un número no muy grande de aminoácidos, distribuidos espacialmente de manera precisa. Esta disposición se mantiene gracias a la contribución de las estructuras (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) de la proteína. La unión del sustrato a la enzima comprende la formación de enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals ^[3].

1.4.4. Nomenclatura de las enzimas.

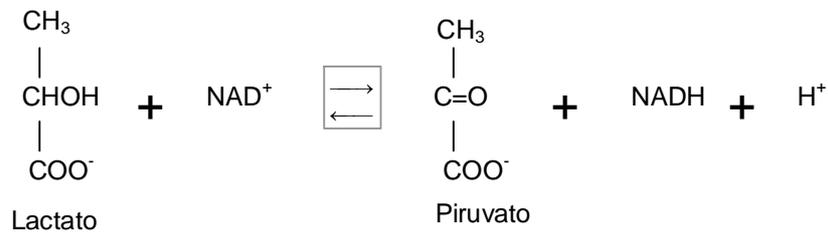
Las enzimas suelen designarse agregando el sufijo –asa al nombre del sustrato sobre el cual actúan. Por ejemplo *amilasa*, *ureasa* y *tirosinasa* son enzimas que catalizan reacciones con *almidón*, *urea* y *tirosina* respectivamente. También se denominan las enzimas según el tipo de reacción catalizada, por ejemplo, *deshidrogenasas* y *descarboxilasas* catalizan la sustracción de hidrógenos y carboxilo del sustrato, respectivamente.

Por otra parte, ciertas enzimas conocidas desde hace mucho tiempo tienen nombres arbitrarios. Entre ellas, *ptialina salival*, *pepsina de jugo gástrico*, *tripsina* y *quimotripsina* de jugo pancreático.

La confusión creada por el uso de nombres según distintos criterios, llevó a la *International Union of Biochemistry* (IUB) a proponer un sistema de clasificación, con normas para asignar a cada enzima un nombre descriptivo y un número que permite ubicarla inequívocamente. En esta clasificación se consideran seis clases principales según el tipo de reacción catalizada. Las diversas reacciones bioquímicas pueden agruparse en esas seis categorías. Cada una de las clases se divide en subclases y sub-subclases. El código numérico utilizado para identificar las enzimas consta de cuatro componentes: el primer número corresponde a la clase principal; el segundo, a la subclase; el tercero, a la sub-subclase y el cuarto es el número de orden de la enzima en su subclase^[3].

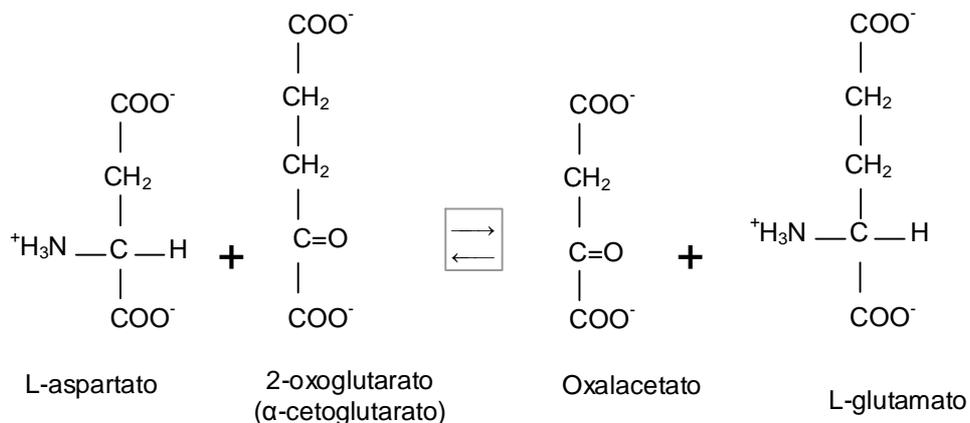
Los seis grandes grupos de la clasificación internacional son:

Oxidoreductasas. Catalizan reacciones de oxido-reducción. Están asociadas a coenzimas. Un ejemplo de este grupo lo constituye la enzima *lactato deshidrogenasa*, que cataliza la oxidación de *lactato* a *piruvato*, y también la reacción inversa (reducción de *piruvato* a *lactato*). La enzima utiliza la molécula NAD^+ (*nicotinamida adenina dinucleótido*) como coenzima. La reacción catalizada es:

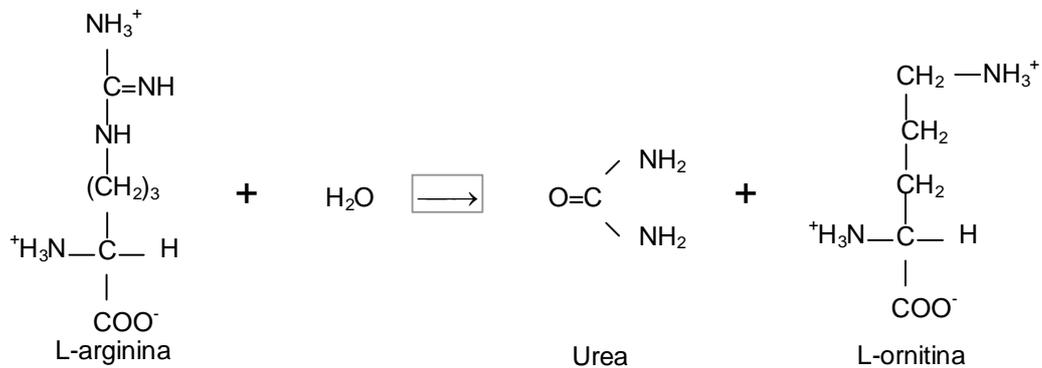


El nombre sistemático es L-lactato: NAD oxidorreductasa; el nombre trivial recomendado: lactato deshidrogenasa y el número EC, 1.1.1.27.

Transferasas. Catalizan la transferencia de un grupo de átomos, como amina, carboxilo, carbonilo, metilo, acilo, glicosilo, fosforilo, desde un sustrato a otro. Por ejemplo, *aminotransferasas* o *transaminasas*, que catalizan la cesión del grupo amina de un compuesto a otro. La reacción es catalizada por una enzima cuyo nombre sistemático es L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa y número EC, 2.6.1.1.

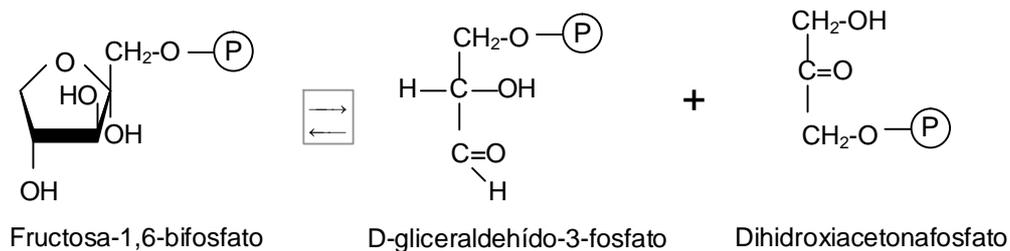


Hidrolasas. Catalizan la ruptura de enlaces C-O, C-N, C-S y O-P por adición de agua. Pertenecen a este grupo la acetilcolinesterasa y ribonucleasa, que hidrolizan la unión éster entre acetato y colina de acetilcolina y las uniones entre nucleótidos en ARN (ácido ribonucleico), respectivamente. Otro ejemplo es la arginasa, que cataliza la hidrólisis de arginina para formar urea ^[3]:



El nombre sistemático es L-arginina amidino hidrolasa; nombre trivial, arginasa y número EC, 3.5.3.1.

Liasas. Catalizan la ruptura de uniones C-C, C-S y C-N (excluyendo uniones peptídicas) de la molécula de sustrato, por un proceso distinto a la hidrólisis. Por ejemplo, aldolasa, que divide fructosa 1,6-bifosfato de acuerdo a la reacción:



El nombre sistemático es fructosa-1,6-bifosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato liasa; nombre trivial recomendado, fructosa-bifosfato aldolasa y número EC, 4.1.2.13.

Isomerasas. Interconvierten isómeros de cualquier tipo (ópticos, geométricos o de posición). Algunas de ellas reciben nombres triviales, como epimerasa, racemasa, mutasa. Ejemplos son, la fosfogluco-isomerasa, que cataliza la interconversión de glucosa-6-fosfato; o la triosafofosato isomerasa, que cataliza la reacción:

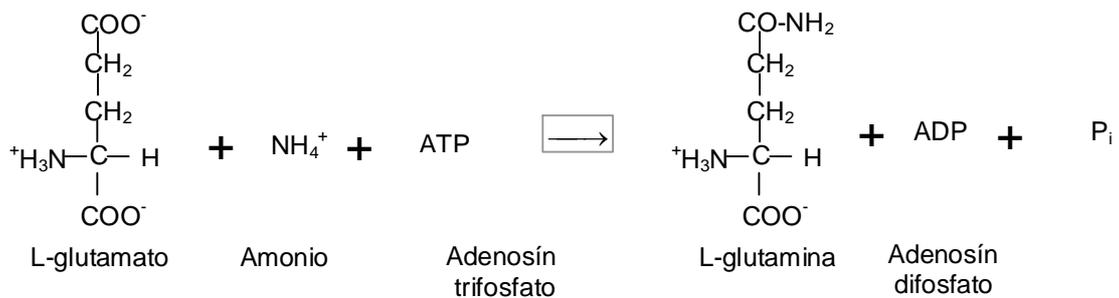


Dihidroxiacetonafosfato

D-gliceraldehído-3-fosfato

El nombre sistemático es D-gliceraldehído-3-fosfato cetol isomerasa; nombre trivial recomendado, triosafosfato isomerasa; número EC, 5.3.1.1.

Ligasas. También llamadas sintetetasas o sintetasas, catalizan la formación de enlaces entre C y O, N, S y otros átomos. En general, unen dos moléculas utilizando la energía de la hidrólisis de nucleósidos trifosforados. Por ejemplo, la glutamina sintetasa actúa en la reacción entre ácido glutámico y amoníaco para formar glutamina. La energía necesaria para la síntesis es provista por hidrólisis de la molécula de ATP (*adenosín trifosfato*):



El nombre sistemático es *L-glutamato: amoníaco ligasa (ADP)*; nombre trivial recomendado, *glutaminasa sintetasa*; número EC, 5.3.1.1 ^[3].

2. Cinética Química.

En este capítulo se introducen los conceptos generales que se utilizarán en el análisis de la cinética química de las enzimas como catalizadores de reacciones bioquímicas en la célula. Los conceptos más importantes se describen en los siguientes párrafos.

2.1. Energía libre.

Es la cantidad de energía contenida en un sistema que se puede transformar en trabajo. Las reacciones químicas que ocurren en la célula usualmente se presentan a temperatura y presión constantes. Por lo tanto, la energía libre asociada a estas reacciones es la energía libre de Gibbs, G . En una reacción química, el cambio en la energía libre, ΔG corresponde a la diferencia en el contenido de energía libre entre reactivos y productos. Las reacciones químicas espontáneas ocurren cuando, $\Delta G < 0$. En los casos en que ΔG es positiva, se necesita energía adicional para llevar a cabo la reacción química. En la célula, es común que la energía desprendida por las reacciones altamente favorables ($\Delta G < 0$) se aproveche para producir reacciones desfavorables desde el punto de vista termodinámico ($\Delta G > 0$).

2.2. Catálisis.

El fenómeno de la catálisis es un proceso mediante el cual la velocidad de una reacción química se acelera o se retarda debido a la presencia de pequeñas cantidades de una sustancia adicional denominada *catalizador*. La adición de un catalizador no altera las relaciones energéticas entre las sustancias involucradas en la reacción, además de no consumirse durante la misma.

La catálisis homogénea se produce cuando los componentes de la reacción, incluido el catalizador, se encuentran en la misma fase de agregación. Por el contrario, en la catálisis heterogénea el catalizador es típicamente, un sólido y los reactivos están en fase fluida.

La catálisis enzimática es de tipo homogéneo y domina el comportamiento metabólico de los sistemas biológicos.

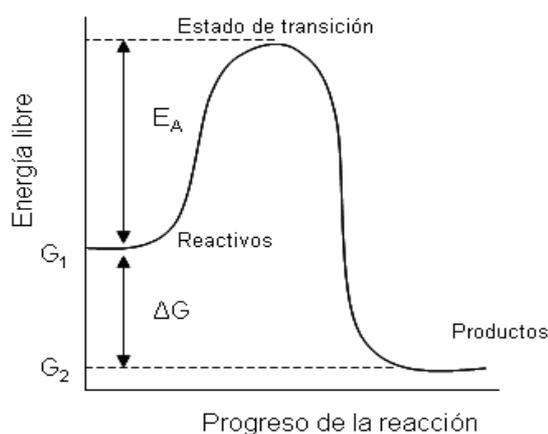
2.3. Energía de activación (E_A).

Para que una reacción proceda espontáneamente a temperatura y presión constantes, la energía libre de Gibbs de los productos debe ser mayor que la energía libre de Gibbs de los reactivos. Para que los reactivos formen los productos, sin embargo, debe superarse una barrera de energía sustancial. La altura de esta barrera, conocida como energía de activación, determina la cinética del proceso: la reacción es lenta cuando esta barrera es alta y más rápida cuando es baja.

La energía de activación es la cantidad de energía (promedio) que debe suministrarse a los reactivos para convertirlos en productos. La cima de la curva de energía se denomina estado de transición, a partir de ella, la reacción procede espontáneamente en la formación de productos. Asimismo, la altura de dicha barrera depende de la dirección que toma la reacción ^[10].

En una reacción química, los reactivos representan un estado energético inicial G_1 y la energía de activación suministra la energía necesaria para alcanzar un estado activado --estado de transición--, a partir del cual se producen los productos finales con energía G_2 . La diferencia entre el contenido energético inicial y el final se llama energía libre de reacción, $\Delta G = G_2 - G_1$. El siguiente esquema ejemplifica estas ideas.

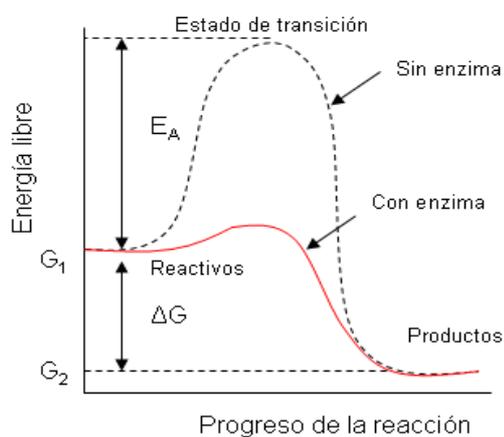
Figura 2.1.A. Energía de activación de una reacción química.



Tomado de: Hayne, Donald T. (2001). p. 252

Las reacciones catalizadas por enzimas se presentan usualmente en condiciones extraordinariamente suaves: temperaturas en las cuales el agua está en estado líquido, valores de pH cercanos al neutro y presiones cercanas a la atmosférica. Las enzimas disminuyen la barrera energética entre reactivos y productos, puesto que las reacciones bioquímicas se encuentran catalizadas, transcurren más rápidamente que una no catalizada ^[10].

Figura 2.1.B. Energía de activación de una reacción enzimática.



Tomado de: Hayne, Donald T. (2001). p. 253

En resumen, el papel de las enzimas es minimizar la altura de la barrera energética e implícitamente disminuir la energía de activación con la finalidad de aumentar la probabilidad de que una molécula alcance el estado de transición.

2.4. Modelos de Reacciones químicas.

El término reacción química corresponde a un proceso en el que una o más sustancias llamados “reactivos” se transforman en otra(s) sustancia(s) diferente(s) llamados los productos de la reacción.

Las reacciones elementales (en fase gas o líquida) son debidas a colisiones entre partículas (átomos o moléculas) las cuales rompen y/o forman nuevos enlaces químicos. Estas partículas se mueven con velocidades que dependen de la temperatura, es decir, a temperaturas altas las velocidades son mayores ^[23].

2.4.1. Ley de acción de masas.

En principio, las ecuaciones que gobiernan cualquier reacción química pueden formularse mediante la ley de acción de masas; en la cual, se establece que la velocidad de una reacción química es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos elevado a su coeficiente estequiométrico.

De acuerdo a lo anterior, la velocidad (v) para una reacción elemental $aA + bB \xrightarrow{k} cC + dD + \dots$ es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos,

$$v = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b .$$

La notación entre corchetes: $[A]$, $[B]$,..., denota la concentración correspondiente a cada componente; k es la constante de velocidad de reacción que depende de diversos factores, por ejemplo, temperatura, naturaleza de las sustancias, concentración, etc. Los exponentes a y b son los coeficientes estequiométricos de cada especie química y representan el orden de la reacción de la sustancia correspondiente.

2.4.2. Velocidad de reacción.

Es la cantidad de sustancia obtenida como producto de la reacción o bien la cantidad de sustancia transformada por unidad de tiempo. La cantidad de sustancia se mide en unidades de concentración, moles por litro de disolución. La velocidad, v , de una reacción describe qué tan rápido ocurre la transformación de una sustancia ^[23].

Usualmente la velocidad de reacción se expresa como un cambio en la concentración de una especie química por unidad de tiempo, por ejemplo $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}]$. En términos matemáticos esto es

$$v = \frac{dc}{dt} [=] \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{t}} .$$

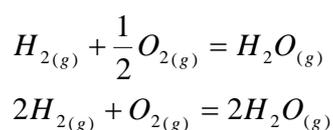
En general, la velocidad de reacción de un proceso depende en alguna forma de las concentraciones o cantidades involucradas; la velocidad de reacción es una función de las concentraciones. Esto es:

$$v = f(\text{concentraciones}).$$

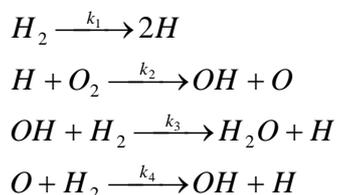
Esta función puede ser simple, la más simple es $v=\text{constante}$, o una más compleja. No obstante, brinda información importante acerca del mecanismo del proceso de reacción. La función f está definida de acuerdo a la ley de acción de masas para las reacciones elementales, mientras que f debe determinarse experimentalmente para aquellas reacciones no elementales. Uno de los principales objetivos de la investigación en la cinética es determinar la ley de velocidad para las reacciones de interés ^[23].

2.4.3. Estequiometría, mecanismo de reacción y orden de reacción

En cinética química es necesario entender y distinguir entre la estequiometría de la reacción, el orden de la reacción y el mecanismo de la reacción. La estequiometría de la reacción dice cuántas moléculas de cada reactivo son necesarias para formar cada molécula de los productos. Esto se expresa en forma de moles. Únicamente las relaciones entre moles ($1 \text{ mol} = 6.023 \times 10^{23}$ moléculas) son importantes. Por ejemplo, consideremos las siguientes reacciones,



Ambas ecuaciones son dos formas correctas de expresar la estequiometría de la reacción entre el H_2 y O_2 para formar H_2O . El mecanismo de una reacción, en general, representa una serie o conjunto de reacciones elementales que son consistentes con la estequiometría de la reacción. Por ejemplo, en la reacción de H_2 y O_2 en la fase gas, el proceso consiste de las siguientes reacciones elementales:



Este conjunto de cuatro reacciones (cada una a velocidades de reacción distintas, $k_1 \dots k_4$) representa el mecanismo de reacción propuesto para esta reacción química. La velocidad de una reacción química está determinada por la velocidad del paso más lento en el mecanismo de reacción.

El orden de una reacción química se puede categorizar como de orden cero, de primer orden, de segundo orden, etc., de acuerdo a si la velocidad de reacción es proporcional a la potencia cero, primera, segunda, etc., de la concentración. El significado de una reacción de orden cero es que la velocidad de reacción es constante e independiente de la concentración de los reactivos. Esto es característico de algunas reacciones catalizadas por enzimas tales como la *alcohol deshidrogenasa*, bajo condiciones especiales donde la enzima está saturada con los reactivos. En general, las reacciones de orden n son aquellas en las cuales la cantidad de reactivo transformado por unidad de tiempo es proporcional a la concentración de reactivo presente elevada a la potencia n , esto es

$$\frac{dC}{dt} = -kC^n$$

donde dC es la disminución de la concentración de reactivo, dt es la variación en el tiempo y k representa la constante de velocidad de orden n para una reacción en particular. Para cualquier reacción, la ecuación de velocidad de reacción es de la forma:

$$v = kC_A^m C_B^n C_P^q$$

donde las concentraciones C_A , C_B , etc. están elevadas a las potencias m , n , etc. y pueden ser números enteros o cero ($C_A^0=1$) o bien números fraccionales. El orden de la reacción con respecto a un componente particular A , B , P , etc. es el exponente del término de la concentración de dicha especie [23].

Debido a que la velocidad depende de las concentraciones de varias especies químicas, es necesario distinguir entre el orden con respecto a un componente en particular y el orden total de la reacción. Este último corresponde a la suma de las potencias de todas las concentraciones; en el ejemplo, el orden total de la reacción es, $m+n+q$. Algunos ejemplos representativos se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 1.1. Velocidad y orden de reacción para algunas reacciones.

Reacción estequiométrica	Ley de velocidad	Orden de reacción
$\text{Sucrosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{H^+} \text{fructosa} + \text{glucosa}$	$v = k \cdot [\text{sucrosa}]$	1
$\text{L-isoleucina} \longrightarrow \text{D-isoleucina}$	$v = k \cdot [\text{L-isoleucina}]$	1
${}^{14}_6\text{C} \longrightarrow {}^{14}_7\text{N} + \beta^-$	$v = k \cdot [{}^{14}_6\text{C}]$	1
$2 \text{ Proflavin} \longrightarrow \text{dímero proflavin}$	$v = k \cdot [\text{proflavin}]^2$	2
$p\text{-nitrofenil acetato} + 2\text{OH}^- \xrightarrow{\text{pH } 9} p\text{-nitrofenilato}^- + \text{acetato}^- + \text{H}_2\text{O}$	$v = k \cdot [p\text{-nitrofenil acetato}] \cdot [\text{OH}^-]$	2 (total)
$\text{Hemoglobina} \cdot 3\text{O}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Hb} \cdot 4\text{O}_2$	$v = k \cdot [\text{Hb} \cdot 3\text{O}_2] \cdot [\text{O}_2]$	2 (total)
$\text{H}_2 + \text{I}_2 \longrightarrow 2\text{HI}$	$v = k \cdot [\text{H}_2] \cdot [\text{I}_2]$	2 (total)
$\text{H}_2 + \text{Br}_2 \longrightarrow 2\text{HBr}$	$v = \frac{k \cdot [\text{H}_2] \cdot [\text{Br}_2]^{1/2}}{k' + [\text{HBr}] / [\text{Br}_2]}$	Complejo
$\text{CH}_3\text{CHO} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}$	$v \cong k \cdot [\text{CH}_3\text{CHO}]^{3/2}$	3/2 (aprox.)
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \xrightarrow{\text{enzimas}} \text{CH}_3\text{CHO}$	$v = \text{constante}$	0

Tomado de: Tinoco, J. (1995) p. 328

En el caso en que la concentración de un componente permanezca constante durante el curso de la reacción, prácticamente se descarta de la expresión de velocidad de reacción v . Una ley de velocidad más general para la primera reacción de la tabla anterior podría ser,

$$v = k'[\text{sucrosa}][H^+][H_2O]$$

En este ejemplo, el ión H^+ actúa como un catalizador y su concentración permanece constante durante el transcurso de la reacción. Por otra parte, la concentración de H_2O (el solvente) varía muy poco debido a que está presente en gran exceso. Por lo tanto, los términos $[H^+]$ y $[H_2O]$ permanecen constantes y se omiten en la ley de velocidad de la tabla 2.1 que se muestra arriba. No obstante, cuando la reacción se realiza en presencia de diferentes concentraciones de H^+ , o con un solvente inerte adicional, la dependencia de primer orden de reacción sobre las concentraciones $[H^+]$ y $[H_2O]$ sigue estando presente.

En la tabla 2.1, es fácil observar que no existe una relación simple entre la estequiometría de la reacción y la ley de velocidad. En principio, no existe una relación directa entre el orden de reacción y la estequiometría de la reacción. Para conocer el orden de reacción es necesario efectuar experimentos. Continuando con los ejemplos presentados en la tabla 2.1, la reacción entre H_2 y I_2 es de primer orden con respecto a cada reactivo en un amplio rango de condiciones. No obstante, la reacción similar entre H_2 y Br_2 exhibe una compleja ley de velocidad que no puede describirse mediante un simple orden de reacción bajo todas condiciones. En este caso, la velocidad de reacción depende tanto de los reactivos como del producto. Esto se debe a la existencia de un paso reversible en el mecanismo de tal reacción que se vuelve importante conforme la concentración del producto aumenta.

2.4.4. Análisis de datos experimentales para determinar la velocidad de reacción.

La ley de velocidad para una reacción debe determinarse necesariamente a partir de datos experimentales. La finalidad de los experimentos en cinética química puede ser simplemente conocer la dependencia de la velocidad con las concentraciones por razones prácticas, o bien entender el mecanismo de la reacción. Por ejemplo, si se estudia la *desactivación* de un virus mediante su reacción con *formaldehído*, es importante conocer cómo depende la velocidad de reacción con la concentración del virus y la de formaldehído. El conocimiento de la ley de velocidad es necesario para determinar el tiempo del tratamiento con formaldehído necesario para asegurar que todos los virus estén desactivados antes de que sean usados para inmunizar a una cierta población. También es importante conocer como la temperatura, el pH, y el tipo de solvente empleado afecta la velocidad de reacción.

Existen muchas maneras de obtener datos de velocidad. El método más común es obtener concentraciones de los reactivos y de los productos a diferentes tiempos durante la reacción. Si el tiempo requerido para llevar a cabo el análisis es grande comparado con la velocidad de la reacción, es necesario el “*apagado*” o el cese repentino de la reacción.

Una reacción catalizada por enzimas, por ejemplo, puede detenerse al enfriar rápidamente la mezcla de reacción, mediante la incorporación de un agente que desnaturalice la enzima, o mediante la adición de un compuesto adicional que disminuya la actividad catalítica de la enzima ^[23].

En caso de que exista una propiedad física que cambie significativamente conforme procede la reacción, ésta se puede utilizar para deducir la velocidad de reacción. Por ejemplo, si los reactivos y productos absorben luz de una cierta longitud de onda, la propiedad de absorbancia en esta longitud de onda puede relacionarse con la velocidad de reacción para obtener datos experimentales que ayuden a determinar la velocidad de la reacción ^[23].

La tabla 2.2 muestra una recapitulación de las velocidades de reacción. Asimismo, la Fig. 2.2 muestra esquemáticamente la velocidad de reacción para ejemplos de reacciones de orden cero y de primer orden mediante la relación existente entre la concentración de un reactivo *C* y el tiempo (conocido también como perfiles de concentración).

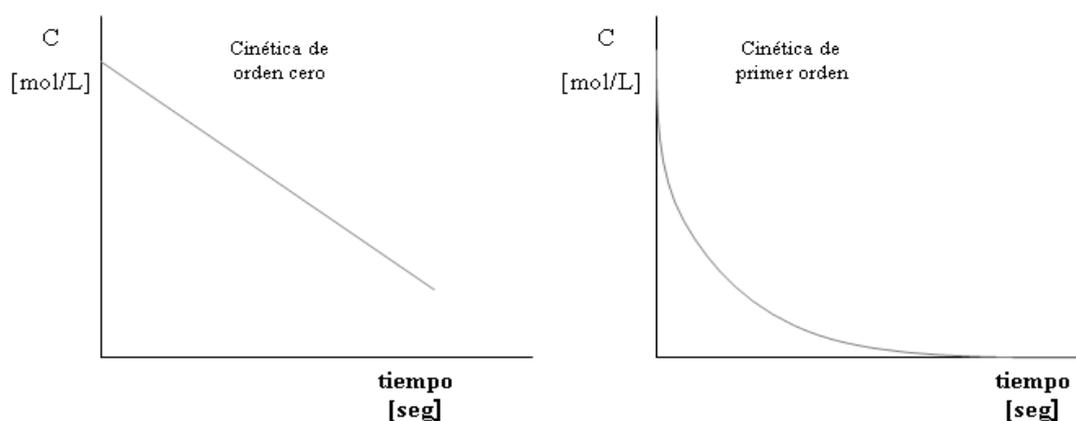
Tabla 1.2. Resumen de velocidades de reacción.

Orden de reacción	Velocidad de reacción	Unidades de <i>k</i>
Orden cero	$dC / dt = k$	$M \cdot \text{tiempo}^{-1}$
Primer orden	$dC / dt = k \cdot C$	tiempo^{-1}
Segundo orden (I)	$dC / dt = k \cdot C^2$	$M^{-1} \cdot \text{tiempo}^{-1}$
Segundo orden (II)	$dC / dt = k \cdot C_A \cdot C_B$	$M^{-1} \cdot \text{tiempo}^{-1}$
<i>n</i> -ésimo orden	$dC / dt = k \cdot C^n$	$M^{1-n} \cdot \text{tiempo}^{-1}$

Tomado de Tinoco, J (1995) p. 349

M [=] molaridad [=] mol·L⁻¹

Figura 2.2. Perfiles de concentración para cinéticas de orden cero y primer orden.



Tomado de: Tinoco, J (1995) pp. 331

Las reacciones de orden 1 desempeñan un importante papel en los fenómenos físicos y biológicos. Así por ejemplo, la desintegración radioactiva corresponde a una cinética de primer orden, el crecimiento bacteriano es igualmente un fenómeno exponencial (la curva en este caso es creciente).

Para reacciones de orden superior en las cuales la cinética es muy compleja, los perfiles de velocidad de reacción varían según el modelo empleado para resolver la cinética de las mismas.

2.4.5. Influencia de la temperatura en la velocidad de reacción.

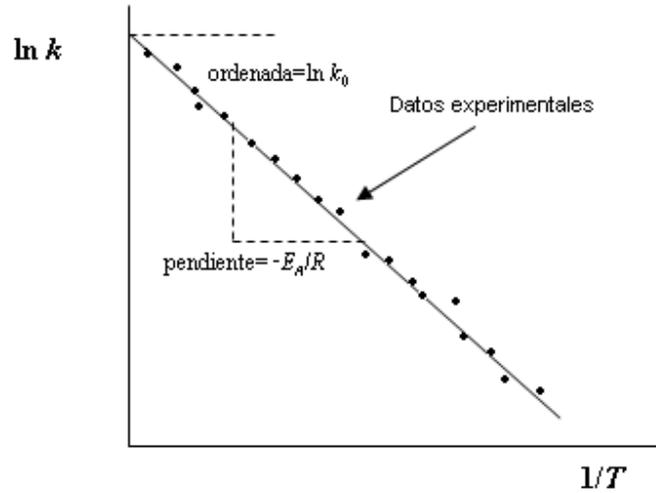
Al aumentar la temperatura de una reacción química, su velocidad de reacción se incrementa. Para la mayoría de las reacciones químicas existe una relación logarítmica entre la constante de velocidad k y el recíproco de la temperatura absoluta T (en grados Kelvin). Esta relación se expresa mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\ln k = - \left(\frac{E_A}{RT} \right) + \ln k_0$$
$$k = k_0 \cdot \exp \left(\frac{-E_A}{RT} \right)$$

donde E_A es la energía de activación, k_0 corresponde a un factor de frecuencia, y R es la constante de los gases ideales. Esta expresión representa una ecuación empírica y describe el comportamiento de muchos sistemas químicos y de algunos procesos biológicos.

La forma usual de obtener la energía de activación es a través de la gráfica del logaritmo $\ln k$ versus $1/T$ obteniéndose una línea recta (Figura 2.3). Esta se utiliza para ajustar los datos experimentales obtenidos. La pendiente de esta línea recta es igual a la razón, $-E_A/R$. Una vez que se conoce la energía de activación, E_A a partir de la gráfica anterior, la ecuación de Arrhenius puede resolverse para conocer la constante k_0 .

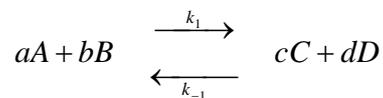
Figura 2.3. Relación entre k y la temperatura T.



Tomado de: Tinoco, J. (1995) p. 366

2.5. Equilibrio Químico

Todas las reacciones químicas alcanzan el equilibrio. Por lo tanto, en principio, para cada paso de reacción en una dirección existe una dirección inversa. En la práctica, es posible ignorar el paso inverso, porque bien la constante de equilibrio es muy grande (favoreciendo la formación de productos con ello) o la concentración de los productos se mantienen muy pequeñas en el transcurso de la reacción ^[23]. Sin embargo, es importante conocer la relación entre las constantes de velocidad (k) y las constantes de equilibrio termodinámico (K_{eq}). Por ejemplo, para la siguiente reacción bimolecular reversible



deben considerarse dos velocidades de reacción que, de acuerdo a la ley de acción de masas, éstas son:

$$v_1 = k_1[A]^a[B]^b$$

$$v_{-1} = k_{-1}[C]^c[D]^d$$

donde k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de reacción, y los exponentes a , b , c y d son coeficientes estequiométricos.

Debido a la reversibilidad de la ecuación química, debe haber un momento en que se alcance el equilibrio químico y ambas velocidades sean iguales, esto es, $v_1=v_2$ (figura 2.4). Por tanto se tiene

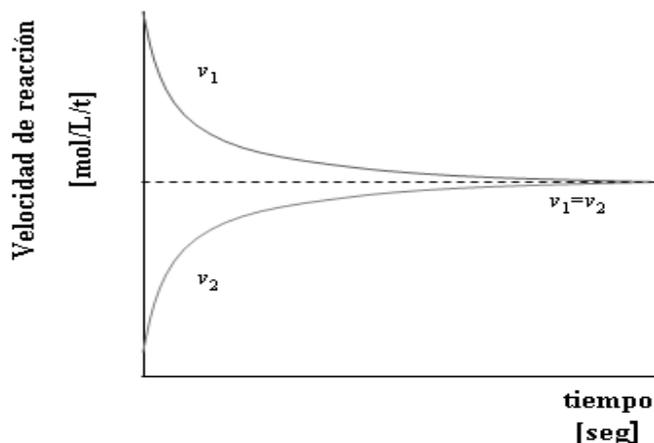
$$k_1[A]^a[B]^b = k_{-1}[C]^c[D]^d$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

donde K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción. La ecuación anterior establece que cuando el sistema está en equilibrio a una cierta temperatura existe una relación simple entre las concentraciones de productos y de reactivos.

Figura 2.4. Equilibrio químico para una reacción bimolecular.



Tomado de: Enciclopedia Encarta. Microsoft® Student (2007)

La constante de equilibrio permite predecir la dirección en la que se favorece la reacción en condiciones determinadas de temperatura y presión. Si la K_{eq} es mayor a 1, la reacción procede a una mayor velocidad hacia la formación de los productos que en sentido contrario ($k_1 > k_{-1}$). Por otro lado, si K_{eq} es menor de 1, la reacción inversa procede a mayor velocidad, esto es ($k_1 < k_{-1}$), por lo que la concentración de los reactivos se eleva a expensas de la de los productos.

Es importante considerar la parte energética en este punto. La proporción entre reactivos y productos presentes en equilibrio depende de los niveles de energía libre relativa de los reactivos y los productos.

Mientras la energía libre de los reactivos (G_1) sea mayor que la energía libre de los productos (G_2), ΔG tiene un valor negativo y la reacción procede en el sentido de formación de productos. Mientras mayor sea la ΔG , más se aleja la reacción del equilibrio y más trabajo puede realizarse en el sistema. A medida que avanza la reacción, disminuye la diferencia en el contenido de energía libre entre los reactivos y los productos (ΔG se vuelve menos negativa) hasta que en el equilibrio la diferencia es cero ($\Delta G = 0$) y no puede obtenerse más trabajo. Por lo tanto, el valor de ΔG se utiliza para predecir la dirección en la que procede una reacción particular en un momento determinado. La ΔG de la reacción, $G_2 - G_1$, se consigue a partir de las concentraciones de los reactivos y productos presentes en ese instante, de acuerdo a la siguiente expresión

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad \text{con} \quad \Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K_{eq}$$

donde ΔG° es la energía libre estándar y es un valor fijo para una reacción determinada, por tanto indica la dirección en la que procedería la reacción si el sistema está en condiciones estándar (25 °C y 1 atm). Las condiciones estándar no prevalecen en muchos sistemas, por lo que hay que tener precaución cuando se usen valores de ΔG° en los cálculos de energía ^[1].

3. Cinética Enzimática.

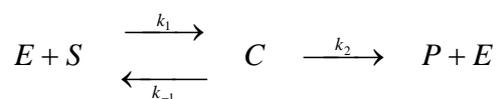
A las reacciones catalizadas por enzimas se les denominan reacciones enzimáticas. Las reacciones catalizadas por enzimas están bajo un estricto control celular. Los principales factores que influyen sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas son las concentraciones de enzima y de sustrato.

Debido al carácter proteico de las enzimas, la velocidad de las reacciones enzimáticas también se ve influida por factores que modifican la estructura de las proteínas, como la temperatura y el pH. Primeramente se menciona el fundamento sobre el cual se basan los distintos modelos para analizar los procesos enzimáticos, posteriormente será necesario conocer los conceptos de inhibición enzimática con el fin de completar la descripción de tales reacciones.

3.1. Mecanismo de Michaelis-Menten de la catálisis enzimática.

En este punto es importante recordar que la catálisis enzimática es del tipo homogéneo y que su característica principal es que el agente catalizador o enzima actúa de manera muy específica sobre un reactivo llamado *sustrato*. Además, concentraciones muy pequeñas de enzima suelen ser suficientes para producir una actividad catalítica enorme sobre grandes cantidades de sustrato.

El mecanismo de Michaelis-Menten (1913) es uno de los más sencillos que se han propuesto para explicar el comportamiento de las enzimas frente a reactivos para un proceso en disolución^[17]. Este mecanismo se basa en las reacciones siguientes:



donde S es el sustrato, E la enzima, C es el complejo enzima-sustrato y P el producto de la reacción. Como se ve, la enzima no se consume en el proceso global. Por lo tanto, la concentración total de la enzima debe permanecer constante durante la reacción. Este modelo utiliza la hipótesis del estado estacionario sobre la velocidad de cambio del complejo C , en términos matemáticos es:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2) \cdot [C] \approx 0$$

La concentración total de enzima E_T es la suma de las concentraciones de la enzima libre más la concentración de la enzima unida al sustrato en todo momento, es decir, debe cumplirse la expresión $[E_T] = [E] + [C] = \text{cte.}$; de este modo resulta que

$$[C] = \frac{k_1[E_T][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

Esto permite escribir la cinética o velocidad de la reacción global, aquella que da la formación del producto P , como

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[C] = \frac{k_2[E_T][S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]} = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m + [S]}$$

donde $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$ es la constante de Michaelis para esta reacción. Tiene unidades de concentración y corresponde a la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo (figura 3.1.A). La expresión anterior se conoce como la ecuación de Michaelis-Menten y describe el comportamiento de muchas enzimas conforme varía la concentración del sustrato. Esta ecuación puede evaluarse para ilustrar la dependencia de la velocidad de reacción con $[S]$ y K_m en las siguientes condiciones ^[16]:

1. Cuando $[S]$ es mucho menor que K_m . Esto permite simplificar la ecuación de la siguiente forma:

$$v = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m + [S]}; v = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m} = K[S]$$

2. Cuando $[S]$ es mucho mayor que K_m . Por lo tanto la expresión original se reduce en la siguiente ecuación:

$$v = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m + [S]}; v = \frac{k_2[E_T][S]}{[S]} = k_2[E_T] = v_{\max}$$

3. Cuando $[S]=K_m$. Sucede que:

$$v = \frac{k_2[E_T][S]}{K_m + [S]}; v = \frac{k_2[E_T][S]}{[S] + [S]} = \frac{v_{\max}[S]}{2[S]} = \frac{v_{\max}}{2}$$

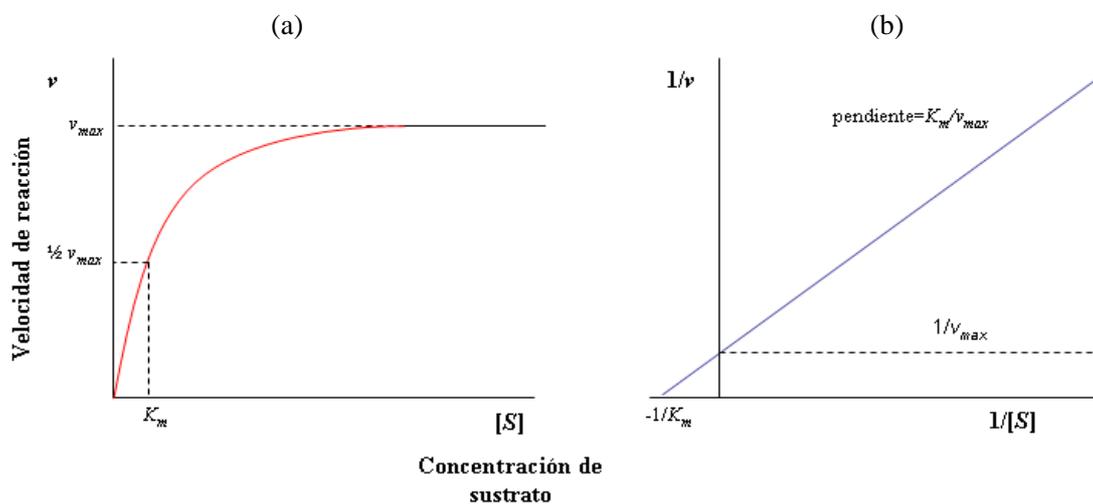
El efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada por una enzima se muestra en la figura 3.1. (a).

La forma de la ecuación de Michaelis-Menten para la velocidad de una reacción enzimática se puede transformar en ecuaciones más sencillas para ajustar los datos experimentales. Destaca la expresión de Lineweaver-Burk, en cuyo caso se trazan recíprocos de la velocidad contra la concentración de sustrato. Con esto, se obtiene la siguiente ecuación lineal:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{\max}[S]} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{\max}}$$

La representación gráfica de esta ecuación corresponde a una recta y se muestra en la figura 3.1 (b). El valor de la ordenada al origen permite calcular v_{\max} y el corte con el eje de las abscisas permite calcular K_m . Por lo tanto, la forma gráfica de esta ecuación resulta especialmente práctica para determinar las constantes cinéticas de una enzima.

Figura 3.1. Velocidad para una reacción enzimática



Tomado de: Mayes, P. A. (2001) pp. 110, 112

3.1.1. Significado de las constantes cinéticas

La velocidad de reacción varía de manera considerable según sea la concentración de sustrato. Con concentraciones bajas de sustrato, las moléculas de enzima se someten a pocas colisiones con el sustrato en un tiempo dado. Por consiguiente, las moléculas de sustrato limitan la velocidad de la reacción enzimática. Con altas concentraciones de sustrato, las enzimas chocan con las moléculas de sustrato con más rapidez de la que pueden convertirse en producto. Por lo tanto, las moléculas de enzima trabajarán a su máxima capacidad, es decir, las moléculas de enzima limitan la velocidad. En consecuencia, mientras mayor concentración de sustrato haya en la mezcla de reacción, la enzima se aproxima a un estado de saturación, conocido como velocidad máxima, v_{max} .

Como se ha visto, la constante de Michaelis, K_m , es igual a la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de v_{max} . Como su nombre indica, la K_m es una constante para una enzima determinada y por tanto independiente de la concentración de sustrato o de enzima. En la mayoría de los casos, el valor de K_m proporciona una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Mientras mayor sea esta constante, es más alta la concentración de sustrato que se requiere para alcanzar la mitad de la v_{max} y, por consiguiente, es menor la afinidad de la enzima por ese sustrato. La K_m de la mayoría de las enzimas está entre 10^{-1} y 10^{-7} M. Otros factores que influyen en de modo notorio en la cinética de las enzimas son el pH y la temperatura del medio circundante^[12].

3.1.2. Factores que afectan la cinética enzimática.

La actividad de las enzimas es afectada enormemente por los cambios en la temperatura y el pH. Conforme la temperatura aumenta, las moléculas de una reacción química adquieren mayor energía cinética. Esto incrementa las posibilidades de que ocurran las colisiones necesarias para llevar a cabo la reacción y por lo tanto la velocidad de reacción incrementa. Existe una cierta temperatura a la cual la actividad catalítica de la enzima presenta su valor máximo, que corresponde a la temperatura óptima. Por encima de él, la actividad de la enzima decrece rápidamente.

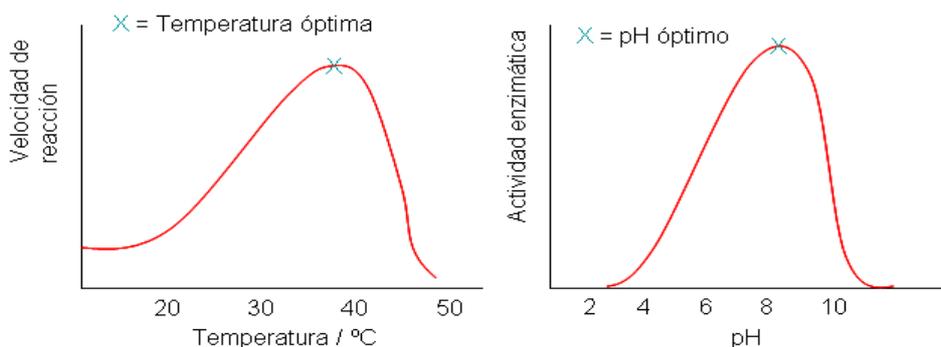
Para la mayoría de las enzimas de animales, la temperatura óptima es alrededor de 37° C. La actividad disminuye bruscamente más allá de esa temperatura. Alrededor de 60° C, la mayor parte de las enzimas se encuentran completamente inactivas. Este efecto se explica por la acción de calor sobre la estructura molecular^[3].

Asimismo, cada enzima trabaja dentro de un pequeño rango de pH. Existe un pH en el cual la actividad de la enzima es máxima llamado pH óptimo. Esto se debe a que los cambios en el pH del medio afectan el estado de ionización de los grupos funcionales en la molécula de enzima y de sustrato, lo que cambia la forma de la enzima, y por tanto su efectividad.

Para la mayoría de las enzimas, el pH óptimo se encuentra entre pH 6 y 8. Por debajo o por encima de esos valores, la velocidad de reacción, y por tanto, la actividad enzimática cae más o menos rápidamente. Sin embargo hay algunas excepciones, por ejemplo, la pepsina del jugo gástrico tiene un pH óptimo extremadamente ácido de alrededor de 1.5; la fosfatasa ácida, abundante en la próstata, presenta su mayor actividad a pH de 5; la fosfatasa alcalina y enzimas de otros órganos alcanzan su máxima actividad a pH 9.5 [3].

La siguiente figura muestra tales efectos sobre la actividad de las enzimas.

Figura 3.2. Temperatura y pH óptimos de una enzima.



Tomado de: Blanco, A.(2000). pp 102-103

3.2. Regulación enzimática.

El mantenimiento de los sistemas vivos requiere la coordinación de múltiples sucesos (a veces contrapuestos) en los que generalmente intervienen las enzimas. Los mecanismos de regulación son necesarios para:

1. Mantener el orden del sistema (ahorro de recursos);
2. Conservar la energía, y
3. Responder a las variaciones ambientales.

Las reacciones enzimáticas del metabolismo pueden ser aceleradas, retrasadas o casi eliminadas por medio de la regulación metabólica. La actividad de las enzimas puede ser modificada por la acción de inhibidores, por la acción de moduladores alostéricos sobre enzimas alostéricas o por modificación covalente de la enzima.

La función de una proteína se relaciona de manera notoria con su estructura (conformación). Por lo tanto las células regulan la actividad de las proteínas mediante la modificación de la conformación de las moléculas claves de la proteína. En el caso de las enzimas, la regulación de la actividad catalítica se enfoca en la modificación de la estructura del sitio activo. Dos mecanismos frecuentes para alternar la forma del sitio activo de una enzima son la modificación covalente y la regulación alostérica. Sin embargo, es preciso entender primeramente el fenómeno de la inhibición enzimática para entender estos últimos.

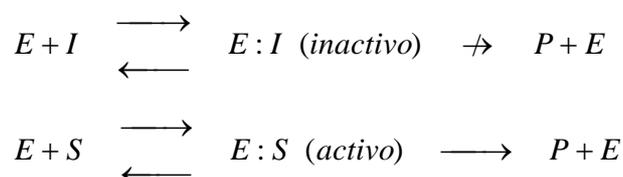
3.2.1. Inhibición enzimática.

La actividad de las enzimas puede inhibirse. Las moléculas que reducen la actividad de una enzima, denominadas *inhibidores*, incluyen muchos fármacos, antibióticos, conservantes alimentarios y venenos. Las investigaciones de la inhibición enzimática y de los inhibidores llevadas a cabo por los químicos son importantes por varias razones:

1. La razón más importante, es que en los seres vivos la inhibición enzimática es un medio importante para regular las rutas metabólicas;
2. Numerosos tratamientos clínicos se fundamentan en la inhibición enzimática.
3. El proceso de inhibición enzimática es útil para comprender los mecanismos de acción tóxica y farmacológica de algunos compuestos.

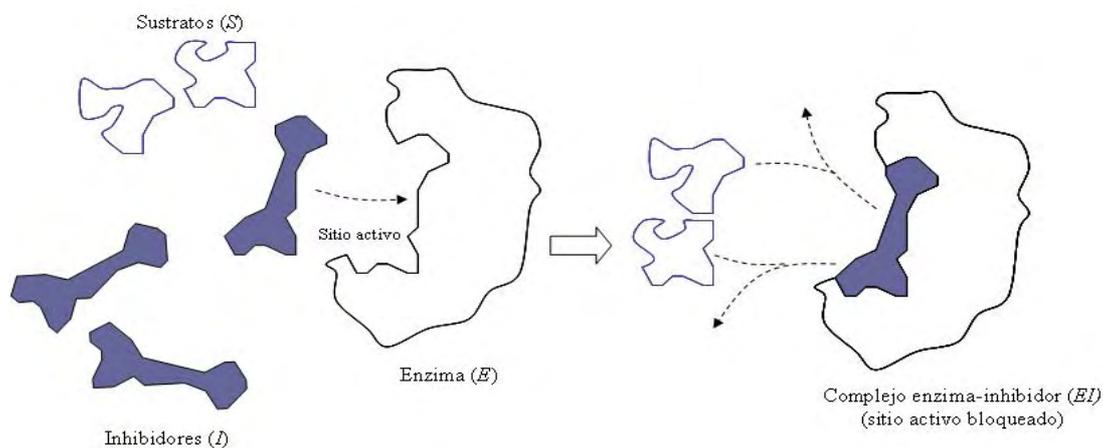
La presencia de ciertas moléculas en una reacción enzimática puede disminuir la velocidad de la reacción al interferir con la formación del complejo enzima-sustrato, con su disociación o con ambos procesos. Básicamente, pueden llegar a presentarse dos mecanismos distintos de inhibición, la inhibición competitiva y la inhibición no competitiva, los cuales se presentan a continuación.

Inhibición competitiva. Debido a su similitud molecular, los inhibidores competitivos pueden competir con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Al ocupar el sitio activo, esta molécula actúa como un inhibidor competitivo I al impedir que el sustrato S se una a la enzima E , forme el complejo enzima-sustrato $E:S$ y produzca un producto P . En su lugar se forma un complejo enzima-inhibidor $E:I$ que frena la reacción ^[16]. La inhibición puede ser invertida al diluir el inhibidor, o adicionando sustrato en gran exceso. La acción de los inhibidores competitivos puede entenderse en términos de las siguientes reacciones:



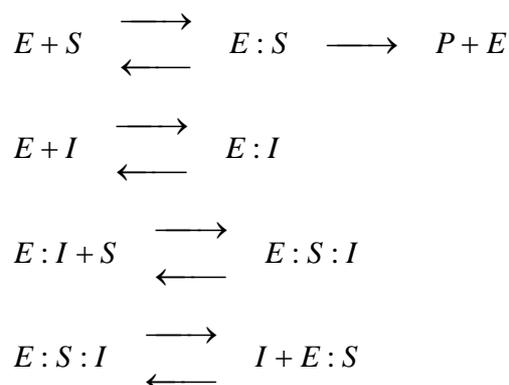
donde $E:I$ es una forma inactiva de la enzima, es decir, de esta manera no se producirá el producto P . El efecto de un inhibidor competitivo depende de las concentraciones relativas del inhibidor y el sustrato. La siguiente figura esquematiza este mecanismo.

Figura 3.3. Fenómeno de inhibición enzimática.



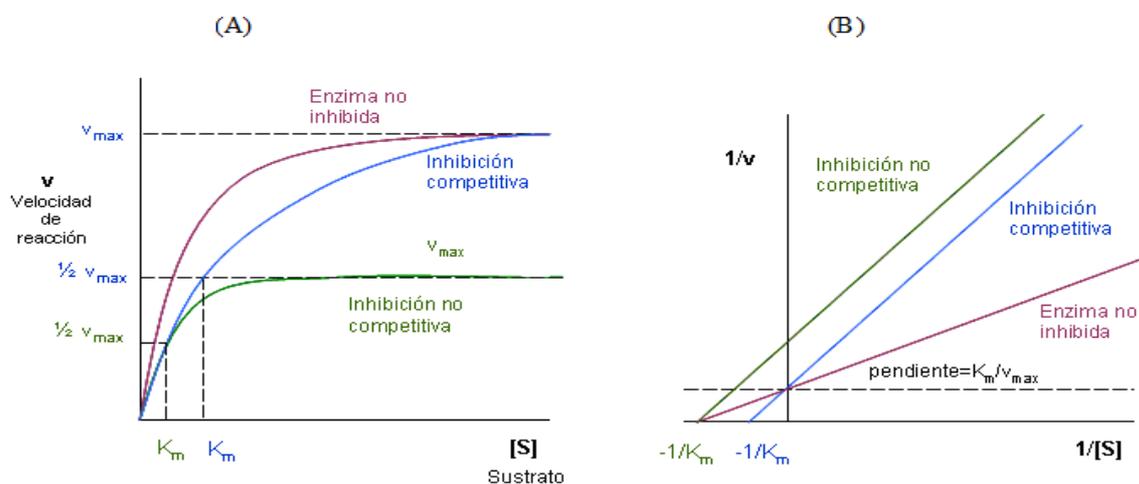
Tomado de: Karp, G. (2006) p. 112

Inhibición no-competitiva. En este tipo de inhibición enzimática, no existe competencia entre el sustrato S y el inhibidor I por el sitio activo de la enzima, por lo general, el inhibidor actúa en un sitio distinto al punto activo de la enzima. Por ello, el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre (formación del complejo $E:I$), como al complejo $E:S$ (formación de $E:I:S$). El complejo $E:I:S$ se disocia de nuevo en $I + E:S$ y este último complejo dará el producto P . Las siguientes reacciones se presentan en este tipo de inhibición ^[11]



En presencia de este tipo de inhibidores, la formación de P se realiza más lentamente, y de hecho, la inhibición no competitiva causa disminución en los parámetros cinéticos v_{\max} y en el valor de K_m . Por tanto, la reacción puede hacerse más lenta, pero no se interrumpe. Estas observaciones se muestran en la figura 3.4.

Figura 3.4. Efecto de los inhibidores en la velocidad de reacción.



Tomado de: Karp, G. (2006) p.113

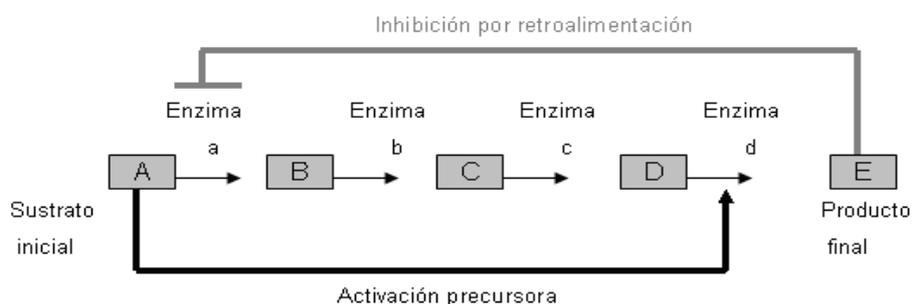
En la figura anterior se muestra el efecto de los inhibidores competitivos y no competitivos cuando la velocidad de la reacción se grafica como la velocidad de la reacción contra la concentración de sustrato (A) o como su recíproco (B). El inhibidor no competitivo disminuye la v_{max} sin afectar K_m , mientras que el inhibidor competitivo aumenta K_m sin afectar la velocidad máxima. En un caso, la v_{max} disminuye y en el otro K_m aumenta. En ambos tipos, la pendiente (K_m/v_{max}) se incrementa en relación con la reacción no inhibida. Las células utilizan una versión de inhibición no competitiva para regular la actividad de enzimas clave en las vías metabólicas ^[12].

Los estudios de inhibición a menudo brindan información acerca de la especificidad de una enzima, la estructura física y química del sitio activo y del mecanismo cinético de la reacción. En la vida cotidiana, los inhibidores enzimáticos pueden encontrarse enmascarados como drogas, antibióticos, preservativos, venenos y toxinas.

3.2.2. Regulación alostérica.

Si el producto de una serie de reacciones en una vía metabólica, comienza a acumularse en la célula, puede provocar la inhibición de la primera reacción frenando por lo tanto toda la reacción en conjunto (proceso denominado inhibición por retroalimentación). Por otro lado, la acumulación de una sustancia dentro de la célula puede activar una enzima que desencadene una secuencia de reacciones para la cual esta sustancia sea el sustrato inicial de la misma (proceso llamado activación precursora). Esto reduce la concentración del sustrato inicial ^[22].

Este tipo de regulación se aprecia en la siguiente figura:



Tomado de: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/...>

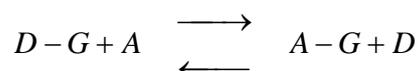
En el caso de la inhibición por retroalimentación y la activación precursora, la actividad de la enzima es regulada por una molécula que no es su sustrato. En estos casos, la molécula con tal efecto se une a la enzima en un sitio diferente del sitio activo en el cual se une con el sustrato. Cuando dicha molécula se une a este sitio (denominado punto alostérico de la enzima), altera la estructura de la enzima, por lo tanto se modifica la actividad catalítica de ella. Esto se conoce como efecto alostérico. En esta forma de regulación enzimática se presenta lo siguiente,

- En la inhibición por retroalimentación, el efecto alostérico provoca una baja afinidad de la enzima por su sustrato.
- En la activación precursora, la molécula con efecto alostérico incrementa la afinidad de la enzima por su sustrato ^[22].

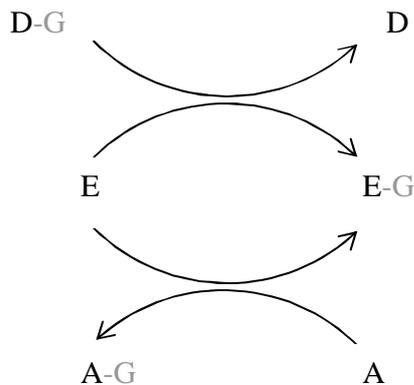
3.2.3. Modificación covalente.

Existen enzimas que regulan su actividad por el pasaje de una forma activa a inactiva debido a la formación o rotura reversible o irreversible de enlaces covalentes. Las enzimas modificadas covalentemente son aquellas que ven modificada su actividad mediante la unión covalente y reversible de un grupo funcional químico.

El efecto neto de tales reacciones es la transferencia de un grupo funcional químico, así para la siguiente reacción de transferencia de grupo en equilibrio ^[16]



un grupo G , se transfiere desde un donador $D-G$ al aceptor A . La reacción en conjunto involucra la ruptura del enlace $D-G$ y la formación de un nuevo enlace $A-G$, con esto una enzima E se activa y forma el compuesto $E-G$ y posteriormente $E-G$ se convierte de nuevo en E . Las reacciones de transferencia de grupo (modificación covalente) catalizadas por una enzima E pueden representarse de manera general como sigue:



Tomado de: Mayes P. A. (2001) p. 105

Existen tres características importantes de las reacciones transferencia de grupo, catalizadas por enzimas:

1. Cada reacción implica tanto la ruptura, como la formación de un enlace covalente.
2. La enzima es un reactivo que interactúa tanto con el enlace *D-G* como con *A*.
3. La enzima actúa de manera catalítica para toda la reacción en conjunto, no obstante para cada reacción parcial existe una relación estequiométrica 1:1 entre la enzima y el resto de los reactivos, es decir, se necesita una molécula de sustrato por cada molécula de enzima para llevar a cabo la reacción entre ellos.

Existen varias reacciones de modificación covalente, las cuales se citan a continuación:

Acetilación. Adición de un grupo acetilo, CH_3-CO- , a los residuos de aminoácido de una proteína.

Fosforilación. Consiste en la adición de un grupo fosfato (HPO_4^{-2}) al aminoácido de una proteína. Habitualmente, la fosforilación/defosforilación de proteína suele ejercer una función reguladora de las mismas. Es el tipo más común de modificación de proteínas.

Metilación. Adición de un grupo metilo ($-CH_3$). La actividad de algunas proteínas es alterada mediante este cambio.

Carboxilación. Adición de un grupo carboxilo (-COOH).

Hidroxilación. Adición de un grupo hidroxilo (-OH).

Glicosilación. Consiste en la adición de una o varias moléculas de azúcar.

Otras modificaciones. Se conocen hasta 100 tipos más de reacciones que modifican los aminoácidos de una proteína, como puede ser la adición de yodo en la *tiroglobina* aunque en muchos casos se desconoce la función que pueden cumplir ^[16].

El objetivo de todos estos cambios o modificaciones puede ser permitir la adopción de una estructura que posibilite la función, la activación o la inhibición de la actividad de las proteínas en general, esto incluye a las enzimas.

La modificación covalente como se ilustra con la adición (o eliminación) de grupos fosfato es un mecanismo general para cambiar la actividad de las enzimas, que se conoce como ciclos de fosforilación-defosforilación de proteínas. La modificación covalente de enzimas se realiza con mayor frecuencia por la transferencia de un grupo fosfato de la molécula del ATP (*adenosín trifosfato*). Las enzimas que realizan la transferencia de grupos fosfato a otras proteínas se llaman *quinasas de proteína* y regulan actividades tan diversas como la acción hormonal, el ciclo celular y la expresión genética. Esto sugiere que para algunas enzimas, estos grupos químicos se encuentran inhibiendo o promoviendo la actividad de las mismas, modificando con ello su estructura y, por lo tanto, controlando su actividad ^[1].

Las *quinasas* son enzimas que transfieren grupos fosfato a sus sustratos, en cuyo caso se dice que el sustrato se encuentra en una forma activa por la presencia de dicho grupo químico. Las *fosfatasas* son enzimas que degradan el grupo fosfato de su sustrato, en este caso, se dice que éste último se encuentra en su forma inactiva.

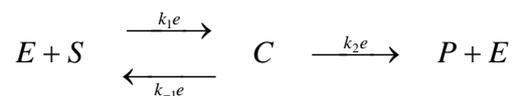
Con el fin de controlar la actividad de las proteínas en la célula, éste último se vale frecuentemente del mecanismo de fosforilación/defosforilación para controlar el metabolismo dentro ella. Este es el fenómeno que principalmente se analiza en este trabajo.

El conocimiento del efecto alostérico y la identificación de enzimas reguladoras en los seres vivos mediante la modificación covalente han abierto grandes perspectivas en los estudios metabólicos pues constituyen una nueva vía para describir los complejos mecanismos de regulación.

3.3. Modelos de redes bioquímicas.

Las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en las células comprenden un conjunto de reacciones acopladas --modificaciones covalentes-- y catalizadas por enzimas. A menudo este acoplamiento da lugar a una red de reacciones. Las redes de reacciones se pueden formular mediante una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales acopladas entre sí para describir el comportamiento temporal de las especies que se encuentran interactuando en la red ^[24].

En este trabajo, se estudiarán redes de reacciones que comprenden la modificación covalente de enzimas mediante el proceso de fosforilación/defosforilación. Es preciso recordar que la fosforilación activa a las enzimas y la defosforilación las inactiva, de esta forma se controla la actividad de ellas. Para cada ciclo de activación/desactivación de enzimas estará presente una reacción enzimática de la forma



siendo E una enzima; S su sustrato; C el complejo enzima-sustrato y, P el producto de esta reacción. Las constantes de velocidad se denotan de la siguiente manera: k_1 para la unión de la enzima y el sustrato, k_{-1} para la disociación del complejo y k_2 para la formación del producto.

Asimismo, para cada reacción de este tipo, existe una constante de Michaelis, definida por la ecuación siguiente $K_{me} = (k_{-1e} + k_{2e})/k_{1e}$. El subíndice e hace referencia específica a la enzima E ; esta notación resulta conveniente al analizar procesos que involucran redes de reacciones ya que participan en ellas más de dos enzimas, por lo tanto se define una constante de Michaelis, K_{mi} , para cada enzima i presente, de acuerdo a la expresión

$$K_{mi} = \frac{k_{-1i} + k_{2i}}{k_{1i}}$$

Algunas de estas reacciones son muy rápidas, otras muy lentas o intermedias. Las grandes diferencias que existen en las distintas escalas de tiempo involucradas (difieren entre ellas en muchos ordenes de magnitud) crean dificultades para estudiar la evolución temporal (cinética) de las reacciones y así comprender los principios básicos de su operación. Ejemplos de lo anterior son:

$$\begin{aligned}\frac{d[A]}{dt} &= \varepsilon^{-1} f([A],[B],...) \longrightarrow \text{RAPIDA} \\ \frac{d[B]}{dt} &= g([A],[B],...) \longrightarrow \text{INTERMEDIA} \\ \frac{d[C]}{dt} &= \varepsilon h([A],[B],...) \longrightarrow \text{LENTA} \\ 0 < \varepsilon &\ll 1\end{aligned}$$

donde ε es un número que está relacionado con la velocidad de reacción ^{[6] [17]}. Para simplificar y eliminar del análisis las variables que varían lentamente se utiliza la aproximación cuasi-estacionaria QSSA en la que $d[C]/dt \approx 0$, por lo que se cumple que $[C] \approx C_T = \text{cte}$. Para variables más rápidas, el proceso debe escribirse como sigue:

$$\frac{d[A]}{dt} = \varepsilon^{-1} \cdot f([A], [B])$$

en cuyo caso la concentración $[A]$ cambia muy rápidamente hasta que se cumpla la condición

$$\frac{d[A]}{dt} = \varepsilon^{-1} \cdot f([A], [B], ...) \approx 0$$

La aproximación al estado cuasi-estacionario implica resolver la ecuación algebraica, por ejemplo $f([A], [B], ...) = 0$ en la que $[A] = f'([B], C_T, ...)$. Con esto se obtiene una nueva ecuación diferencial donde se involucra la escala de tiempo intermedia solamente ^[6], esto es

$$\frac{d[B]}{dt} = g\langle f'([B], C_T, ...), [B], ... \rangle$$

3.3.1. La aproximación cuasi-estacionaria QSSA.

Se basa en suponer que los complejos intermediarios enzima-sustrato no varían en el tiempo, o bien, el cambio en ellos es lo suficientemente pequeño, por tanto prácticamente la concentración de los mismos permanece constante. Esta hipótesis es retomada en el modelo de Michaelis-Menten, por lo que la aproximación QSSA es en realidad dicho esquema. El ejemplo clásico de Michaelis-Menten proporciona un punto de partida para estudiar redes de reacciones y diferenciar las escalas de tiempo presentes en las mismas.

Siguiendo el esquema de reacciones para una reacción catalizada por una enzima, es posible escribir la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente forma:

$$[E] + [C] = E_T = \text{cte.}$$
$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [C] - k_2 \cdot [C] = 0$$
$$\frac{d[S]}{dt} = -k_2 \cdot C = -\frac{k_2 E_T [S]}{K_m + [S]}, \quad K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

En el caso en que $E_T \ll K_m + [S]$, el lado derecho de la ecuación anterior será pequeño y en consecuencia $[S]$ cambiará lentamente en el tiempo, de aquí que sea posible usar la aproximación QSSA. Esta condición necesariamente se debe cumplir para que tenga validez este modelo ^[6].

3.3.2. La aproximación total tQSSA para reacciones catalizadas por enzimas.

El enfoque que se le da a esta aproximación de redes de reacciones químicas yace en una escala de tiempo modificada de la cinética de Michaelis-Menten que utiliza para su análisis la hipótesis cuasi-estacionaria ^[6].

Bajo condiciones en que la enzima y el sustrato están presentes en concentraciones similares, la condición $E_T \ll K_m + [S]$ no se cumple; por tanto, una variable intermedia apropiada en la escala de tiempo es

$$\hat{S}(t) = S(t) + C(t).$$

En términos de esta variable, las ecuaciones que gobiernan al sistema anterior son

$$E + C = E_T = \text{constante}$$

$$E_T \hat{S} - (E_T + \hat{S} + K_m) \cdot C + C^2 = 0$$

$$\frac{d\hat{S}}{dt} = -k_2 \cdot C$$

Las ecuaciones anteriores son conocidas como la aproximación total cuasi-estacionaria tQSSA. Para conocer la cinética de las ecuaciones es necesario resolver la ecuación anterior exactamente para C como función de \hat{S} y E_T y sustituir esta nueva fórmula en la ecuación para $d\hat{S}/dt$. Para ello, es posible utilizar la siguiente expresión, que representa una buena aproximación siempre que se cumpla $C^2 \ll E_T \hat{S}$. Por lo tanto el sistema se simplifica al considerar que

$$C \approx \frac{E_T \cdot \hat{S}}{K_m + E_T + \hat{S}}$$

Esta ecuación aproximada se conoce como el *aproximante Padé* a la cinética enzimática. Se ha proporcionado un cuidadoso análisis sobre las condiciones de validez de las aproximaciones tQSSA y los aproximantes de Padé en la cinética de redes de reacciones ^[6].

Estas dos aproximaciones a la cinética enzimática son utilizadas a menudo para simplificar los modelos cinéticos de dichos procesos. Asimismo, introducen un ajuste en las escalas de tiempo que involucran las distintas velocidades de reacción que se presentan, con esto se percibe mucho mejor la dinámica de tales sistemas.

En este trabajo de investigación, se estudia la cinética de las redes de reacciones involucradas con el control de la actividad de proteínas y se aplican las aproximaciones QSSA y tQSSA a las mismas para comparar la dinámica de los sistemas. Con esto en mente se describirán en detalle, más adelante, cómo funcionan estas aproximaciones.

4. Aplicaciones.

Parte del gran interés puesto en este proyecto de investigación, es el potencial campo de aplicación que poseen las enzimas en diferentes sectores de la investigación y de la industria. Primeramente, las enzimas son utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones. En los siguientes párrafos describimos algunos ejemplos:

4.1. Biobaterías.

Actualmente, se ha desarrollado un prototipo de pilas ecológicas que funcionan con azúcar. Esta innovación puede generar energía como para que funcione un reproductor de música con un par de altavoces.

Fabricadas con un plástico especial, estas pilas cuentan con una estructura de dos polos. En su polo positivo, hay enzimas que digieren las moléculas de azúcar que se introducen mediante una solución azucarada en el dispositivo. En el polo negativo, hay enzimas que reducen el oxígeno. Desde el polo positivo se extraen los electrones de hidrógeno del azúcar, a través de la oxidación de las enzimas. Los iones liberados van hacia el polo negativo a través del circuito generando una corriente eléctrica, que puede alimentar pequeños aparatos electrónicos.

Las pilas a base de azúcar, gracias a que son benignas con el medio ambiente, pueden llegar a convertirse en un importante dispositivo energético.

En las pruebas realizadas por parte de la compañía Sony, se pudieron generar 50 milivatios, una capacidad que la sitúa por encima de otras biobaterías que existen en el mundo. Se ha elegido el azúcar porque se trata de una sustancia regenerativa, y que puede encontrarse en casi todos los lugares del mundo. Todavía se encuentran en desarrollo y en etapas de investigación ^[19].

Figura 4.1. Biobaterías.



Tomado de: www.genciencia.com/autor/victor-puente.

4.2 Inmovilización covalente de enzimas.

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos: presentan una gran actividad catalítica; muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad); son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica ^[2].

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Como **ventajas** del empleo de enzimas inmovilizadas se pueden destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima;
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales **inconvenientes** del proceso de inmovilización son:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
- Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
- El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas.

De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente ^[2].

La inmovilización covalente de enzimas presenta las siguientes ventajas:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al mantener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

La unión covalente de una enzima a un soporte sólido está basada en la reacción química entre los residuos de aminoácido localizados en la superficie de una enzima y la activación de grupos químicos que están sujetos al soporte. Una enzima inmovilizada covalentemente puede considerarse como un sistema compuesto a su vez de diversos componentes (figura 5.2).

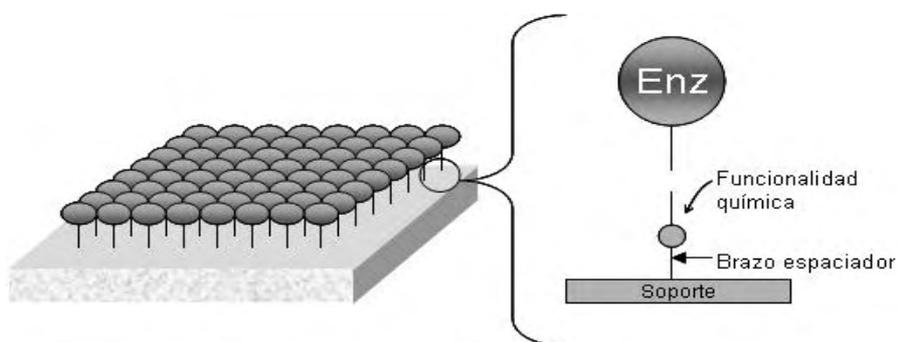
Por otra parte, las siguientes propiedades afectan el rendimiento del proceso de inmovilización ^[14]:

- Naturaleza física del soporte (tamaño de los poros, tamaño de partícula, porosidad).
- Naturaleza química del soporte (composición química del soporte).
- Naturaleza química del enlace entre la enzima y el soporte.
- Conformación de la enzima al momento de la inmovilización o después de ella.
- Orientación de la enzima.
- Naturaleza y longitud del brazo espaciador.
- El número de enlaces formados entre la enzima y el soporte.

En la siguiente figura puede apreciarse esquemáticamente en qué consiste el método de inmovilización de enzimas unidas covalentemente a un soporte sólido. El sistema en conjunto está representado por: la enzima (Enz); la funcionalidad química, que se refiere a la interacción entre los grupos funcionales químicos del soporte y los residuos de aminoácido de la enzima; el brazo espaciador, de naturaleza química e implicada con la retención de la actividad de la enzima y el soporte.

El medio utilizado esencialmente para la inmovilización de enzimas es 99.9% acuoso. En algunos casos, la inmovilización de la enzima se logra en medios orgánicos ^[14].

Figura 4.2. Inmovilización covalente de enzimas y componentes.



Tomado de: Linqui, Cao (2005) pp.169

4.3. Nanotecnología.

Uso de estructuras biológicas como plantillas de materiales nanoestructurados. Es posible utilizar sólidos para encapsular material biológico en el interior de sólidos porosos. Gracias a esta alternativa sintética se han podido encapsular enzimas que, una vez inmovilizadas, mantienen su actividad catalítica. Además, es posible separar el material compuesto bio-inorgánico del medio de reacción y reutilizarlo repetidamente.

La precipitación de sílice requiere condiciones agresivas, por ejemplo, pH alcalino, que no son compatibles con la estabilidad de las biomoléculas que se pretenden inmovilizar. Para solventar este problema es posible utilizar silafinas y otros polipéptidos (unión de varios aminoácidos) o poliaminas que induzcan la formación de la sílice en condiciones suaves, previniendo así la desnaturalización de la biomolécula ^[8].

Siguiendo esta estrategia sintética, se ha inmovilizado la enzima *butirilcolinesterasa* en sílice con rendimientos del 90% en unos pocos segundos mediante el uso del péptido (polímeros de aminoácidos) sintético R5, que es una de las unidades repetitivas del polipéptido natural *silafina*.

El material compuesto bio-inorgánico presenta mayor estabilidad térmica que la enzima en disolución. Ensayos catalíticos en lecho fijo y en lecho fluidizado han indicado que el material inmovilizado conserva su actividad catalítica y que ésta se mantiene con el tiempo y tras sucesivos usos. El uso de unidades de construcción de tamaño nanométrico permite la preparación de sólidos organizados a varias escalas con gran precisión. La síntesis, modificación y funcionalización de estas nano-unidades condicionan la arquitectura final del sólido, así como la manera en la que estas piezas se organizan en estructuras más complejas ^[8].

Dentro de este contexto, muchos estudios se han enfocado en la aplicación de bio-moléculas (por ejemplo, ADN) para producir materiales de formas y tamaños determinados. El ADN es una cadena semejante a los biopolímeros con funciones biológicas intrínsecas como la auto-replicación. Empero, se ha puesto a prueba el hecho de si el ADN hibridado con nanomateriales puede ser manipulado con enzimas.

Un grupo de investigadores de la Universidad de Purdue, en Indiana, U.S.A han encontrado que es posible la adición o el plegamiento de nanopartículas en sitios específicos del ADN. Ellos demostraron que es posible el revestimiento de la molécula de ADN con materiales nanoestructurados utilizando enzimas.

Los investigadores fueron capaces de preparar nanopartículas de CoFe_2O_4 y cubrir el ADN del fago λ (virus capaz de infectar las bacterias) con ellas. Los investigadores creen que este descubrimiento abrirá nuevos métodos para generar materiales nanoestructurados uni-dimensionales novedosos, con posibles aplicaciones en dispositivos de almacenamiento de memoria y sensores magnéticos ^[5].

4.4. Biosensores

Los biosensores constituyen una herramienta imprescindible en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental.

En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de compuesto que sea capaz de interaccionar específicamente con un sistema biológico. Esto se debe a la aplicación de los principios de señalización celular, esto es, el modo en que las células interactúan con el ambiente que les rodea.

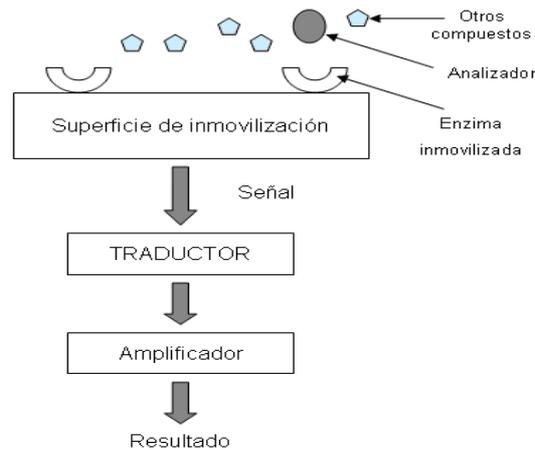
El proceso conocido como señalización celular tiene como fin la transducción de señales químicas provenientes del exterior de la célula y generar como respuesta otra nueva señal para coordinar su comportamiento. Este proceso es llevado a cabo dentro de la célula mediante ciclos repetidos de fosforilación/defosforilación de proteínas (en forma de cascada) cuyo fin es propagar la señal a través de ella y amplificar su eficiencia catalítica.

Generalmente, el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un transductor que, en contacto con un analizador que contiene a la señal (p.e. química), se encargará de transformar la señal química en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.). El empleo de los biosensores presenta las siguientes ventajas:

- La instrumentación requerida es barata y sencilla;
- el análisis es muy sensible; y por último
- permite el uso de muestras con color o turbias que no se podrían medir con métodos espectroscópicos.

Los métodos de inmovilización más utilizados en el diseño de biosensores son la inclusión en membranas semipermeables y la unión covalente a membranas. En ambos casos, las enzimas inmovilizadas van adheridas a la superficie sensible de un electrodo ^[2].

Figura 4.3. Componentes de un biosensor.



Tomado de: Arroyo, M. (1998) p. 11

Algunas aplicaciones de los biosensores son las siguientes:

- Como se indicó anteriormente, los biosensores son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico. Los niveles séricos (del aminoácido **Ser**) de glucosa, lactato y ácido úrico se pueden detectar mediante electrodos enzimáticos disponibles comercialmente. Actualmente, el desarrollo de nuevos biosensores va dirigido a la detección de fármacos, células y virus patógenos.
- En el caso del control de calidad en la industria alimenticia, los biosensores pueden determinar el grado de contaminación microbiana, o bien, cuantificar el azúcar presente en bebidas.
- Finalmente, los biosensores pueden ser muy útiles en el control de la polución del medioambiente. Los analizadores de contaminantes en el agua se basan en el empleo de biosensores capaces de detectar la presencia de residuos tóxicos, pesticidas, herbicidas o microorganismos.

4.5. Fabricación de biochips.

Los *biochips* son dispositivos de tamaño muy reducido que contienen material biológico y que es utilizado en la obtención de información biomédica muy diversa. Estos dispositivos son conocidos también con el nombre de *microarrays* o *micromatrices* de material biológico. Reciben este nombre porque los primeros biochips fueron fabricados usando la tecnología empleada en la producción de microchips para uso informático (fotolitografía), para fijar el material biológico sobre un portaobjetos de vidrio.

Como tales dispositivos miniaturizados, se puede inmovilizar sobre ellos gran cantidad de material biológico de origen diverso como tejidos, células, proteínas, moléculas pequeñas o ácidos nucleicos, entre otros. El material biológico inmovilizado en un biochip conforma una serie ordenada de puntos microscópicos que permite conocer en todo momento lo que hay depositado en ellos. El número de matrices en un biochip puede llegar a alcanzar varias decenas de miles.

Los biochips a base de ácido desoxirribonucleico (ADN) o chips genéticos son los más perfeccionados en la actualidad y ya se están empleando en la obtención de información genética. En ellos se integran miles de sondas (el material inmovilizado) de material genético con secuencias conocidas. Al ser puestas en contacto con una muestra procedente de un paciente, sólo las cadenas que sean complementarias a las presentes en el biochip hibridarán entre sí. Como consecuencia, se origina un patrón de luz característico que es leído por un escáner y transferido a una computadora con el software apropiado para interpretar dicha información. Así se pueden detectar las mutaciones que presenta una persona en sus genes.

Aunque los biochips se están utilizando fundamentalmente en el terreno de la investigación, no cabe duda que en los próximos años se producirá una incorporación paulatina de esta tecnología revolucionaria a los diferentes ámbitos de la sanidad como herramienta diagnóstica, en la prevención del cáncer y otras enfermedades, y como método de análisis genético.

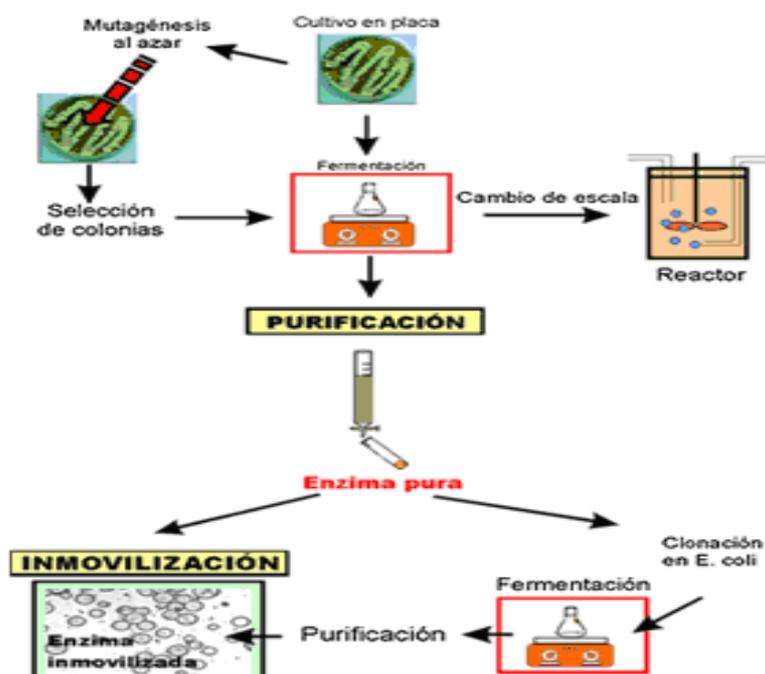
En resumen, se tratan de circuitos integrados compuestos por biopolímeros, como proteínas y ácidos nucleicos, con los que es posible sustituir a los chips semiconductores convencionales ^[7].

4.6 Tecnología enzimática.

Las enzimas se obtienen de microorganismos (bacterias, hongos o levaduras) seleccionados, y posteriormente cultivados por fermentación (en matraz o reactor). A partir de los caldos de cultivo se procede a la purificación de la enzima que catalizaría la reacción de interés. Una vez purificada, se realizaría su caracterización, estudios cinéticos y de estabilidad en las condiciones de trabajo. Por otra parte, es posible intentar la clonación del gen que codifica para la enzima en la bacteria *Escherichia coli*, lo que permitiría su máxima expresión y su obtención en grandes cantidades. Tanto la enzima original como la enzima clonada, tras su purificación, se podría inmovilizar para su posterior recuperación y reutilización en el proceso.

Las enzimas inmovilizadas podrían ser empleadas tanto en medio acuoso, como en medio orgánico, según el tipo de biotransformación que se fuera a realizar^[2]. El proceso es el siguiente:

Figura 4.4. Proceso esquemático de obtención de enzimas.

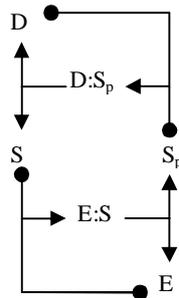


Resultados y discusión.

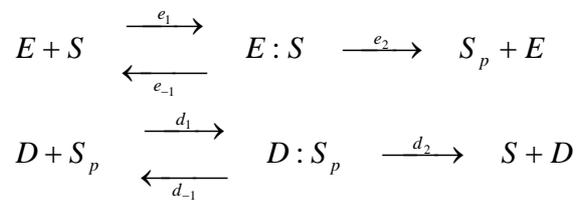
En la biología molecular y de sistemas, un modelo fundamental para comenzar a estudiar las redes bioquímicas que comprenden la modificación de proteínas, es el modelo de Goldbeter-Koshland (G-K), pues constituye un módulo de reacciones bioquímicas fundamentales. Este modelo hipotético resulta muy útil, ya que a partir de éste se pueden construir otros modelos más complejos que consisten en el acoplamiento de módulos de este tipo.

Esto comprende un ciclo de fosforilación-defosforilación, que involucra la formación de una forma activa S_p a partir de un sustrato S (forma inactiva), cuya reacción se encuentra catalizada por dos enzimas, D y E . La especie S_p representa la forma fosforilada (forma activa) de S ; la fosforilación se realiza por la enzima denominada *quinasa* que se representa con la letra E , y la defosforilación (la reacción inversa) la lleva a cabo una enzima llamada *fosfatasa* representada con la letra D [6].

Figura 5.1.A Diagrama esquemático del modelo G-K.



El mecanismo de reacciones que comprende esta red es el siguiente:



donde las cantidades e_1 , e_{-1} y e_2 representan las constantes de velocidad para la reacción catalizada por la enzima E y las letras d_1 , d_{-1} y d_2 son las constantes para la reacción que es catalizada por la enzima D .

A partir de aquí, los mecanismos de reacciones para las redes tendrán la siguiente notación: los puntos en los extremos de una línea del diagrama indican la unión entre dos especies químicas para formar un complejo enzima-sustrato, señalado por la flecha simple y también que la reacción es reversible, por ejemplo, $D + S_p \leftrightarrow D:S_p$. La doble flecha se refiere a la disociación del complejo enzima-sustrato (por ejemplo $D:S_p \rightarrow D+S$), la ausencia de un punto sobre la línea del diagrama indica que la reacción es irreversible.

Volviendo al ejemplo anterior, la concentración total para las enzimas y el sustrato en cualquier tiempo viene dada por las siguientes ecuaciones

$$D_T = D + [D : S_p]$$

$$E_T = E + [E : S]$$

$$S_T = S + S_p + [D : S_p] + [E : S]$$

donde D_T , E_T y S_T son las concentraciones totales para las enzimas D , E y S , siendo las primeras constantes.

Tomando en cuenta las suposiciones de que no existen gradientes en las concentraciones de las especies químicas, que el mezclado es perfecto en el volumen de reacción y aplicando la ley de acción de masas, se definen velocidades de cambio para cada componente de la red. Las ecuaciones que describen el comportamiento en el tiempo de las concentraciones de las especies químicas cambiantes son

$$\frac{dS_p}{dt} = -d_1 \cdot (D_T - [D : S_p]) \cdot S_p + d_{-1} \cdot [D : S_p] + e_2 \cdot [E : S] \dots \dots \dots (1)$$

$$\frac{d[D : S_p]}{dt} = d_1 \cdot (D_T - [D : S_p]) \cdot S_p - d_{-1} \cdot [D : S_p] - d_2 \cdot [D : S_p] \dots \dots \dots (2)$$

$$\frac{d[E : S]}{dt} = e_1 \cdot (S_T - S_p) \cdot (E_T - [E : S]) - e_{-1} \cdot [E : S] - e_2 \cdot [E : S] \dots \dots \dots (3)$$

Por otra parte, de acuerdo al apartado de cinética enzimática, la hipótesis de Michaelis-Menten de la cinética enzimática indica que las siguientes condiciones deben cumplirse

$$\frac{d[D : S_p]}{dt} = 0 \dots \dots \dots (4)$$

$$\frac{d[E : S]}{dt} = 0 \dots \dots \dots (5)$$

Sustituyendo las ecuaciones (4) y (5) en las ecuaciones (2) y (3) para los complejos enzima-sustrato, y reorganizando, se tiene:

$$[D : S_p] = \frac{D_T \cdot S_p}{K_{md} + S_p} \dots \dots \dots (6)$$

$$[E : S] = \frac{E_T \cdot (S_T - S_p)}{K_{me} + S_T - S_p} \dots \dots \dots (7)$$

en donde $K_{me} = (e_{-1} + e_2) / e_1$ y $K_{md} = (d_{-1} + d_2) / d_1$ son las constantes de Michaelis para las reacciones, y los subíndices e y d se refieren a las reacciones de las enzimas E y D respectivamente.

Sustituyendo las ecuaciones (6) y (7) en la ecuación (1), se obtiene la ecuación que describe la formación de S_p en el transcurso del tiempo:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{V_e(1-x)}{J_e + 1-x} - \frac{V_d x}{J_d + x} \dots \dots \dots (8)$$

donde se han hecho los siguientes cambios de variables $x = S_p / S_T$, $J_e = (K_{me} + E_T) / S_T$, $J_d = (K_{md} + D_T) / S_T$, $V_e = e_2 \cdot E_T / S_T$, $V_d = d_2 \cdot D_T / S_T$.

Esta ecuación dinámica describe la evolución en el tiempo de la red de la figura 4.1, y fue investigada por primera vez en 1981 por Goldbeter y Koshland ^[9]. El análisis de Goldbeter y Koshland de los ciclos de fosforilación-defosforilación resulta excelente para analizar sistemas de control metabólico, donde las concentraciones del metabolito (sustrato) S_T son mayores en magnitud comparada con las concentraciones de enzima, E_T y D_T .

Para analizar las redes bioquímicas donde interactúan proteínas, la hipótesis de Michaelis-Menten no resulta válida, y debe(n) tomarse en cuenta la(s) contribución(es) de los complejos enzima-sustrato.

Por otro lado, para aplicar tQSSA a estas reacciones se tiene que definir la siguiente variable: $\hat{S}_p = S_p + D \cdot S_p$. Una variable circunfleja como \hat{S}_p denota un cambio en las distintas escalas de tiempo presentes en el mecanismo de reacciones, al representar esta variable como la suma de una especie química libre más todos los complejos intermediarios donde aparece dicha especie [6]. De esta forma y aplicando la aproximación estacionaria a los complejos, es posible definir la velocidad de cambio de esta variable como:

$$\begin{aligned} \frac{d\hat{S}_p}{dt} &= e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] \\ 0 &= D_T \cdot \hat{S}_p - [D:S_p] \cdot (D_T + K_{md} + \hat{S}_p) + [D:S_p]^2 \\ 0 &= E_T \cdot (S_T - \hat{S}_p) - [E:S] \cdot (E_T + K_{me} + S_T - \hat{S}_p) + [E:S]^2 \end{aligned}$$

Asimismo, despreciando los términos cuadráticos en las contribuciones de los complejos enzima sustrato, $[E:S]^2$ y $[D:S_p]^2$, a las ecuaciones cinéticas anteriores y definiendo nuevamente J_d y J_e como en (8), se tiene que el cambio $d\hat{S}_p/dt$ está sujeta a las siguientes definiciones:

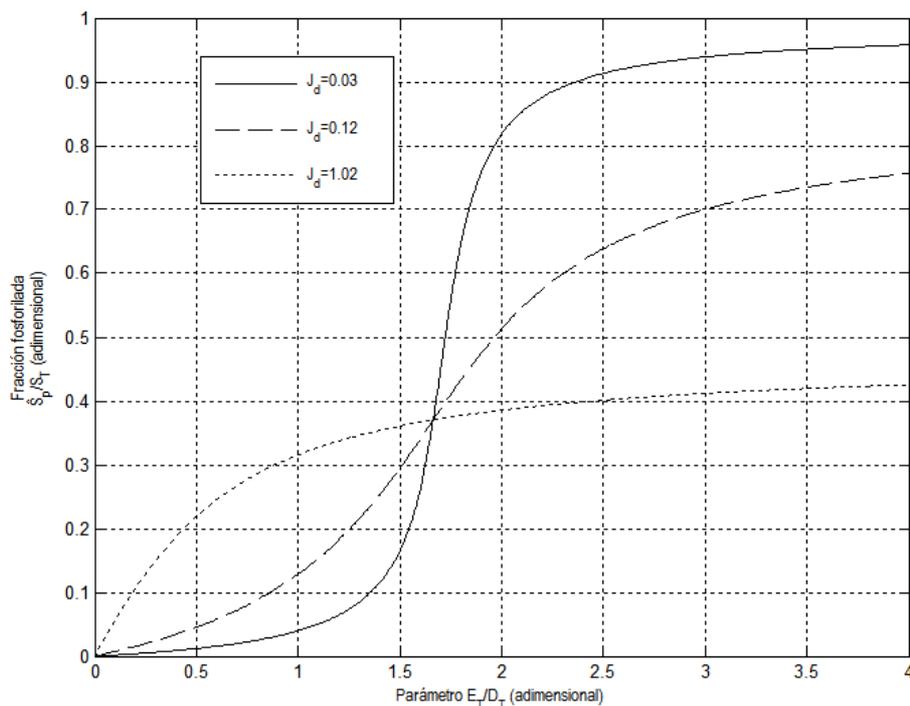
$$\begin{aligned} \frac{d\hat{S}_p}{dt} &= e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] & \frac{dx}{dt} &= \frac{V_e(1-x)}{J_e + 1 - x} - \frac{V_d x}{J_d + x} \dots\dots\dots(9) \\ 0 &= \frac{D_T}{S_T} \cdot \frac{\hat{S}_p}{S_T} - [D:S_p] \cdot \left(\frac{D_T + K_{md}}{S_T} + \frac{\hat{S}_p}{S_T} \right) & x &= \frac{\hat{S}_p}{S_T}, \quad \hat{S}_p = S_p + [D:S_p] \\ 0 &= \frac{E_T}{S_T} \cdot \left(1 - \frac{\hat{S}_p}{S_T} \right) - [E:S] \cdot \left(\frac{E_T + K_{me}}{S_T} + 1 - \frac{\hat{S}_p}{S_T} \right) & J_e &= \frac{K_{me} + E_T}{S_T}, \quad J_d = \frac{K_{md} + D_T}{S_T} \\ & & V_e &= e_2 \cdot E_T / S_T, \quad V_d = d_2 \cdot D_T / S_T \end{aligned}$$

Esta aproximación a las ecuaciones algebraicas en (9) se conoce como el aproximante de Padé.

La solución de la ecuación (9) en el estado estacionario para la forma fosforilada \hat{S}_p se grafica versus E_T/D_T para valores de las constantes cinéticas, $d_2/e_2 = 1.7$, $K_{me} = K_{md} = 1$ nM (*nanomolar*, corresponde a una concentración igual a 1×10^{-9} M o 1×10^{-9} moles/L), $S_T = 50$ nM y para diferentes valores de la concentración total de la enzima D_T : 0.5 nM ($J_d = 0.03$), 5 nM ($J_d = 0.12$) y 50 nM ($J_d = 1.02$).

La gráfica siguiente muestra las concentraciones de \hat{S}_p/S_T , para valores de $J_d=0.03$, línea continua (—); $J_d=0.12$ línea segmentada (---), en los que la solución es una función sigmoïdal de E_T . Para $J_d > 1$, es decir cuando $J_d=1.02$ (⋯), la forma de la solución es diferente de la anterior e indica que el producto, \hat{S}_p/S_T , crece monótonicamente al aumentar la cantidad E_T/D_T .

Figura 5.1.B Solución del modelo G-K con el aproximante Padé.



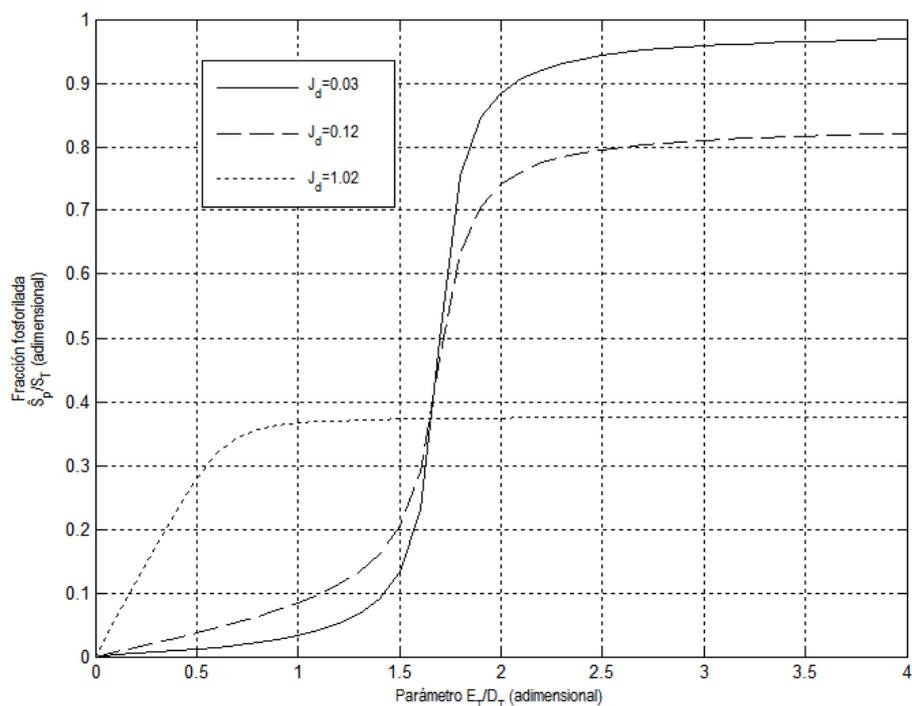
Las relaciones entre $J_e = (K_{me}+E_T)/S_T$ y $J_d = (K_{md}+D_T)/S_T$, muestran que valores pequeños en J_d corresponden a una concentración total de sustrato S_T significativamente mayor que la de la enzima D_T (esto es, $K_{md} + D_T \ll S_T$).

Los valores grandes en J_d muestran que las concentraciones totales de sustrato son menores que la de la enzima, por lo tanto la enzima estará presente en un orden de concentración mayor que su sustrato (en cuyo caso, $K_{md} + D_T \gg S_T$). Esta gráfica muestra la sensibilidad de la fracción fosforilada de sustrato \hat{S}_p/S_T , con los parámetros de E_T/D_T que indican la proporción de concentración total de enzima quinasa E_T con la concentración total de la enzima fosforilada D_T .

Lo anterior requiere que la concentración total de enzima sea pequeña con respecto a la concentración de sustrato: el requerimiento estándar para que resulte válida la suposición de Michaelis-Menten. Sin embargo, en este tipo de procesos en los que las concentraciones de enzima y sustrato se encuentran presentes a concentraciones similares (ya que ambos, enzima y sustratos son proteínas), la suposición de Michaelis-Menten no resulta del todo cierta y es necesario aplicar otro tipo de aproximación: tQSSA.

Por otra parte, la aproximación tQSSA se utiliza para resolver exactamente el valor de \hat{S}_p/S_T sin necesidad de considerar el aproximante de Padé. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica, donde se sigue manteniendo la sensibilidad del sistema con diferentes valores de J_d .

Figura 5.1.C Solución del modelo G-K con la aproximación tQSSA



Las ecuaciones para este modelo se dan en la tabla 2.1, donde se presenta el modelo completo y las correspondientes aproximaciones estacionarias QSSA y tQSSA llevadas a cabo para simplificar el modelo. Los valores de los parámetros necesarios para la simulación de la cinética del sistema se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.1. Ecuaciones para el modelo de la figura 5.1.

Modelo	Ecuaciones
Modelo exacto	$D=D_T[D:S_p]$
	$E=E_T[E:S]$
	$S=S_T-S_p-[D:S_p]-[E:S]$
	$d[D:S_p]/dt=d_1 \cdot D \cdot S_p-(d_{-1}+d_2) \cdot [D:S_p]$
	$d[E:S]/dt=e_1 \cdot E \cdot S-(e_{-1}+e_2) \cdot [E:S]$
	$dS_p/dt=e_2 \cdot [E:S]-d_1 \cdot D \cdot S_p+d_{-1} \cdot [D:S_p]$
QSSA	$0=D_T \cdot S_p-(K_{md}+S_p) \cdot [D:S_p]$
	$0=E_T \cdot (S_T-S_p-[D:S_p]) \cdot [E:S]-(E_T+K_{me}+S_T-S_p-[D:S_p]) \cdot [E:S]^2$
	$dS_p/dt=e_2 \cdot [E:S]-d_1 \cdot D \cdot S_p+d_{-1} \cdot [D:S_p]$
tQSSA	$\hat{S}_p=S_p+[D:S_p]$
	$0=D_T \cdot \hat{S}_p-[D:S_p] \cdot (D_T+K_{md}+\hat{S}_p)+[D:S_p]^2$
	$0=E_T \cdot (S_T-\hat{S}_p)-[E:S] \cdot (E_T+K_{me}+S_T-\hat{S}_p)+[E:S]^2$
	$d\hat{S}_p/dt=e_2 \cdot [E:S]-d_2 \cdot [D:S_p]$

Las ecuaciones de la tabla 2.1 están sujetas a las siguientes condiciones iniciales: $S_p(0)=S_T$, $S(0)=0$, $D:S_p(0)=0$, $E:S(0)=0$.

Tabla 2.2. Parámetros utilizados en el modelado de los procesos.

Enzima	S	S	C	D_p	E	F
Sustrato	D	E	D_p	S_p	S	E_p
Letra l	a	b	c	d	e	f
l_1	0.2	5	0.1	0.0009	0.1	0.1
l_{-1}	0.02	10.6	0.1	0.005	0.05	0.01
l_2	4	0.4	20	0.085	0.05	2
K_{ml}	20.1	2.2	201	100	1	20.1
L_T	50	50	10	200	20	0.5

Tomado de: Ciliberto, A, et al. (2007) p. 466

En la tabla 2.2, las constantes l_1 tienen unidades de $nM^{-1} \text{ min}^{-1}$, mientras que las constantes de disociación l_{-1} y l_2 presentan unidades en min^{-1} . Las concentraciones totales l_T y las constantes de Michaelis, K_{ml} tienen unidades expresadas en nM.

Los parámetros de la tabla anterior dependen de la enzima y su sustrato. Por ejemplo, la reacción entre la enzima E y el sustrato S tiene las constantes asociadas a la letra e , siendo estas constantes e_1 , e_{-1} y e_2 . Así también, debido a la naturaleza proteica de las interacciones en una red de reacciones, se da el caso de que las enzimas pueden actuar como sustratos y también, los sustratos pueden actuar como enzimas. En este caso, debe interpretarse a S como la enzima y a E como el sustrato, así pues, le corresponden las constantes dadas por la letra b y son b_1 , b_{-1} y b_2 . Esta es la forma correcta de interpretar esta tabla.

Las soluciones para el comportamiento de las concentraciones de los complejos enzima-sustrato ($[E:S]$ y $[D:S_p]$) se grafican como función de la concentración de sustrato, S y S_p , respectivamente para el modelo completo (trazo negro) así como para las aproximaciones QSSA (trazo azul) y tQSSA (trazo rojo). Esto se muestra en la Figura 5.2.

Figura 5.2. Comparación entre QSSA y tQSSA para el modelo G-K.

Figura 5.2 (A)

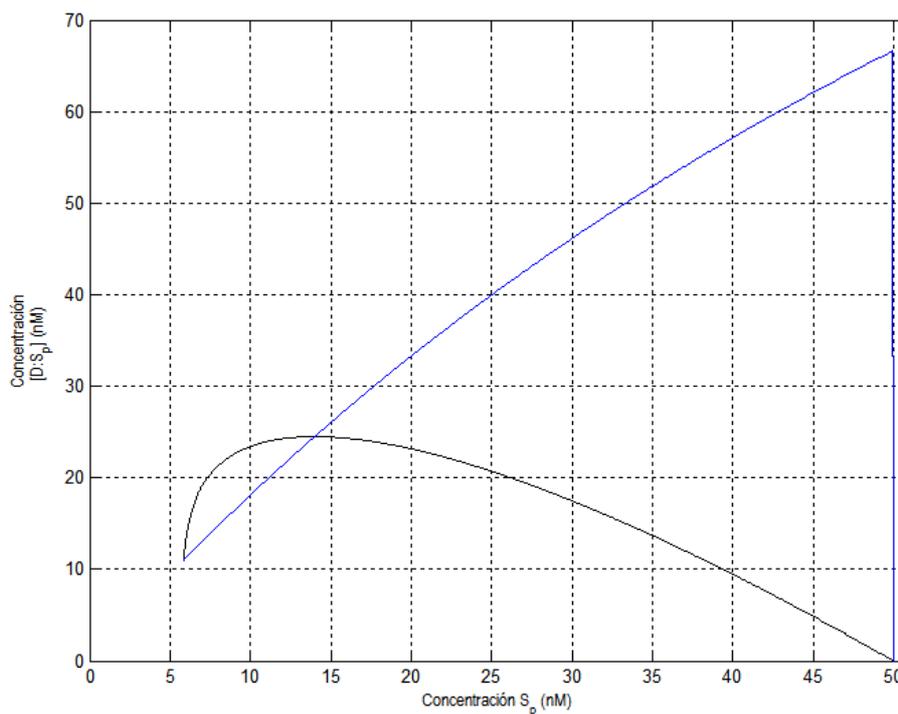


Figura 5.2 (B)

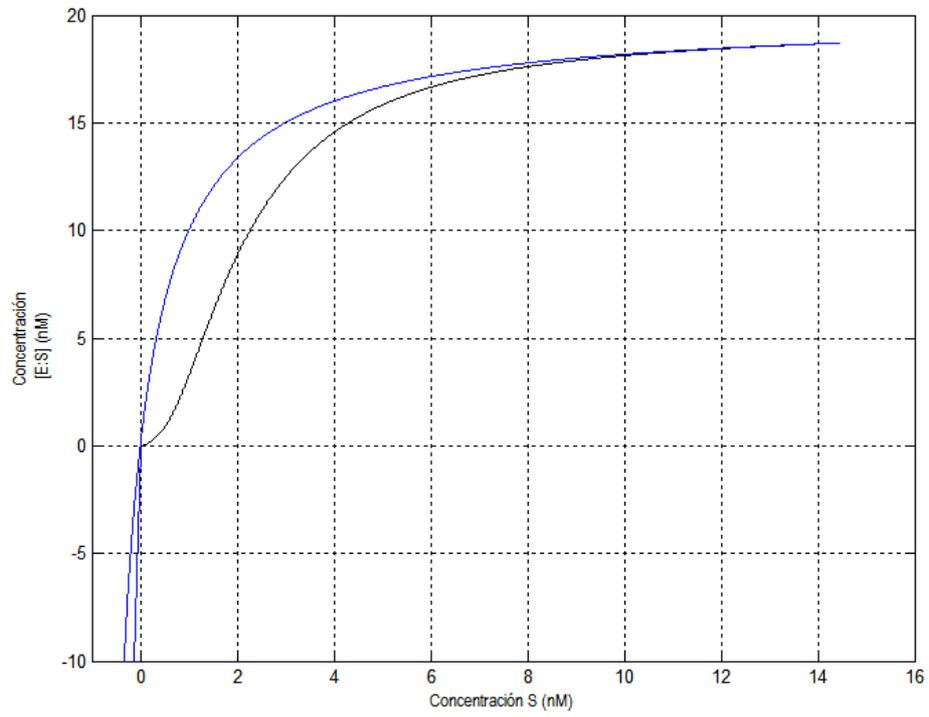


Figura 5.2 (C)

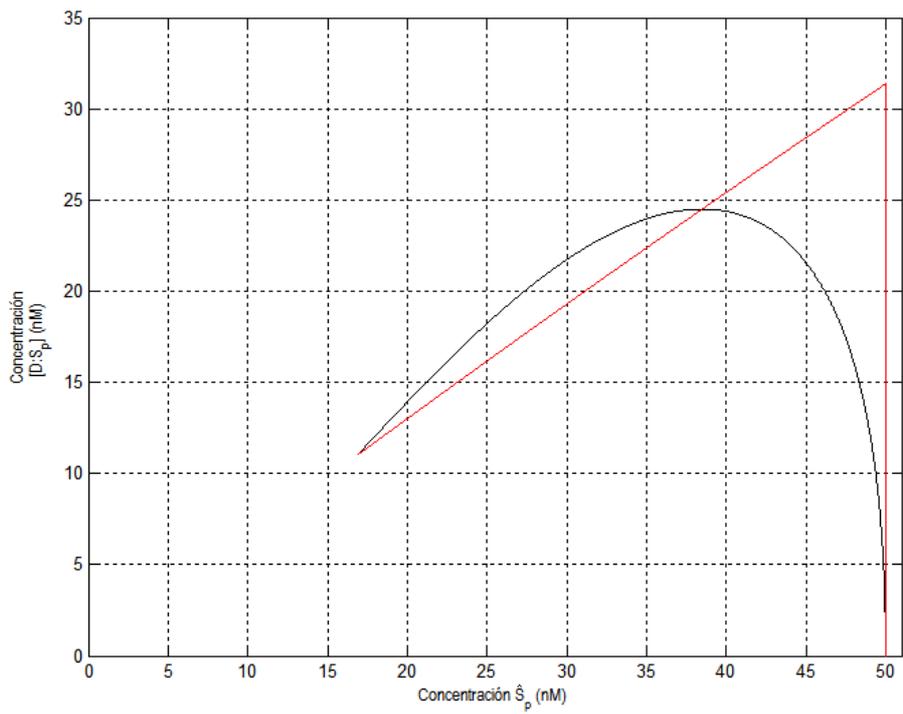
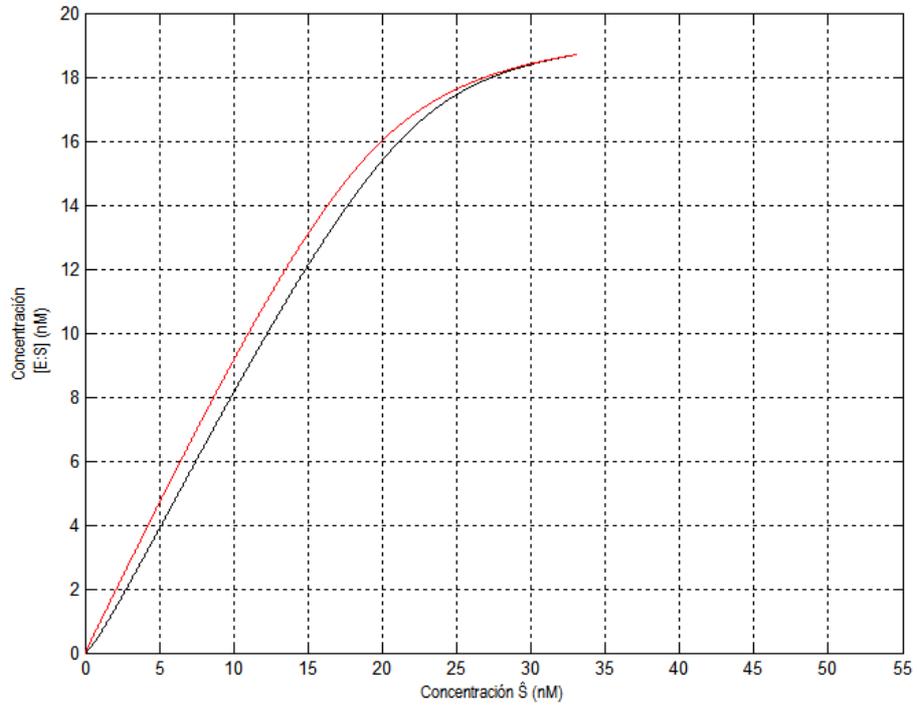


Figura 5.2 (D)



En las siguientes figuras se grafica la evolución de la concentración del sustrato S en el transcurso del tiempo.

Figura 5.2 (E)

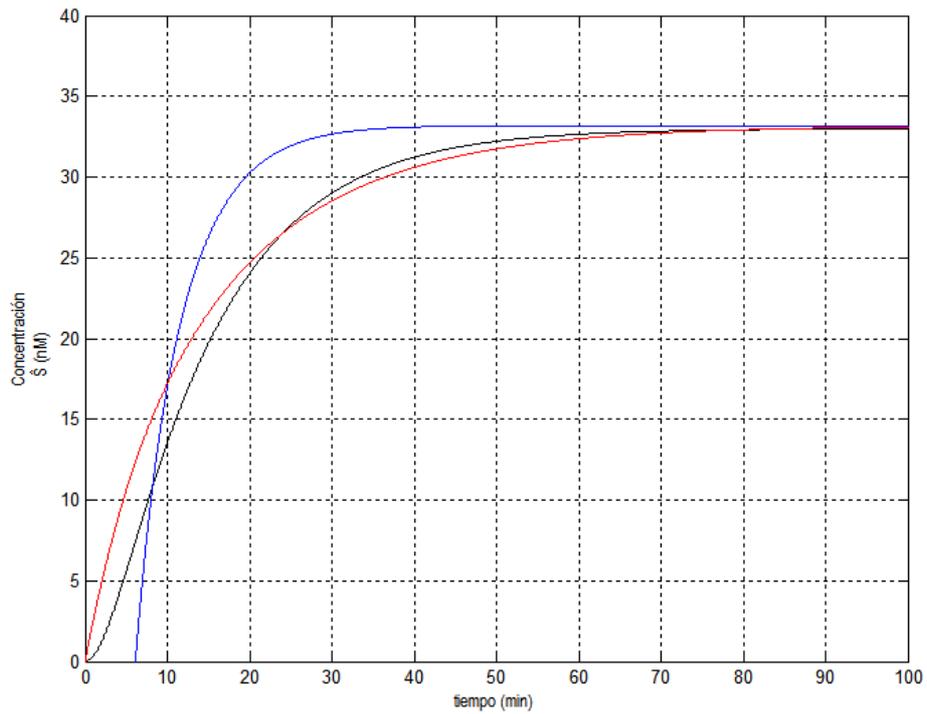
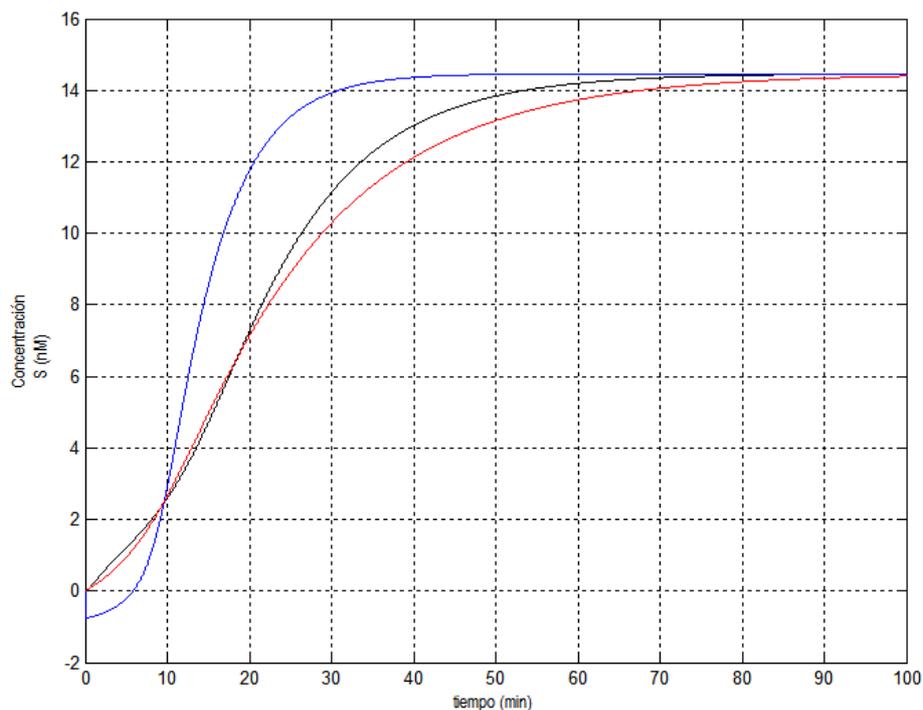


Figura 5.2 (F)



Cabe señalar que las graficas 5.2 (A) y 5.2 (C) representan el comportamiento del complejo $[D:S_p]$ mientras que las graficas 5.2 (B) y 5.2 (D) corresponden al comportamiento del complejo $[E:S]$ como funciones de las concentraciones de las formas fosforilada (S_p) y no fosforilada (S), respectivamente.

A partir de la solución exacta, --figuras 5.2 (A) y (C)--, al comienzo de la simulación S_p forma un complejo -- $[D:S_p]$ -- con la enzima D y se alcanza un máximo para el mismo; a partir de entonces, la concentración del producto S_p decrece lentamente para producir S . Esto se debe a que el sustrato S promueve la formación de la forma fosforilada S_p , y a su vez, S_p se emplea para formar de nuevo el sustrato S , con esto se conforma un ciclo de retroalimentación entre ellas.

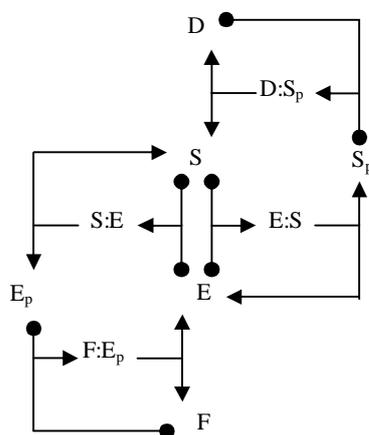
En el caso de las figuras 5.2 (B) y 5.2 (D), se muestra que tan pronto se produce S , también lo hace complejo $[E:S]$, convirtiendo al sustrato S nuevamente a su forma fosforilada S_p . Es decir, los complejos enzima-sustrato favorecen el ciclo fosforilacion-defosforilacion.

Los resultados anteriores muestran que durante toda la simulación la aproximación tQSSA reproduce o se aproxima mucho mejor a la dinámica de la red que la aproximación QSSA. Al comienzo de la misma, la aproximación QSSA da valores de concentración negativos para S , lo que no tiene sentido físico en este contexto y demuestra que esta aproximación conduce a conclusiones erróneas en lo que respecta a reproducir la dinámica del sistema. A diferencia de lo anterior, la aproximación tQSSA produce resultados de la dinámica que son semejantes a los que se obtienen con el modelo exacto.

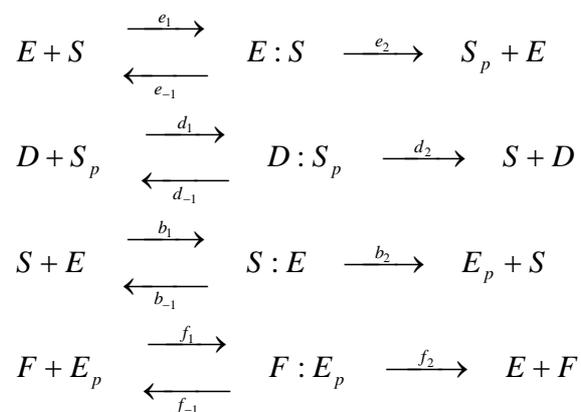
La red anterior puede acoplarse con un segundo módulo para formar una nueva red (figura 5.3). El arreglo de red resultante presenta ahora un mecanismo de reacción diferente. Este mecanismo se ha propuesto para describir la dinámica del ciclo celular de células eucariotas. En el modelo del ciclo celular eucariota, existen interacciones entre dos moléculas clave en la transición de la fase G_2 a la mitosis M (división celular, transición G_2/M) [6] [15] [18].

Las proteínas son: S = MPF (factor promotor de la fase M , que es un dímero entre dos moléculas, la ciclina $Cdc2$ y una ciclina B) y E =Wee1 (una proteína encargada de la fosforilación e inactivación de la molécula de ciclina $Cdc2$). El mecanismo para este proceso consiste en dos ciclos de retroalimentación basados en el modelo de Goldbeter-Koshland donde se presenta el fenómeno de antagonismo (la interacción entre dos o más especies químicas que disminuye el efecto que cada uno de ellos presenta individualmente) entre las especies E y S [6].

Figura 5.3. Diagrama esquemático de red con dos módulos de reacciones G-K (caso monoestable).



El mecanismo de reacción para este proceso involucra los siguientes pasos:



En el diagrama anterior: las letras S y E representan dos enzimas quinasa; por otro lado, las letras D y F representan dos enzimas fosfatasa.

Para aplicar la aproximación tQSSA al modelo de transición G_2/M se definen variables que incluyen una especie molecular libre más los complejos intermediarios donde se presenta dicha especie. De esta forma, las reacciones de asociación-disociación y aquéllas donde una especie química actúa como catalizador se cancelan. Para este caso se definen las siguientes variables ^[6]

$$\hat{S} = S + [E:S] + [S:E]$$

$$\hat{E} = E + [E:S] + [S:E] + [S_p:E]$$

Cuyas velocidades de cambio están dadas por

$$\begin{aligned}
 \frac{d\hat{S}}{dt} &= d_2 \cdot [D : S_p] - e_2 \cdot [E : S] \\
 \frac{d\hat{E}}{dt} &= f_2 \cdot [F : E_p] - b_2 \cdot [S : E] - b'_2 \cdot [S_p : E]
 \end{aligned}$$

Las ecuaciones para este modelo se dan en la tabla 2.3, así como sus correspondientes aproximaciones estacionarias para simplificar el mismo.

Tabla 2.3. Ecuaciones para la red de la Figura 5.3.

Modelo	Ecuaciones
Modelo completo	$D = D_T - [D:S_p]$
	$S_p = S_T - S - [E:S] - [S:E] - [D:S_p]$
	$E_p = E_T - E - [E:S] - [S:E] - [F:E_p]$
	$F = F_T - [F:E_p]$
	$d[D:S_p]/dt = d_1 \cdot D \cdot S_p - (d_{-1} + d_2) \cdot [D:S_p]$
	$d[E:S]/dt = e_1 \cdot E \cdot S - (e_{-1} + e_2) \cdot [E:S]$
	$d[S:E]/dt = b_1 \cdot S \cdot E - (b_{-1} + b_2) \cdot [S:E]$
	$d[F:E_p]/dt = f_1 \cdot F \cdot E_p - (f_{-1} + f_2) \cdot [F:E_p]$
	$dS/dt = e_{-1} \cdot [E:S] - e_1 \cdot S \cdot E + d_2 \cdot [D:S_p] + (b_{-1} + b_2) \cdot [S:E] - b_1 \cdot S \cdot E$
	$dE/dt = (e_{-1} + e_2) \cdot [E:S] - e_1 \cdot E \cdot S + f_2 \cdot [F:E_p] - b_1 \cdot E \cdot S$
tQSSA	$\hat{S} = S + [E:S] + [S:E]$
	$\hat{E} = E + [E:S] + [S:E]$
	$0 = D_T (S_T - \hat{S}) - [D:S_p] - (D_T + K_{md} + S_T - \hat{S}) + [D:S_p]^2$
	$0 = (\hat{E} - [S:E]) \cdot (\hat{S} - [S:E]) - [E:S] \cdot (\hat{E} - [S:E] + K_{me} + \hat{S} - [S:E]) + [E:S]^2$
	$0 = (\hat{E} - [E:S]) \cdot (\hat{S} - [E:S]) - [S:E] \cdot (\hat{E} - [E:S] + K_{mb} + \hat{S} - [E:S]) + [S:E]^2$
	$0 = F_T (E_T - \hat{E}) - [F:E_p] - (F_T + K_{mf} + E_T - \hat{E}) + [F:E_p]^2$
	$d\hat{S}/dt = d_2 \cdot [D:S_p] - e_2 \cdot [E:S]$
	$d\hat{E}/dt = f_2 \cdot [F:E_p] - b_2 \cdot [S:E]$

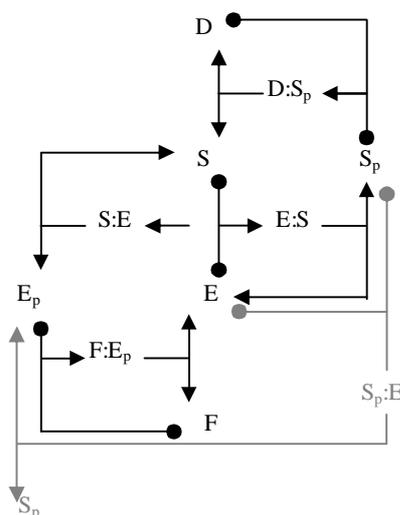
Esta red se analizará más adelante desde un contexto dinámico con el fin de dar a conocer los fenómenos no-lineales presentes en muchas reacciones de este tipo y naturaleza. Para ello es preciso conocer el comportamiento cualitativo de las soluciones y los estados estacionarios que pueden presentarse conforme se alcanza un tiempo extremadamente largo en el curso de la reacción.

El aspecto dinámico de los sistemas no lineales puede producir cambios significativos en la medida en que cambian los parámetros asociados. En particular, los puntos de equilibrio (estados estacionarios) podrán aparecer y desaparecer cambiando así la estabilidad del sistema. Estos cambios en la dinámica reciben el nombre de bifurcaciones. La existencia de dos situaciones estacionarias muy diferentes entre las que un sistema dinámico puede oscilar recibe el nombre de *bi-estabilidad*.

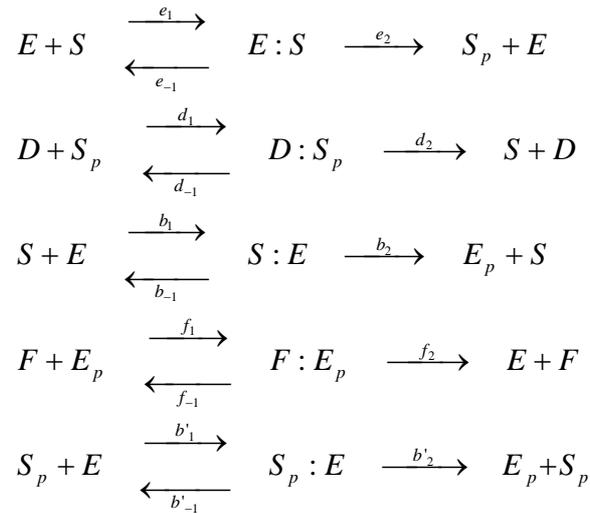
Hay un procedimiento semi-cuantitativo que es de especial importancia en la investigación de la dinámica de los sistemas no-lineales, aun cuando las soluciones analíticas exactas sean imposibles de obtener. Este procedimiento consiste en analizar las trayectorias del sistema en el plano-fase (también llamado retrato fase). Para ello se determinan los puntos de equilibrio del sistema procediendo a un análisis de estabilidad de las soluciones. Los puntos de equilibrio se obtienen como solución del sistema de ecuaciones simultáneas que resultan al igualar con cero todas las derivadas respecto del tiempo. El comportamiento de las trayectorias cerca de los puntos de equilibrio determinan las propiedades de estabilidad del sistema. Si en el límite cuando $t \rightarrow \infty$, las trayectorias del espacio fase convergen a uno o más puntos de equilibrio entonces los puntos serán estables (*atractores*). Por otra parte, si en el mismo límite las trayectorias divergen de los puntos de equilibrio, éstos serán inestables (*repulsores*).

Considerando la red de la figura 5.3, al acoplar dos módulos de reacciones, el sistema solo exhibe monoestabilidad, lo cual se muestra más adelante en la figura 5.5 incisos 'A'...'C'. El análisis del plano-fase para este caso (figura 5.5D) muestra un único punto de equilibrio, por lo que el sistema solamente presenta un solo estado estacionario. Al añadir reacciones adicionales a la red anterior, por ejemplo, cuando S_p reacciona con E para formar un complejo $S_p:E$ (esto es, $S_p + E \leftrightarrow S_p:E$) y la disociación de dicho complejo $--S_p:E \rightarrow E + S_p--$ el sistema exhibe la biestabilidad. Lo anterior resulta en el siguiente arreglo de la red, donde las reacciones adicionales se muestran en color gris:

Figura 5.4. Diagrama esquemático de red con dos módulos de reacciones G-K (caso biestable).



El mecanismo de reacción que se lleva a cabo en este sistema se representa por el siguiente conjunto de reacciones:



Las reacciones adicionales en gris de la figura 5.4 determinan que tipo de régimen presenta el sistema. Si por ejemplo, no se consideran las reacciones entre S_p y E (es decir los pasos en la reacción $E + S \leftrightarrow S_p : E \rightarrow E_p + S_p$ se eliminan), el comportamiento es monoestable. Por otra parte, al considerar tales reacciones, se presenta el fenómeno de biestabilidad. Las ecuaciones involucradas para este caso se dan en la tabla 2.4.

El parámetro S_T esta asociado con la bifurcación. Debido a que S_T representa la concentración total de sustrato presente en la célula, es interesante conocer cómo se comportará la red conforme se varía este parámetro. La motivación de este análisis esta relacionada con el hecho de que la concentración de sustrato S (y por lo tanto de S_T) debe ser mayor que la concentración de la enzima. Esta es una condición que necesariamente debe cumplirse para que ocurra la reacción entre ellos.

Tabla 2.4. Ecuaciones para el modelo de red de la figura 5.4.

Modelo	Ecuaciones
Modelo completo	$D=D_T \cdot [D:S_p]$
	$S_p=S_T \cdot S \cdot [E:S] \cdot [S:E] \cdot [D:S_p] \cdot [S_p:E]$
	$E_p=E_T \cdot E \cdot [E:S] \cdot [S:E] \cdot [F:E_p] \cdot [S_p:E]$
	$F=F_T \cdot [F:E_p]$
	$d[D:S_p]/dt=d_1 \cdot D \cdot S_p \cdot (d_1+d_2) \cdot [D:S_p]$
	$d[E:S]/dt=e_1 \cdot E \cdot S \cdot (e_1+e_2) \cdot [E:S]$
	$d[S:E]/dt=b_1 \cdot S \cdot E \cdot (b_1+b_2) \cdot [S:E]$
	$d[F:E_p]/dt=f_1 \cdot F \cdot E_p \cdot (f_1+f_2) \cdot [F:E_p]$
	$d[S_p:E]/dt=b'_1 \cdot E \cdot S_p \cdot (b'_1+b'_2) \cdot [S_p:E]$
	$dS/dt=e_1 \cdot [E:S] \cdot e_1 \cdot S \cdot E + d_2 \cdot [D:S_p] + (b_1+b_2) \cdot [S:E] \cdot b_1 \cdot S \cdot E$
$dE/dt=(e_1+e_2) \cdot [E:S] \cdot e_1 \cdot E \cdot S + f_2 \cdot [F:E_p] \cdot b_1 \cdot E \cdot S \cdot b'_1 \cdot E \cdot S_p + b'_1 \cdot [S_p:E]$	
tQSSA	$\hat{S}=S+[E:S]+[S:E]$
	$\hat{E}=E+[E:S]+[S:E]+[S_p:E]$
	$0=D_T \cdot (S_T \cdot \hat{S} \cdot [S_p:E]) \cdot [D:S_p] \cdot (D_T+K_{md}+S_T \cdot \hat{S} \cdot [S_p:E]) + [D:S_p]^2$
	$0=(\hat{E} \cdot [S:E] \cdot [S_p:E]) \cdot (\hat{S} \cdot [S:E]) \cdot [E:S] \cdot (\hat{E} \cdot [S:E] \cdot [S_p:E] + K_{me} + \hat{S} \cdot [S:E]) + [E:S]^2$
	$0=(\hat{E} \cdot [E:S] \cdot [S_p:E]) \cdot (\hat{S} \cdot [E:S]) \cdot [S:E] \cdot (\hat{E} \cdot [E:S] \cdot [S_p:E] + K_{mb} + \hat{S} \cdot [E:S]) + [S:E]^2$
	$0=F_T \cdot (E_T \cdot \hat{E}) \cdot [F:E_p] \cdot (F_T+K_{mf}+E_T \cdot \hat{E}) + [F:E_p]^2$
	$0=(S_T \cdot \hat{S} \cdot [D:S_p]) \cdot (\hat{E} \cdot [E:S] \cdot [S:E]) \cdot [S_p:E] \cdot (S_T \cdot \hat{S} + K_{mb} \cdot [D:S_p] + \hat{E} \cdot [E:S] \cdot [S:E]) + [S_p:E]^2$
	$d\hat{S}/dt=d_2 \cdot [D:S_p] \cdot e_2 \cdot [E:S]$
	$d\hat{E}/dt=f_2 \cdot [F:E_p] \cdot b_2 \cdot [S:E] \cdot b'_2 \cdot [S_p:E]$

El análisis de plano-fase implica resolver las ecuaciones del modelo tQSSA de la tabla 2.3 y 2.4 respectivamente con $d\hat{E}/dt=0$ (cuya solución se denomina nulclina S), y con $d\hat{S}/dt=0$ (en este caso, la curva-solución que resulta de resolver esta ecuación se denomina nulclina E).

Aplicando el análisis previamente discutido es posible ver que en el régimen de parámetros donde hay tres puntos de equilibrio, el punto intermedio, ver figura 5.5.C, es inestable, mientras que los otros dos puntos son estables. Para generar el diagrama de fases que se muestra en las Figuras 5.5.C-D, así como para estudiar las propiedades de bi-estabilidad del sistema dinámico completo se utilizaron las ecuaciones del modelo tQSSA (tabla 2.3 y 2.4). El correspondiente diagrama se muestra en la figura 5.5.A (rama inferior) y 5.5.B (rama superior).

Así pues, se encuentra que hay dos tipos de comportamiento dinámico: (i) Existe un régimen de los parámetros del sistema en el que se obtiene *monoestabilidad* (Fig. 5.5D), es decir, para todas las condiciones iniciales posibles el sistema evoluciona siempre hacia el mismo punto de equilibrio (*atractor*). (ii) Hay otro régimen de los parámetros en donde se tiene el fenómeno de *biestabilidad*, es decir, se obtienen dos puntos de equilibrio estables diferentes (Figura 5.5.C).

En el diagrama de la figura 5.5.A, se muestra la variación de la concentración de \hat{S} con el parámetro de S_T , la rama superior representa el caso en que se presenta la monoestabilidad del sistema, mientras que la rama inferior representa la biestabilidad que se distingue de la anterior rama por asemejarse a una curva de histéresis en el sistema.

Así también, el diagrama de la figura 5.5.B representa el cambio en la concentración de \hat{E} con el parámetro de bifurcación S_T . De forma similar, la rama superior de esta gráfica constituye el caso de biestabilidad; por otra parte, la rama inferior de la gráfica representa el fenómeno de monoestabilidad.

A partir de los diagramas de bifurcación, se observa que cuando, $2 < \hat{S} < 5$, S_T se localiza en la región inestable (....) de la gráfica \hat{S} versus S_T . Asimismo, se encuentra que cuando, $9 < \hat{E} < 15$, sucede lo mismo en la gráfica de \hat{E} como función de S_T . Esta región de inestabilidad se observa con claridad en el diagrama del plano-fase correspondiente (ver Fig. 5.5.A...B). Estas regiones de inestabilidad no son accesibles por el sistema debido a que se produce un salto de una rama estable a la otra, representado por las flechas del diagrama correspondiente.

Las figuras 5.5.C-D constituyen los diagramas o retratos del plano-fase correspondientes al análisis de bifurcación para los casos biestable (Figura 5.5.C) y monoestable (Figura 5.5.D). Estos diagramas corresponden al modelo tQSSA con $S_T=12$. El trazo rojo corresponde a la nulclina \hat{S} , el trazo negro corresponde a la nulclina \hat{E} . Los puntos de equilibrio están representados por puntos.

Figura 5.5. Diagramas de bifurcación y plano-fase para las figuras 5.3 y 5.4.

Figura 5.5.A.

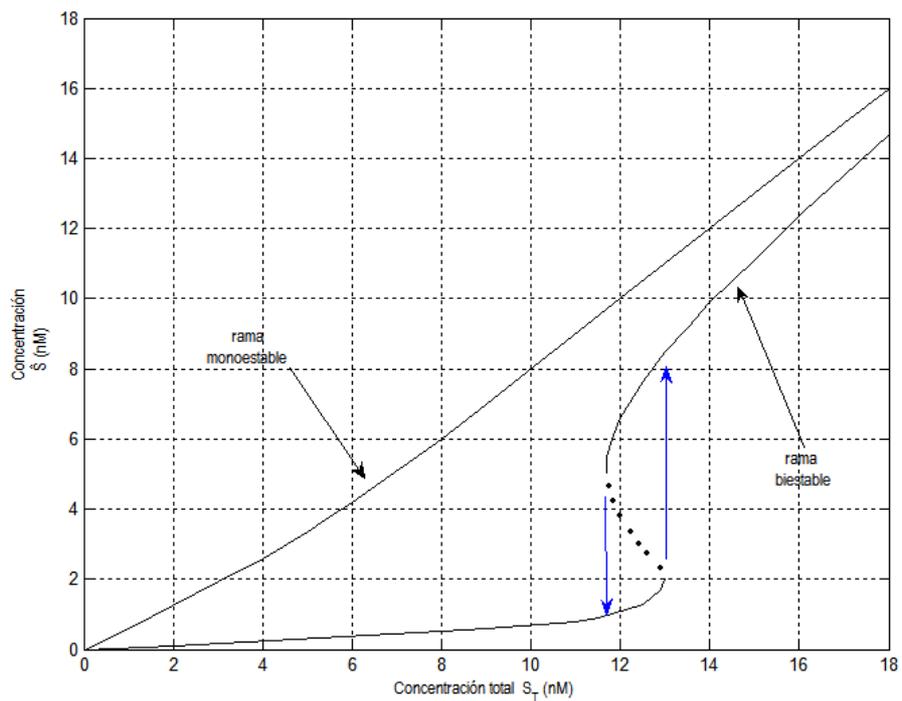


Figura 5.5B

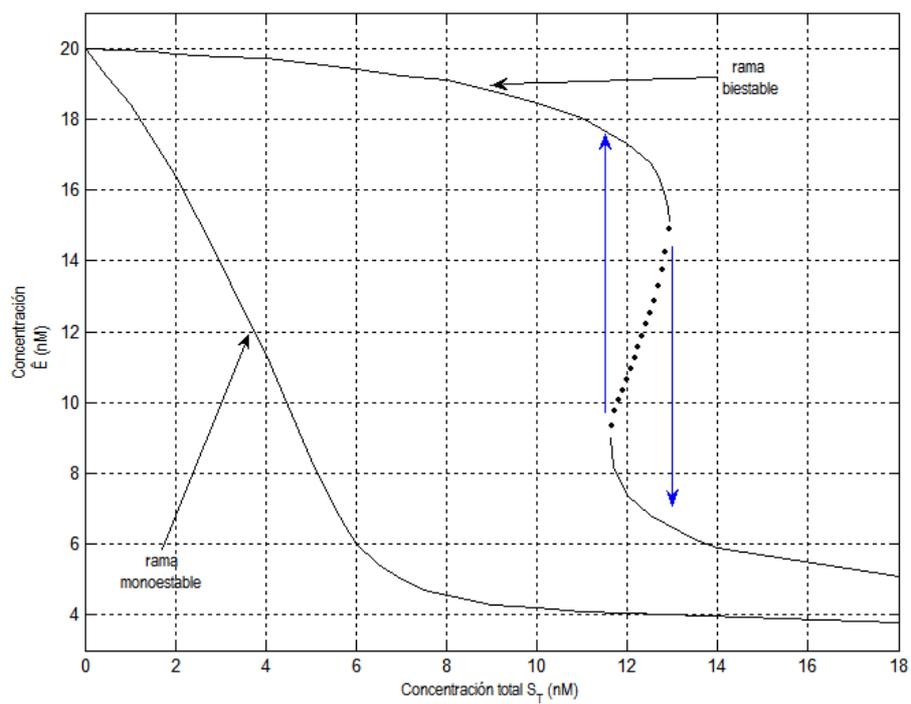


Figura 5.5C. Caso biestable.

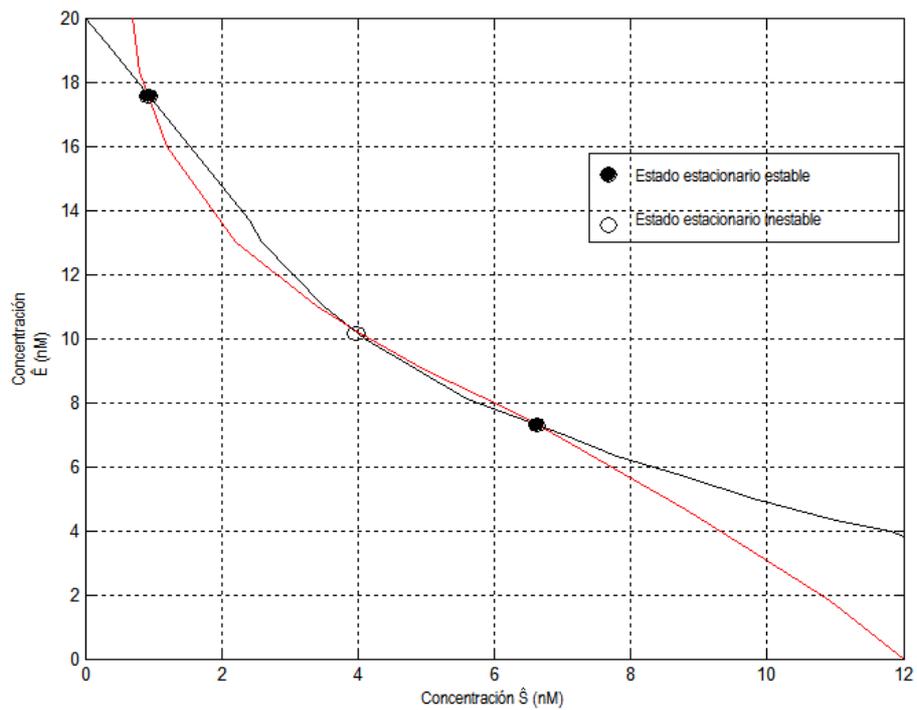
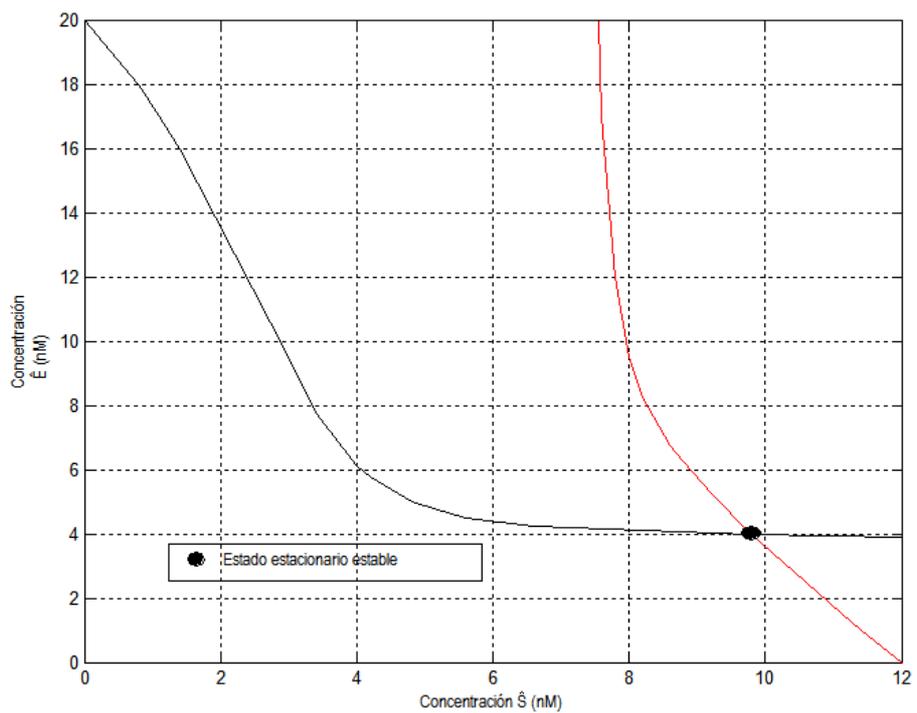


Figura 5.5D. Caso monoestable.

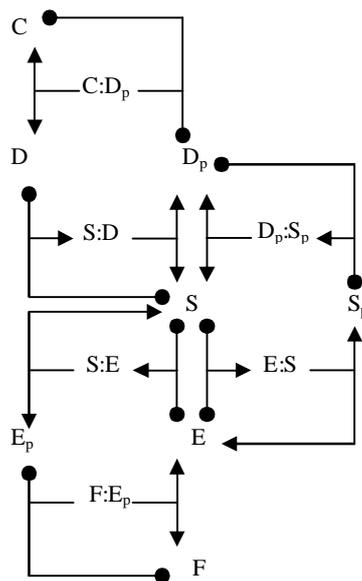


Para las reacciones adicionales en gris de la figura 5.4, los correspondientes parámetros son: $b'_1=0.05 \text{ nM min}^{-1}$, $b'_{-1}=0.005 \text{ min}^{-1}$ y $b'_2=0.0001 \text{ min}^{-1}$. En el caso de la construcción del diagrama de fase-plano, se presentan los siguientes parámetros, $S_T=12$ y $E_T=20$, con las condiciones iniciales siguientes: $\hat{S}(0)=0$, $S_p(0)=0$, $\hat{E}(0)=E_T$, $D:S_p(0)=0$, $E:S(0)=0$, $S:E(0)=0$, $F:E_p(0)=0$ y $S_p:E(0)=0$.

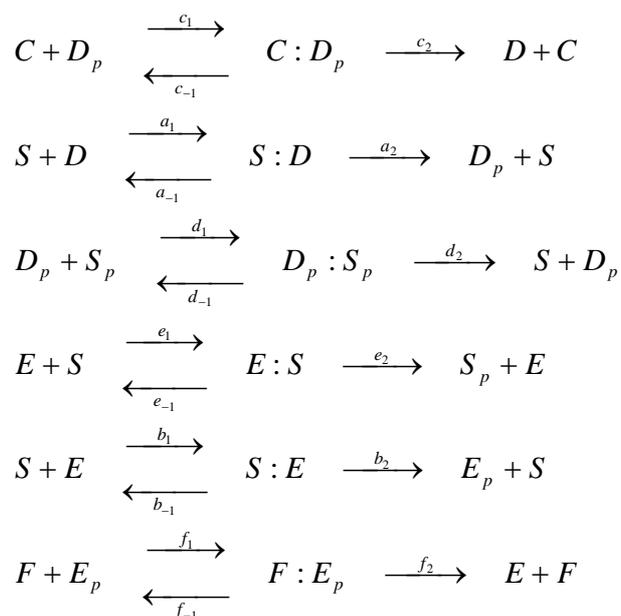
Las reacciones que se consideraron anteriormente (figuras 5.3 y 5.4.), sugieren que para que se presente la bi-estabilidad en el sistema es necesario el acoplamiento de un tercer módulo que considere estas reacciones. Con esto es posible modelar las interacciones y las transiciones de un estado del sistema a otro por medio de bifurcaciones. Para mantener la topología de la red, es necesario también considerar otras reacciones, por ejemplo, el ciclo de fosforilación/defosforilación entre S y S_p . Esto cambia la actividad de S al pasar a su forma S_p .

Estas consideraciones dan lugar a la red de la figura 5.6, cuya complejidad es aún mayor que la de las redes anteriores. Este nuevo modelo corresponde a las transiciones de fase entre G_2 y M del ciclo celular eucariota (investigada inicialmente en extractos de huevo de rana *Xenopus*)^{[15] [18]}. El mecanismo de reacción para esta red se muestra esquemáticamente mediante el siguiente diagrama, indicando las reacciones que se llevan a cabo en él^[6].

Figura 5.6. Diagrama esquemático de red con tres módulos de reacciones G-K.



El mecanismo de reacciones en este caso es el siguiente:



Donde están presentes dos enzimas quinasa, S y E , y tres enzimas fosfatasa, C , D y F . La tabla 2.5 muestra las ecuaciones para este modelo en particular y las aproximaciones utilizadas en la simulación del proceso. Los valores de los parámetros se tomaron de la tabla 2.2, de acuerdo con la correcta interpretación de esta tabla, dada anteriormente.

Esta red de reacciones se ha propuesto en teoría y se ha verificado experimentalmente que los mecanismos de reacciones juegan un papel importante en el proceso del ciclo celular, donde las especies químicas poseen los siguientes nombres: en este caso, las proteínas involucradas son $E=Wee1$, $S=MPF$ y $D=Cdc25$.

Puesto que S induce la fosforilación en D , y D_p es una forma más activa, las especies S y D_p se activan mutuamente. Finalmente, C es una fosfatasa que convierte a D_p nuevamente en D .

En conjunto, la red consiste de tres módulos G-K: el primero (trayecto $C/D/S$) controla la fosforilación de D , el segundo (trayecto $D/S/E$) comprende la fosforilación de S , y por último, el trayecto ($S/E/F$) controla la actividad de E (figura 5.6).

Para aplicar las aproximaciones tQSSA a este modelo, se definen las siguientes variables

$$\begin{aligned}\hat{D}_p &= D_p + [D_p : S_p] + [C : D_p] \\ \hat{S} &= S + [E : S] + [S : E] + [S : D] \\ \hat{E} &= E + [E : S] + [S : E]\end{aligned}$$

cuya dinámica está descrita por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}\frac{d\hat{D}_p}{dt} &= a_2 \cdot [S : D] - c_2 \cdot [C : D_p] \\ \frac{d\hat{S}}{dt} &= d_2 \cdot [D_p : S_p] - e_2 \cdot [E : S] \\ \frac{d\hat{E}}{dt} &= f_2 \cdot [F : E_p] - b_2 \cdot [S : E]\end{aligned}$$

Las concentraciones de los complejos enzima-sustrato están dadas por la resolución simultánea de un conjunto de seis ecuaciones cuadráticas algebraicas. Las simulaciones numéricas confirman que la aproximación tQSSA captura mejor la dinámica exacta del sistema al minimizar el error dado por la aproximación QSSA. Esto reduce la dimensionalidad del sistema enormemente como se aprecia en la tabla 4.5 para el modelo tQSSA.

Las condiciones iniciales necesarias para las ecuaciones del modelo mostrado en la tabla 4.5 son las siguientes: $S(0) = 0$; $D_p(0) = D_T = 200$ y $E(0) = E_T = 20$. Los complejos enzima-sustrato: $[D:S_p]$, $[E:S]$, $[S:E]$, $[C:D_p]$, $[S_p:E]$ y $[F:E_p]$ tienen concentraciones iniciales igual a cero (cuando $t=0$).

Al aplicar la aproximación tQSSA, las ecuaciones diferenciales para los complejos enzima-sustrato se convierten en ecuaciones algebraicas y solamente se resuelven tres ecuaciones diferenciales de las seis originales. Esto representa una ventaja, ya que la resolución del sistema es aparentemente más fácil de obtener. Además, las escalas de tiempo se ven afectadas por la inclusión de esta aproximación, por lo que para comparar ambas aproximaciones debe graficarse la solución del modelo completo de ecuaciones diferenciales con las variables adecuadas que corresponden a la aproximación estacionaria de interés.

Es decir, para comparar la solución exacta con QSSA y tQSSA se grafican los complejos $[D_p:S_p]$ y $[E:S]$ como funciones de las variables apropiadas (que corresponde a S_p y S para la aproximación QSSA, y \hat{S}_p y \hat{S} para la aproximación tQSSA). La figura 5.7 muestra los perfiles de concentración obtenidos mediante la comparación del modelo completo y las aproximaciones QSSA y tQSSA.

Tabla 2.5. Ecuaciones para el modelo de la figura 5.6.

Modelo	Ecuaciones
Modelo completo	$C=C_T-[D:S_p]$
	$D=D_T-D_p-[D_p:S_p]-[C:D_p]-[S:D]$
	$S_p=S_T-S-[E:S]-[S:E]-[S:D]-[D_p:S_p]$
	$E_p=E_T-E-[E:S]-[S:E]-[F:E_p]$
	$F=F_T-[F:E_p]$
	$d[C:D_p]/dt=c_1 \cdot C \cdot D_p - (c_{-1} + c_2) \cdot [C:D_p]$
	$d[S:D]/dt=a_1 \cdot S \cdot D - (a_{-1} + a_2) \cdot [S:D]$
	$d[D_p:S_p]/dt=d_1 \cdot D_p \cdot S_p - (d_{-1} + d_2) \cdot [D_p:S_p]$
	$d[E:S]/dt=e_1 \cdot E \cdot S - (e_{-1} + e_2) \cdot [E:S]$
	$d[S:E]/dt=b_1 \cdot S \cdot E - (b_{-1} + b_2) \cdot [S:E]$
	$d[F:E_p]/dt=f_1 \cdot F \cdot E_p - (f_{-1} + f_2) \cdot [F:E_p]$
	$dD_p/dt=a_2 \cdot [S:D] - c_1 \cdot D_p \cdot C + c_{-1} \cdot [C:D_p] - d_1 \cdot D_p \cdot S_p + (d_{-1} + d_2) \cdot [D_p:S_p]$
	$dS/dt=e_{-1} \cdot [E:S] - e_1 \cdot S \cdot E + d_2 \cdot [D:S_p] + (b_{-1} + b_2) \cdot [S:E] - b_1 \cdot S \cdot E - a_1 \cdot S \cdot D + (a_{-1} + a_2) \cdot [S:D]$
	$dE/dt=(e_{-1} + e_2) \cdot [E:S] - e_1 \cdot E \cdot S + f_2 \cdot [F:E_p] - b_1 \cdot E \cdot S + b_{-1} \cdot [S:E]$
QSSA	$0=(C_T-[C:D_p]) \cdot D_p - K_{mc} \cdot [C:D_p]$
	$0=S \cdot (D_T - D_p - [D_p:S_p] - [S:D]) - [C:D_p] - K_{ms} \cdot [S:D]$
	$0=D_p \cdot (S_T - S - [E:S] - [S:E] - [S:D]) - [D_p:S_p] - K_{ms} \cdot [D_p:S_p]$
	$0=E \cdot S - K_{me} \cdot [E:S]$
	$0=S \cdot E - K_{ms} \cdot [S:E]$
	$0=(F_T - [F:E_p]) \cdot (E_T - E - [E:S] - [S:E] - [F:E_p]) - K_{mf} \cdot [F:E_p]$
	$dD_p/dt=a_2 \cdot [S:D] - c_1 \cdot D_p \cdot C + c_{-1} \cdot [C:D_p] - d_1 \cdot D_p \cdot S_p + (d_{-1} + d_2) \cdot [D_p:S_p]$
	$dS/dt=e_{-1} \cdot [E:S] - e_1 \cdot S \cdot E + d_2 \cdot [D:S_p] + (b_{-1} + b_2) \cdot [S:E] - b_1 \cdot S \cdot E - a_1 \cdot S \cdot D + (a_{-1} + a_2) \cdot [S:D]$
	$dE/dt=(e_{-1} + e_2) \cdot [E:S] - e_1 \cdot E \cdot S + f_2 \cdot [F:E_p] - b_1 \cdot E \cdot S + b_{-1} \cdot [S:E]$
	$d\hat{D}_p/dt=a_2 \cdot [S:D] - c_2 \cdot [C:D_p]$
tQSSA	$\hat{D}_p=D_p+[D_p:S_p]+[C:D_p]$
	$\hat{S}=S+[S:D]+[E:S]+[S:E]$
	$\hat{E}=E+[E:S]+[S:E]$
	$0=C_T \cdot (\hat{D}_p - [D_p:S_p]) - [C:D_p] \cdot (C_T + K_{mc} + \hat{D}_p - [D_p:S_p]) + [C:D_p]^2$
	$0=(\hat{S} - [E:S] - [S:E]) \cdot (D_T - \hat{D}_p) - [S:D] \cdot (\hat{S} - [E:S] - [S:E] + K_{ms} + D_T - \hat{D}_p) + [S:D]^2$
	$0=(\hat{D}_p - [C:D_p]) \cdot (S_T - \hat{S}) - [D_p:S_p] \cdot (\hat{D}_p - [C:D_p] + K_{ms} + S_T - \hat{S}) + [D_p:S_p]^2$
	$0=(\hat{E} - [S:E]) \cdot (\hat{S} - [S:E] - [S:D]) - [E:S] \cdot (\hat{E} - [S:E] + K_{me} + \hat{S} - [S:E] - [S:D]) + [E:S]^2$
	$0=(\hat{E} - [S:E]) \cdot (\hat{S} - [E:S] - [S:D]) - [S:E] \cdot (\hat{S} - [E:S] - [S:D] + K_{ms} + \hat{E} - [S:E]) + [S:E]^2$
	$0=F_T \cdot (E_T - \hat{E}) - [F:E_p] \cdot (F_T + K_{mf} + E_T - \hat{E}) + [F:E_p]^2$
	$d\hat{D}_p/dt=a_2 \cdot [S:D] - c_2 \cdot [C:D_p]$
$d\hat{S}/dt=d_2 \cdot [D:S_p] - e_2 \cdot [E:S]$	
$d\hat{E}/dt=f_2 \cdot [F:E_p] - b_2 \cdot [S:E]$	

Figura 5.7. Comparación de las aproximaciones QSSA y tQSSA con tres módulos G-K.

Figura 5.7.A

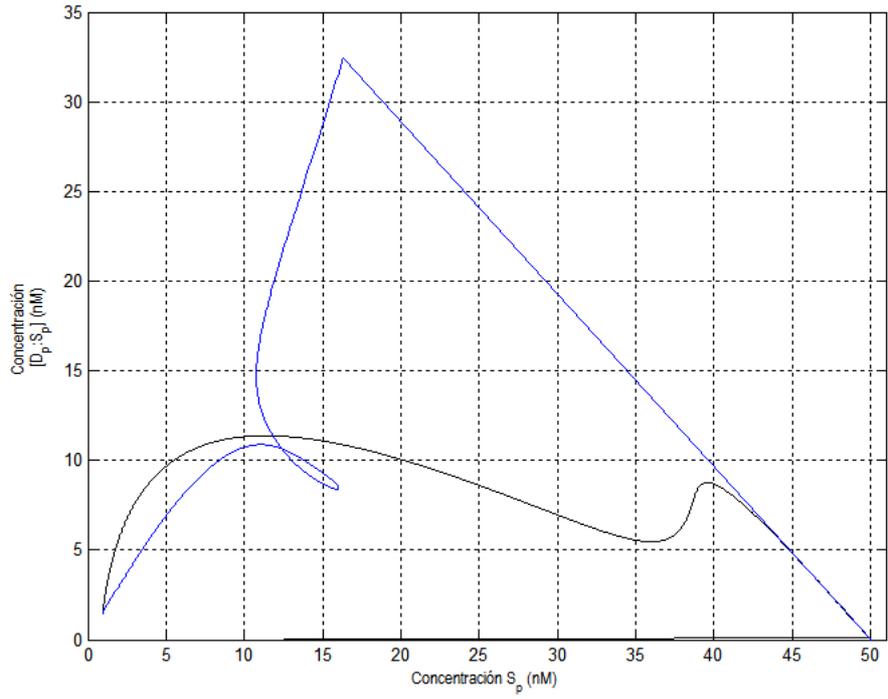


Figura 5.7B

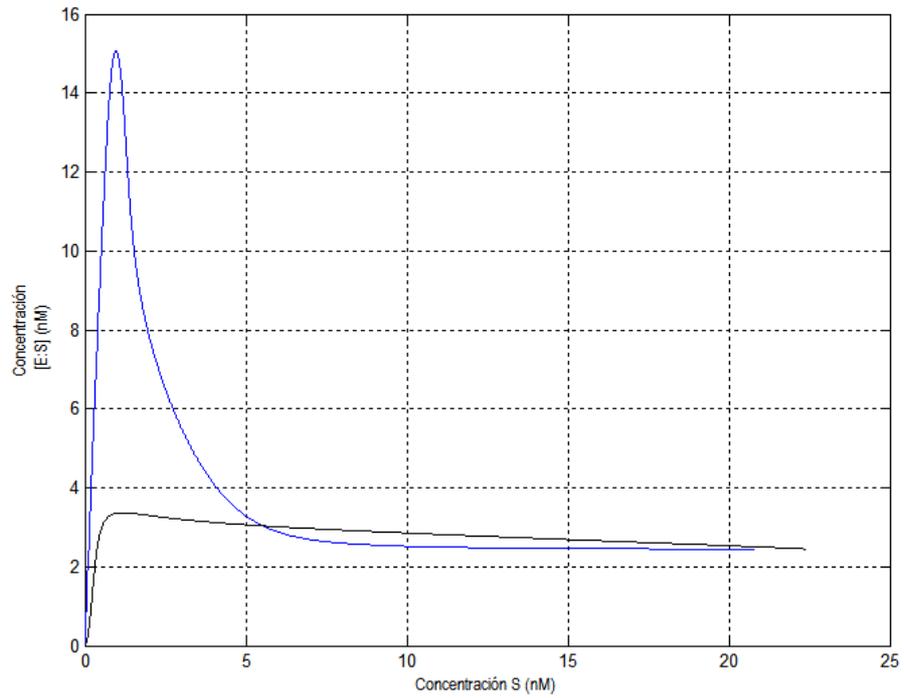


Figura 5.7C

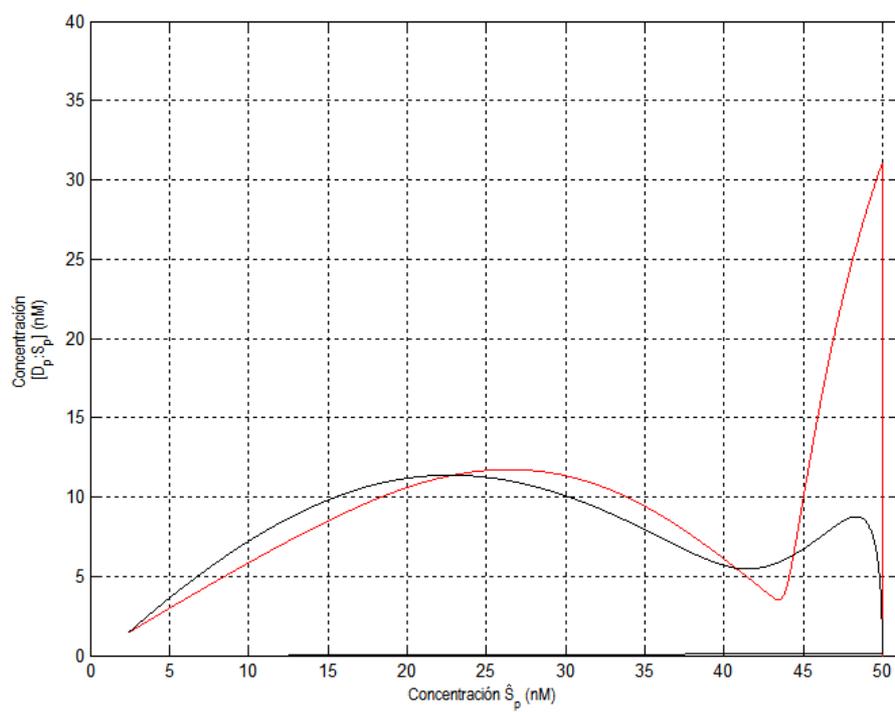


Figura 5.7D

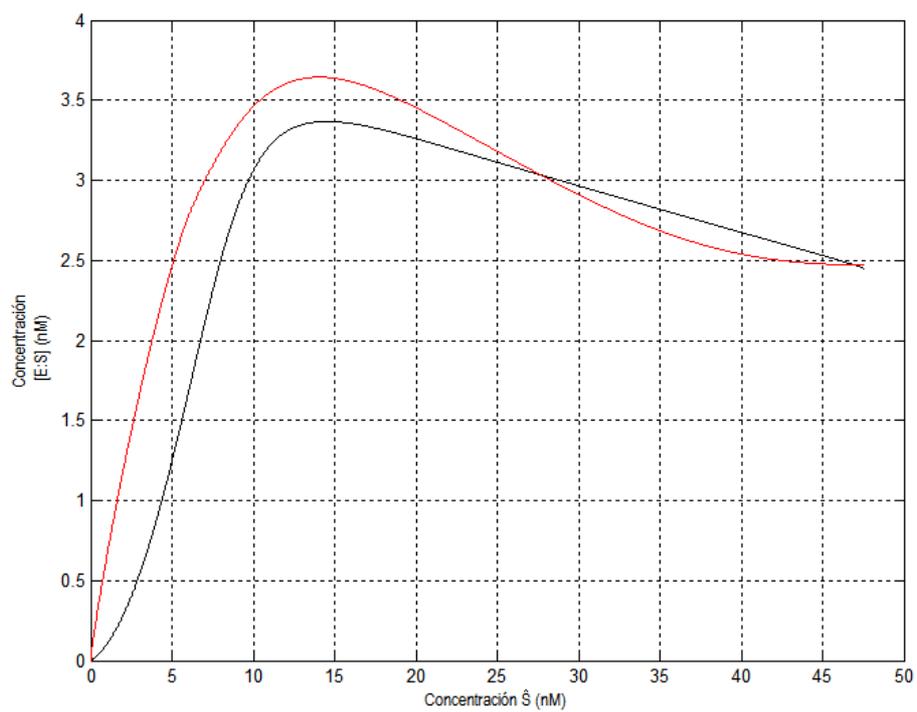


Figura 5.7E

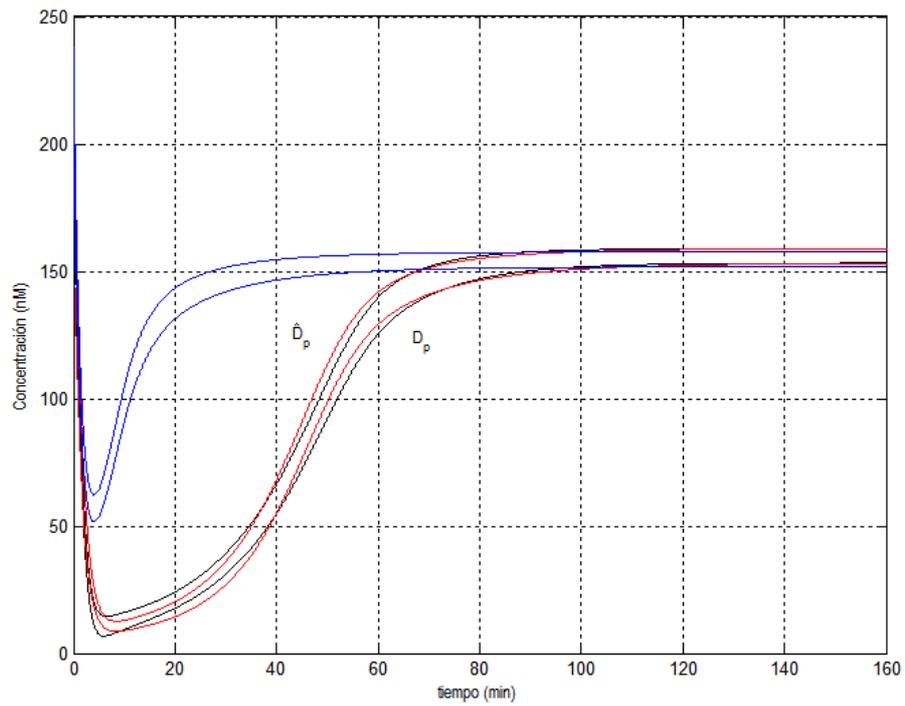


Figura 5.7F

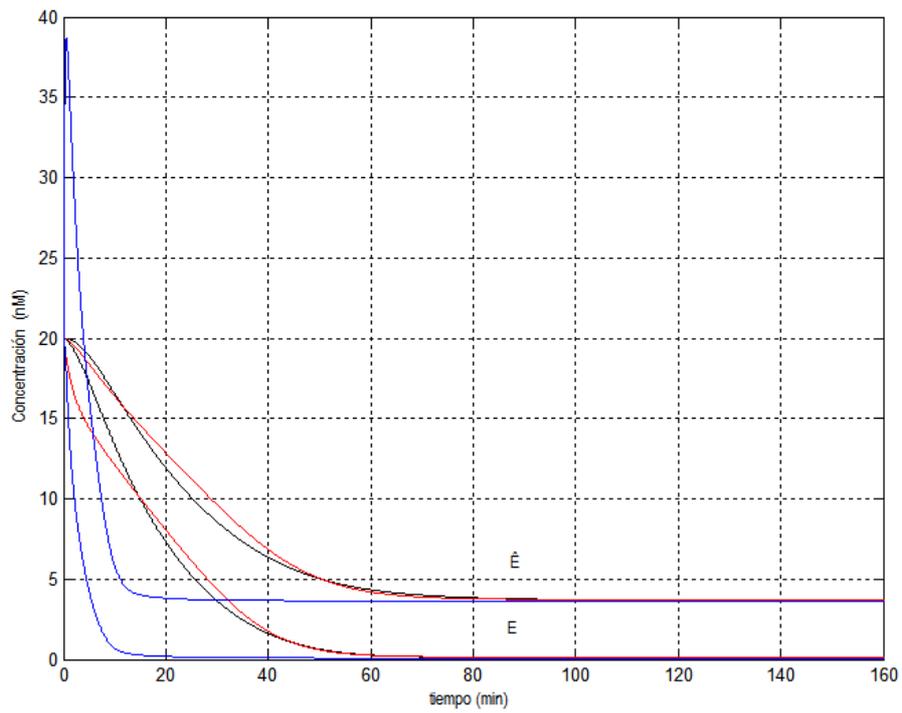
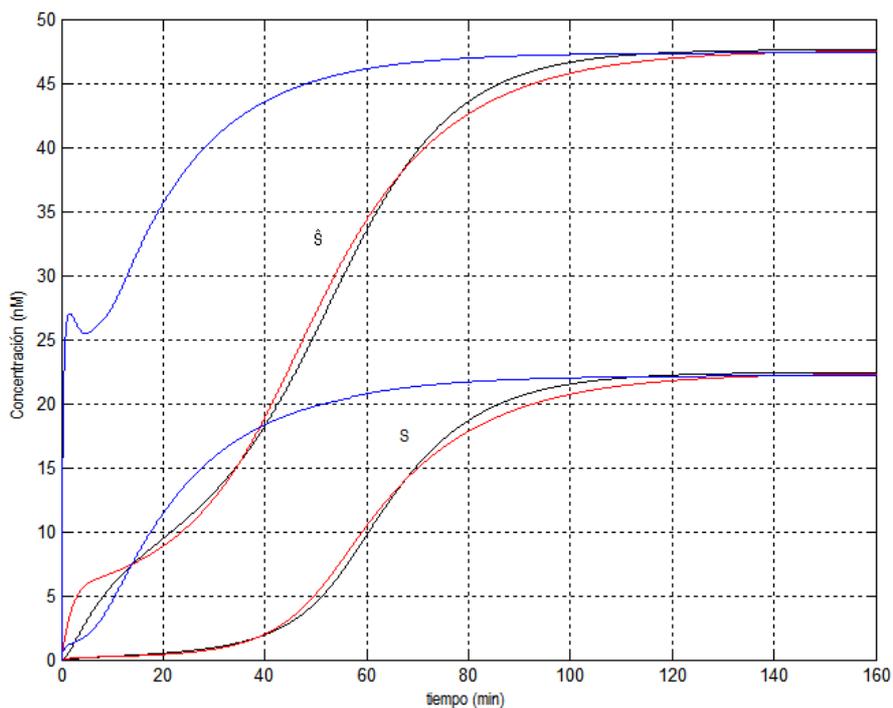


Figura 5.7G



La figura 5.7 inciso C-D muestran la formación de los complejos intermedios $[E:S]$ con respecto a la concentración del sustrato S , así como la del complejo $[D_p:S_p]$ como función de la forma activa S_p tanto para los modelos completo, como para las aproximaciones QSSA y tQSSA.

En la figura 5.7 inciso E-G se muestran la evolución en el tiempo para las enzimas E y S , así como de D_p que es la forma activa de la enzima D .

A partir de la figura 5.7 incisos A-G, es posible ver que durante la simulación, nuevamente tQSSA se ajusta mejor a los datos que reproducen la cinética exacta (líneas rojas) con el modelo completo (líneas negras). Cabe señalar que ambas aproximaciones capturan muy bien la parte final del curso del tiempo para estas especies químicas, mientras que la aproximación QSSA no reproduce bien la parte inicial de las simulaciones.

Nuevamente se da el caso de que los perfiles de concentración son semejantes al comportamiento dictado en la red de la Figura 5.1. Esto se debe a que la estructura o topología de la red se mantiene en todos los modelos anteriores, por lo que es de esperar un comportamiento semejante.

Esto sugiere, en principio, que las simplificaciones en los modelos cinéticos (tales como la aproximación estacionaria tQSSA) introducen importantes ajustes en las simulaciones a la dinámica del sistema que se vuelven importantes durante el transcurso de la reacción.

Por otra parte, otras simplificaciones como la aproximación QSSA, introducen errores en la dinámica del sistema porque en teoría no se cumple la ley de Michaelis-Menten para estas reacciones donde se involucran interacciones entre proteínas.

Asimismo, se ha investigado el comportamiento de las soluciones que pueden presentarse en tales sistemas al modificar distintos parámetros como las concentraciones de sustrato; también se ha sugerido comparar la dinámica de los distintos modelos cinéticos al comparar la dinámica del modelo exacto con las aproximaciones cuasi-estacionarias para corroborar que se cumplen los distintos perfiles de concentración.

La complejidad de los sistemas puede conducir a fenómenos de biestabilidad y multiestabilidad por lo que pueden considerarse como si fueran interruptores moleculares debido a que solo desencadenan algunos fenómenos para ciertos conjuntos de parámetros o bajo ciertas condiciones (activando o desactivando al sistema), esto es capturado teóricamente mediante los diagramas de bifurcación y el retrato fase del sistema, donde se aprecian transiciones entre varios estados estacionarios que pueden explicar los fenómenos observados experimentalmente.

La complejidad del sistema aumenta aún más, porque los mecanismos que se han propuesto para las reacciones presentadas en este trabajo pareciera que tienen en común un módulo de reacciones. Estos circuitos o interruptores moleculares se encuentran formando una arquitectura compleja que se encuentran regulando diversos procesos biológicos a nivel celular como pueden ser: el ciclo celular (división celular), la señalización celular y la muerte celular programada (*apoptosis*)^[24].

El fenómeno de la biestabilidad, y en general la multiestabilidad, da lugar a transiciones entre los diferentes estados estacionarios. Estos fenómenos pueden ser modelados a partir de redes de reacciones. Con estas ideas, es posible entender y modelar la fisiología celular desde una perspectiva dinámica. Por otra parte, la cinética de las redes de reacciones enzimáticas se utiliza para modelar y entender algunos procesos metabólicos en la célula.

Las principales hipótesis para formular estos modelos fueron las siguientes:

1. No existen gradientes de concentración en el volumen de reacción, por lo tanto no se considera la posible difusión que pueda contribuir a los balances de materia para cada componente. Por esta razón, el cambio en las concentraciones de las especies químicas puede representarse mediante ecuaciones diferenciales ordinarias.
2. Las variables (concentraciones químicas) son funciones continuas del tiempo, por tanto las concentraciones están representadas por su valor medio y no se consideran las fluctuaciones que puedan ocurrir en ellos.

Estas hipótesis pueden traducirse en un modelo matemático, cuyas propiedades se han investigado mediante simulaciones numéricas a las ecuaciones del mismo. Con esto, se ha diseñado una serie de programas en lenguaje MATLAB que proporcionan un medio para investigar las reacciones involucradas con el cambio de actividad de las enzimas que ocurren en diversos procesos celulares. Con el fin de simplificar el problema del modelado, se utilizaron aproximaciones cuasi-estacionarias para comparar la dinámica que exhiben los sistemas y ajustar las escalas de tiempo presentes.

Los resultados muestran que el uso de la aproximación tQSSA extiende el dominio de parámetros en los cuales resulta válido realizar estas simplificaciones, particularmente cuando se cumple la condición en que las concentraciones de enzima son menores a la del sustrato, esto es, el término -- $E_0 \ll S_0 + K_m$ -- de la ecuación de Michaelis- Menten. Con esto en mente, se demuestra la validez del modelo al comparar tales aproximaciones con la dinámica exacta que exhibe el sistema. Por tanto, es deseable emplear la aproximación tQSSA para simplificar los modelos matemáticos obtenidos de la cinética enzimática.

Conclusiones.

Después de analizar los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. Se diseñaron y escribieron los programas en MATLAB que mediante extensas simulaciones numéricas describen el comportamiento dinámico de los modelos cinéticos obtenidos en relación con el proceso de fosforilación /defosforilación de proteínas.
2. Pueden distinguirse dos regímenes cuasi-estacionarios, las aproximaciones QSSA y tQSSA, para los cuales es posible realizar un ajuste en las diferentes escalas de tiempo presentes en la dinámica de dichos procesos.
3. La aproximación cuasi-estacionaria tQSSA resulta válida para cualquier conjunto de parámetros que se tomen, es decir, se puede simplificar la dimensionalidad de estos sistemas sin perder demasiada generalidad sobre el problema; en contraparte, la aproximación QSSA no llega a cumplirse en tales sistemas, lo cual introduce errores significativos en la dinámica del sistema, como la presencia de concentraciones negativas.
4. Existen bifurcaciones y ciclos de histéresis que son subyacentes a los mecanismos de control en el ciclo celular de las células eucariotas. En particular, el proceso intrínseco de fosforilación y defosforilación simultánea de proteínas controla la actividad de ciertas enzimas clave en estos procesos.

Bibliografía.

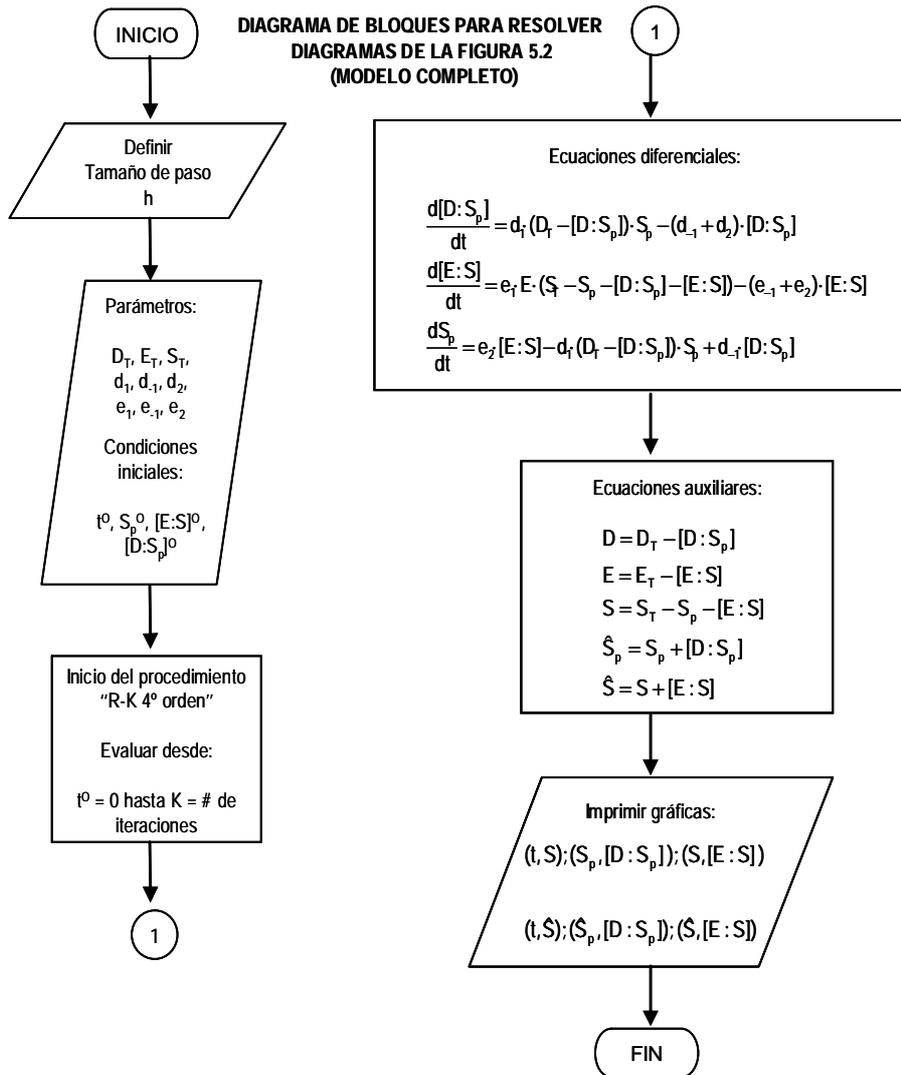
- [1] Alberts, B. *et al.* (2006). *Introducción a la Biología Celular*. 2ª Edición. Médica Panamericana. Madrid, España. pp. 83-102.
- [2] Arroyo, M *et al.* (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica, 39:2; pp. 23-39.
- [3] Blanco, A. (2000). *Química Biológica*. 7ª Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. pp 123-126, 132-133.
- [4] Carreño V, Castillo I. (2001). *Principios de biología molecular*. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona, España. pp. 107-110.
- [5] Chang, Zhong. (2007). *Enzymes Can Cut or Glue Nanoparticle-Coated DNA*. MRS BULLETIN. Vol. 32 No. 9. p. 686.
- [6] Ciliberto A, Capuani F, Tyson JJ (2007). *Modeling Networks of Coupled Enzymatic Reactions Using the Total Quasi-Steady State Approximation*. PLoS Computational Biology. 3(3): pp. 0463-0472.
- [7] Enciclopedia Microsoft ® Encarta ® 2007. © 1993-2006 Microsoft Corporation.
- [8] García, M J. (2006). *Sólidos ordenados desde la nano a la macroestructura*. Departamento de Química Inorgánica. Instituto de Materiales. Universidad de Alicante. pp. 1-19.
- [9] Goldbeter A, Koshland DE Jr (1981). *An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems*. Proc Natl Acad Sci USA 78: pp. 6840-6844.
- [10] Hayne, D. T. (2001). *Biological Thermodynamics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 252-253.
- [11] Herrera, E. (1991). *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Vol. 1. Mc-Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 128-132.
- [12] Karp, G. *et al.* (2006). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*. 4ª Edición. Mc-Graw Hill. México, D.F. pp. 92-129.
- [13] Levine, IN. (2004). *Fisicoquímica*. 5ª edición. Vol. 2. Mc-Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 723-726, 1113.
- [14] Linqui, Cao. (2005) *Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, Applications and Design*. WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. pp. 1-37, 169-192.
- [15] Marlovits G, Tyson C, Novak B y Tyson J. (1998). *Modeling M-phase in Xenopus oocytes extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA*. Biophysical Chemistry. 72: pp. 169-184.
- [16] Mayes, P. A. *et al* (2001). *Bioquímica de Harper*. 15ª Edición. Manual Moderno. México, D.F. pp. 87-88, 101-126.
- [17] Murray, JD (1989). *Mathematical Biology*. 2ª Ed. Springer-Verlag. Seattle, USA. pp. 109-135.
- [18] Novak B, Tyson J. (1993). *Numerical analysis of a comprehensive model of M-phase control in Xenopus oocyte extracts and intact embryos*. Journal of Cell Science. 106: pp. 1153-1158.
- [19] Página web del blog de ciencia, ecología y cambio climático GENCENCIA: <http://www.genciencia.com/autor/victor-puente> (publicado el 27 de Agosto de 2007).
- [20] Página web del Proyecto Biológico del Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular de la Universidad de Arizona: <http://www.arizona.edu.org>.
- [21] Página web del Proyecto Biosfera del Ministerio de Educación y Ciencia: <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/biomol/imagenes>.

[22] Página web: [http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/...](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/)

[23] Tinoco, Jr. et al. (1995). *Physical Chemistry: Principles and applications in biological sciences*. 3^a Ed. Prentice-Hall. Seattle, USA. pp. 323-365.

[24] Zoltan Szallasi, et al. (2006). *System Modeling in Cell Biology*. The MIT Press. Massachussets, EU. pp. 97-123.

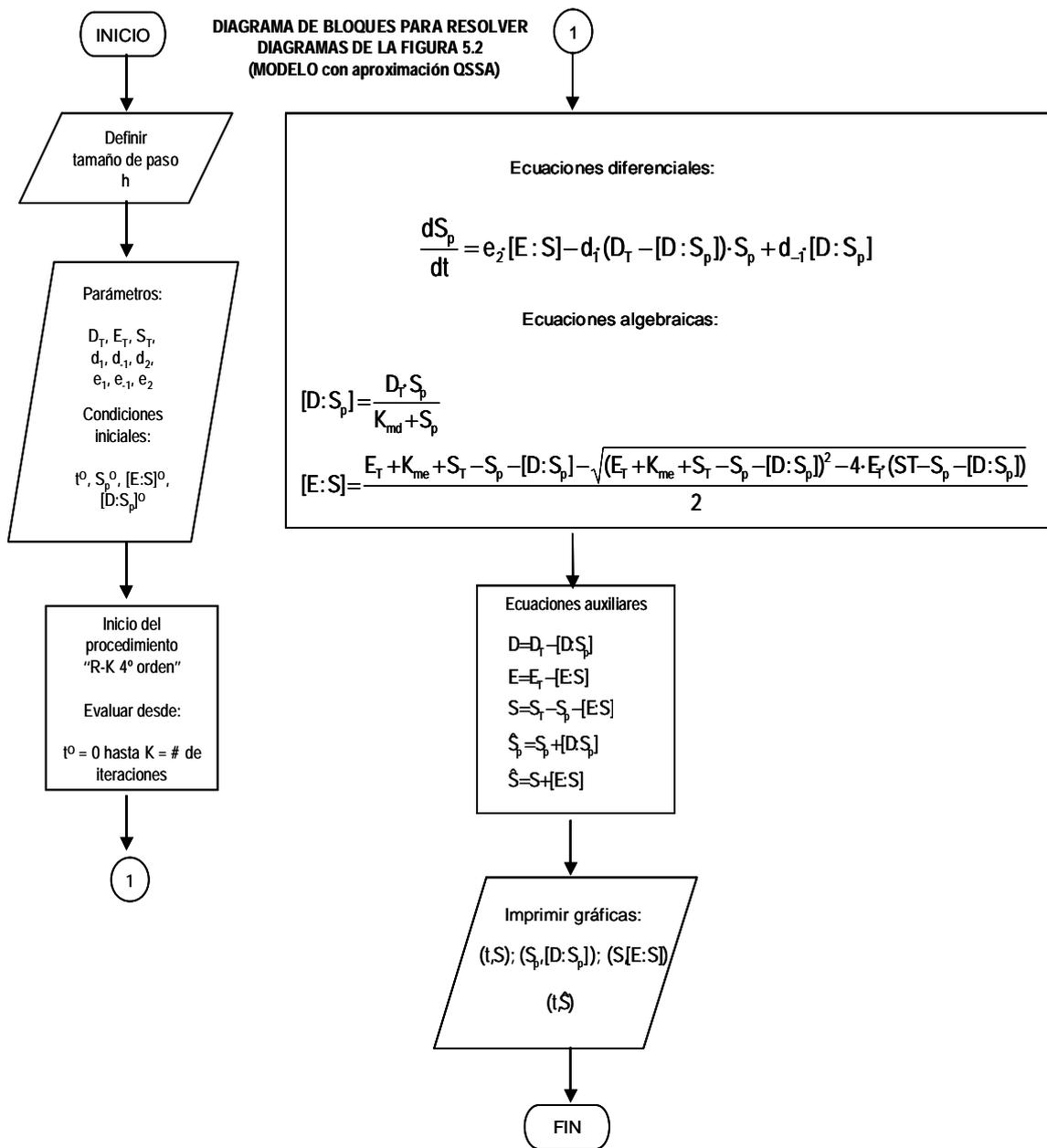
ANEXO. Programas en MATLAB 7.0



```

% Programa para resolver diagramas de la fig. 5.2, ecuaciones en tabla 2.1 (modelo completo, líneas negras en todos los casos).
clear all
h=0.01; % Tamaño de paso
% Parámetros (ver tabla 2.2)
ET=20;ST=50;DT=200;e1=0.1;e_1=0.05;e2=0.05;d1=0.0009;d_1=0.005;d2=0.085;kme=1;kmd=100;
% condiciones iniciales, donde A=[E:S], B=[D:SP] y SP=Sp
t(1)=0;A(1)=0;B(1)=0;SP(1)=ST; K=20000; % K es el # de iteraciones
for k=1:K % Algoritmo de Runge-Kutta 4to. Orden.
t(k+1)=t(k)+h;
A1=e1*(ET-A(k))*(ST-SP(k)-B(k)-A(k))-(e_1+e2)*A(k);
B1=d1*(DT-B(k))*SP(k)-(d_1+d2)*B(k);
SP1=e2*A(k)-d1*(DT-B(k))*SP(k)+d_1*B(k);
A2=e1*(ET-(A(k)+h/2*A1))*(ST-(SP(k)+h/2*SP1)-(B(k)+h/2*B1)-...
(A(k)+h/2*A1))-(e_1+e2)*(A(k)+h/2*A1);
B2=d1*(DT-(B(k)+h/2*B1))*(SP(k)+h/2*SP1)-(d_1+d2)*(B(k)+h/2*B1);
SP2=e2*(A(k)+h/2*A1)-d1*(DT-(B(k)+h/2*B1))*(SP(k)+h/2*SP1)+...
d_1*(B(k)+h/2*B1);
A3=e1*(ET-(A(k)+h/2*A2))*(ST-(SP(k)+h/2*SP2)-(B(k)+h/2*B2)-...
(A(k)+h/2*A2))-(e_1+e2)*(A(k)+h/2*A2);
B3= d1*(DT-(B(k)+h/2*B2))*(SP(k)+h/2*SP2)-(d_1+d2)*(B(k)+h/2*B2);
SP3= e2*(A(k)+h/2*A2)-d1*(DT-(B(k)+h/2*B2))*(SP(k)+h/2*SP2)+...
d_1*(B(k)+h/2*B2);
A4= e1*(ET-(A(k)+h*A3))*(ST-(SP(k)+h*SP3)-(B(k)+h*B3)-...
(A(k)+h*A3))-(e_1+e2)*(A(k)+h*A3);
B4= d1*(DT-(B(k)+h*B3))*(SP(k)+h*SP3)-(d_1+d2)*(B(k)+h*B3);
SP4= e2*(A(k)+h*A3)-d1*(DT-(B(k)+h*B3))*(SP(k)+h*SP3)+d_1*(B(k)+h*B3);
SP(k+1)=SP(k)+(h/6)*(SP1+2*SP2+2*SP3+SP4);
B(k+1)=B(k)+(h/6)*(B1+2*B2+2*B3+B4);
A(k+1)=A(k)+(h/6)*(A1+2*A2+2*A3+A4);
% ecuaciones auxiliares
D(k+1)=DT-B(k+1);
E(k+1)=ET-A(k+1);
S(k+1)=ST-SP(k+1)-B(k+1)-A(k+1);
SPC(k+1)=SP(k+1)+B(k+1); % definición de las variables  $\hat{S}=SC$  y  $\hat{S}_p=SPC$ 
SC(k+1)= S(k+1)+A(k+1);
end
>> plot(SP,B, 'k', SPC,B, 'k')
>> plot(S,A, 'k', SC,A, 'k')
>> plot(t,S, 'k', t,SC, 'k')

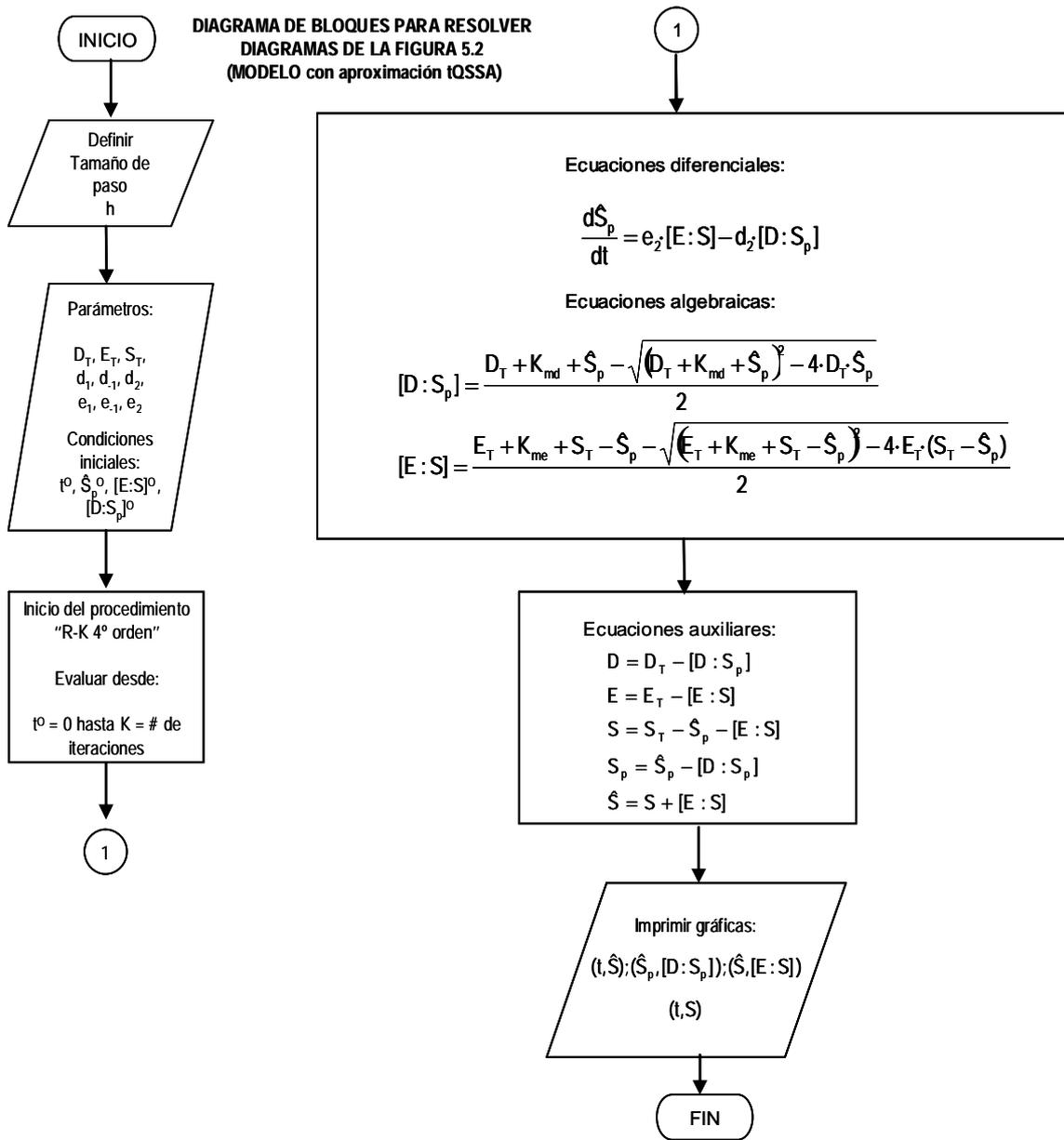
```



```

% Programa para resolver diagramas de la fig. 5.2, ecuaciones en tabla 2.1 (modelo QSSA, líneas azules en todos los casos).
h=0.01; % Tamaño de paso
%Parámetros (ver tabla 2.2)
ET=20;ST=50;DT=200;e1=0.1;e_1=0.05;e2=0.05;d1=0.0009;d_1=0.005;d2=0.085; kme=1;kmd=100;
%Condiciones iniciales a t=0; para la aproximación QSSA; A=[E:S];B=[D:Sp];SP=Sp y S=S;
t(1)=0;A(1)=0;B(1)=0;SP(1)=ST; csp(1)=ST;K=20000;
for k=1:K % Los complejos A y B se resuelven en el estado estacionario.
    t(k+1)=t(k)+h;
    A1=((ET+kme+ST-SP(k)-B(k))-((ET+kme+ST-SP(k)-B(k))^2-4*ET*...
        (ST-SP(k)-B(k)))^0.5)/2);
    B1=DT*SP(k)/(kmd+SP(k));
    SP1=e2*A1+d_1*B1-d1*(DT-B(k))*SP(k);
    A2=((ET+kme+ST-(SP(k)+h/2*SP1)-(B(k)+h/2*B1))-((ET+kme+ST-...
        (SP(k)+h/2*SP1)-(B(k)+h/2*B1))^2-4*ET*(ST-(SP(k)+h/2*SP1)-...
        (B(k)+h/2*B1)))^0.5)/2);
    B2=DT*(SP(k)+h/2*SP1)/(kmd+(SP(k)+h/2*SP1));
    SP2=e2*A2+d_1*B2-d1*(DT-(B(k)+h/2*B2))*(SP(k)+h/2*SP1);
    A3=((ET+kme+ST-(SP(k)+h/2*SP2)-(B(k)+h/2*B2))-((ET+kme+ST-...
        (SP(k)+h/2*SP2)-(B(k)+h/2*B2))^2-4*ET*(ST-(SP(k)+h/2*SP2)-...
        (B(k)+h/2*B2)))^0.5)/2);
    B3=DT*(SP(k)+h/2*SP2)/(kmd+(SP(k)+h/2*SP2));
    SP3=e2*A3+d_1*B3-d1*(DT-(B(k)+h/2*B3))*(SP(k)+h/2*SP2);
    A4=((ET+kme+ST-(SP(k)+h*SP3)-(B(k)+h*B3))-((ET+kme+ST-(SP(k)+h*SP3)-...
        (B(k)+h*B3))^2-4*ET*(ST-(SP(k)+h*SP3)-(B(k)+h*B3)))^0.5)/2);
    B4=DT*(SP(k)+h*SP3)/(kmd+(SP(k)+h*SP3));
    SP4=e2*A4+d_1*B4-d1*(DT-(B(k)+h*B4))*(SP(k)+h*SP3);
    SP(k+1)=SP(k)+h/6*(SP1+2*SP2+2*SP3+SP4);
    B(k+1)=DT*SP(k+1)/(kmd+SP(k+1));
    A(k+1)=(ET+kme+ST-SP(k+1)-B(k+1))-((ET+kme+ST-SP(k+1)-B(k+1))^2-...
        4*ET*(ST-SP(k+1)-B(k+1)))^0.5)/2);
%Ecuaciones auxiliares
    D(k+1)=DT-B(k+1);
    E(k+1)=ET-A(k+1);
    S(k+1)=ST-SP(k+1)-B(k+1)-A(k+1);
    SPC(k+1)=SP(k+1)+B(k+1); % definición de las variables  $\hat{S}=SC$  y  $\hat{Sp}=SPC$ 
    SC(k+1)=S(k+1)+A(k+1);
end
>> plot(SP,B,'b')
>> plot(t,S,'b',t,SC,'b')
>> plot(S,A,'b')

```



```

% Programa para resolver diagramas de la fig. 5.2, ecuaciones en tabla 2.1 (modelo tQSSA, líneas rojas en todos los casos).
h=0.01; % Tamaño de paso
ET=20;ST=50;DT=200;e1=0.1;e_1=0.05;e2=0.05;d1=0.0009;d_1=0.005;d2=0.085;kme=1;kmd=100; % Parámetros (ver tabla 2.2)
% condiciones iniciales: t(1)=0;A(1)=0;B(1)=0;SPC(1)=ST; % donde A=[E:S], B=[D:SP] y SPC= $\hat{S}p$ 
K=20000; % número de iteraciones
for k=1:K % Algoritmo de Runge-Kutta 4o orden. Los complejos A y B se resuelven en el estado estacionario.
t(k+1)=t(k)+h;
A1=((ET+kme+ST-SPC(k))-((ET+kme+ST-SPC(k))^2-4*ET*(ST-SPC(k)))^0.5)/2);
B1=((DT+kmd+SPC(k))-((DT+kmd+SPC(k))^2-4*DT*SPC(k))^0.5)/2);
SPC1=e2*A1-d2*B1;
A2=((ET+kme+ST-(SPC(k)+h/2*SPC1))-((ET+kme+ST-(SPC(k)+h/2*SPC1))^2-...
4*ET*(ST-(SPC(k)+h/2*SPC1)))^0.5)/2);
B2=((DT+kmd+(SPC(k)+h/2*SPC1))-((DT+kmd+(SPC(k)+h/2*SPC1))^2-...
4*DT*(SPC(k)+h/2*SPC1))^0.5)/2);
SPC2=e2*A2-d2*B2;
A3=((ET+kme+ST-(SPC(k)+h/2*SPC2))-((ET+kme+ST-(SPC(k)+h/2*SPC2))^2-...
4*ET*(ST-(SPC(k)+h/2*SPC2)))^0.5)/2);
B3=((DT+kmd+(SPC(k)+h/2*SPC2))-((DT+kmd+(SPC(k)+h/2*SPC2))^2-...
4*DT*(SPC(k)+h/2*SPC2))^0.5)/2);
SPC3=e2*A3-d2*B3;
A4=((ET+kme+ST-(SPC(k)+h*SPC3))-((ET+kme+ST-(SPC(k)+h*SPC3))^2-...
4*ET*(ST-(SPC(k)+h*SPC3)))^0.5)/2);
B4=((DT+kmd+(SPC(k)+h*SPC3))-((DT+kmd+(SPC(k)+h*SPC3))^2-...
4*DT*(SPC(k)+h*SPC3))^0.5)/2);
SPC4=e2*A4-d2*B4;
SPC(k+1)=SPC(k)+(h/6)*(SPC1+2*SPC2+2*SPC3+SPC4);
A(k+1)=((ET+kme+ST-SPC(k+1))-((ET+kme+ST-SPC(k+1))^2-...
4*ET*(ST-SPC(k+1)))^0.5)/2);
B(k+1)=((DT+kmd+SPC(k+1))-((DT+kmd+SPC(k+1))^2-4*DT*SPC(k+1))^0.5)/2);
% ecuaciones auxiliares
D(k+1)=DT-B(k+1);
E(k+1)=ET-A(k+1);
S(k+1)=ST-SPC(k+1)-A(k+1);
SP(k+1)=SPC(k+1)-B(k+1); % definición de las variables  $S = SC$  y  $Sp = SPC$ 
SC(k+1)= S(k+1)+A(k+1);
end
>> plot(SPC,B, 'r')
>> plot(SC,A,'r')
>> plot(t,S,'r',t,SC,'r')

```

Para resolver los diagramas de \hat{S}_p/S_T contra el parámetro E_T/D_T de la figura 5.1.C, con las ecuaciones de la tabla 2.1 (modelo tQSSA) se siguió el siguiente algoritmo:

A partir del modelo tQSSA original, en el estado estacionario se tiene

$$\begin{aligned} \frac{d\hat{S}_p}{dt} &= e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] = 0 \\ 0 &= D_T \cdot \hat{S}_p - [D:S_p] \cdot (D_T + K_{md} + \hat{S}_p) + [D:S_p]^2 \\ 0 &= E_T \cdot (S_T - \hat{S}_p) - [E:S] \cdot (E_T + K_{me} + S_T - \hat{S}_p) + [E:S]^2 \end{aligned}$$

Dividiendo por S_T , queda

$$\begin{aligned} e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] &= 0 \\ 0 &= D_T/S_T \cdot \hat{S}_p/S_T - [D:S_p] \cdot (D_T + K_{md})/S_T + \hat{S}_p/S_T + [D:S_p]^2 \\ 0 &= E_T/S_T \cdot (1 - \hat{S}_p/S_T) - [E:S] \cdot (E_T + K_{me})/S_T + 1 - \hat{S}_p/S_T + [E:S]^2 \end{aligned}$$

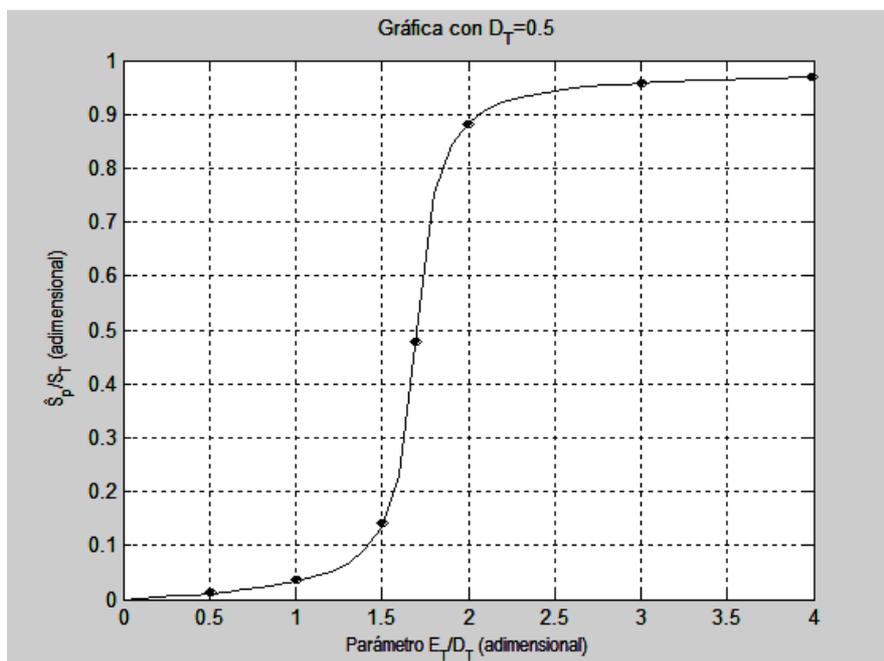
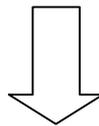
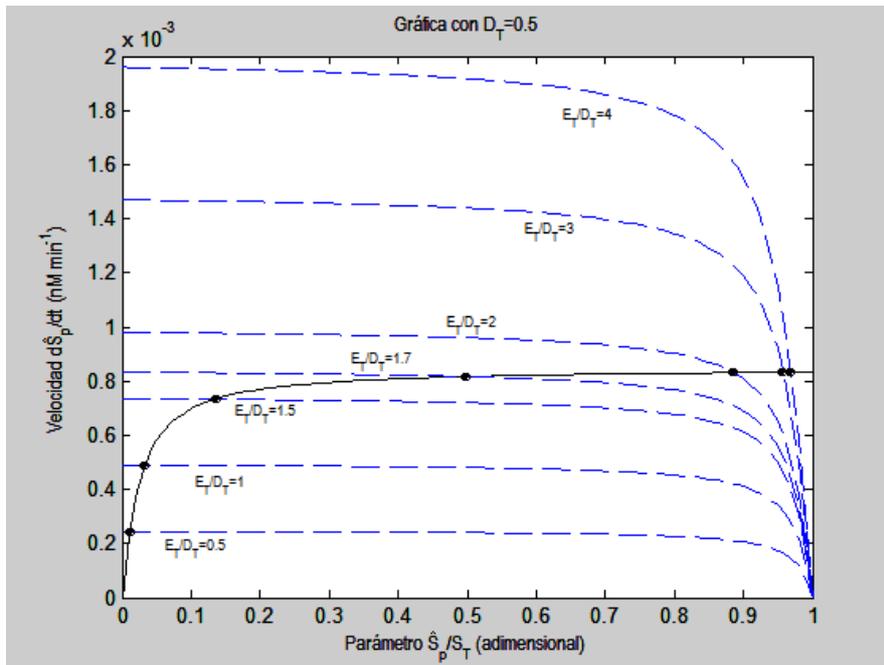
Con $E_T = E_T/D_T \cdot D_T$

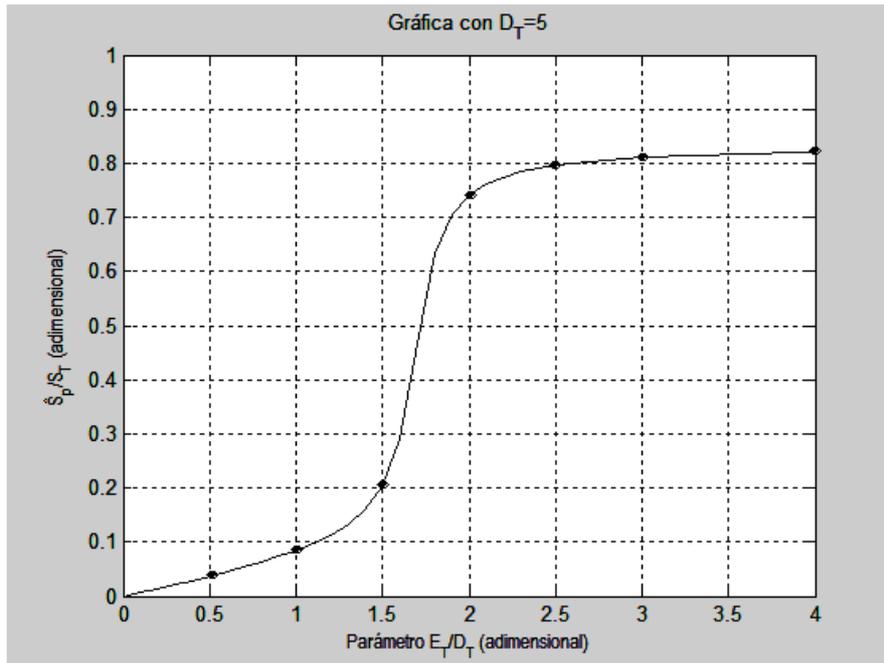
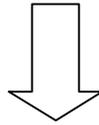
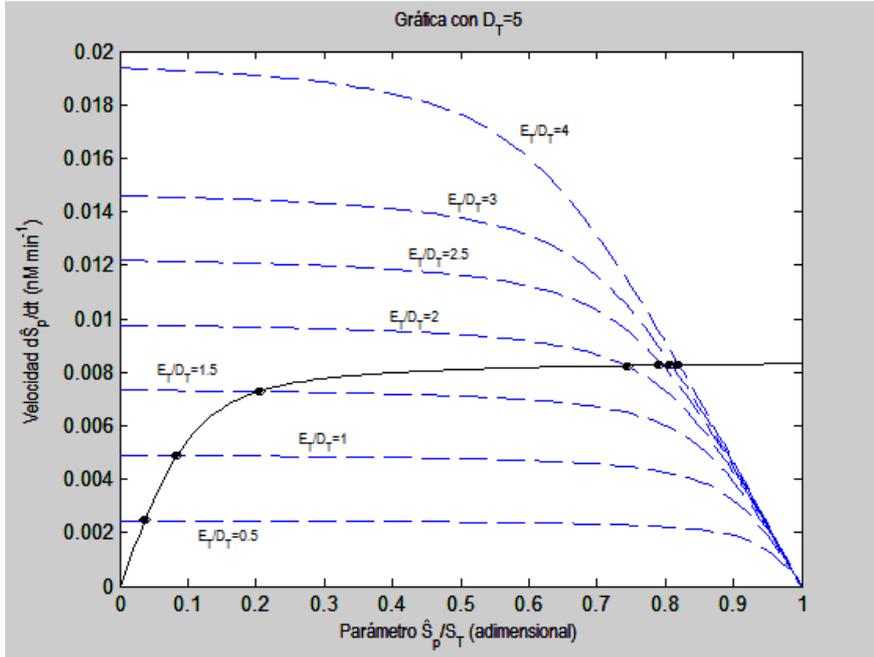
Esta es la ecuación que se resuelve para \hat{S}_p/S_T contra el parámetro E_T/D_T de la siguiente forma:

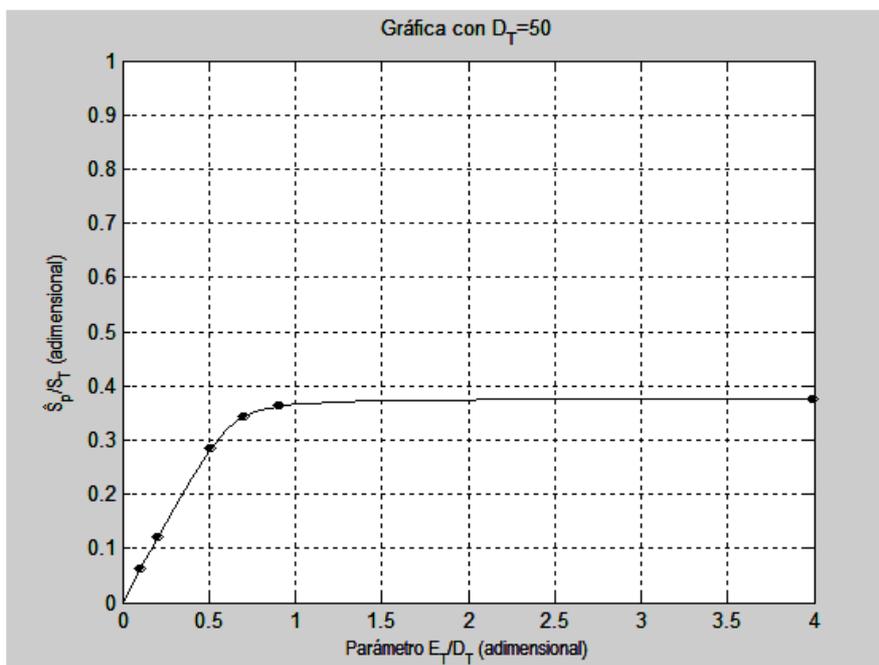
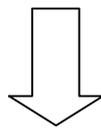
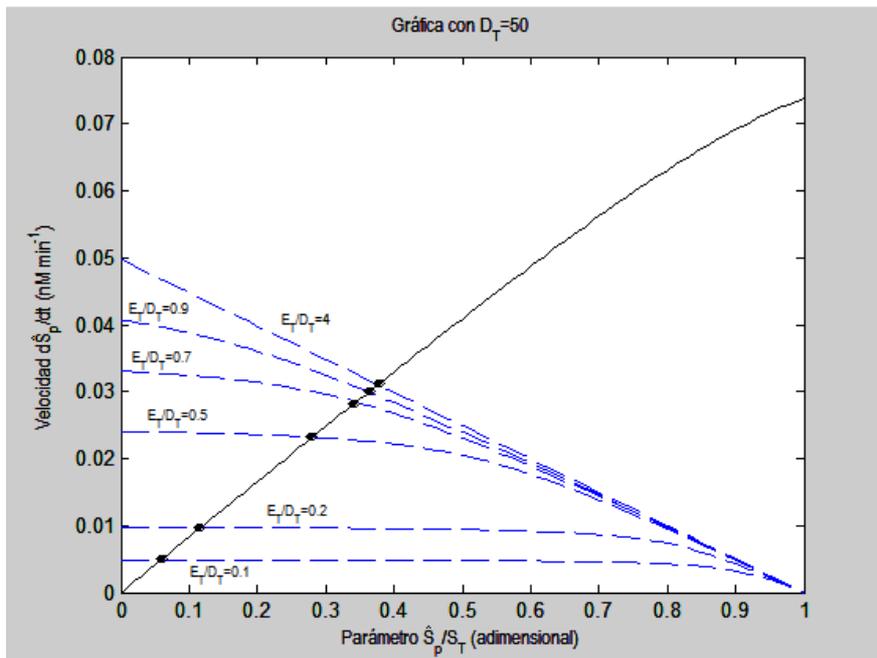
1. Primero resolvemos las ecuaciones $e_2 \cdot [E:S]$ --línea continua-- y $d_2 \cdot [D:S_p]$ --línea discontinua-- como función de \hat{S}_p para diferentes valores de E_T/D_T . Para este punto se utilizó el siguiente programa:

```
% Modelo tQSSA sin aproximante Pade
% X= S_p/S_T,
X=0:0.01:1;ST=50;kme=1;kmd=1;e2=0.05;d2=0.085;DT=0.5;ETDT=4;
% Términos para la ecuación cuadrática Ax^2+Bx+C
% Término para e2*[E:S]
A1=1;B1=(ETDT*DT+kme)/ST+1-X;C1=ETDT*DT/ST*(1-X);
F1=e2*(B1-(B1.^2-4*A1.*C1).^0.5)/2;
plot(X,F1)
hold on
% Término para d2*[D:S_p]
A2=1;B2=(DT+kmd)/ST+X;C2=DT/ST*X;
F2=d2*(B2-(B2.^2-4*A2.*C2).^0.5)/2;
plot(X,F2,'k')
```

2. Se repiten los cálculos del programa anterior para diferentes valores de E_T/D_T , puesto que los términos $e_2 \cdot [E:S]$ y $d_2 \cdot [D:S_p]$ deben ser iguales en todo momento. Finalmente, observando que los puntos donde intersectan las curvas obtenidas de esta manera, corresponden al valor estacionario de \hat{S}_p/S_T , se grafican en una nueva figura el valor de \hat{S}_p/S_T con el correspondiente de E_T/D_T . Las siguientes gráficas muestran los resultados.







- Para resolver los diagramas de \hat{S}_p/S_T contra el parámetro E_T/D_T de la figura 5.1.C, con las ecuaciones de la tabla 2.1 (modelo tQSSA con aproximante Padé) se siguió el siguiente algoritmo:

A partir de la siguiente ecuación, obtenida anteriormente,

$$\begin{aligned}\frac{d\hat{S}_p}{dt} &= e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] = 0 \\ 0 &= D_T \cdot \hat{S}_p - [D:S_p] \cdot (D_T + K_{md} + \hat{S}_p) + [D:S_p]^2 \\ 0 &= E_T \cdot (S_T - \hat{S}_p) - [E:S] \cdot (E_T + K_{me} + S_T - \hat{S}_p) + [E:S]^2\end{aligned}$$

Es posible despreciar los términos cuadráticos $[D:S_p]^2$ y $[E:S]^2$ de la ecuación anterior (aproximante Padé), por consiguiente se obtiene la siguiente expresión

$$\begin{aligned}\frac{d\hat{S}_p}{dt} &= e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] = 0 \\ 0 &= D_T \cdot \hat{S}_p - [D:S_p] \cdot (D_T + K_{md} + \hat{S}_p) \\ 0 &= E_T \cdot (S_T - \hat{S}_p) - [E:S] \cdot (E_T + K_{me} + S_T - \hat{S}_p)\end{aligned}$$

Rearreglando, se obtiene la expresión que debe resolverse a fin de conocer la dependencia de \hat{S}_p/S_T contra el parámetro E_T/D_T .

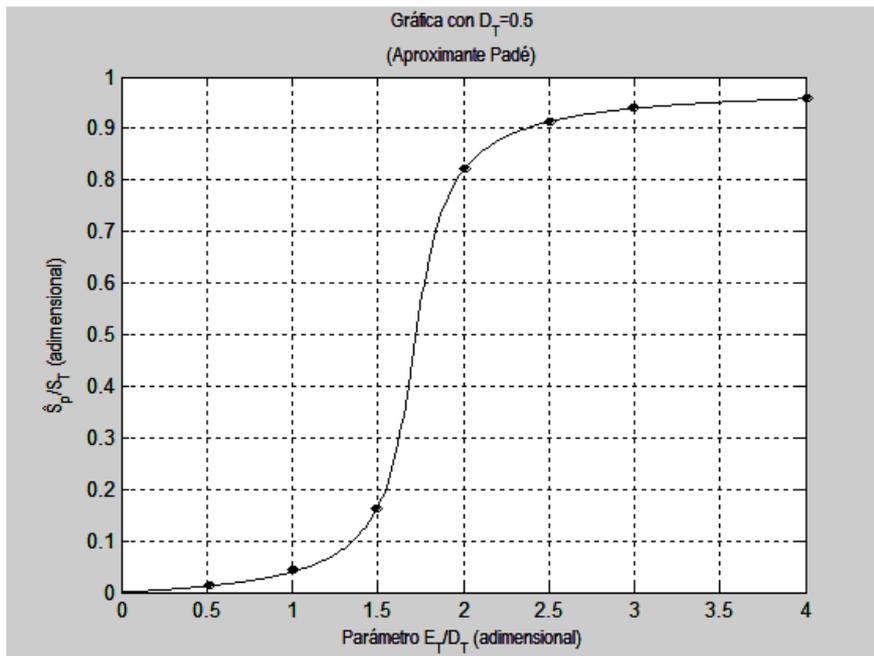
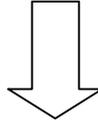
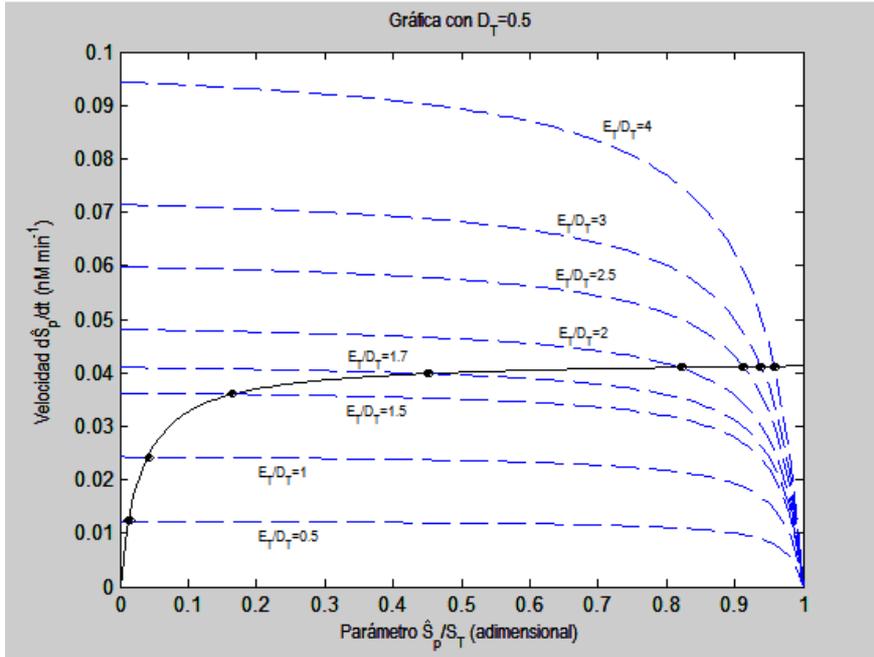
$$\begin{aligned}e_2 \cdot [E:S] - d_2 \cdot [D:S_p] &= 0 \\ [D:S_p] &= \frac{D_T \cdot \hat{S}_p}{(D_T + K_{md} + \hat{S}_p)} \\ [E:S] &= \frac{E_T \cdot (S_T - \hat{S}_p)}{(E_T + K_{me} + S_T - \hat{S}_p)}\end{aligned}$$

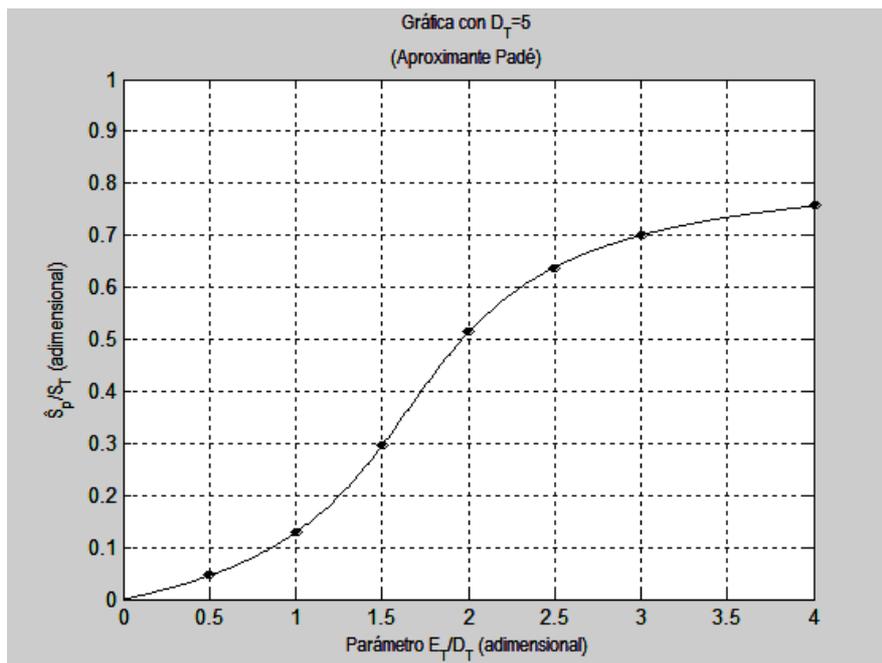
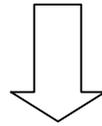
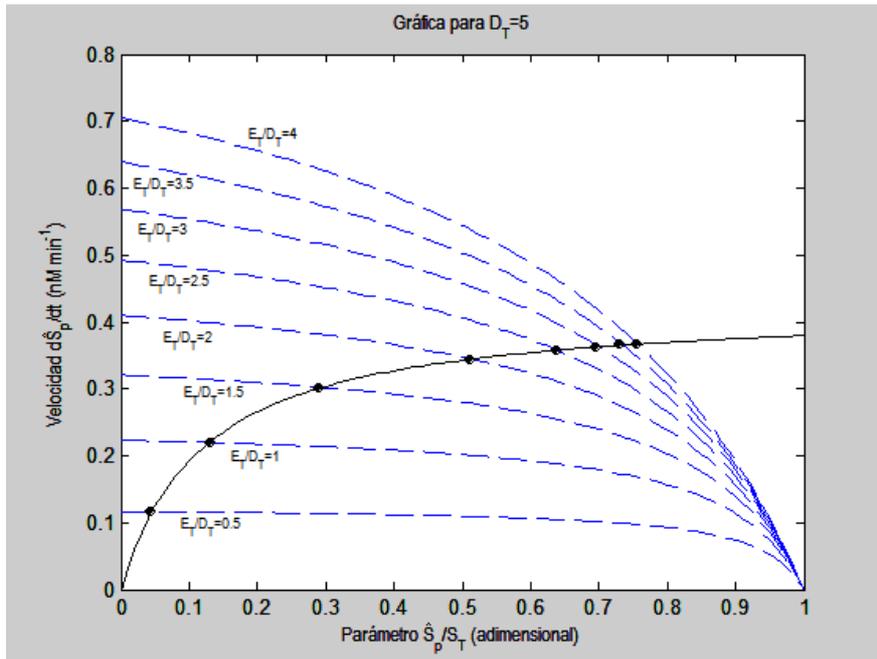
Para resolver esta ecuación, se utilizó el siguiente programa en MATLAB 7:

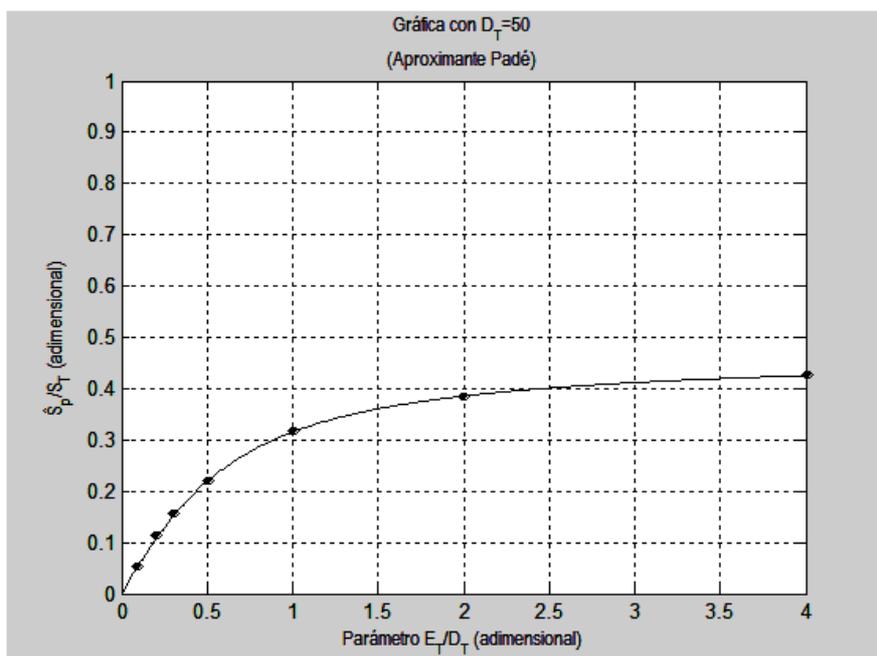
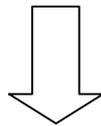
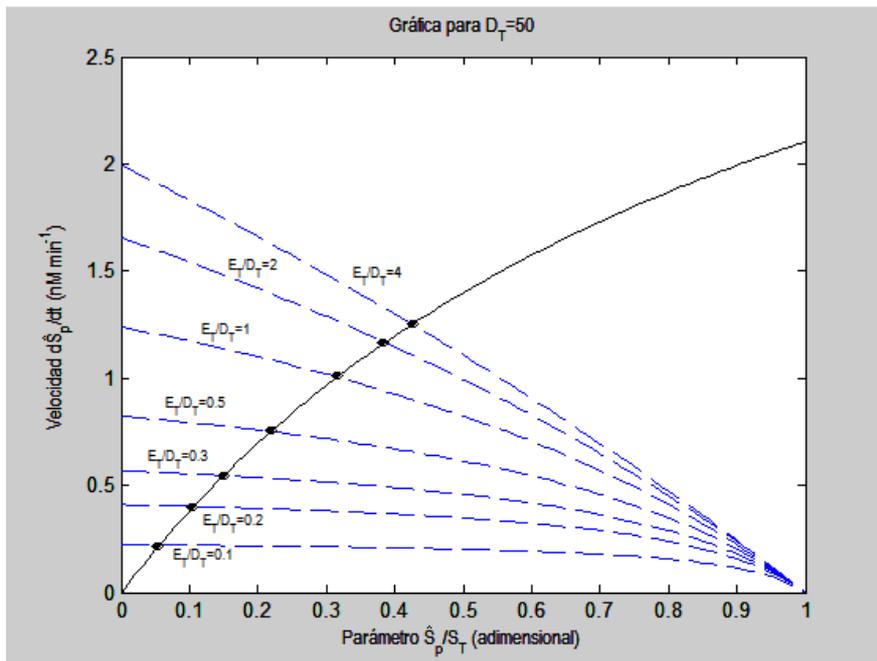
```
% Modelo tQSSA con aproximante Padé a las ecuaciones algebraicas
% X=  $\hat{S}_p/S_T$ 
X=0:0.01:1;ST=50;kme=1;kmd=1;e2=0.05;d2=0.085;DT=0.5;ETDT=4;
% a continuación se evalúa la expresión e2*[E:S]=0
F1=e2*ETDT*DT*(1-X)./(ETDT*DT+kme)/ST+1-X);
plot(X,F1)
hold on
% término d2*[D:Sp]
F2=d2*DT*X./((DT+kmd)/ST+X);
plot(X,F2,'k')

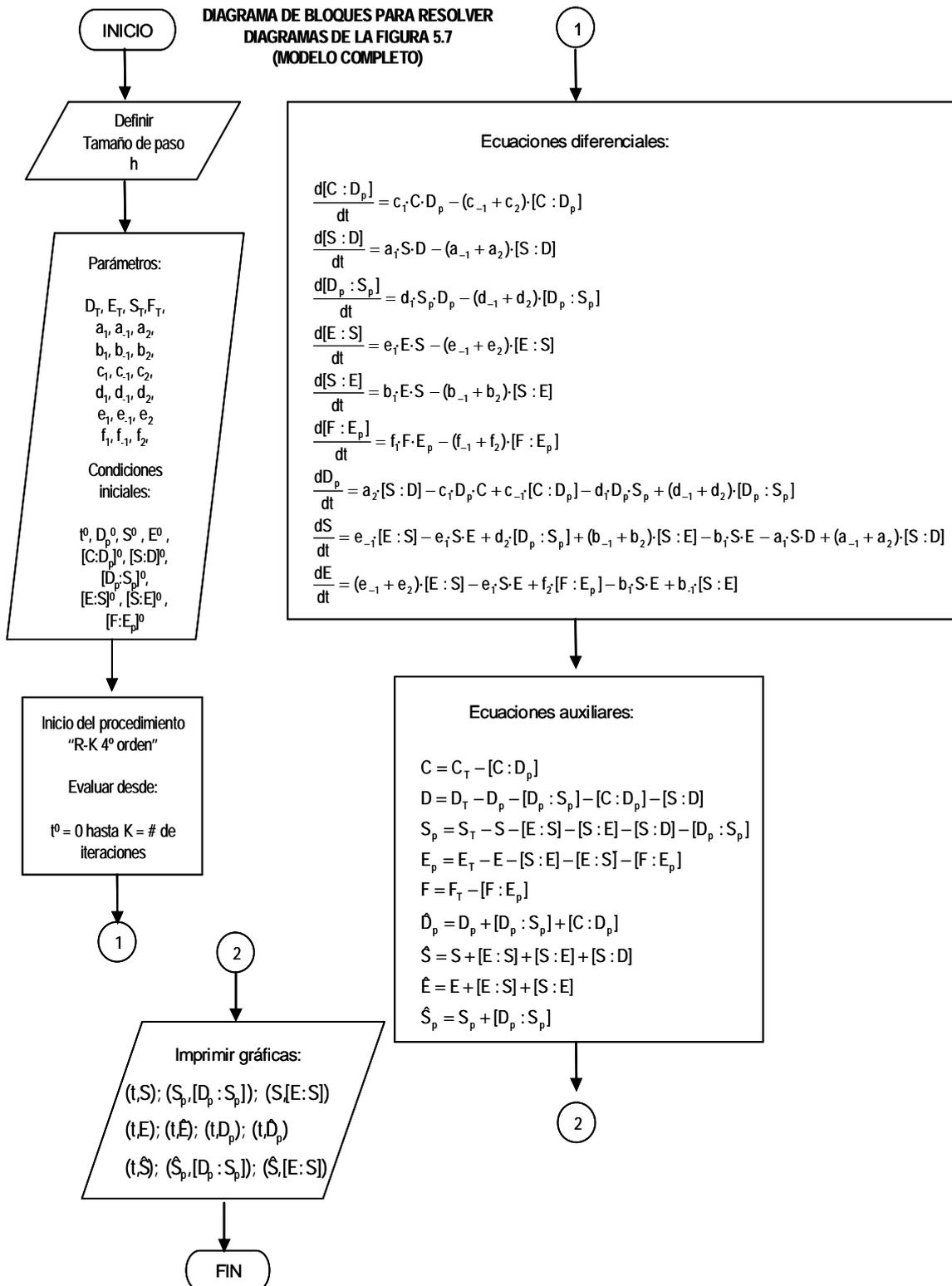
% se repiten los cálculos para DT=5 y DT=50 para distintos valores de ETDT.
```

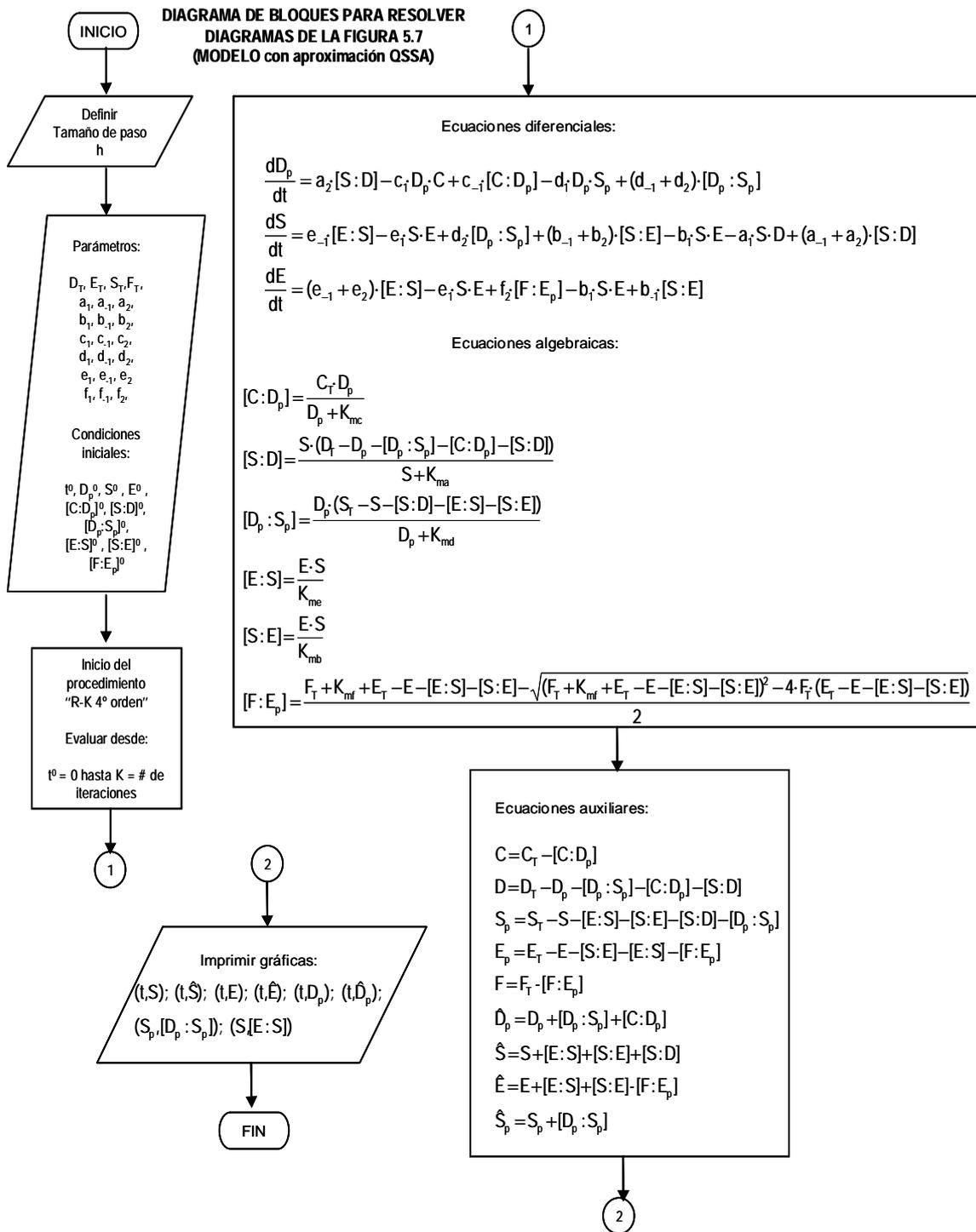
Este programa genera las siguientes gráficas, cuya información es utilizada para obtener el diagrama de \hat{S}_p/S_T contra el parámetro E_T/D_T .

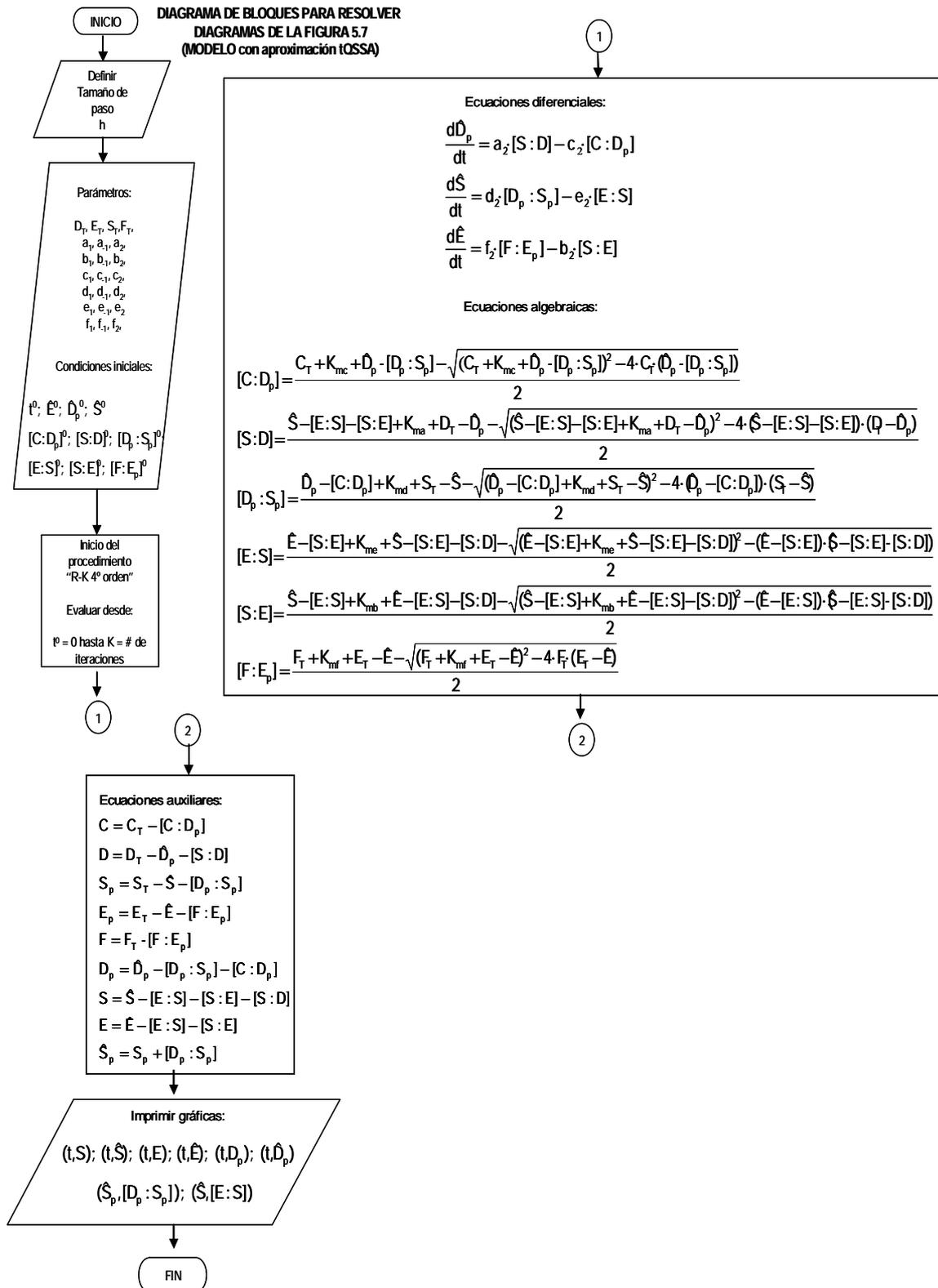












Programa para resolver los diagramas de la fig. 5.7, con las ecuaciones de la tabla 2.5 (modelo completo, líneas negras en todos los casos).

```

h=0.01;%tamaño de paso
%parámetros
CT=10;FT=0.5;DT=200;ST=50;ET=20;c1=0.1;c1r=0.1;c2=20;a1=0.2;a1r=0.02;a2=4;
d1=0.0009;d1r=0.005;d2=0.085;e1=0.1;e1r=0.05;e2=0.05;b1=5;b1r=10.6;b2=0.4;f1=0.1;f1r=0.01;f2=2;
kmc=201;kma=20.1;kmd=100;kme=1;kmb=2.2;kmf=20.1;
P(1)=0;Q(1)=0;R(1)=0;X(1)=0;Y(1)=0;Z(1)=0;E(1)=20;DP(1)=200;S(1)=0;t(1)=0;% condiciones iniciales: donde
% P=[C:DP], Q=[S:D], R=[Dp:Sp], X=[E:S], Y=[S:E], Z=[F:Ep], Ec=Ê, DPc=Đp y Sc=Ŝ.
K=20000;% número de iteraciones
for k=1:K
    t(k+1)=t(k)+h;
    %algoritmo de Runge-Kutta 4º orden
    P1=c1*(CT-P(k))*DP(k)-(c1r+c2)*P(k);
    Q1=a1*S(k)*(DT-DP(k)-R(k)-P(k)-Q(k))-(a1r+a2)*Q(k);
    R1=d1*DP(k)*(ST-S(k)-X(k)-Y(k)-Q(k)-R(k))-(d1r+d2)*R(k);
    X1=e1*E(k)*S(k)-(e1r+e2)*X(k);
    Y1=b1*E(k)*S(k)-(b1r+b2)*Y(k);
    Z1=f1*(FT-Z(k))*(ET-E(k)-Y(k)-X(k)-Z(k))-(f1r+f2)*Z(k);
    DP1=a2*Q(k)-c1*DP(k)*(CT-P(k))+c1r*P(k)-d1*DP(k)*(ST-X(k)-Y(k)-Q(k)-...
        R(k)-S(k))+(d1r+d2)*R(k);
    S1=e1r*X(k)-e1*E(k)*S(k)+d2*R(k)+(b1r+b2)*Y(k)-b1*E(k)*S(k)-a1*S(k)*...
        (DT-DP(k)-R(k)-P(k)-Q(k))+(a1r+a2)*Q(k);
    E1=(e1r+e2)*X(k)-e1*E(k)*S(k)+f2*Z(k)-b1*E(k)*S(k)+b1r*Y(k);

    P2=c1*(CT-(P(k)+h/2*P1))*(DP(k)+h/2*DP1)-(c1r+c2)*(P(k)+h/2*P1);
    Q2=a1*(S(k)+h/2*S1)*(DT-(DP(k)+h/2*DP1)-(R(k)+h/2*R1)-...
        (P(k)+h/2*P1)-(Q(k)+h/2*Q1))-(a1r+a2)*(Q(k)+h/2*Q1);
    R2=d1*(DP(k)+h/2*DP1)*(ST-(S(k)+h/2*S1)-(X(k)+h/2*X1)-...
        (Y(k)+h/2*Y1)-(Q(k)+h/2*Q1)-(R(k)+h/2*R1))-(d1r+d2)*(R(k)+h/2*R1);
    X2=e1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)-(e1r+e2)*(X(k)+h/2*X1);
    Y2=b1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)-(b1r+b2)*(Y(k)+h/2*Y1);
    Z2=f1*(FT-(Z(k)+h/2*Z1))*(ET-(E(k)+h/2*E1)-(Y(k)+h/2*Y1)-...
        (X(k)+h/2*X1)-(Z(k)+h/2*Z1))-(f1r+f2)*(Z(k)+h/2*Z1);
    DP2=a2*(Q(k)+h/2*Q1)-c1*(DP(k)+h/2*DP1)*(CT-(P(k)+h/2*P1))+...
        c1r*(P(k)+h/2*P1)-d1*(DP(k)+h/2*DP1)*(ST-(X(k)+h/2*X1)-...
        (Y(k)+h/2*Y1)-(Q(k)+h/2*Q1)-(R(k)+h/2*R1)-(S(k)+h/2*S1))+...
        (d1r+d2)*(R(k)+h/2*R1);
    S2=e1r*(X(k)+h/2*X1)-e1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+...
        d2*(R(k)+h/2*R1)+(b1r+b2)*(Y(k)+h/2*Y1)-b1*(E(k)+h/2*E1)*...
        (S(k)+h/2*S1)-a1*(S(k)+h/2*S1)*(DT-(DP(k)+h/2*DP1)-...
        (R(k)+h/2*R1)-(P(k)+h/2*P1)-(Q(k)+h/2*Q1))+(a1r+a2)*(Q(k)+h/2*Q1);
    E2=(e1r+e2)*(X(k)+h/2*X1)-e1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+...
        f2*(Z(k)+h/2*Z1)-b1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+b1r*(Y(k)+h/2*Y1);

    P3=c1*(CT-(P(k)+h/2*P2))*(DP(k)+h/2*DP2)-(c1r+c2)*(P(k)+h/2*P2);
    Q3=a1*(S(k)+h/2*S2)*(DT-(DP(k)+h/2*DP2)-(R(k)+h/2*R2)-...
        (P(k)+h/2*P2)-(Q(k)+h/2*Q2))-(a1r+a2)*(Q(k)+h/2*Q2);
    R3=d1*(DP(k)+h/2*DP2)*(ST-(S(k)+h/2*S2)-(X(k)+h/2*X2)-...
        (Y(k)+h/2*Y2)-(Q(k)+h/2*Q2)-(R(k)+h/2*R2))-(d1r+d2)*(R(k)+h/2*R2);
    X3=e1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)-(e1r+e2)*(X(k)+h/2*X2);
    Y3=b1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)-(b1r+b2)*(Y(k)+h/2*Y2);
    Z3=f1*(FT-(Z(k)+h/2*Z2))*(ET-(E(k)+h/2*E2)-(Y(k)+h/2*Y2)-...
        (X(k)+h/2*X2)-(Z(k)+h/2*Z2))-(f1r+f2)*(Z(k)+h/2*Z2);
    DP3=a2*(Q(k)+h/2*Q2)-c1*(DP(k)+h/2*DP2)*(CT-(P(k)+h/2*P2))+...
        c1r*(P(k)+h/2*P2)-d1*(DP(k)+h/2*DP2)*(ST-(X(k)+h/2*X2)-...
        (Y(k)+h/2*Y2)-(Q(k)+h/2*Q2)-(R(k)+h/2*R2)-(S(k)+h/2*S2))+...
        (d1r+d2)*(R(k)+h/2*R2);
    S3=e1r*(X(k)+h/2*X2)-e1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+...
        d2*(R(k)+h/2*R2)+(b1r+b2)*(Y(k)+h/2*Y2)-b1*(E(k)+h/2*E2)*...
        (S(k)+h/2*S2)-a1*(S(k)+h/2*S2)*(DT-(DP(k)+h/2*DP2)-...
        (R(k)+h/2*R2)-(P(k)+h/2*P2)-(Q(k)+h/2*Q2))+(a1r+a2)*(Q(k)+h/2*Q2);
    E3=(e1r+e2)*(X(k)+h/2*X2)-e1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+...
        f2*(Z(k)+h/2*Z2)-b1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+b1r*(Y(k)+h/2*Y2);

    P4=c1*(CT-(P(k)+h*P3))*(DP(k)+h*DP3)-(c1r+c2)*(P(k)+h*P3);
    Q4=a1*(S(k)+h*S3)*(DT-(DP(k)+h*DP3)-(R(k)+h*R3)-(P(k)+h*P3)-...
        (Q(k)+h*Q3))-(a1r+a2)*(Q(k)+h*Q3);

```

%continúan ecuaciones del modelo completo de ecuaciones diferenciales

```
R4= d1*(DP(k)+h*DP3)*(ST-(S(k)+h*S3)-(X(k)+h*X3)-(Y(k)+h*Y3)-...
(Q(k)+h*Q3)-(R(k)+h*R3))-(d1r+d2)*(R(k)+h*R3);
X4= e1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)-(e1r+e2)*(X(k)+h*X3);

Y4= b1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)-(b1r+b2)*(Y(k)+h*Y3);
Z4= f1*(FT-(Z(k)+h*Z3))*(ET-(E(k)+h*E3)-(Y(k)+h*Y3)-(X(k)+h*X3)-...
(Z(k)+h*Z3))-(f1r+f2)*(Z(k)+h*Z3);
DP4=a2*(Q(k)+h*Q3)-c1*(DP(k)+h*DP3)*(CT-(P(k)+h*P3))+...
c1r*(P(k)+h*P3)-d1*(DP(k)+h*DP3)*(ST-(X(k)+h*X3)-(Y(k)+h*Y3)-...
(Q(k)+h*Q3)-(R(k)+h*R3)-(S(k)+h*S3))+(d1r+d2)*(R(k)+h*R3);
S4=e1r*(X(k)+h*X3)-e1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+d2*(R(k)+h*R3)+...
(b1r+b2)*(Y(k)+h*Y3)-b1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)-a1*(S(k)+h*S3)*...
(DT-(DP(k)+h*DP3)-(R(k)+h*R3)-(P(k)+h*P3)-(Q(k)+h*Q3))+...
(a1r+a2)*(Q(k)+h*Q3);
E4=(e1r+e2)*(X(k)+h*X3)-e1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+f2*(Z(k)+h*Z3)-...
b1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+b1r*(Y(k)+h*Y3);
```

```
DP(k+1)=DP(k)+h/6*(DP1+2*DP2+2*DP3+DP4);
S(k+1)=S(k)+h/6*(S1+2*S2+2*S3+S4);
E(k+1)=E(k)+h/6*(E1+2*E2+2*E3+E4);
P(k+1)=P(k)+h/6*(P1+2*P2+2*P3+P4);
Q(k+1)=Q(k)+h/6*(Q1+2*Q2+2*Q3+Q4);
```

```
R(k+1)=R(k)+h/6*(R1+2*R2+2*R3+R4);
X(k+1)=X(k)+h/6*(X1+2*X2+2*X3+X4);
Y(k+1)=Y(k)+h/6*(Y1+2*Y2+2*Y3+Y4);
Z(k+1)=Z(k)+h/6*(Z1+2*Z2+2*Z3+Z4);
```

% ecuaciones auxiliares

```
C(k+1)=CT-P(k+1);
D(k+1)=DT-DP(k+1)-R(k+1)-P(k+1)-Q(k+1);
SP(k+1)=ST-S(k+1)-X(k+1)-Y(k+1)-Q(k+1)-R(k+1);
EP(k+1)=ET-E(k+1)-X(k+1)-Y(k+1)-Z(k+1);
F(k+1)=FT-Z(k+1);
```

```
DPC(k+1)=DP(k+1)+R(k+1)+P(k+1);
SPC(k+1)=SP(k+1)+R(k+1);
SC(k+1)=S(k+1)+X(k+1)+Y(k+1)+Q(k+1);
EC(k+1)=E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1);
```

end

```
plot(t,DP,t,DPC);
plot(t,E,t,EC);
plot(t,S,t,SC);
plot(S,A,SC,A);
plot(SP,R,'k',SPC,R,'k')
```

Programa para resolver los diagramas de la fig. 5.7, con las ecuaciones de la tabla 2.5 (modelo QSSA, líneas azules en todos los casos).

```
h=0.001;
%parámetros
CT=10;FT=0.5;DT=200;ST=50;ET=20;
c1=0.1;c1r=0.1;c2=20;
a1=0.2;a1r=0.02;a2=4;
d1=0.0009;d1r=0.005;d2=0.085;
e1=0.1;e1r=0.05;e2=0.05;
b1=5;b1r=10.6;b2=0.4;
f1=0.1;f1r=0.01;f2=2;
kmc=((c1r+c2)/c1);kma=((a1r+a2)/a1);kmd=((d1r+d2)/d1);kme=((e1r+e2)/e1);kmb=((b1r+b2)/b1);kmf=((f1r+f2)/f1);
P(1)=0;Q(1)=0;R(1)=0;X(1)=0;Y(1)=0;Z(1)=0;E(1)=20;DP(1)=200;S(1)=0;t(1)=0; % condiciones iniciales: donde
% P=[C:Dp], Q=[S:D], R=[Dp:Sp], X=[E:S], Y=[S:E], Z=[F:Ep]; E, S y Dp son las variables.
K=160000; % número de iteraciones
for k=1:K
t(k+1)=t(k)+h;
P1=CT*DP(k)/(kmc+DP(k));
Q1=S(k)*(DT-(DP(k)+R(k)+P(k)))/(kma+S(k));
R1=DP(k)*(ST-(X(k)+Y(k)+Q(k)+S(k)))/(kmd+DP(k));
X1=E(k)*S(k)/kme;
```

% continúan ecuaciones del modelo con aproximación QSSA

Y1=E(k)*S(k)/kmb;
Z1=((FT+kmf+ET-(E(k)+X(k)+Y(k)))-((FT+kmf+ET-(E(k)+X(k)+Y(k)))^2-...
4*FT*(ET-(E(k)+X(k)+Y(k)))^0.5)/2);
DP1=a2*Q1-c1*DP(k)*(CT-P1)+c1r*P1-d1*DP(k)*(ST-(X1+Y1+Q1+R1+S(k)))+...
(d1r+d2)*R1;
S1=e1r*X1-e1*E(k)*S(k)+d2*R1+(b1r+b2)*Y1-b1*E(k)*S(k)-...
a1*S(k)*(DT-(DP(k)+R1+P1+Q1))+(a1r+a2)*Q1;
E1=(e1r+e2)*X1-e1*E(k)*S(k)+f2*Z1-b1*E(k)*S(k)+b1r*Y1;

P2=CT*(DP(k)+h/2*DP1)/(kmc+(DP(k)+h/2*DP1));
Q2=(S(k)+h/2*S1)*(DT-(DP(k)+h/2*DP1)+(R(k)+h/2*R1)+...
(P(k)+h/2*P1))/(kma+(S(k)+h/2*S1));
R2=(DP(k)+h/2*DP1)*(ST-(X(k)+h/2*X1)+(Y(k)+h/2*Y1)+(Q(k)+h/2*Q1)+...
(S(k)+h/2*S1))/(kmd+(DP(k)+h/2*DP1));
X2=(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)/kme;
Y2=(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)/kmb;
Z2=((FT+kmf+ET-(E(k)+h/2*E1)+(X(k)+h/2*X1)+(Y(k)+h/2*Y1))-...
((FT+kmf+ET-(E(k)+h/2*E1)+(X(k)+h/2*X1)+(Y(k)+h/2*Y1)))^2-...
4*FT*(ET-(E(k)+h/2*E1)+(X(k)+h/2*X1)+(Y(k)+h/2*Y1)))^0.5)/2);
DP2=a2*Q2-c1*(DP(k)+h/2*DP1)*(CT-P2)+c1r*P2-...
d1*(DP(k)+h/2*DP1)*(ST-(X2+Y2+Q2+R2+(S(k)+h/2*S1)))+(d1r+d2)*R2;
S2=e1r*X2-e1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+d2*R2+...
(b1r+b2)*Y2-b1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)-...
a1*(S(k)+h/2*S1)*(DT-(DP(k)+h/2*DP1)+R2+P2+Q2))+(a1r+a2)*Q2;
E2=(e1r+e2)*X2-e1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+f2*Z2-...
b1*(E(k)+h/2*E1)*(S(k)+h/2*S1)+b1r*Y2;

P3=CT*(DP(k)+h/2*DP2)/(kmc+(DP(k)+h/2*DP2));
Q3=(S(k)+h/2*S2)*(DT-(DP(k)+h/2*DP2)+(R(k)+h/2*R2)+...
(P(k)+h/2*P2))/(kma+(S(k)+h/2*S2));
R3=(DP(k)+h/2*DP2)*(ST-(X(k)+h/2*X2)+(Y(k)+h/2*Y2)+(Q(k)+h/2*Q2)+...
(S(k)+h/2*S2))/(kmd+(DP(k)+h/2*DP2));
X3=(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)/kme;
Y3=(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)/kmb;
Z3=((FT+kmf+ET-(E(k)+h/2*E2)+(X(k)+h/2*X2)+(Y(k)+h/2*Y2))-...
((FT+kmf+ET-(E(k)+h/2*E2)+(X(k)+h/2*X2)+(Y(k)+h/2*Y2)))^2-...
4*FT*(ET-(E(k)+h/2*E2)+(X(k)+h/2*X2)+(Y(k)+h/2*Y2)))^0.5)/2);
DP3=a2*Q3-c1*(DP(k)+h/2*DP2)*(CT-P2)+c1r*P3-d1*(DP(k)+h/2*DP2)*(ST-...
(X3+Y3+Q3+R3+(S(k)+h/2*S2)))+(d1r+d2)*R3;
S3=e1r*X3-e1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+d2*R3+(b1r+b2)*Y3-...
b1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)-a1*(S(k)+h/2*S2)*(DT-...
(DP(k)+h/2*DP2)+R3+P3+Q3))+(a1r+a2)*Q3;
E3=(e1r+e2)*X3-e1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+f2*Z3-...
b1*(E(k)+h/2*E2)*(S(k)+h/2*S2)+b1r*Y3;

P4=CT*(DP(k)+h*DP3)/(kmc+(DP(k)+h*DP3));
Q4=(S(k)+h*S3)*(DT-(DP(k)+h*DP3)+(R(k)+h*R3)+...
(P(k)+h*P3))/(kma+(S(k)+h*S3));
R4=(DP(k)+h*DP3)*(ST-(X(k)+h*X3)+(Y(k)+h*Y3)+(Q(k)+h*Q3)+...
(S(k)+h*S3))/(kmd+(DP(k)+h*DP3));
X4=(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)/kme;
Y4=(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)/kmb;
Z4=((FT+kmf+ET-(E(k)+h*E3)+(X(k)+h*X3)+(Y(k)+h*Y3))-...
((FT+kmf+ET-(E(k)+h*E3)+(X(k)+h*X3)+(Y(k)+h*Y3)))^2-...
4*FT*(ET-(E(k)+h*E3)+(X(k)+h*X3)+(Y(k)+h*Y3)))^0.5)/2);
DP4=a2*Q4-c1*(DP(k)+h*DP3)*(CT-P(k)+h*P3)+c1r*P4-...
d1*(DP(k)+h*DP3)*(ST-(X(k)+h*X3)+(Y(k)+h*Y3)+(Q(k)+h*Q3)+...
(R(k)+h*R3)+(S(k)+h*S3)))+(d1r+d2)*R4;
S4=e1r*X4-e1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+d2*R4+(b1r+b2)*Y4-...
b1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)-a1*(S(k)+h*S3)*(DT-(DP(k)+h*DP3)+...
(R(k)+h*R3)+(P(k)+h*P3)+(Q(k)+h*Q3)))+(a1r+a2)*Q4;
E4=(e1r+e2)*X4-e1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+f2*Z4-...
b1*(E(k)+h*E3)*(S(k)+h*S3)+b1r*Y4;

DP(k+1)=DP(k)+h/6*(DP1+2*DP2+2*DP3+DP4);
S(k+1)=S(k)+h/6*(S1+2*S2+2*S3+S4);
E(k+1)=E(k)+h/6*(E1+2*E2+2*E3+E4);

P(k+1)=CT*DP(k+1)/(kmc+DP(k+1));

```

%continúan ecuaciones del modelo con aproximación QSSA
Q(k+1)=S(k+1)*(DT-(DP(k+1)+R(k)+P(k+1)))/(kma+S(k+1));
R(k+1)=DP(k+1)*(ST-(X(k)+Y(k)+Q(k+1)+S(k+1)))/(kmd+DP(k+1));
X(k+1)=E(k+1)*S(k+1)/kme;
Y(k+1)=E(k+1)*S(k+1)/kmb;
Z(k+1)=((FT+kmf+ET-(E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1)))-((FT+kmf+ET-...
(E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1)))^2-...
4*FT*(ET-(E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1))))^0.5)/2);

```

```

%ecuaciones auxiliares

```

```

C(k+1)=CT-P(k+1);
D(k+1)=DT-(DP(k+1)+R(k+1)+P(k+1))-Q(k+1);
SP(k+1)=ST-(S(k+1)+X(k+1)+Y(k+1)+Q(k+1))-R(k+1);
EP(k+1)=ET-(E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1))-Z(k+1);
F(k+1)=FT-Z(k+1);

```

```

DPc(k+1)=DP(k+1)+R(k+1)+P(k+1);
Sc(k+1)=S(k+1)+X(k+1)+Y(k+1)+Q(k+1);
Ec(k+1)=E(k+1)+X(k+1)+Y(k+1);

```

```

end

```

```

plot(t,DP,'b',t,DPc,'b')
plot(t,S,'b',t,Sc,'b')
plot(t,E,'b',t,Ec,'b')
plot(SP,R,'b')
plot(S,X,'b')

```

Programa para resolver los diagramas de la fig. 5.7, con las ecuaciones de la tabla 2.5 (modelo tQSSA, líneas rojas en todos los casos).

```

h=0.01;% tamaño de paso

```

```

%parámetros

```

```

CT=10;FT=0.5;DT=200;ST=50;ET=20;c1=0.1;c1r=0.1;c2=20;a1=0.2;a1r=0.02;a2=4;
d1=0.0009;d1r=0.005;d2=0.085;e1=0.1;e1r=0.05;e2=0.05;b1=5;b1r=10.6;b2=0.4;f1=0.1;f1r=0.01;f2=2;
kmc=((c1r+c2)/c1);kma=((a1r+a2)/a1);kmd=((d1r+d2)/d1);kme=((e1r+e2)/e1);kmb=((b1r+b2)/b1);kmf=((f1r+f2)/f1);
P(1)=0;Q(1)=0;R(1)=0;X(1)=0;Y(1)=0;Z(1)=0;Ec(1)=20;DPc(1)=200;Sc(1)=0;t(1)=0;% condiciones iniciales: donde
% P=[C;Dp], Q=[S;D], R=[Dp;Sp], X=[E;S], Y=[S;E], Z=[F;Epl], Ec=Ē, DPc=D̄p y Sc=Ŝ
K=20000;% número de iteraciones

```

```

for k=1:K

```

```

t(k+1)=t(k)+h;

```

```

%algoritmo de Runge-Kutta 4º orden

```

```

P1=-((CT+kmc+DPc(k)-R(k))-((CT+kmc+DPc(k)-R(k))^2-4*CT*...
(DPc(k)-R(k))^0.5)/2);

```

```

Q1=-((DT+kma+Sc(k)-DPc(k)-X(k)-Y(k))-((DT+kma+Sc(k)-...
DPc(k)-X(k)-Y(k))^2-4*(Sc(k)-X(k)-Y(k))*(DT-DPc(k))^0.5)/2);

```

```

R1=-((ST+kmd+DPc(k)-Sc(k)-P(k))-((ST+kmd+DPc(k)-Sc(k)-P(k))^2-4*...
(DPc(k)-P(k))*(ST-Sc(k))^0.5)/2);

```

```

X1=-((kme+Sc(k)+Ec(k)-2*Y(k)-Q(k))-((kme+Sc(k)+Ec(k)-2*Y(k)-Q(k))^2-...
4*(Ec(k)-Y(k))*(Sc(k)-Y(k)-Q(k))^0.5)/2);

```

```

Y1=-((kmb+Ec(k)+Sc(k)-2*X(k)-Q(k))-((kmb+Ec(k)+Sc(k)-2*X(k)-Q(k))^2-...
4*(Ec(k)-X(k))*(Sc(k)-X(k)-Q(k))^0.5)/2);

```

```

Z1=-((FT+kmf+ET-Ec(k))-((FT+kmf+ET-Ec(k))^2-4*FT*(ET-Ec(k))^0.5)/2);
DPc1=a2*Q1-c2*P1;
Sc1=d2*R1-e2*X1;
Ec1=f2*Z1-b2*Y1;

```

```

P2=-((CT+kmc+(DPc(k)+h/2*DPc1)-(R(k)+h/2*R1)-...
((CT+kmc+(DPc(k)+h/2*DPc1)-(R(k)+h/2*R1))^2-...
4*CT*((DPc(k)+h/2*DPc1)-(R(k)+h/2*R1))^0.5)/2);

```

```

Q2=-((DT+kma+(Sc(k)+h/2*Sc1)-(DPc(k)+h/2*DPc1)-(X(k)+h/2*X1)-...
(Y(k)+h/2*Y1))-((DT+kma+(Sc(k)+h/2*Sc1)-(DPc(k)+h/2*DPc1)-...
(X(k)+h/2*X1)-(Y(k)+h/2*Y1))^2-4*((Sc(k)+h/2*Sc1)-(X(k)+h/2*X1)-...
(Y(k)+h/2*Y1))*(DT-(DPc(k)+h/2*DPc1))^0.5)/2);

```

```

R2=-((ST+kmd+(DPc(k)+h/2*DPc1)-(Sc(k)+h/2*Sc1)-(P(k)+h/2*P1)-...
((ST+kmd+(DPc(k)+h/2*DPc1)-(Sc(k)+h/2*Sc1)-(P(k)+h/2*P1))^2-...
4*((DPc(k)+h/2*DPc1)-(P(k)+h/2*P1))*(ST-(Sc(k)+h/2*Sc1))^0.5)/2);

```

%continúan las ecuaciones del modelo con aproximación tQSSA

$$\begin{aligned}
 X2 &= ((kme + (Sc(k) + h/2 * Sc1) + (Ec(k) + h/2 * Ec1) - 2 * (Y(k) + h/2 * Y1) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q1) - ((kme + (Sc(k) + h/2 * Sc1) + (Ec(k) + h/2 * Ec1) - \dots \\
 &\quad 2 * (Y(k) + h/2 * Y1) - (Q(k) + h/2 * Q1))^{2-4} * ((Ec(k) + h/2 * Ec1) - \dots \\
 &\quad (Y(k) + h/2 * Y1)) * ((Sc(k) + h/2 * Sc1) - (Y(k) + h/2 * Y1) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q1)))^{0.5} / 2); \\
 Y2 &= ((kmb + (Ec(k) + h/2 * Ec1) + (Sc(k) + h/2 * Sc1) - 2 * (X(k) + h/2 * X1) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q1) - ((kmb + (Ec(k) + h/2 * Ec1) + (Sc(k) + h/2 * Sc1) - \dots \\
 &\quad 2 * (X(k) + h/2 * X1) - (Q(k) + h/2 * Q1))^{2-4} * ((Ec(k) + h/2 * Ec1) - \dots \\
 &\quad (X(k) + h/2 * X1)) * ((Sc(k) + h/2 * Sc1) - (X(k) + h/2 * X1) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q1)))^{0.5} / 2); \\
 Z2 &= ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h/2 * Ec1) - ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h/2 * Ec1))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * FT * (ET - (Ec(k) + h/2 * Ec1)))^{0.5} / 2); \\
 DPc2 &= a2 * Q2 - c2 * P2; \\
 Sc2 &= d2 * R2 - e2 * X2; \\
 Ec2 &= f2 * Z2 - b2 * Y2; \\
 P3 &= ((CT + kmc + (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (R(k) + h/2 * R2) - \dots \\
 &\quad ((CT + kmc + (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (R(k) + h/2 * R2))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * CT * ((DPc(k) + h/2 * DPc2) - (R(k) + h/2 * R2)))^{0.5} / 2); \\
 Q3 &= ((DT + kma + (Sc(k) + h/2 * Sc2) - (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (X(k) + h/2 * X2) - \dots \\
 &\quad (Y(k) + h/2 * Y2) - ((DT + kma + (Sc(k) + h/2 * Sc2) - (DPc(k) + h/2 * DPc2) - \dots \\
 &\quad (X(k) + h/2 * X2) - (Y(k) + h/2 * Y2))^{2-4} * ((Sc(k) + h/2 * Sc2) - (X(k) + h/2 * X2) - \dots \\
 &\quad (Y(k) + h/2 * Y2)) * (DT - (DPc(k) + h/2 * DPc2)))^{0.5} / 2); \\
 R3 &= ((ST + kmd + (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (Sc(k) + h/2 * Sc2) - (P(k) + h/2 * P2) - \dots \\
 &\quad ((ST + kmd + (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (Sc(k) + h/2 * Sc2) - (P(k) + h/2 * P2))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * (DPc(k) + h/2 * DPc2) - (P(k) + h/2 * P2)) * (ST - (Sc(k) + h/2 * Sc2)))^{0.5} / 2); \\
 X3 &= ((kme + (Sc(k) + h/2 * Sc2) + (Ec(k) + h/2 * Ec2) - 2 * (Y(k) + h/2 * Y2) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q2) - ((kme + (Sc(k) + h/2 * Sc2) + (Ec(k) + h/2 * Ec2) - \dots \\
 &\quad 2 * (Y(k) + h/2 * Y2) - (Q(k) + h/2 * Q2))^{2-4} * ((Ec(k) + h/2 * Ec1) - \dots \\
 &\quad (Y(k) + h/2 * Y2)) * ((Sc(k) + h/2 * Sc2) - (Y(k) + h/2 * Y2) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q2)))^{0.5} / 2); \\
 Y3 &= ((kmb + (Ec(k) + h/2 * Ec2) + (Sc(k) + h/2 * Sc2) - 2 * (X(k) + h/2 * X2) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q2) - ((kmb + (Ec(k) + h/2 * Ec2) + (Sc(k) + h/2 * Sc2) - \dots \\
 &\quad 2 * (X(k) + h/2 * X2) - (Q(k) + h/2 * Q2))^{2-4} * ((Ec(k) + h/2 * Ec2) - \dots \\
 &\quad (X(k) + h/2 * X2)) * ((Sc(k) + h/2 * Sc2) - (X(k) + h/2 * X2) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h/2 * Q2)))^{0.5} / 2); \\
 Z3 &= ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h/2 * Ec2) - ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h/2 * Ec2))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * FT * (ET - (Ec(k) + h/2 * Ec2)))^{0.5} / 2); \\
 DPc3 &= a2 * Q3 - c2 * P3; \\
 Sc3 &= d2 * R3 - e2 * X3; \\
 Ec3 &= f2 * Z3 - b2 * Y3; \\
 P4 &= ((CT + kmc + (DPc(k) + h * DPc3) - (R(k) + h * R3) - ((CT + kmc + (DPc(k) + h * DPc3) - \dots \\
 &\quad (R(k) + h * R3)))^{2-4} * CT * ((DPc(k) + h * DPc3) - (R(k) + h * R3)))^{0.5} / 2); \\
 Q4 &= ((DT + kma + (Sc(k) + h * Sc3) - (DPc(k) + h * DPc3) - (X(k) + h * X3) - (Y(k) + h * Y3) - \dots \\
 &\quad ((DT + kma + (Sc(k) + h * Sc3) - (DPc(k) + h * DPc3) - (X(k) + h * X3) - \dots \\
 &\quad (Y(k) + h * Y3))^{2-4} * ((Sc(k) + h * Sc3) - (X(k) + h * X3) - (Y(k) + h * Y3)) * \dots \\
 &\quad (DT - (DPc(k) + h * DPc3)))^{0.5} / 2); \\
 R4 &= ((ST + kmd + (DPc(k) + h * DPc3) - (Sc(k) + h * Sc3) - (P(k) + h * P3) - \dots \\
 &\quad ((ST + kmd + (DPc(k) + h * DPc3) - (Sc(k) + h * Sc3) - (P(k) + h * P3))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * (DPc(k) + h * DPc3) - (P(k) + h * P3)) * (ST - (Sc(k) + h * Sc3)))^{0.5} / 2); \\
 X4 &= ((kme + (Sc(k) + h * Sc3) + (Ec(k) + h * Ec3) - 2 * (Y(k) + h * Y3) - (Q(k) + h * Q3) - \dots \\
 &\quad ((kme + (Sc(k) + h * Sc3) + (Ec(k) + h * Ec3) - 2 * (Y(k) + h * Y3) - (Q(k) + h * Q3))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * ((Ec(k) + h * Ec3) - (Y(k) + h * Y3)) * ((Sc(k) + h * Sc3) - (Y(k) + h * Y3) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h * Q3)))^{0.5} / 2); \\
 Y4 &= ((kmb + (Ec(k) + h * Ec3) + (Sc(k) + h * Sc3) - 2 * (X(k) + h * X3) - (Q(k) + h * Q3) - \dots \\
 &\quad ((kmb + (Ec(k) + h * Ec3) + (Sc(k) + h * Sc3) - 2 * (X(k) + h * X3) - (Q(k) + h * Q3))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * ((Ec(k) + h * Ec3) - (X(k) + h * X3)) * ((Sc(k) + h * Sc3) - (X(k) + h * X3) - \dots \\
 &\quad (Q(k) + h * Q3)))^{0.5} / 2); \\
 Z4 &= ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h * Ec3) - ((FT + kmf + ET - (Ec(k) + h * Ec3))^{2- \dots \\
 &\quad 4 * FT * (ET - (Ec(k) + h * Ec3)))^{0.5} / 2); \\
 DPc4 &= a2 * Q4 - c2 * P4; \\
 Sc4 &= d2 * R4 - e2 * X4; \\
 Ec4 &= f2 * Z4 - b2 * Y4; \\
 DPc(k+1) &= DPc(k) + h/6 * (DPc1 + 2 * DPc2 + 2 * DPc3 + DPc4); \\
 Sc(k+1) &= Sc(k) + h/6 * (Sc1 + 2 * Sc2 + 2 * Sc3 + Sc4); \\
 Ec(k+1) &= Ec(k) + h/6 * (Ec1 + 2 * Ec2 + 2 * Ec3 + Ec4);
 \end{aligned}$$

```

%continúan las ecuaciones del modelo con aproximación tQSSA
P(k+1)=(CT+kmc+DPc(k+1)-R(k)-((CT+kmc+DPc(k+1)-R(k))^2-4*CT*...
(DPc(k+1)-R(k)))^0.5)/2);
Q(k+1)=(DT+kma+Sc(k+1)-DPc(k+1)-X(k)-Y(k)-((DT+kma+Sc(k+1)-...
DPc(k+1)-X(k)-Y(k))^2-4*(Sc(k+1)-X(k)-Y(k))*(DT-DPc(k+1)))^0.5)/2);
R(k+1)=(ST+kmd+DPc(k+1)-Sc(k+1)-P(k+1)-((ST+kmd+DPc(k+1)-Sc(k+1)-...
P(k+1))^2-4*(DPc(k+1)-P(k+1))*(ST-Sc(k+1)))^0.5)/2);
X(k+1)=(kme+Sc(k+1)+Ec(k+1)-2*Y(k)-Q(k+1)-((kme+Sc(k+1)+Ec(k+1)-...
2*Y(k)-Q(k+1))^2-4*(Ec(k+1)-Y(k))*(Sc(k+1)-Y(k)-Q(k+1)))^0.5)/2);
Y(k+1)=(kmb+Ec(k+1)+Sc(k+1)-2*X(k+1)-Q(k+1)-((kmb+Ec(k+1)+Sc(k+1)-...
2*X(k+1)-Q(k+1))^2-4*(Ec(k+1)-X(k+1))*(Sc(k+1)-X(k+1)-...
Q(k+1)))^0.5)/2);
Z(k+1)=(FT+kmf+ET-Ec(k+1)-((FT+kmf+ET-Ec(k+1))^2-4*FT*...
(ET-Ec(k+1)))^0.5)/2);
%ecuaciones auxiliares
C(k+1)=CT-P(k+1);
D(k+1)=DT-DPc(k+1)-Q(k+1);
SP(k+1)=ST-Sc(k+1)-R(k+1);
EP(k+1)=ET-Ec(k+1);
F(k+1)=FT-Z(k+1);
DP(k+1)=DPc(k+1)-R(k+1)-P(k+1);
S(k+1)=Sc(k+1)-X(k+1)-Y(k+1)-Q(k+1);
E(k+1)=Ec(k+1)-X(k+1)-Y(k+1);
SPc(k+1)=SP(k+1)+R(k+1);
end

```

```

plot(t,DPc,'r',t,DP,'r');
plot(t,Sc,'r',t,S,'r');
plot(t,Ec,'r',t,E,'r');
plot(t,SPc,'r');
plot(Sc,X,'r')

```

Programa para resolver las ecuaciones de las tablas 2.3 y 2.4 y generar los diagramas de bifurcación.

```

%Programa para resolver las ecuaciones de las tablas 2.3 Y 2.4
h=0.01;% tamaño de paso
%parámetros
FT=0.5;DT=200;ST=12;ET=20;
d1=0.0009;d1r=0.005;d2=0.085;
e1=0.1;e1r=0.05;e2=0.05;
b1=5;b1r=10.6;b2=0.4;
f1=0.1;f1r=0.01;f2=2;
%Solo en el caso de la tabla 2.4 considerar los siguientes parámetros:
bp1=0.05;bp1r=0.005;bp2=0.0001;kmbp=((bp1r+bp2)/bp1);Y(1)=0;
%estos parámetros deben considerarse en ambas ecuaciones de tablas 2.3 y 2.4
kmd=((d1r+d2)/d1);kme=((e1r+e2)/e1);kmb=((b1r+b2)/b1);kmf=((f1r+f2)/f1);
P(1)=0;Q(1)=0;R(1)=0;X(1)=0;EC(1)=20;SC(1)=0;t(1)=0;% condiciones iniciales: donde
% P=[D:Sp], Q=[E:S], R=[S:E], X=[F:Ep], Y=[Sp:E], EC=E, y SC=S
K=20000;% número de iteraciones
for k=1:K
t(k+1)=t(k)+h;
P1=((DT+kmd+ST-SC(k)-Y(k)-((DT+kmd+ST-SC(k)-Y(k))^2-4*DT*...
(ST-SC(k)-Y(k)))^0.5)/2);
Q1=((kme+SC(k)+EC(k)-2*R(k)-Y(k)-((kme+SC(k)+EC(k)-2*R(k)-Y(k))^2-...
4*(EC(k)-Y(k)-R(k))*(SC(k)-R(k)))^0.5)/2);
R1=((kmb+SC(k)+EC(k)-2*Q(k)-Y(k)-((kmb+SC(k)+EC(k)-2*Q(k)-Y(k))^2-...
4*(EC(k)-Y(k)-Q(k))*(SC(k)-Q(k)))^0.5)/2);
X1=((FT+kmf+ET-Ec(k)-((FT+kmf+ET-Ec(k))^2-4*FT*(ET-Ec(k)))^0.5)/2);
%en el caso de la tabla 2.4 considerar también las ecuaciones
% Y1,Y2,Y3,Y4 (en caso contrario no considerarlas)
Y1=((ST+kmbp-SC(k)+EC(k)-P(k)-Q(k)-Y(k)-((ST+kmbp-SC(k)+EC(k)-P(k)-...
Q(k)-Y(k))^2-4*(ST-SC(k)-P(k))*(EC(k)-Q(k)-R(k)))^0.5)/2);
SC1=d2*P1-e2*Q1;
EC1=f2*X1-b2*R1-bp2*Y1;% en el caso de la tabla 4.3 considerar también los términos donde aparece Y1
P2=((DT+kmd+ST-(SC(k)+h/2*SC1)-(Y(k)+h/2*Y1)-((DT+kmd+ST-...
((SC(k)+h/2*SC1)+(Qh(k)+h/2*Q1)-(Y(k)+h/2*Y1)))^2-4*DT*(ST-...
(SC(k)+h/2*SC1)-(Y(k)+h/2*Q1)))^0.5)/2);
Q2=((kme+(SC(k)+h/2*SC1)+(EC(k)+h/2*EC1)-2*(R(k)+h/2*R1)-...
(Y(k)+h/2*Y1)-((kme+(SC(k)+h/2*SC1)+(EC(k)+h/2*EC1)-...
2*(R(k)+h/2*R1)-(Y(k)+h/2*Y1))^2-...
4*(EC(k)+h/2*EC1)-(Y(k)+h/2*Y1)-(R(k)+h/2*R1))*(SC(k)+...

```

%continúan ecuaciones

$$h/2*SC1-(R(k)+h/2*R1))^0.5/2);$$

$$R2=(kmb+(SC(k)+h/2*SC1)+(EC(k)+h/2*EC1)-2*(Q(k)+h/2*Q1)-...$$

$$(Y(k)+h/2*Y1)-((kme+(SC(k)+h/2*SC1)+(EC(k)+h/2*EC1)-...$$

$$2*(Q(k)+h/2*Q1)-(Y(k)+h/2*Y1))^2-...$$

$$4*(EC(k)+h/2*EC1)-(Y(k)+h/2*Y1)-(Q(k)+h/2*Q1))*((SC(k)+...$$

$$h/2*SC1)-(Q(k)+h/2*Q1))^0.5/2);$$

$$X2=((FT+kmf+ET-(EC(k)+h/2*EC1)-((FT+kmf+ET-(EC(k)+h/2*EC1))^2-...$$

$$4*FT*(ET-(EC(k)+h/2*EC1))^0.5/2);$$

$$Y2=((ST+kmbp-(SC(k)+h/2*SC1)+(EC(k)+h/2*EC1)-(P(k)+h/2*P1)-...$$

$$(Q(k)+h/2*Q1)-(Y(k)+h/2*Y1)-((ST+kmbp-(SC(k)+h/2*SC1)+...$$

$$(EC(k)+h/2*EC1)-(P(k)+h/2*P1)-(Q(k)+h/2*Q1)-(Y(k)+h/2*Y1))^2-...$$

$$4*(ST-(SC(k)+h/2*SC1)-(P(k)+h/2*P1))*((EC(k)+h/2*EC1)-...$$

$$(Q(k)+h/2*Q1)-(R(k)+h/2*R1))^0.5/2);$$

$$SC2=d2*P2-e2*Q2;$$

$$EC2=f2*X2-b2*R2-bp2*Y2;$$

$$P3=((DT+kmd+ST-(SC(k)+h/2*SC2)-(Y(k)+h/2*Y2)-((DT+kmd+ST-...$$

$$((SC(k)+h/2*SC2)+(Qh(k)+h/2*Q2)-(Y(k)+h/2*Y2)))^2-4*DT*(ST-...$$

$$(SC(k)+h/2*SC2)-(Y(k)+h/2*Q2))^0.5/2);$$

$$Q3=((kme+(SC(k)+h/2*SC2)+(EC(k)+h/2*EC2)-2*(R(k)+h/2*R2)-...$$

$$(Y(k)+h/2*Y2)-((kme+(SC(k)+h/2*SC2)+(EC(k)+h/2*EC2)-...$$

$$2*(R(k)+h/2*R2)-(Y(k)+h/2*Y2))^2-...$$

$$4*(EC(k)+h/2*EC2)-(Y(k)+h/2*Y2)-(R(k)+h/2*R2))*((SC(k)+...$$

$$h/2*SC2)-(R(k)+h/2*R2))^0.5/2);$$

$$R3=((kmb+(SC(k)+h/2*SC2)+(EC(k)+h/2*EC2)-2*(Q(k)+h/2*Q2)-...$$

$$(Y(k)+h/2*Y2)-((kme+(SC(k)+h/2*SC2)+(EC(k)+h/2*EC2)-...$$

$$2*(Q(k)+h/2*Q2)-(Y(k)+h/2*Y2))^2-...$$

$$4*(EC(k)+h/2*EC2)-(Y(k)+h/2*Y2)-(Q(k)+h/2*Q2))*((SC(k)+...$$

$$h/2*SC2)-(Q(k)+h/2*Q2))^0.5/2);$$

$$X3=((FT+kmf+ET-(EC(k)+h/2*EC2)-((FT+kmf+ET-(EC(k)+h/2*EC2))^2-...$$

$$4*FT*(ET-(EC(k)+h/2*EC2))^0.5/2);$$

$$Y3=((ST+kmbp-(SC(k)+h/2*SC2)+(EC(k)+h/2*EC2)-(P(k)+h/2*P2)-...$$

$$(Q(k)+h/2*Q1)-(Y(k)+h/2*Y1)-((ST+kmbp-(SC(k)+h/2*SC2)+...$$

$$(EC(k)+h/2*EC2)-(P(k)+h/2*P2)-(Q(k)+h/2*Q2)-(Y(k)+h/2*Y2))^2-...$$

$$4*(ST-(SC(k)+h/2*SC2)-(P(k)+h/2*P2))*((EC(k)+h/2*EC2)-...$$

$$(Q(k)+h/2*Q2)-(R(k)+h/2*R2))^0.5/2);$$

$$SC3=d2*P3-e2*Q3;$$

$$EC3=f2*X3-b2*R3-bp2*Y3;$$

$$P4=((DT+kmd+ST-(SC(k)+h*SC3)-(Y(k)+h*Y3)-((DT+kmd+ST-...$$

$$((SC(k)+h*SC3)+(Qh(k)+h*Q3)-(Y(k)+h*Y3)))^2-4*DT*(ST-...$$

$$(SC(k)+h*SC3)-(Y(k)+h*Q3))^0.5/2);$$

$$Q4=((kme+(SC(k)+h*SC3)+(EC(k)+h*EC3)-2*(R(k)+h*R3)-...$$

$$(Y(k)+h*Y3)-((kme+(SC(k)+h*SC3)+(EC(k)+h*EC3)-...$$

$$2*(R(k)+h*R3)-(Y(k)+h*Y3))^2-...$$

$$4*(EC(k)+h*EC3)-(Y(k)+h*Y3)-(R(k)+h*R3))*((SC(k)+...$$

$$h*SC3)-(R(k)+h*R3))^0.5/2);$$

$$R4=((kmb+(SC(k)+h*SC3)+(EC(k)+h*EC3)-2*(Q(k)+h*Q3)-...$$

$$(Y(k)+h*Y3)-((kme+(SC(k)+h*SC3)+(EC(k)+h*EC3)-...$$

$$2*(Q(k)+h*Q3)-(Y(k)+h*Y3))^2-...$$

$$4*(EC(k)+h*EC3)-(Y(k)+h*Y3)-(Q(k)+h*Q3))*((SC(k)+...$$

$$h*SC3)-(Q(k)+h*Q3))^0.5/2);$$

$$X4=((FT+kmf+ET-(EC(k)+h*EC3)-((FT+kmf+ET-(EC(k)+h*EC3))^2-...$$

$$4*FT*(ET-(EC(k)+h*EC3))^0.5/2);$$

$$Y4=((ST+kmbp-(SC(k)+h*SC3)+(EC(k)+h*EC3)-(P(k)+h*P3)-...$$

$$(Q(k)+h*Q3)-(Y(k)+h*Y3)-((ST+kmbp-(SC(k)+h*SC3)+...$$

$$(EC(k)+h*EC3)-(P(k)+h*P3)-(Q(k)+h*Q3)-(Y(k)+h*Y3))^2-...$$

$$4*(ST-(SC(k)+h*SC3)-(P(k)+h*P3))*((EC(k)+h*EC3)-...$$

$$(Q(k)+h*Q3)-(R(k)+h*R3))^0.5/2);$$

$$SC4=d2*P4-e2*Q4;$$

$$EC=f2*X4-b2*R4-bp2*Y4;$$

$$SC(k+1)=SC(k)+h/6*(SC1+2*SC2+2*SC3+SC4);$$

$$EC(k+1)=EC(k)+h/6*(EC1+2*EC2+2*EC3+EC4);$$

$$P(k+1)=(DT+kmd+ST-SC(k+1)-Y(k)-((DT+kmd+ST-SC(k+1)-Y(k))^2-4*DT*...$$

$$(ST-SC(k+1)-Y(k)))^0.5/2);$$

$$Q(k+1)=((kme+SC(k+1)+EC(k+1)-2*R(k)-Y(k)-((kme+SC(k+1)+EC(k+1)-...$$

$$2*R(k)-Y(k))^2-4*(EC(k+1)-Y(k)-R(k))*((SC(k+1)-R(k)))^0.5/2);$$

$$R(k+1)=((kmb+SC(k+1)+EC(k+1)-2*Q(k+1)-Y(k)-((kmb+SC(k+1)+EC(k+1)-...$$

$$2*Q(k+1)-Y(k))^2-4*(EC(k+1)-Y(k)-Q(k+1))*((SC(k+1)-Q(k+1)))^0.5/2);$$

```

%continúan ecuaciones
X1=((FT+kmf+ET-EC(k+1))-((FT+kmf+ET-EC(k+1))^2-...
4*FT*(ET-EC(k+1)))^0.5)/2);
Y1=((ST+kmbp-SC(k+1)+EC(k+1)-P(k+1)-Q(k+1)-Y(k))-((ST+kmbp-SC(k+1)+...
EC(k+1)-P(k+1)-Q(k+1)-Y(k))^2-4*(ST-SC(k+1)-P(k+1))*...
(EC(k+1)-Q(k+1)-R(k+1)))^0.5)/2);
D(k+1)=DT-Q(k+1);
SP(k+1)=ST-SC(k+1)-Q(k+1)-Y(k+1);
EP(k+1)=ET-EC(k+1)-Y(k+1);
F(k+1)=FT-Y(k+1);
end
>>plot(t,EC,t,SC)
>>plot(SC,EC)

```