

03062
22.3



UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL C.C.H.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE
NITROGENO

DESARROLLO DE UN MODELO MATEMATICO
PARA LA DESCRIPCION DE EFECTOS
COOPERATIVOS EN UNA REACCION
ENZIMATICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A E L

QUIM. ALBERTO ARTURO HERRERA BECERRA

CUERNAVACA, MOR.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1989



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 está 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.

Indice

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
Antecedentes	2
Objetivo De La Tesis	4
3. Capitulo 1. Construcción Del Modelo Matemático	5
Modelado Del Sistema Cerrado	5
Modelado Del Sistema Abierto	9
4. Capitulo 2. Método De Solución	13
Curvas De Velocidad Inicial	13
Curvas De Norma	15
5. Capitulo 3. Simulaciones Numéricas	17
Sistema Cerrado	17
Sistema Abierto	21
6. Capitulo 4. Discusión	25
Sistema Cerrado	25
Perspectivas	26
Sistema Abierto	26
Perspectivas	27
7. Apéndice 1. Interacciones Intermoleculares	29
8. Apéndice 2. Análisis Local Y Estructural De Estabilidad	32
9. Figuras	37
10. Bibliografía	48

Resumen

En el presente trabajo se describe, usando un modelo matemático el fenómeno cooperativo que se origina en una malla bidimensional de enzimas monosustrato. Se consideró que cada una de las moléculas de enzima sufre el efecto del promedio de todas las interacciones intermoleculares que ocurren en el sistema (aproximación de Bragg-Williams) y que estas sólo afectan a uno de los pasos elementales del ciclo catalítico (el Paso de isomerización entre los dos intermediarios estables).

Para determinar las condiciones que deben satisfacer los distintos parámetros definidos en el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que describe la dinámica del sistema enzimático fue necesario realizar un estudio de la estabilidad local y estructural de las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales, las cuales se obtuvieron por medio de simulaciones numéricas. El modelo se estudió bajo dos distintas condiciones: Primero como un sistema cerrado; bajo estas condiciones el modelo presenta transiciones abruptas de actividad catalítica por arriba de un valor umbral para la constante de interacción promedio. Posteriormente, el modelo se estudió como un sistema abierto; bajo estas condiciones el modelo presenta comportamientos excitables.

La tesis está estructurada de la siguiente manera: En la introducción se describen los principales antecedentes teóricos y experimentales que dan origen a los modelos de malla y su importancia en la enzimología moderna; en el capítulo uno se describe con detalle el proceso de construcción del modelo matemático; en el capítulo dos se describen las principales características del método numérico para desarrollar las simulaciones; en el capítulo tres se describen los resultados obtenidos de las simulaciones numéricas; en el capítulo cuatro se interpretan los resultados matemáticos en términos bioquímicos. Se incluyen dos apéndices: En el primero se describe la forma en que son afectadas las constantes de velocidad de reacción por la presencia de interacciones intermoleculares no específicas. En el segundo se incluye una breve descripción de las principales características de los análisis de estabilidad local y de estabilidad estructural para un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias.

Introducción

En esta parte del trabajo describo los principales antecedentes teóricos y experimentales que dan origen al uso de los modelos de malla tipo Ising para el estudio de los fenómenos cooperativos que se han observado en diversos sistemas bioquímicos, así como los objetivos que se persiguen en el presente trabajo.

Antecedentes

Se dice que una membrana es excitable si, bajo la acción de un estímulo externo (que puede ser de naturaleza eléctrica o por medio de sustancias químicas), su permeabilidad cambia de acuerdo a la fuerza del estímulo aplicado (Y. Tagami, 1978). Una membrana excitable muestra una gran diversidad de comportamientos dinámicos no lineales como son la aparición de oscilaciones sostenidas y las respuestas del tipo "todo o nada" ante estímulos pequeños. Además, una membrana excitable muestra la capacidad de amplificar y extender a toda su superficie estímulos que inicialmente se encontraban localizados en regiones específicas de su superficie (R. Blumenthal, 1975).

La respuesta de una membrana excitable se expresa ya sea como cambios en el potencial de la membrana o como cambios en el flujo de una especie química que es transportada a través de la membrana. Las curvas de respuesta contra estímulo muestran en muchos casos una forma sigmoide, por lo que se ha especulado que la respuesta tiene un carácter cooperativo respecto a la fuerza del estímulo. Sin embargo, existen casos donde el mecanismo de excitación es independiente del potencial de membrana aunque las curvas de respuesta siguen mostrando una forma sigmoide. La respuesta cooperativa que muestran este último tipo de membranas no es causada por un flujo de iones a través de la membrana sino que es causada por interacciones intermoleculares entre subunidades receptoras o entre complejos receptor-ionóforo o entre subunidades de las proteínas receptoras (H. Kijima y S. Kijima, 1978).

Se ha tratado de explicar el origen de la respuesta cooperativa causada por la interacción de los componentes proteicos de la membrana por dos distintos acercamientos:

- 1) Uno de ellos es a través de interacciones cooperativas entre las subunidades de una proteína oligomérica, basándose en el modelo alosterico de Monod, Wyman y Changeux, acopladas con procesos de difusión (R. Blumenthal, 1975 y Y. Tagami, 1978).
- 2) El otro es a través de interacciones de largo alcance entre un gran número de protómeros que forman una malla bidimensional tipo Ising (J. P. Changeux y colaboradores, 1967 y H. Kijima y S. Kijima, 1978).

Este último modelo supone que la estructura de una membrana biológica se puede idealizar como una malla bidimensional de unidades lipoprotéicas. Puesto que diversos métodos de análisis biofísico han mostrado que la estructura básica de las membranas biológicas es una bicapa de lípidos donde tanto los lípidos como las proteínas intrínsecas muestran, en muchos casos, una alta movilidad en el plano de la membrana (B. Alberts y colaboradores, 1983), R. Blumenthal argumenta que el uso de un modelo de malla para describir el

comportamiento dinámico de las membranas excitables no es apropiado pues implica un arreglo espacial fijo para las proteínas intrínsecas de membrana (R. Blumenthal, 1975).

Sin embargo, se han reportado diversos sistemas biológicos que muestran regiones específicas de la membrana donde se presentan altas concentraciones de proteínas intrínsecas (A. S. Kaprelyants, 1988). Son en estas regiones de alta concentración de proteínas donde un modelo de malla puede ser útil como una primera aproximación. Además, es posible que se presenten interacciones de largo alcance en un sistema bidimensional compuesto por unidades oligoméricas discretas distribuidas de manera heterogénea (P. R. Blanquet, 1978). La manera en la que se establecen las interacciones en estos sistemas es a través de la fusión de las capas de lípidos de frontera, es decir, el dominio lipídico cuyas propiedades fisicoquímicas son alteradas por la presencia de una proteína intrínseca (G. Vanderkooi, 1978). Esto da origen a los modelos de Ising decorados (P. K. Ghosh y D. Sengupta, 1978) donde las interacciones entre las unidades que forman a la malla se dividen en interacciones directas e interacciones indirectas mediadas por un factor que no pertenece directamente a la malla.

De lo anterior se hace evidente que los modelos de malla proveen un medio útil para el estudio de sistemas biológicos que muestran un comportamiento cooperativo. De hecho, los modelos de malla son ampliamente usados en las ciencias físicas y químicas para modelar fenómenos cooperativos como son las transiciones de fase (S. G. Brush, 1967). Pero, a pesar de que se conocen algunos sistemas bioquímicos que presentan arreglos de enzimas en forma de mallas bidimensionales y tridimensionales (M. Veenhuis y colaboradores, 1981 y H. Kirsten y colaboradores, 1983), T. L. Hill indica que no se ha demostrado que tales sistemas presenten fenómenos cooperativos puesto que no se ha observado que sufran, por ejemplo, transiciones de fase (T. L. Hill, 1985). Por otro lado, en los microtubulos se ha encontrado una clara transición de fase (la actividad de GTPasa en el extremo terminal), pero no es un sistema que se pueda estudiar por medio de modelos de malla (T. L. Hill y Y. Chen, 1984).

Por lo tanto, T. L. Hill llega a la conclusión de que la inclusión de interacciones de largo alcance entre macromoléculas biológicas en los modelos de malla tiene un carácter especulativo. Debido a lo anterior, T. L. Hill no realiza un análisis, desde un punto de vista bioquímico, a los resultados matemáticos que se han obtenido de los modelos de y los utiliza, en cambio, como ejemplos conceptuales para el desarrollo de métodos de análisis en la descripción molecular de sistemas fisicoquímicos en estado estacionario (T. L. Hill, 1985). Además, no analiza los comportamientos dinámicos no lineales, como son las respuestas transitorias de alta actividad catalítica ante estímulos mayores a un valor umbral y las respuestas de actividad catalítica oscilatoria, que pueden aparecer en estos modelos. En este sentido, L. K. Kaczmarek presentó un modelo de malla bajo la aproximación de Bragg-Williams (L. K. Kaczmarek, 1976) donde muestra la aparición de soluciones periódicas. Sin embargo, no realiza un estudio sistemático de los distintos comportamientos dinámicos que puede generar su modelo concentrándose, en cambio, en estudiar el acoplamiento de las soluciones periódicas con un campo oscilante externo.

Objetivo De La Tesis

El objetivo del presente trabajo es estudiar de manera sistemática los comportamientos dinámicos no lineales que se generan en una malla bidimensional de moléculas de enzima bajo la aproximación de Bragg-Williams (o de campo promedio). En particular, se estudia con detalle el efecto que causa la fuerza de interacción entre las moléculas de enzima sobre la dinámica de la reacción enzimática. Considero que este tipo de análisis y su interpretación en términos bioquímicos constituye una alternativa válida para explicar los comportamientos dinámicos no lineales que se han registrado en diversos sistemas biológicos.

Se debe aclarar que el presente trabajo no es el único que existe en la literatura que intente describir los posibles efectos que causan las interacciones intermoleculares en la dinámica de una reacción enzimática. J. Ricard y colaboradores han estudiado los efectos que causan las interacciones entre las moléculas de enzima y las distintas estructuras subcelulares en una teoría que han denominado como Cinética Estructural (J. Ricard y G. Noat, 1984). A partir de este trabajo, G. R. Welch estudia las interacciones moleculares que ocurren en los complejos o agregados multienzimáticos (G. R. Welch y colaboradores, 1988). Conceptualmente, el modelo final que obtuvo Welch es una extensión del modelo de Koshland, Nemethy y Filmer que describe el comportamiento de enlace de sustratos que muestran las enzimas alostericas (J. Ricard y A. Cornish-Bowden, 1987). Se debe aclarar que ninguno de estos modelos involucra la presencia de mallas de proteínas.

El presente trabajo se distingue de los dos anteriores en que se supone que la interacción que sufre una molécula del sistema depende del estado dinámico promedio que muestran las restantes moléculas del sistema; en cambio, en el modelo de J. Ricard se supone que la interacción entre las moléculas de enzima y las moléculas de las estructuras subcelulares son siempre las mismas independientemente del estado dinámico de las moléculas de enzima. Por otra parte, se supone que el sistema enzimático se comporta como un sistema espacialmente infinito, mientras que el modelo de G. R. Welch considera sistemas de agrupamientos multienzimáticos finitos.

Capítulo 1

Construcción Del Modelo Matemático

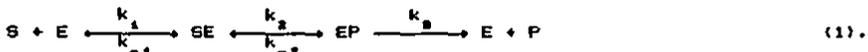
A continuación presento la construcción de un modelo matemático que describe la dinámica de una reacción enzimática donde se presentan interacciones de largo alcance entre las moléculas de enzima. El objetivo que se persigue con el estudio de este modelo es determinar en que aspectos se alteran los comportamientos dinámicos descritos por la enzimología clásica debido a la presencia de las interacciones entre las moléculas de enzima.

El modelo matemático se estudiará bajo dos condiciones dinámicas distintas:

- 1) Primero como un sistema cerrado a intercambios de materia con los alrededores, debido a que esta es la situación que se presenta en los experimentos realizados *in vitro*.
- 2) Posteriormente como un sistema abierto a intercambios de materia con los alrededores, debido a que esta es la situación que impera dentro de la célula viva.

1.1 Modelado Del Sistema Cerrado

Como punto de partida para la construcción del modelo considero el siguiente mecanismo de reacción para la transformación de un sustrato S al producto P por medio de la enzima E:



En estas ecuaciones S, E y P representan las concentraciones de sustrato, enzima y producto en su forma libre respectivamente, mientras que SE y EP representan las concentraciones de los complejos sustrato-enzima y enzima-producto respectivamente; k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} y k_3 son las constantes de velocidad para cada una de las reacciones elementales. Se supone que el sistema se puede modelar como una malla bidimensional tipo Ising donde en cada nodo se encuentra localizada una molécula de enzima.

Las interacciones entre las moléculas de enzima dan origen a una energía libre de interacción que perturba las magnitudes tanto de las energías libres de Gibbs de cada una de las especies moleculares involucradas en el mecanismo de la reacción como de la energía libre de activación de cada uno de los pasos elementales del mecanismo de reacción. Estas perturbaciones alteran los valores de las constantes de velocidad de cada uno de los pasos elementales y, por lo tanto, la velocidad total de la reacción es perturbada. Los efectos de las interacciones entre las moléculas de enzima deben ser incorporados de manera explícita en las constantes de velocidad de cada uno de los pasos elementales de la reacción, corrigiendo la energía libre de activación (en el apéndice I se describe con detalle como se debe realizar tal corrección).

El siguiente paso en la construcción del modelo consiste en suponer las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1) Se supone que el efecto más importante que provocan las interacciones intermoleculares ocurre en la segunda etapa del mecanismo, el proceso reversible de isomerización entre los complejos SE y EP, mientras que el efecto sobre las restantes etapas es pequeño y puede ser despreciado.
- 2) Se supone que las interacciones entre las moléculas de enzima pueden ser descritas bajo la aproximación de campo promedio.

Puesto que el paso de isomerización es el único que es afectado por la presencia de las interacciones, se le puede considerar como un paso autocatalítico en el sentido de que las moléculas del complejo EP interactúan unas con otras de forma tal que catalizan su producción a partir del complejo SE.

Como se realiza la aproximación de campo promedio en el sistema, la energía libre de activación se puede tomar como un término que depende de manera lineal de la concentración del complejo EP (S. Strassler y C. Kittel, 1965). De esta forma, la energía libre de activación de cada uno de los procesos de isomerización toma la forma:

$$\Delta G_{SE}^{\ddagger} = \epsilon_{SE} - \eta[EP] \quad (2a);$$

$$\Delta G_{EP}^{\ddagger} = \epsilon_{EP} - \eta[EP] \quad (2b),$$

donde ΔG_{SE}^{\ddagger} , ΔG_{EP}^{\ddagger} son las energías libres de activación de los procesos de isomerización de SE a EP y de EP a SE respectivamente; ϵ_{SE} y ϵ_{EP} son las energías libres de activación de los mismos procesos en la situación donde no tienen lugar interacciones entre las enzimas; $[EP]$ es la concentración del complejo enzima-producto; η es una constante relacionada con la fuerza de interacción promedio entre las enzimas; el término $-\eta[EP]$ corresponde a la energía libre de interacción.

Para calcular las constantes de velocidad para los procesos de isomerización se hace uso de la teoría del estado de transición (I. H. Segel, 1975). Esta teoría permite relacionar la energía libre de activación de una reacción elemental con su constante de velocidad según la fórmula:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left[-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}\right] \quad (3),$$

donde k es la constante de velocidad de la reacción elemental, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck, R es la constante universal de los gases ideales y T es la temperatura absoluta del sistema. Sustituyendo en la ecuación (3) las expresiones para las energías libres de activación de los procesos de isomerización, (2) se obtienen las siguientes expresiones para las constantes de velocidad:

$$k_2 = \frac{k_B T}{h} \exp\left[-\frac{(c_2 - \eta(EP))}{RT}\right] \quad (4a);$$

$$k_{-2} = \frac{k_B T}{h} \exp\left[-\frac{(c_2 - \eta(EP))}{RT}\right] \quad (4b).$$

Al rearrreglar los términos exponenciales en las expresiones anteriores, se obtienen las siguientes expresiones:

$$k_2 = \alpha \exp[\theta(EP)] \quad (5a);$$

$$k_{-2} = \beta \exp[\theta(EP)] \quad (5b),$$

si se definen α , β y θ como:

$$\alpha = \frac{k_B T}{h} \exp\left[-\frac{c_2}{RT}\right] \quad (6a);$$

$$\beta = \frac{k_B T}{h} \exp\left[-\frac{c_2}{RT}\right] \quad (6b);$$

$$\theta = \eta/RT \quad (6c).$$

Como puede observarse en las expresiones anteriores, las constantes de velocidad para los procesos de isomerización incluyen los efectos provocados por las interacciones entre las enzimas en un factor exponencial.

Por último, la constante de equilibrio para la reacción de isomerización toma la forma:

$$K_{eq} = \frac{\alpha \exp[\theta(EP)]}{\beta \exp[\theta(EP)]} = \frac{\alpha}{\beta} \quad (7),$$

la cual indica que las interacciones entre las enzimas no afectan a la constante de equilibrio de la reacción de isomerización.

Para describir la dinámica del mecanismo de reacción (1) se hace uso de la Ley de Acción de Masas, con la cual se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden:

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}SE - k_1S^*E \quad (8a),$$

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}SE + k_2EP - k_1S^*E \quad (8b),$$

$$\frac{dSE}{dt} = k_1S^*E + \beta e^{\theta EP} EP - (k_{-1} + \alpha e^{\theta EP}) SE \quad (8c),$$

$$\frac{dEP}{dt} = \alpha e^{\theta EP} SE - (k_2 + \beta e^{\theta EP}) EP \quad (8d),$$

$$\frac{dP}{dt} = k_3 EP \quad (8e);$$

donde S, E, SE, EP y P representan las concentraciones del sustrato libre, de la enzima en su forma libre, de los complejos sustrato-enzima y enzima-producto y del producto libre respectivamente, todas ellas como funciones dependientes del tiempo t. El sistema de ecuaciones diferenciales (8) debe cumplir además con las condiciones iniciales:

$$S(0) = S_0 \neq 0, E(0) = E_0 \neq 0, SE(0) = EP(0) = P(0) = 0 \quad (9).$$

Durante el transcurso de un experimento cinético, la enzima no se degrada de manera apreciable. De esta manera, se establece la condición de balance de masa para la concentración total de enzima E_0 :

$$E_0 = E + SE + EP \quad (10).$$

La igualdad anterior indica que sólo es necesario conocer la evolución temporal de las concentraciones de las especies S, P y cualesquiera dos de entre E, SE o EP para tener caracterizada toda la dinámica de la reacción. Si se toman en consideración a las especies SE y EP para la caracterización de la dinámica, el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias reducido que se debe resolver es:

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 E_0 S + (k_{-1} + k_1 S) SE + k_1 S EP \quad (11a),$$

$$\frac{dSE}{dt} = k_1 E_0 S - (k_{-1} + k_1 S + \alpha e^{\theta EP}) SE + (\beta e^{\theta EP} - k_1 S) EP \quad (11b),$$

$$\frac{dEP}{dt} = \alpha e^{\theta EP} SE - (\beta e^{\theta EP} + k_3) EP \quad (11c),$$

$$\frac{dP}{dt} = k_3 EP \quad (11d).$$

Para simplificar el análisis matemático del sistema de ecuaciones diferenciales (11), es conveniente expresarlo en forma adimensional pues de esta manera se puede reducir el número de parámetros ajustables que lo definen (C. C. Lin y L. A. Segel, 1974). Para hacer adimensional el sistema de ecuaciones diferenciales se introducen las siguientes variables adimensionales:

$$\tau = \frac{t}{k_1 E_0} \quad (12a);$$

$$s = \frac{S}{E_0} \quad (12b);$$

$$se = \frac{SE}{E_0} \quad (12c);$$

$$ep = \frac{EP}{E_0} \quad (12d);$$

$$p = \frac{P}{E_0} \quad (12e).$$

Llevando a cabo el cambio de variables, el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias adimensional toma la forma:

$$\frac{ds}{d\tau} = -s + (K_{-1} + s)se + s^*ep \quad (13a),$$

$$\frac{dse}{d\tau} = s - (s + K_{-1} + K_2 e^{\phi ep})se + (K_{-2} e^{\phi ep} - s)ep \quad (13b),$$

$$\frac{d\phi p}{d\tau} = K_2 e^{\phi ep} se - (K_3 + K_{-2} e^{\phi ep})ep \quad (13c),$$

$$\frac{dp}{d\tau} = K_3 ep \quad (13d),$$

donde los parámetros K_{-1} , K_2 , K_{-2} , K_3 y ϕ se han definido como:

$$K_{-1} = \frac{k_{-1}}{k_1 E_0} \quad (14a);$$

$$K_2 = \frac{\alpha}{k_1 E_0} \quad (14b);$$

$$K_{-2} = \frac{\beta}{k_1 E_0} \quad (14c);$$

$$K_3 = \frac{k_3}{k_1 E_0} \quad (14d);$$

$$\phi = \theta E_0 \quad (14e);$$

y las condiciones iniciales toman la forma:

$$s(0) = s_0 = \frac{S_0}{E_0} \neq 0, \quad se(0) = ep(0) = p(0) = 0 \quad (15).$$

Nótese que si la función $ep(\tau)$ es conocida entonces es posible conocer la función $p(\tau)$ por integración directa de la ecuación (13d). Por lo tanto, sólo es necesario conocer la solución del sistema reducido formado por las ecuaciones (13a), (13b) y (13c) para tener totalmente caracterizada la dinámica del mecanismo de reacción (1).

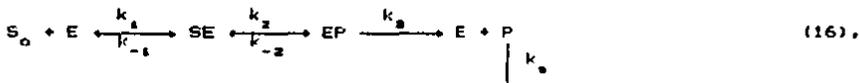
1.2 Modelado Del Sistema Abierto

En la sección anterior se construyó el modelo matemático suponiendo que el sistema enzimático bajo estudio se encuentra en un compartimento donde no ocurren intercambios de materia con sus alrededores. En esta situación, las leyes de la termodinámica indican que una vez iniciada la reacción, esta llegará al equilibrio termodinámico pues no existe manera de forzar al sistema a permanecer alejado del mismo. La única forma posible de mantener a un sistema alejado del equilibrio

termodinámico es manteniendo constante la perturbación que inicialmente lo alejó de dicha situación (G. Nicolis e I. Prigogine, 1977).

En el caso anterior, la perturbación consistió en modificar las concentraciones de equilibrio tanto del reactivo como del producto de la reacción. Así entonces, la forma de hacer que el sistema siempre se encuentre una una situación alejada del equilibrio es manteniendo las concentraciones de reactivo y de producto distintas a las que toman en el equilibrio. Esto sólo es posible si el sistema es capaz de intercambiar materia con los alrededores.

Para el modelado del sistema abierto, el mecanismo de reacción para la transformación de un sustrato S en el producto P por medio de la enzima E se modifica de la siguiente forma:



donde S_0 es la concentración constante de sustrato en el medio de reacción; E, SE, EP y P representan las concentraciones de la enzima en su forma libre, del complejo sustrato-enzima, del complejo enzima-producto y del producto en su forma libre respectivamente; k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} , k_3 y k_4 son las constantes de velocidad de las reacciones elementales. Debido a que se está añadiendo continuamente sustrato al medio de reacción, es válido suponer que la concentración de sustrato en él se mantiene constante independientemente de la duración del experimento.

La dinámica de este nuevo mecanismo de reacción está descrita por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dE}{dt} = k_{-1}SE + k_3EP - k_1S_0 * E \quad (17a),$$

$$\frac{dSE}{dt} = k_1S_0 * E + \beta e^{\theta EP} EP - (k_{-1} + \alpha e^{\theta EP}) SE \quad (17b),$$

$$\frac{dEP}{dt} = \alpha e^{\theta EP} SE - (k_2 + \beta e^{\theta EP}) EP \quad (17c),$$

$$\frac{dP}{dt} = k_3EP - k_4P \quad (17d):$$

donde E, SE, EP y P son las concentraciones de la enzima en su forma libre, del complejo sustrato-enzima, del complejo enzima-producto y del producto en su forma libre respectivamente como función del tiempo t y S_0 es la concentración constante de sustrato en el medio de reacción; además, el sistema de ecuaciones diferenciales (17) debe cumplir con las condiciones iniciales:

$$E(0) = E_0 \neq 0, SE(0) = EP(0) = P(0) = 0 \quad (18).$$

A continuación se supone que los intercambios de materia sólo se dan

entre el sustrato y el producto de la reacción mientras que las restantes especies moleculares no fluyen hacia los alrededores. De esta manera, se establece la condición de balance de masa para la concentración total de enzima de igual forma a como ocurre en el caso anterior. Por lo tanto, el sistema de ecuaciones diferenciales que en realidad se debe resolver es el siguiente:

$$\frac{dSE}{dt} = k_1 E_0 S_0 - (k_{-1} + k_1 S_0 + \alpha e^{\phi EP}) SE + (\beta e^{\phi EP} - k_1 S_0) EP \quad (19a),$$

$$\frac{dEP}{dt} = \alpha e^{\phi EP} SE - (\beta e^{\phi EP} + k_2) EP \quad (19b),$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 EP - k_3 P \quad (19c),$$

sujeto a las condiciones iniciales:

$$SE(0) = EP(0) = P(0) = 0 \quad (20).$$

Tal como se hizo en el caso anterior, para facilitar el estudio del sistema (19) es conveniente expresarlo en forma adimensional. Para esto se realiza un cambio de variables en el sistema usando las mismas variables adimensionales que se definieron en el caso del sistema cerrado (véase la ecuación no. 12). Después de realizar el cambio de variables, se obtiene el sistema adimensional:

$$\frac{dse}{d\tau} = s_0 - (s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi ep}) se + (K_{-2} e^{\phi ep} - s_0) ep \quad (21a),$$

$$\frac{dep}{d\tau} = K_2 e^{\phi ep} se - (K_{-2} e^{\phi ep} + K_3) ep \quad (21b),$$

$$\frac{dp}{d\tau} = K_3 ep - K_4 p \quad (21c);$$

donde K_{-1} , K_2 , K_{-2} , K_3 y ϕ tienen el mismo significado que en el caso anterior (véase la ecuación no. 14) mientras que los parámetros s_0 y K_4 se han definido como:

$$s_0 = \frac{S_0}{E_0} \quad (22a);$$

$$K_4 = \frac{k_3}{k_1 E_0} \quad (22b);$$

y, por último, las condiciones iniciales toman la forma:

$$se(0) = ep(0) = p(0) = 0 \quad (23).$$

Como puede observarse en el sistema de ecuaciones diferenciales (21), la ecuación (21c) está desacoplada de las dos restantes, por lo que se puede resolver de manera inmediata una vez que sean conocidas las funciones $se(\tau)$ y $ep(\tau)$, lo cual hace que el problema matemático se

reduzca a la búsqueda de las soluciones de las ecuaciones diferenciales (21a) y (21b). Las soluciones que son de particular interés para el presente trabajo son las soluciones excitables (en términos bioquímicos, estas soluciones constituyen comportamientos dinámicos donde el sistema es capaz de amplificar un pequeño estímulo externo mostrando durante un cierto instante de tiempo una alta actividad catalítica) y las soluciones periódicas (en términos bioquímicos, estas soluciones constituyen comportamientos dinámicos donde las concentraciones de los complejos enzima-sustrato y enzima-producto y del producto de la reacción oscilan en el tiempo de manera autónoma).

Capítulo 2

Método De Solución

En este capítulo describo los métodos matemáticos que deben ser empleados en el análisis del modelo matemático construido en el capítulo anterior.

2.1 Curvas De Velocidad Inicial

La dinámica de una reacción catalizada por una enzima monosustrato que se ajusta a un mecanismo de reacción que involucra la presencia de dos intermediarios estables atraviesa por tres distintas etapas (L. A. Segel, 1988). Dichas etapas presentan las siguientes características:

- 1) En la primera etapa se observa que la concentración de sustrato casi no se altera mientras que las concentraciones de los dos intermediarios aumentan hasta alcanzar un valor máximo. Esta etapa es muy corta y sólo puede ser registrada usando técnicas especiales de medición.
- 2) En la segunda etapa se observa que las concentraciones de los intermediarios se mantienen casi constantes mientras que las concentraciones del sustrato y del producto cambian de manera apreciable.
- 3) En la última etapa se observa que las concentraciones de los intermediarios decaen rápidamente y, junto con la concentración de sustrato, alcanzan su valor mínimo mientras que las concentraciones de producto y de enzima libre alcanzan su valor máximo.

En los experimentos realizados *in vitro* sólo se registra el comportamiento dinámico del sistema enzimático durante la segunda etapa pues con tal información se pueden determinar las características más importantes de la enzima como catalizador biológico.

Debido a lo anterior, para la descripción de la dinámica de una reacción enzimática es razonable suponer que las concentraciones de los complejos SE y EP no cambian en el tiempo, lo cual se expresa en términos matemáticos de la siguiente forma:

$$\frac{ds_e}{dt} = s_0 - (s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi_{EP}})se + (K_{-2} e^{\phi_{EP}} - s_0)ep = 0 \quad (1a),$$

$$\frac{dep}{dt} = K_2 e^{\phi_{EP}} se - (K_3 + K_{-2} e^{\phi_{EP}})ep = 0 \quad (1b).$$

Puesto que en la primera etapa de la reacción la concentración de sustrato casi no cambia, se sustituye, en lugar de la concentración $s(t)$, la concentración inicial de sustrato s_0 ; esta aproximación se conoce como suposición de pseudo estado estacionario. Como pueda observarse en el sistema de ecuaciones no lineales (1), las concentraciones en el pseudo estado estacionario de los complejos SE y EP (se_0 y ep_0 respectivamente) son función de la concentración inicial de sustrato.

Ahora sólo resta calcular la concentración del sustrato $s(t)$ para determinar la dinámica completa de la reacción; la función $s(t)$ es la

solución de la ecuación diferencial:

$$\frac{ds}{dt} = -s + (K_{-1} + s)se + s^2ep \quad (2),$$

la cual puede ser integrada de manera directa puesto que las funciones $se(\tau)$ y $ep(\tau)$ ya son conocidas (corresponden a las concentraciones de pseudo estado estacionario).

La característica cinética más importante que se registra durante la etapa de pseudo estado estacionario de la reacción es la velocidad inicial. Esta velocidad es la velocidad instantánea que se registra en el momento en que las concentraciones de los intermediarios alcanzan su valor máximo (precisamente las concentraciones de pseudo estado estacionario). La velocidad inicial puede ser calculada por medio de las siguientes ecuaciones:

$$v_o = -\frac{ds}{dt} = -(-s_o + (K_{-1} + s_o)se_o + s_o^2ep_o) = \frac{dp}{dt} = K_2 ep_o \quad (3).$$

Como se puede observar en las ecuaciones anteriores, la velocidad inicial de la reacción es función de la concentración inicial de sustrato. Así, una gráfica de la velocidad inicial de la reacción contra la concentración inicial de sustrato contiene la gran mayoría de la información cinética interesante de la reacción enzimática.

Para calcular la velocidad inicial de la reacción es necesario conocer las concentraciones en el pseudo estado estacionario de los complejos SE y EP. Tales concentraciones son las soluciones del sistema de ecuaciones no lineales (1). Sin embargo, no es factible encontrar una solución exacta para este sistema (debido a la presencia de los términos exponenciales) salvo en el caso donde no se presentan interacciones entre las enzimas (el caso con $\phi = 0$).

Las expresiones para las concentraciones se_o y ep_o en este último caso son las siguientes:

$$se_o = \frac{(K_{-2} + K_3) s_o}{s_o (K_2 + K_{-2} + K_3) + K_3 (K_{-1} + K_2) + K_{-1} K_{-2}} \quad (4a),$$

$$ep_o = \frac{K_3 s_o}{s_o (K_2 + K_{-2} + K_3) + K_3 (K_{-1} + K_2) + K_{-1} K_{-2}} \quad (4b);$$

con las cuales la ecuación para la velocidad inicial toma la forma clásica de Michaelis-Mentens:

$$v_o(s_o) = \frac{V_{\max} s_o}{s_o + K_m} \quad (5),$$

si se definen las siguientes constantes:

$$K_m = \frac{K_3(K_{-1} + K_2) + K_{-1}K_{-2}}{K_2 + K_{-2} + K_3} \quad (6a)$$

$$V_{max} = \frac{K_2K_3}{K_2 + K_{-2} + K_3} \quad (6b)$$

Obsérvese en la ecuación (5) que conforme la concentración inicial de sustrato se hace muy grande ($s_0 \gg K_m$), la velocidad inicial se acerca asintóticamente a un valor límite (V_{max}). Este comportamiento de la velocidad inicial se observa experimentalmente para reacciones enzimáticas donde la concentración de enzima es muy baja y, por lo tanto, se espera que no se presenten interacciones entre las moléculas de enzima (K. Hayashi y N. Sakamoto, 1986).

Debido al resultado anterior, se espera que cuando se tengan interacciones entre las moléculas de enzima ($\phi \neq 0$) aparezca uno de tres posibles comportamientos:

- 1) Que la ecuación para la velocidad inicial siga mostrando la forma de Michaelis-Menten, pero que las constantes K_m y V_{max} se vean alteradas.
- 2) Que la velocidad inicial muestre una forma sigmoide respecto de la concentración inicial de sustrato.
- 3) Que la velocidad inicial muestre un cambio abrupto al alcanzarse un valor crítico para la concentración inicial de sustrato.

Como en este caso no se puede obtener una expresión exacta para la velocidad inicial, se debe recurrir a los métodos numéricos para obtener una solución aproximada para las curvas de velocidad inicial (en el apéndice 2 se muestra el método numérico empleado en este trabajo).

2.2 Curvas De Nomas

Para determinar la posible existencia de comportamientos excitables en el modelo es necesario resolver el sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{ds_e}{dt} = s_0 - (s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi ep})s_e + (K_{-2} e^{\phi ep} - s_0)ep \quad (7a)$$

$$\frac{dep}{dt} = K_3 e^{\phi ep} s_e - (K_{-2} e^{\phi ep} + K_3)ep \quad (7b)$$

Sin embargo, no es posible obtener una solución exacta para este sistema debido a la presencia de los términos exponenciales, por lo que se hace necesario considerar una estrategia que involucre el uso de métodos numéricos para obtener, por lo menos, soluciones aproximadas.

Para el diseño de un método numérico eficaz se debe tomar en cuenta que en el sistema de ecuaciones diferenciales (7) se encuentran definidos seis parámetros ajustables (s_0 , K_{-1} , K_2 , K_{-2} , K_3 y ϕ). Sólo algunos pocos conjuntos de valores para estos parámetros corresponden a las condiciones necesarias que originan comportamientos excitables.

Así, una búsqueda de soluciones de manera aleatoria generaría, con toda seguridad, un gran número de soluciones para el sistema que no corresponderían a comportamientos excitables.

Debido a lo anterior, la estrategia para la búsqueda de soluciones debe consistir en calcular primero los estados estacionarios (y sus características de estabilidad local) del sistema de ecuaciones diferenciales para un cierto conjunto de valores para los parámetros y, posteriormente, realizar un análisis de la estabilidad estructural de los estados estacionarios para limitar las zonas del espacio de parámetros que pueden dar origen a comportamientos excitables (en el apéndice 2 se describe en que consiste el análisis de estabilidad local y estructural). Una vez que se ha encontrado evidencia de la presencia de un comportamiento excitable entonces se procede a realizar el cálculo numérico de las soluciones no estacionarias.

Para representar de manera gráfica los resultados obtenidos se hará uso de gráficas donde se relacionan, de manera simultánea, las dos componentes del estado estacionario con el parámetro libre; lo anterior es posible debido a que cada componente del estado estacionario es función de los distintos parámetros. Para esto se toma la norma euclidiana de los estados estacionarios:

$$\text{norma} = (\text{se}_0^2 + \text{ep}_0^2)^{\frac{1}{2}} \quad (8).$$

El análisis de estabilidad estructural genera un conjunto de parejas (parámetro libre, norma) con el cual es posible generar una curva de norma contra parámetro libre. La curva de norma contiene toda la información sobre la forma como dependen los estados estacionarios y su estabilidad local del parámetro libre (E. Doedel, 1984).

Cuando el sistema de ecuaciones diferenciales presenta múltiples estados estacionarios para un cierto conjunto de valores para el parámetro libre entonces la curva de norma debe mostrar una forma de "S". Una característica geométrica importante de las curvas de norma bajo estas condiciones son aquellos puntos donde la curva cambia de dirección o puntos límite; estos puntos se caracterizan porque en ellos la derivada de la curva de norma respecto del parámetro libre se hace vertical. Es muy importante caracterizar estos puntos pues su relación con los puntos de bifurcación de Hopf (ver definición en el apéndice 2) indican la presencia de comportamientos excitables.

Capítulo 3

Simulaciones Numéricas

Una vez construido el modelo matemático que describe la dinámica de una reacción enzimática donde se incluyen interacciones de largo alcance entre las moléculas de enzima y determinada la estrategia para la búsqueda de comportamientos matemáticos de interés bioquímico, se procedió a realizar las simulaciones numéricas. En este capítulo se describen los resultados más importantes que se obtuvieron de tales simulaciones.

98

3.1 Sistema Cerrado

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad se eligieron de forma tal que en las simulaciones numéricas se obtuvieran fenómenos cooperativos. Después de haber realizado varias simulaciones de prueba, los parámetros se ajustaron a los valores:

$$K_{-1} = 0.94, K_2 = 0.06, K_{-2} = 0.50 \text{ y } K_3 = 6.50 \quad (1)$$

Para determinar el intervalo de variación para la concentración inicial de sustrato s_0 se tomó como referencia la dinámica donde no se presentan interacciones (es decir, el caso donde el parámetro ϕ toma el valor de 0.00 unidades). En este caso, la dinámica de la reacción está caracterizada por las constantes K_m y V_{max} (constantes de Michaelis-Menten). Un intervalo de variación apropiado para s_0 comprende una longitud de aproximadamente $10K_m$ unidades (I. H. Segel, 1975). Así, con los valores que se eligieron para los parámetros, y las expresiones definidas en el capítulo anterior, las constantes de Michaelis-Menten toman los valores:

$$K_m = 0.98725 \text{ y } V_{max} = 0.05524 \quad (2)$$

y se obtiene el siguiente intervalo de variación para s_0 :

$$s_0 \in [0.00, 10.00] \quad (3)$$

Sólo resta determinar el conjunto de valores que puede tomar el parámetro ϕ o constante de interacción promedio. Debido a que se está considerando que las interacciones entre las moléculas de enzima favorecen la velocidad de la reacción de cada una de las moléculas de enzima que componen al sistema entonces el parámetro ϕ solo puede tomar valores mayores a cero.

En las figuras 1A y 1B se muestran las curvas de velocidad inicial contra concentración inicial de sustrato que se obtuvieron de las simulaciones numéricas. Como puede observarse en las figuras, las dinámicas con valores de ϕ comprendidos entre 10.00 y 40.00 unidades muestran un comportamiento similar al de la dinámica de referencia (curva A). Al analizar los resultados numéricos, se encontró que les

constantes de Michaelis-Menten aumentan sus valores respecto de los que se encontraron en la dinámica de referencia; los valores calculados por el método gráfico de Lineweaver-Burk para las constantes de Michaelis-Menten se muestran en la tabla no. 1:

TABLA No. 1

ϕ	K_m	V_{max}
0.00	0.98733	0.05524
10.00	1.08091	0.06013
20.00	1.21714	0.06659
30.00	1.42968	0.07578
40.00	1.84929	0.09098

En cambio, para las dinámicas con valores para ϕ mayores o iguales a 50.00 unidades se observa la aparición de intervalos de concentración inicial de sustrato donde existen tres valores distintos para la velocidad inicial asociados a un valor único de s_0 . Además, las simulaciones muestran que para valores grandes de s_0 todas las curvas se acercan, de manera asintótica, a un valor límite (este valor límite se hace constante conforme ϕ aumenta). Este último comportamiento es importante porque indica una saturación en la respuesta de la enzima a altas concentraciones de sustrato, tal como era de esperarse.

Nótese que el inicio de la zona de multiplicidad para la dinámica con el valor de 50.00 unidades para ϕ se encuentra casi al final del intervalo de variación para s_0 . Debido a esto, se investigó la posible existencia de zonas de multiplicidad para las dinámicas con valores para ϕ menores a 50.00 unidades pero para valores para s_0 en el siguiente intervalo:

$$s_0 \in [10.00, 100.00]$$

(4).

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 2A y 2B. Como puede observarse en estas figuras sólo la curva F (la dinámica con el valor de 50.00 unidades para ϕ) muestra una zona de multiplicidad mientras que las curvas restantes muestran un comportamiento casi constante que corresponde a la región de saturación de la curva de velocidad inicial. De estos resultados se puede concluir que, de existir zonas de multiplicidad para las dinámicas con valores para ϕ menores o iguales a 40.00 unidades, estas se deben presentar para valores de s_0 mayores a 100.00 unidades.

La aparición de intervalos de concentración inicial de sustrato donde se presentan tres distintas velocidades iniciales para la reacción enzimática es un resultado extraño desde un punto de vista

bioquímico, por lo que es necesario dar una explicación alternativa a este resultado matemático. El análisis detallado de la dinámica completa de la reacción debe proveer los datos necesarios que permitan realizar una corrección a las curvas de velocidad inicial.

En este momento es conveniente recordar que las curvas de velocidad inicial fueron calculadas suponiendo que la hipótesis de pseudo estado estacionario también es válida cuando hay interacciones intermoleculares presentes en el sistema. Las concentraciones máximas de los intermediarios (los complejos SE y EP) son calculadas suponiendo que la concentración inicial de sustrato no ha cambiado durante el intervalo de tiempo que transcurre desde el inicio de la reacción hasta que los complejos alcanzan sus concentraciones máximas. Sin embargo, en un sistema real, la concentración de sustrato que se registra en el sistema en el momento en que los complejos han alcanzado sus concentraciones máximas siempre es menor que la concentración inicial de sustrato; este hecho puede constituirse en una fuente de error en el cálculo de las curvas de velocidad inicial.

Para determinar el comportamiento real del modelo en las zonas donde se presentan múltiples velocidades iniciales se realizó un estudio de la dinámica con el valor para ϕ de 60.00 unidades por medio de simulaciones numéricas del sistema de ecuaciones diferenciales usando el método de Runge-Kutta semi-implícito de tercer orden (M. L. Michelson, 1976). Tal como puede observarse en la figura 2B (curva G), en este caso la zona de multiplicidad aparece entre los valores de 3.50 y 6.00 unidades para la concentración inicial de sustrato.

En el estudio de la dinámica de la reacción se consideraron valores para la concentración inicial de sustrato que se encuentran cerca de la zona donde aparece la multiplicidad de velocidades iniciales, estudiando con detalle lo que ocurre en las concentraciones iniciales de sustrato donde desaparece la multiplicidad. En las figuras 3A, 3B, 3C y 3D se muestran los cambios temporales que sufren las concentraciones de las distintas especies que intervienen en la reacción cuando la concentración inicial de sustrato toma los valores de 3.50, 7.00, 8.00 y 10.00 unidades respectivamente.

Tal como se mencionó en el capítulo anterior, la velocidad inicial de una reacción enzimática corresponde a la velocidad instantánea de la reacción cuando la concentración de los intermediarios estables alcanzan su valor máximo. Las simulaciones numéricas muestran que la concentración de sustrato que existe en el medio de reacción cuando los complejos alcanzan su concentración máxima es alrededor de un 20% menor que la concentración inicial de sustrato; de esta manera, los valores de las concentraciones máximas para los complejos (en especial la del complejo EP) se encuentran por debajo de los calculados bajo la hipótesis de pseudo estado estacionario. En la tabla no. 2 se muestran, a manera de ejemplo, algunos valores de las concentraciones máximas de los complejos (el superíndice "pe" indica que se trata de la concentración calculada usando la hipótesis de pseudo estado estacionario):

TABLA No. 2

s_o	SE_o	EP_o	SEP^{p**}_o	EP^{p**}_o
3.50	0.714864	0.011168	0.758465	0.013241
5.00	0.787444	0.014629	0.808184	0.017338
6.00	0.818118	0.017172	0.725290	0.077319
7.00	0.840905	0.021277	0.743671	0.081130
7.50	0.850306	0.078820	0.751547	0.082639
8.00	0.858628	0.081924	0.758681	0.083958
10.00	0.884104	0.086646	0.781459	0.087929

Puesto que la velocidad inicial de la reacción es proporcional a la concentración máxima del complejo EP (la constante de proporcionalidad es el parámetro K_p) entonces la velocidad inicial real que muestra el modelo debe seguir la misma tendencia que muestra la concentración máxima de EP. En la tabla no. 3 se muestran, a manera de ejemplo, algunos valores de la velocidad inicial:

TABLA No. 3

s_o	v_o	v_o^{p**}
3.50	0.072591	0.086069
5.00	0.095088	0.112696
6.00	0.111621	0.502574
7.00	0.138301	0.527342
7.50	0.512328	0.537154
8.00	0.532504	0.545726
10.00	0.563199	0.571541

Como se puede observar en las tablas anteriores, la concentración máxima del complejo EP (y, por lo tanto, también la velocidad inicial de la reacción) sufre un cambio abrupto cuando la concentración inicial de sustrato cambia de 7.00 a 7.50 unidades. También las concentraciones calculados bajo la hipótesis de pseudo estado estacionario muestran una transición abrupta pero a una concentración inicial de sustrato menor; en este caso la transición se observa entre 5.50 y 6.00 unidades para s_o . En la figura 4 se muestra la curva de velocidad inicial calculada

por la aproximación de pseudo estado estacionario (en trazo continuo) y la curva de velocidad inicial que resulta de las simulaciones numéricas de la dinámica (en este caso sólo se indican unos cuantos puntos marcados por cruces).

Por último, para las dinámicas que comienzan con valores mayores a 7.50 unidades para la concentración inicial de sustrato se observa que la velocidad de la reacción cambia después de que se ha consumido un poco más de la mitad de la concentración inicial de sustrato (esto se observa como un cambio de pendiente en la curva de cambio para la concentración de sustrato). El valor de la concentración de sustrato para el que ocurre este cambio en la velocidad es similar al valor de la concentración inicial de sustrato donde se comienzan a registrar múltiples velocidades iniciales en la curva de velocidad inicial (alrededor de 3.60 unidades). Además, la relación entre las concentraciones de los complejos es muy similar en todos estos casos ($EP/SE \sim 0.080$ unidades).

3.2 Sistema Abierto

A continuación muestro los resultados obtenidos en la búsqueda de comportamientos excitables en el modelo matemático, habiendo escogido ϕ como el primer parámetro libre y estudiando el efecto que producen s_0 y K_2 como segundos parámetros libres. Puesto que el presente estudio es una extensión de la situación que ocurre en el caso del sistema cerrado, se eligió el mismo conjunto de valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad que se usó en el caso anterior (véase la ecuación no. 1).

Primero se estudió el efecto que produce s_0 como segundo parámetro libre. En las figuras 5A, 5B, 5C y 5D se muestran ampliaciones de los intervalos para ϕ que muestran los comportamientos dinámicos más interesantes. Las zonas que aparecen con trazo discontinuo en las gráficas anteriores corresponden a los estados estacionarios que son localmente inestables.

A continuación describo los resultados que se obtuvieron en este estudio:

1) Para la dinámica con el para s_0 valor de 0.10 unidades (figura 5A) se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) No se encontró multiplicidad de estados estacionarios.
- b) Aparece un subintervalo para ϕ donde el único estado estacionario del sistema es localmente inestable.
- c) El cambio de estabilidad de los estados estacionarios está asociado con valores propios complejos para el sistema, es decir, se presentan dos puntos de bifurcación de Hopf en el sistema (los puntos de bifurcación de Hopf aparecen marcados como BH en la figura).
- d) Debido a lo anterior, para cada estado estacionario inestable debe estar asociado un ciclo límite.

2) Para las dinámicas con valores para s_0 de 0.50 unidades y de 1.00 unidades (figuras 5B y 5C respectivamente) se obtuvieron los siguientes resultados:

a) Aparece un subintervalo para ϕ donde existe multiplicidad de estados estacionarios, es decir, el sistema presenta dos puntos limite (estos puntos aparecen marcados como PL en la figura).

b) Existe un subintervalo para ϕ dentro de la región de multiplicidad donde dos de los tres estados estacionarios son localmente inestables.

c) El cambio de estabilidad del estado estacionario que se localiza en la rama inferior de la curva de norma está asociado con valores propios complejos, es decir, se presenta un punto de bifurcación de Hopf (marcado como BH) en la rama inferior de la curva de norma.

d) El punto de bifurcación de Hopf se encuentra dentro de la zona de multiplicidad, por lo que el sistema debe mostrar una rama de soluciones periódicas que parte de una trayectoria homoclina asociada a un estado estacionario de la rama intermedia (este punto aparece marcado como TH) y termina en el punto de bifurcación de Hopf.

e) Ambas dinámicas presentan el mismo comportamiento dinámico cualitativamente hablando. La dinámica con el valor para s_0 de 1.00 unidades muestra el punto de bifurcación de Hopf muy cerca del primer punto limite, por lo que la zona donde coexisten dos estados estacionarios inestables es muy corta.

3) Para la dinámica con el valor para s_0 de 5.00 unidades (figura 5D) se obtuvieron los siguientes comportamientos:

a) Aparece un subintervalo para ϕ donde existe multiplicidad de estados estacionarios, es decir, el sistema presenta dos puntos limite (marcados como PL en la figura).

b) No hay puntos de bifurcación de Hopf.

La presencia de múltiples estados estacionarios donde dos de ellos son localmente inestables es de gran importancia pues se ha observado en otros sistemas de ecuaciones diferenciales de dos dimensiones que, bajo estas mismas condiciones, se originan comportamientos dinámicos excitables como respuesta a una perturbación en los valores de estado estacionario (Y. Anan y N. Go, 1978).

A continuación muestro cuatro series de cálculos, obtenidos con el método de Runge-Kutta semi-implícito de tercer orden (M. L. Michelsen, 1976), donde ejemplifico los distintos comportamientos excitables que puede mostrar el modelo matemático.

En la figura 6 muestro el comportamiento dinámico del sistema (representado por el plano fase SE-EP) cuando el parámetro libre principal ϕ toma el valor de 161.00 unidades y el segundo parámetro libre s_0 toma el valor de 0.50 unidades; bajo estas condiciones el sistema presenta dos estados estacionarios inestables (A y B en la figura) y uno estable (C en la figura). También se muestran tres distintas trayectorias: Dos de ellas (las nos. 1 y 2) parten del estado estacionario central mientras que la última trayectoria (la no. 3) se inicia en los alrededores del estado estacionario superior. Como se puede observar en la figura, todas estas trayectorias se dirigen hacia el estado estacionario inferior, el estado estacionario estable.

El fenómeno de excitabilidad se debe entender de la siguiente manera:

- 1) Inicialmente las concentraciones de los complejos SE y EP se encuentran en los valores del estado estacionario estable.
- 2) El sistema sufre una perturbación en el valor de la concentración de sustrato.
- 3) Al terminar la perturbación, las concentraciones de los complejos SE y EP se encuentran en la parte superior del estado estacionario central.
- 4) El sistema evoluciona hasta que alcanza nuevamente las condiciones del estado estacionario estable.

En la figura 7 muestro el comportamiento temporal de la concentración de producto conforme ocurre el fenómeno de excitabilidad que se acaba de describir (la flecha indica el momento en el cual el sistema sufre la perturbación).

En las figuras 8A, 8B y 8C muestro el comportamiento dinámico del sistema (también representado por el plano fase SE-EP) cuando el parámetro libre principal ϕ toma los valores de 161.011 unidades, 161.040 unidades y 161.050 unidades y para el valor de 0.50 unidades para el parámetro ϵ ; bajo todas estas condiciones el sistema siempre presenta dos estados estacionarios inestables (marcados como A y B en todas las figuras) y uno estable (marcado como C en todas las figuras).

En todas las figuras se muestran cuatro distintas trayectorias en el plano fase. Nótese que en todos los casos se presenta una trayectoria cerrada alrededor del estado estacionario superior (estas trayectorias están marcadas como 1 en todas las figuras) que corresponden a los ciclos límite asociados a los estados estacionarios inestables que se encuentran en la curva de norma entre la solución homoclina asociada a la rama intermedia y el punto de bifurcación de Hopf (véase la figura 5B). De manera similar al caso anterior, dos de las restantes trayectorias (marcadas como 2 y 3 en todas las figuras) parten del estado estacionario intermedio B; la trayectoria 2 se dirige hacia el ciclo límite, es decir, el ciclo límite se comporta como un atractor; por el contrario, la trayectoria 3 se dirige hacia el estado estacionario inferior (el cual sigue siendo el estado estacionario estable). La última trayectoria (marcada como 4) muestra que no todas las trayectorias que se encuentren cerca del ciclo límite se dirigen hacia él.

El ciclo límite que aparece en la figura 8A es particularmente interesante. Como puede observarse en la figura, el ciclo límite se acerca bastante al estado estacionario intermedio B. Esto quiere decir que dicho ciclo límite corresponde a un valor para el parámetro libre que se encuentra muy cerca del valor donde debe aparecer la trayectoria homoclina. Una trayectoria homoclina es aquella trayectoria cerrada que incluye un estado estacionario (este estado estacionario posee la característica de ser localmente inestable en una cierta dirección) mientras que en la dirección opuesta es localmente estable). Como puede deducirse de la figura, la trayectoria homoclina se forma cuando el ciclo límite es de tal tamaño que alcanza al estado estacionario intermedio.

Debido a las características anteriores, el fenómeno de excitabilidad presenta ahora las siguientes características:

1) Si el sistema está en las condiciones del estado estacionario inestable y la magnitud de la perturbación no es muy grande entonces el sistema amortigua la perturbación y rápidamente regresa a la situación inicial.

2) Si la magnitud de la perturbación es mayor a un valor umbral entonces el sistema evolucionará hacia el ciclo límite.

En la figura 9 muestro el comportamiento temporal de la concentración de producto cuando la perturbación es mayor al valor umbral. Como puede observarse en la figura, la concentración oscila de manera autónoma tal como se esperaba.

Por último se realizó el estudio del comportamiento dinámico del sistema tomando como segundo parámetro libre a K_{-2} . Este estudio tiene como objetivo analizar como se modifican los comportamientos dinámicos no lineales que presenta el sistema cuando se modifica el valor de la constante de equilibrio del paso de isomerización.

En la figura 10 muestro las curvas de norma contra el parámetro libre principal ϕ . De la figura se pueden deducir las siguientes características del sistema:

1) Conforme aumenta el valor para K_{-2} , la zona de multiplicidad desaparece, mientras que para valores bajos para K_{-2} , la zona de multiplicidad se hace más amplia.

2) Para valores bajos para K_{-2} se presentan cambios de estabilidad asociados con soluciones periódicas dentro de la zona de multiplicidad, mientras que para valores altos para K_{-2} , se observa que este tipo de cambio de estabilidad desaparece.

Los resultados anteriores implican que, tomando un valor constante para la norma, la relación de las concentraciones de estado estacionario para los complejos SE y EP se alejan del valor de la constante de equilibrio para valores bajos de K_{-2} y, por lo tanto, se debe esperar la aparición de comportamientos dinámicos no lineales, como en efecto sucede.

Capítulo 4

Discusión

En este capítulo realizo un resumen de los resultados más importantes que se obtuvieron y discuto las modificaciones y análisis que se deben realizar al modelo para convertirlo en una herramienta útil para la descripción de efectos cooperativos en un sistema enzimático más complejo.

4.1 Sistema Cerrado

Los resultados obtenidos en el estudio muestran que, bajo las suposiciones usadas en la construcción del modelo matemático, se presentan dos tipos distintos de dinámicas para la reacción dependiendo de si el valor que presenta la constante de interacción entre las enzimas se encuentra por debajo o por arriba de un valor umbral. Así, cuando el sistema enzimático presenta una constante de interacción por debajo del valor umbral se obtiene la ecuación de Michaelis-Menten para la velocidad inicial; en cambio, cuando la constante de interacción presenta valores mayores o iguales al valor umbral, la dinámica enzimática muestra una transición abrupta en la velocidad inicial de la reacción. Debido a esto, las curvas de velocidad inicial contra concentración inicial de sustrato muestran una forma de escalón.

De lo anterior se puede concluir que en un sistema enzimático donde las interacciones entre las moléculas de enzimas predominan sobre otro tipo de interacciones, se debe encontrar que para fuerzas de interacción moderadas la dinámica no presenta cambios cualitativos importantes respecto de la que se registran en un sistema donde las interacciones no predominan. En cambio, cuando la fuerza de interacción entre las moléculas de enzima es grande, se presentan transiciones abruptas de actividad catalítica a partir de un valor umbral para la concentración inicial de sustrato.

Puesto que para los sistemas enzimáticos con constantes de interacción por debajo del valor umbral se obtuvo la ecuación de Michaelis-Menten para la velocidad inicial entonces fue posible calcular las constantes K_m y V_{max} haciendo uso de las gráficas de inversos o gráficas de Lineweaver-Burk. Analizando los resultados numéricos obtenidos, se observa que las constantes disminuyen su valor conforme la constante de interacción disminuya.

En los sistemas de enzimas asociadas a membranas modelo se ha observado que conforme se altera el medio lipídico que rodea a las moléculas de enzima las constantes de Michaelis-Menten disminuyen su valor (G. Lenz, 1978). La explicación que ha sido dada en tales casos es que la disminución en el valor de V_{max} indica que la velocidad de formación del complejo enzima-producto ha disminuido por efecto de la remoción de los lípidos mientras que la disminución en el valor de la K_m indica que se ha incrementado la accesibilidad del sustrato hacia la enzima o que el complejo enzima-sustrato ha incrementado su estabilidad. En el presente caso se puede dar una explicación similar argumentando que cuando aumenta la fuerza de interacción entre las

moléculas de enzima se provoca que, por un lado, aumente la velocidad de formación del complejo EP (lo que ocasiona el aumento de V_{max}) y que, por otro lado, aumente la estabilidad del complejo SE y/o se liberen las restricciones estéricas entre el sustrato libre y la enzima libre (lo que da por resultado el aumento de K_m).

En las membranas plasmáticas de sistemas como *Dicystostellium discoideum* durante el proceso de agregación (A. Hase, 1982) y de huevos de erizo de mar después del fenómeno de fertilización (D. E. Wolf y colaboradores, 1981) se ha observado un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la membrana (recambio de la composición de lípidos en el caso de *D. discoideum* y rearrreglos en la organización de lípidos en el caso del huevo de erizo de mar) asociados con cambios en las actividades catalíticas de diversas enzimas membranales. El presente modelo puede explicar los fenómenos anteriores argumentando que la membrana constituye un soporte inerte que permite a las diversas enzimas membranales que se mantengan a una distancia tal entre ellas que se establecen interacciones intermoleculares de largo alcance. Así, el cambio en las propiedades fisicoquímicas de la membrana modifica la distancia entre las moléculas de enzima, con lo cual cambia la fuerza de interacción entre ellas; es el cambio en la fuerza de interacción entre las moléculas de enzima lo que origina el cambio de actividad.

4.1.1 Perspectivas

Considero que los siguientes aspectos deben ser estudiados para complementar el estudio del sistema cerrado:

- 1) Puesto que no es posible determinar una fórmula exacta para la concentración en el pseudo estado estacionario del complejo enzima-producto en los casos donde la constante de interacción es mayor que el valor umbral, se debe intentar obtener fórmulas aproximadas para ellas por métodos de perturbación simple (J. D. Murray, 1977).
- 2) Estudiar como se afecta la dinámica de la reacción cuando las interacciones entre las moléculas de enzima afectan a todas las constantes de velocidad involucradas en el mecanismo de la reacción.

Una vez realizados estos estudios se puede proceder en dos distintas direcciones:

- 1) Se puedan estudiar los efectos que causan las interacciones sobre la dinámica de la reacción en el caso de mecanismos de reacción más complejos para enzimas monosustrato y de mecanismos de reacción para enzimas bisustrato.
- 2) Se puedan estudiar los efectos combinados de interacciones entre moléculas de enzima y factores estructurales en modelos que intenten describir más cercanamente la situación presente en la célula viva.

4.2 Sistema Abierto

Los resultados obtenidos muestran intervalos para la constante de interacción donde coexisten tres distintos estados estacionarios en el sistema. El análisis de estabilidad local muestra que se pueden generar los siguientes comportamientos dinámicos como respuesta a una perturbación externa:

1) Si la perturbación es menor que un valor umbral entonces el sistema amortiguará la perturbación y rápidamente regresará a las condiciones del estado estacionario.

2) Si la perturbación es mayor que el valor umbral entonces se pueden presentar dos distintos comportamientos:

a) Si el sistema se encuentra bajo las condiciones donde no aparecen ciclos límite entonces se produce una respuesta transitoria de alta actividad catalítica.

b) Si el sistema se encuentra bajo las condiciones donde se presentan ciclos límite entonces sufre una transición hacia un régimen de actividad catalítica oscilatoria.

Un sistema biológico que muestra este tipo de comportamientos lo constituye el proceso de agregación que sufre *Dictyostelium discoideum* al agotarse su fuente de alimentación. En estudios independientes se ha observado que, durante el proceso de agregación, la composición de los principales constituyentes de la membrana plasmática de estas células sufre cambios cuantitativos importantes (A. Hase, 1982); otros estudios muestran que al inicio del proceso de agregación distintas enzimas asociadas a la membrana plasmática muestran comportamientos excitables mientras que, al final del proceso de agregación, las mismas enzimas muestran ahora un comportamiento oscilatorio (A. Goldbeter y L. A. Segel, 1980).

Es importante mencionar los siguientes factores relacionados con la aparición de ciclos límite en el presente modelo. J. J. Tyson y J. C. Light demostraron, en un trabajo publicado en 1973, que la única manera posible en la que un sistema de reacción química que presenta dos intermediarios puede dar origen a comportamientos dinámicos periódicos es que este sea abierto y que se presente un paso autocatalítico en el mecanismo de la reacción que involucre, por lo menos, a uno de los intermediarios (el presente modelo también cumple con estos requisitos químicos). Los pasos autocatalíticos han sido modelados por medio de reacciones trimoleculares de la forma: $2X + Y \longrightarrow 3X$; sin embargo, se ha demostrado que este tipo de reacciones ocurren con una muy baja probabilidad. J. J. Tyson y J. C. Light mencionan en su trabajo que tales reacciones puede ser interpretadas como una descomposición de la especie Y, formada por la unión de las especies X y B, que es catalizada por una "enzima" hipotética $2X + Y \longrightarrow 2X + B + X$.

En el presente modelo se incluye una forma alternativa de modelar una reacción autocatalítica por medio de interacciones a través de fuerzas dispersivas entre los intermediarios. Lo anterior puede ser útil para explicar fenómenos autocatalíticos en sistemas biológicos para los cuales no se ha podido encontrar un mecanismo de reacción como, por ejemplo, en el proceso de liberación de iones calcio durante la propagación de ondas de actividad cortical en los huevos de *Nedaea* después de la fertilización (A. Cheer y colaboradores, 1987).

4.2.1 Perspectivas

En cuanto a los estudios que se deben realizar al sistema considero que los más importantes son los siguientes:

1) Completar el análisis de bifurcación del sistema de ecuaciones

diferenciales no lineales.

2) Determinar el tipo de comportamientos no lineales que se obtendrían al acoplar la dinámica de reacción estudiada con un esquema de difusión simple y sus implicaciones bioquímicas.

Por lo que respecta al análisis de bifurcación, se debe determinar la forma como dependen los puntos límite y los puntos de bifurcación de Hopf respecto de los restantes parámetros que caracterizan al modelo. Además, se deben determinar las ramas de soluciones periódicas y la forma en la que cambia la amplitud y la frecuencia de los ciclos límite a lo largo de ellas. Puesto que el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que se necesita analizar no se puede resolver de manera exacta es necesario realizar el análisis de bifurcación de manera numérica haciendo uso de los métodos de continuación (una referencia importante para estos estudios lo constituye el trabajo de E. Doedel y J. P. Kernevez de 1985).

Al acoplar un sistema de reacción química con comportamientos dinámicos excitables con procesos de difusión simple se presentan fenómenos no lineales como son la generación de ondas químicas solitarias y trenes de ondas químicas (V. Anan y N. Gó, 1979), por lo que se debe esperar la aparición de fenómenos similares en el modelo. Se debe tener cuidado en cuanto a las interpretaciones bioquímicas en este caso pues se debe considerar la difusión de los complejos GE y EP. Diversos estudios en sistemas *in vivo* y en sistemas modelo *in vitro* han mostrado que la difusión de macromoléculas biológicas está restringida espacialmente (K. Jacobson y colaboradores, 1987). Esto implica que se deben considerar términos matemáticos más complejos para describir el proceso de difusión de dichas especies y, por lo tanto, se debe estudiar primero como se afectan las soluciones de onda en los esquemas de reacción-difusión con términos no lineales.

Apéndice 1

Interacciones Intermoleculares

La presencia de interacciones intermoleculares entre los componentes de un sistema de reacción química (catalizada por una enzima) generan una energía libre de interacción que perturba las energías libres de activación de cada uno de los pasos elementales del mecanismo molecular de la reacción. En este apéndice realizo una breve descripción, en términos de la teoría del estado de transición, de la forma en que se deben cuantificar las perturbaciones en las constantes de velocidad de un paso elemental de reacción. Estos conceptos fueron tomados del libro "Cooperativity theory in biochemistry. Steady-state and equilibrium systems" de T. L. Hill.

Considérense dos estados 1 y 2 de un ciclo catalítico enzimático cualquiera conectados por las transiciones $1 \xrightarrow{\alpha_0} 2$ y $2 \xrightarrow{\beta_0} 1$. Sean α_0 y β_0 las constantes de velocidad de primer orden para cada una de las transiciones, G_1 y G_2 las energías libres de Gibbs por molécula para los estados 1 y 2 respectivamente y G^\ddagger la energía libre de activación o altura de la barrera energética hacia el estado activado cuando los efectos de las interacciones intermoleculares no son apreciables (véase la figura A).

En el momento en que los estados 1 y 2 alcanzan la condición de equilibrio termodinámico (la constante de equilibrio toma la forma $K_0 = \alpha_0/\beta_0$), las concentraciones en el equilibrio P_1^{00} y P_2^{00} de los estados 1 y 2 se relacionan por medio de:

$$\frac{P_2^{00}}{P_1^{00}} = \frac{\exp[-G_2/RT]}{\exp[-G_1/RT]} = \exp[(G_1 - G_2)/RT] \quad (1);$$

además, se debe cumplir la condición de balance detallado:

$$\alpha_0 P_1^{00} = \beta_0 P_2^{00} \quad (2).$$

De esta manera, la constante de equilibrio se relaciona con las energías libres de Gibbs de cada uno de los dos estados por medio de:

$$K_0 = \frac{\alpha_0}{\beta_0} = \frac{P_2^{00}}{P_1^{00}} = \exp[(G_1 - G_2)/RT] \quad (3).$$

La presencia de interacciones intermoleculares en el sistema provocan, en el caso más general, que tanto las magnitudes de las energías libres de Gibbs para cada uno de los estados sean perturbadas (por cantidades ϵ_1 y ϵ_2 respectivamente) como la altura de la carrera energética hacia el estado activado (por una cantidad ϵ^\ddagger).

Las alturas de las barreras energéticas perturbada (G^*) y no perturbada (G_0^*) se relacionan por medio de:

$$G^* = G_0^* + \omega^*, \text{ donde } \omega^* = (1 - f)\omega_1 + f\omega_2 \quad (4).$$

El parámetro adimensional f describe la manera en la cual se distribuyen las perturbaciones ω_1 y ω_2 para cada uno de los estados 1 y 2 y es característico de la naturaleza de la perturbación (véase la figura A).

Una vez que se conoce la altura hacia el estado activado, es posible conocer la constante de velocidad asociada por medio de la ecuación de Eyring. En el caso donde no son apreciables los efectos de las interacciones, las constantes de velocidad de cada una de las transiciones toman la forma:

$$\alpha_0 = \frac{k_B T}{h} \exp[-(G_0^* - G_1)/RT] \quad (5a);$$

$$\beta_0 = \frac{k_B T}{h} \exp[-(G_0^* - G_2)/RT] \quad (5b).$$

Por otro lado, en el caso donde son apreciables los efectos de las interacciones, las constantes de velocidad (α y β) toman la forma:

$$\alpha = \frac{k_B T}{h} \exp[-(G^* - (G_1 + \omega_1))/RT] \quad (6a);$$

$$\beta = \frac{k_B T}{h} \exp[-(G^* - (G_2 + \omega_2))/RT] \quad (6b).$$

De esta manera, se obtiene las siguientes relaciones entre las constantes de velocidad perturbadas y no perturbadas:

$$\alpha = \alpha_0 \exp[f(\omega_1 - \omega_2)/RT] \quad (7a);$$

$$\beta = \beta_0 \exp[(1 - f)(\omega_1 - \omega_2)/RT] \quad (7b).$$

El caso donde $f = 0$ corresponde a la situación donde la constante de velocidad para la transición del estado 1 hacia el estado 2 no es alterada por las interacciones (es decir, se tiene que $\alpha = \alpha_0$); por el contrario, cuando $f = 1$ entonces es la constante de velocidad para la transición del estado 2 hacia el estado 1 la que no es modificada por las interacciones (es decir, tiene que $\beta = \beta_0$). En cualquiera de estos casos, la constante de velocidad de la reacción opuesta sufre todo el efecto de la energía libre de interacción ($\omega_1 - \omega_2$).

La relación entre las constantes de equilibrio perturbada (K) y no perturbada (K_0) está dada por:

$$\begin{aligned}
 K &= \frac{\alpha}{\beta} = \frac{P_2^*}{P_1^*} = \frac{\exp[-(G_2 + \omega_2)/RT]}{\exp[-(G_1 + \omega_1)/RT]} \\
 &= K_0 \exp[(\omega_1 - \omega_2)/RT] \\
 &= \frac{\alpha_0}{\beta_0} \exp[(\omega_1 - \omega_2)/RT] \quad (8),
 \end{aligned}$$

donde P_1^* y P_2^* son las concentraciones en el equilibrio de los estados 1 y 2 respectivamente. Es decir, la energía libre de interacción ($\omega_1 - \omega_2$) modifica la relación α_0/β_0 para producir la relación α/β .

También es factible considerar que las interacciones no modifican las magnitudes de las energías libres G_1 y G_2 de los estados 1 y 2 (por lo tanto, la constante de equilibrio para la transición no se altera) y que sólo modifican la altura de la barrera energética hacia el estado de transición en la cantidad ω (en este caso, la relación entre las constantes de velocidad perturbada y no perturbada sigue siendo dada por la ecuación no. 7). Este caso corresponde a la situación donde tanto ω_1 como ω_2 son muy pequeñas pero el parámetro f es, en valor absoluto, muy grande. De esta manera, si en la ecuación no. 4 se cumple que $|f|$ es muy grande entonces la perturbación se puede expresar como:

$$\omega^* = f(\omega_2 - \omega_1) \quad (9).$$

Como se puede observar en la expresión anterior, aunque ω_1 y ω_2 sean muy pequeños en magnitud, como $|f|$ es muy grande, ω^* puede tomar un valor finito (véase la figura B).

Esta última situación es la que se supone que ocurre entre los complejos SE y EP en el modelo (la energía libre de interacción se calcula por medio de la aproximación de Bragg-Williams para un sistema tipo Ising). Sólo resta introducir las constantes de velocidad modificadas en el sistema de ecuaciones diferenciales que describe la dinámica de la reacción para determinar la influencia de las interacciones en el comportamiento dinámico del sistema.

Apéndice 2

Análisis Local Y Estructural De Estabilidad

Para determinar si es posible que un sistema de ecuaciones diferenciales presente soluciones excitables primero se deben calcular los estados estacionarios del mismo para un cierto conjunto inicial de valores para los parámetros. En el caso particular del modelo, los estados estacionarios son las soluciones del sistema de ecuaciones no lineales:

$$\frac{ds_e}{dt} = s_0 - (s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi_{ep_0}})s_e + (K_{-2} e^{\phi_{ep_0}} - \varepsilon_0)ep_0 = 0 \quad (1a),$$

$$\frac{dep}{dt} = K_2 e^{\phi_{ep_0}} s_e - (K_{-2} e^{\phi_{ep_0}} + K_3)ep_0 = 0 \quad (1b).$$

Obsérvese que el sistema (1) es igual al que se obtiene en el cálculo de las concentraciones de pseudo estado estacionario de los complejos SE y EP del sistema cerrado.

Un método adecuado para resolver el sistema (1) es el de sustituciones sucesivas (J. R. Rice, 1983) que consiste, en este caso, de despejar la variable s_e de la ecuación (1b) y sustituirla en la ecuación (1a), obteniéndose entonces las siguientes ecuaciones:

$$f(ep_0) = e^{\phi_{ep_0}} [K_2 s_0 - (s_0 (K_2 + K_{-2}) + K_{-1} K_{-2} + K_2 K_3)ep_0] - K_3 (s_0 + K_{-1})ep_0 = 0 \quad (2a),$$

$$s_e = (K_2 + K_{-2} e^{\phi_{ep_0}})ep_0 / K_2 e^{\phi_{ep_0}} \quad (2b).$$

Puesto que la variable ep_0 no se puede despejar en términos de los parámetros, debido a la presencia del término exponencial, se debe recurrir a los métodos numéricos para obtener una solución aproximada. El método numérico que se elija debe ser capaz de encontrar el número de raíces que posee la función (2a) en un cierto intervalo para la variable independiente y debe poder aproximar, hasta una precisión definida de antemano, el valor numérico de cada una de las raíces.

La estrategia usada en este trabajo fue la de localización por aproximaciones sucesivas (A. Carnahan y colaboradores, 1969), la cual consiste de las siguientes etapas:

- 1) Se elige un intervalo (denominado intervalo de estudio) donde se sospecha que existe una raíz para la función (2a), aunque se desconoce su localización exacta. Este intervalo se caracteriza porque en los extremos del mismo la función cambia de signo.
- 2) El intervalo de estudio se divide en subintervalos de igual longitud

(en este caso se usaron 500) y la función es evaluada nuevamente en los extremos de cada uno de ellos, separando aquellos donde la función cambia de signo. La división tiene por objeto rastrear de manera más fina el intervalo de estudio para localizar todas las posibles raíces. 3) En aquellos subintervalos donde la función cambia de signo, la raíz existente se aproxima a la precisión que se desea usando alguno de los métodos numéricos de convergencia rápida desarrollados para funciones no lineales de una sola variable. En este caso se usó el método de Regula-Falsi modificado (J. R. Rice, 1983).

Para determinar el intervalo de estudio se tomó en cuenta que la variable independiente ep_0 representa una concentración y sólo puede tomar valores positivos. Así, al evaluar la función (2a) en $ep_0 = 0$, esta toma el valor: $f(0) = K_2 s_0$, el cual siempre es positivo o cero puesto que K_2 , por definición, es una constante positiva y s_0 , al ser una concentración, también es positiva. Nótese que la expresión que se encuentra encerrada entre los paréntesis rectangulares en la expresión (2a) es la que determina el signo que toma la función, por lo que si se cumple que:

$$ep_0 = ep_1 = \frac{K_2 s_0}{s_0 (K_2 + K_{-2}) + K_{-1} K_{-2} + K_2 K_3} \quad (5),$$

entonces la función toma el valor: $f(ep_1) = -K_3 (s_0 + K_{-2}) ep_1$, el cual es negativo puesto que s_0 , K_{-1} , K_3 y ep_1 son positivos. De lo anterior, se tiene que entre los extremos del intervalo:

$$0 \leq ep_0 \leq ep_1 = \frac{K_2 s_0}{s_0 (K_2 + K_{-2}) + K_{-1} K_{-2} + K_2 K_3} \quad (6),$$

la función $f(ep_0)$ cambia por lo menos una vez de signo y, por lo tanto, dentro del debe existir por lo menos una raíz para la función. Este es el intervalo de estudio.

Una vez que se han calculado los estados estacionarios, el siguiente paso consiste en determinar las características de estabilidad local de cada uno de ellos, esto es, se debe determinar la dirección que tienen las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales en una vecindad centrada en cada uno de los estados estacionarios encontrados; si estas soluciones se dirigen hacia el estado estacionario entonces se dice que este es localmente estable y si, por el contrario, se alejan de él entonces se dice que es localmente inestable.

Si se definen las vecindades centradas en los estados estacionarios de la siguiente forma:

$$se \leq se_0 \leq oe \quad (3a),$$

$$e\dot{p} \leq e\dot{p}_0 \pm e\dot{n} \quad (3b),$$

donde se_0 , ep_0 son los valores de los estados estacionarios y oe , en representan valores arbitrariamente pequeños, entonces el sistema de ecuaciones diferenciales que se debe resolver es de la forma:

$$\frac{dse}{dt} = \frac{dse}{dt} = f(se_0, oe, ep_0, \pm en) \quad (4a),$$

$$\frac{dep}{dt} = \frac{dep}{dt} = g(se_0, oe, ep_0, \pm en) \quad (4b).$$

Las funciones f y g pueden ser aproximadas, sin cometer un error apreciable en el cálculo, por sus desarrollos en series de Taylor alrededor de los valores se_0 y ep_0 (G. M. Odell, 1980) en la forma siguiente:

$$f(se_0, \pm oe, ep_0, \pm en) \approx f(se_0, ep_0) + \left(\frac{\partial f}{\partial se}\right)_{se_0, ep_0} oe + \left(\frac{\partial f}{\partial ep}\right)_{se_0, ep_0} en + [\text{términos de orden superior}] \quad (5a),$$

$$g(se_0, \pm oe, ep_0, \pm en) \approx g(se_0, ep_0) + \left(\frac{\partial g}{\partial se}\right)_{se_0, ep_0} oe + \left(\frac{\partial g}{\partial ep}\right)_{se_0, ep_0} en + [\text{términos de orden superior}] \quad (5b).$$

Puesto que sólo se está interesado en el comportamiento del sistema de ecuaciones diferenciales dentro de la vecindad (3) se pueden ignorar los términos de orden superior en el desarrollo pues su contribución al valor total de la función es pequeño. Esto da por resultado el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dse}{dt} \approx [-(s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi_{ep_0}})]oe + [e^{\phi_{ep_0}} \{\phi(K_{-2} ep_0 - K_2 se_0) + K_{-2} I - s_0\}]en \quad (6a),$$

$$\frac{dep}{dt} \approx [K_2 e^{\phi_{ep_0}}]oe + [e^{\phi_{ep_0}} \{\phi(K_2 se_0 - K_{-2} ep_0) - K_{-2} I - K_2\}]en \quad (6b).$$

Como puede observarse, se ha obtenido un sistema de ecuaciones diferenciales lineales (los términos encerrados por paréntesis rectangulares son constantes) para el cual se puede obtener fácilmente su solución como funciones de la forma:

$$oe = oe_0 e^{\lambda t} \quad (7a),$$

$$en = en_0 e^{\lambda t} \quad (7b),$$

Al sustituir estas funciones en el sistema (6) se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones lineales homogéneo:

$$a_{11}(a_{11} - \lambda) + e\eta(a_{12}) = 0 \quad (8a),$$

$$a_{21}(a_{21}) + e\eta(a_{22} - \lambda) = 0 \quad (8b);$$

donde:

$$a_{11} = [-(s_0 + K_{-1} + K_2 e^{\phi_{EP} \phi_0})] \quad (9a),$$

$$a_{12} = [e^{\phi_{EP} \phi_0} (\phi(K_{-2} e_{P_0} - K_2 s_0 e_0) + K_{-2}) - s_0] \quad (9b),$$

$$a_{21} = [K_2 e^{\phi_{EP} \phi_0}] \quad (9c),$$

$$a_{22} = [e^{\phi_{EP} \phi_0} (\phi(K_2 s_0 e_0 - K_{-2} e_{P_0}) - K_{-2}) - K_2] \quad (9d).$$

El sistema (8) debe satisfacer la ecuación:

$$\lambda^2 - T\lambda + \Delta = 0 \quad (10);$$

$$\text{con: } T = a_{11} + a_{22} \text{ y } \Delta = a_{11} a_{22} - a_{12} a_{21} \quad (11),$$

para tener soluciones no triviales. Puesto que la ecuación (10) es cuadrática, sus dos soluciones son de la forma:

$$\lambda_1 = (T + (T^2 - 4\Delta)^{1/2})/2 \quad (12a),$$

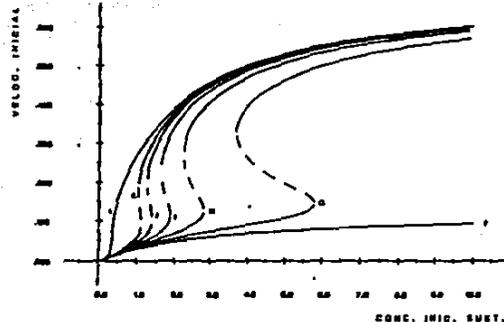
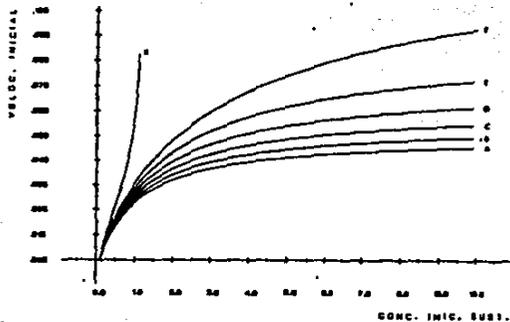
$$\lambda_2 = (T - (T^2 - 4\Delta)^{1/2})/2 \quad (12b).$$

Las soluciones del sistema linealizado (6) son funciones exponenciales donde λ determina el signo del argumento. Entonces el signo de la parte real de λ determina si la función crece o decrece y, por lo tanto, determina que dirección toman las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias dentro de la vecindad del estado estacionario. Un caso muy importante se presenta cuando los valores que toman los distintos parámetros del sistema hacen que λ_1 y λ_2 sean números imaginarios puros. Esto indica que es posible que a partir de tales condiciones se generen soluciones periódicas para el sistema. Los valores para el parámetro libre que cumplen con estas últimas condiciones se denominan puntos de bifurcación de Hopf.

Una vez realizado el análisis de estabilidad local para los estados estacionarios del sistema de ecuaciones diferenciales, se procede a realizar el análisis de estabilidad estructural o análisis de bifurcación. Para esto se escoge, de manera arbitraria, a alguno de los parámetros que definen al sistema (el parámetro libre) y se modifica ligeramente su valor respecto del que se le asignó inicialmente. Lo anterior origina un nuevo conjunto de valores para los parámetros con

el cual se calculan nuevamente los estados estacionarios del sistema y su estabilidad local.

El objetivo del análisis de estabilidad estructural es determinar la forma como dependen tanto el número de estados estacionarios del sistema de ecuaciones diferenciales como su estabilidad local del parámetro libre. Con esta información es posible predecir el tipo de soluciones no estacionarias que posee el sistema.

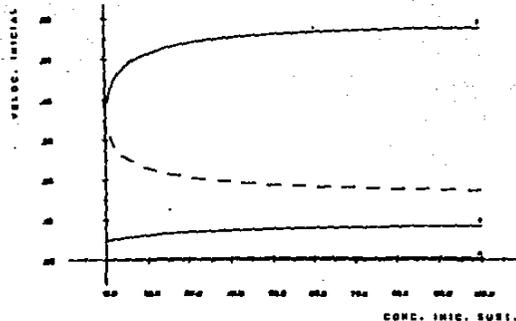
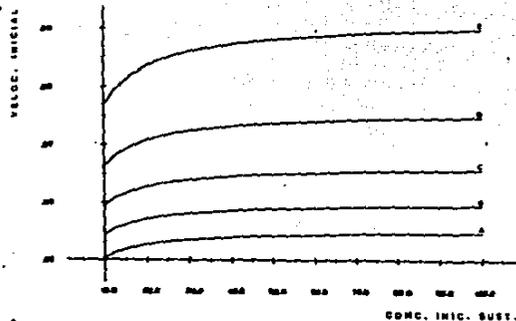


FIGURAS 1A Y 1B.
CURVAS DE VELOCIDAD INICIAL CONTRA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

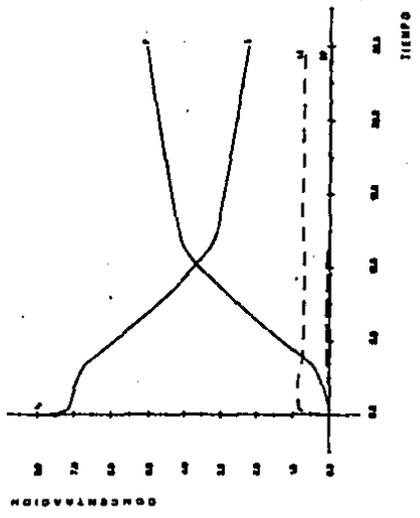
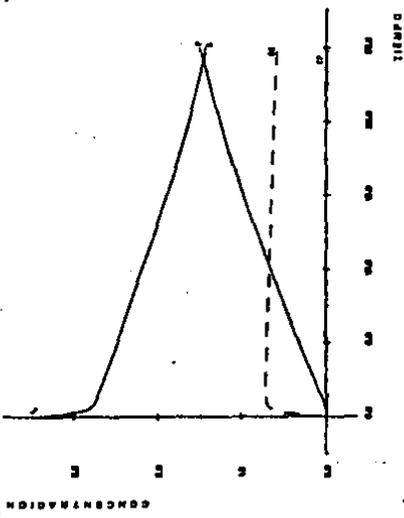
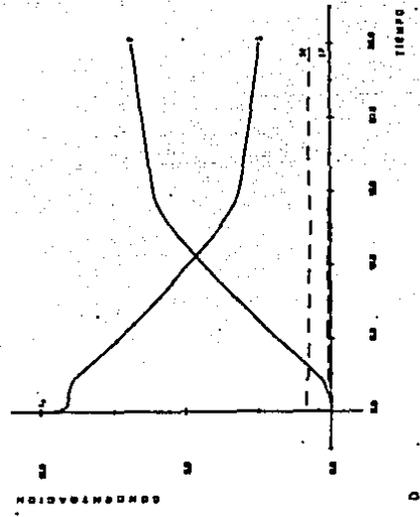
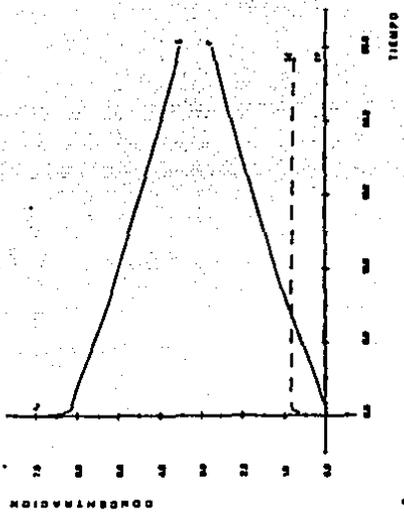
Los valores para el parámetro libre ϕ son: A) 0.00, B) 10.00, C) 20.00, D) 30.00, E) 40.00, F) 50.00, G) 60.00, H) 70.00, I) 80.00, J) 90.00, K) 100.00 y L) 200.00 unidades.

Notese que todas las curvas con valores mayores o iguales a 50.00 unidades para ϕ presentan zonas donde aparecen multiples velocidades iniciales. La curva con el valor de 200.00 unidades para ϕ presenta una zona de multiplicidad muy estrecha.



FIGURAS 2A Y 2B.
CURVAS DE VELOCIDAD INICIAL CONTRA CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades. Los valores para el parámetro libre ϕ son A) 0.00, B) 10.00, C) 20.00, D) 30.00, E) 40.00 y F) 50.00 unidades. Notese que solo la curva con el valor de 50.00 unidades para ϕ muestra multiplicidad de velocidades iniciales en este intervalo de variación para la concentración inicial de sustrato.



FIGURAS 3A, 3B, 3C Y 3D. (PÁGINA ANTERIOR).
DINÁMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA. SISTEMA CERRADO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

El valor para el parámetro ϕ es: 60.00 unidades.

Los valores para la concentración inicial de sustrato s_0 son: fig. 3A) 3.50, fig. 3B) 7.00, fig. 3C) 7.50 y fig. 3D) 10.00 unidades.

Símbolos: S; concentración del sustrato, SE; concentración del complejo sustrato-enzima, EP; concentración del complejo enzima-producto, P; concentración del producto y s_0 ; concentración inicial de sustrato.

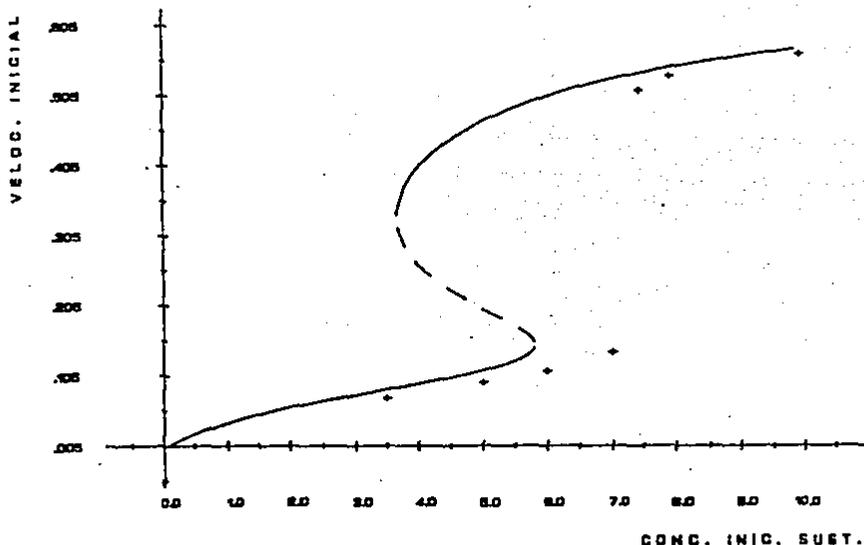


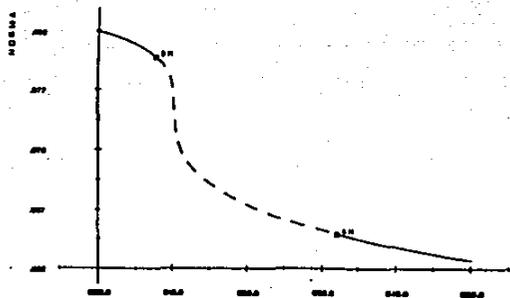
FIGURA 4.
CURVA DE VELOCIDAD INICIAL CONTRA CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUSTRATO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

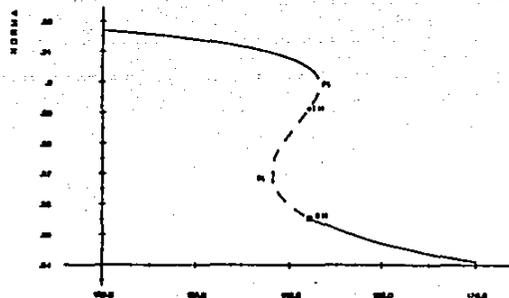
El valor para el parámetro ϕ es: 60.00 unidades.

La curva con trazo continuo representa la curva de velocidad inicial calculada bajo la hipótesis de pseudo estado estacionario.

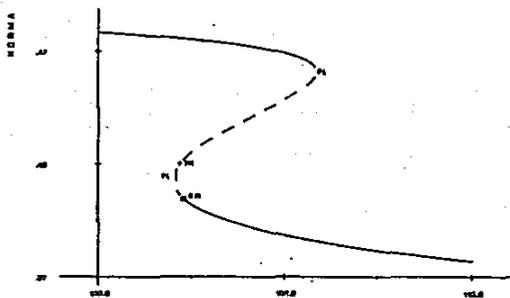
Las cruces representan las velocidades iniciales que se calcularon de la simulación numérica de la dinámica.



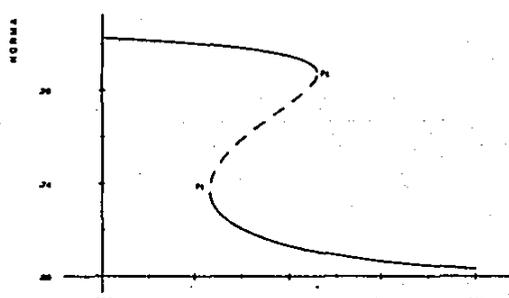
PHI (PARAM. LIBRES)



PHI (PARAM. LIBRES)



PHI (PARAM. LIBRES)



PHI (PARAM. LIBRES)

D

FIGURAS 5A, 5B, 5C Y 5D. (PÁGINA ANTERIOR).
CURVAS DE NORMA CONTRA PARÁMETRO LIBRE.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades. Los valores para la concentración constante de sustrato s_0 son: fig. 5A) 0.10, fig. 5B) 0.50, fig. 5C) 1.00 y fig. 5D) 5.00 unidades. Las zonas que aparecen con trazo discontinuo corresponden a los estados estacionarios que son localmente inestables. Simbolos: BH: punto de bifurcación de Hopf, PL: punto límite, TH: trayectoria homocliana.

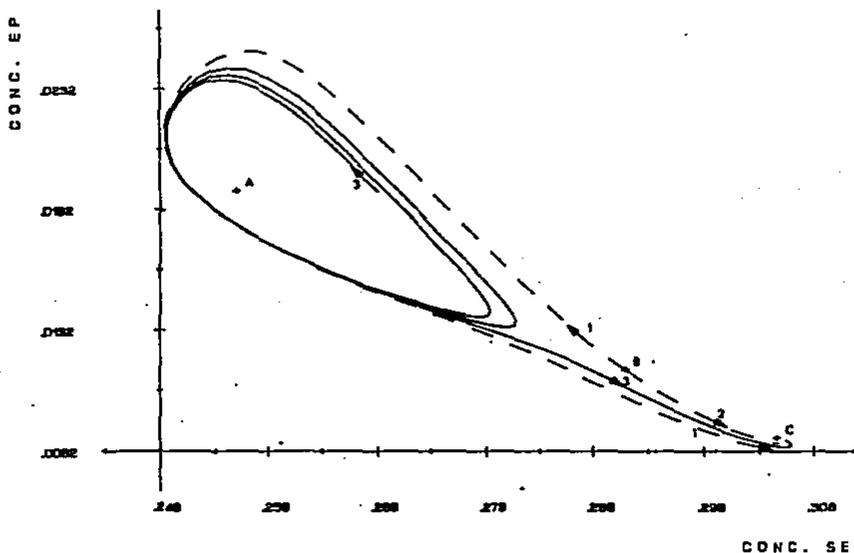


FIGURA 6.
DINÁMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA. SISTEMA ABIERTO.
PLANO FASE: CONCENTRACIÓN DE SE CONTRA CONCENTRACIÓN DE EP.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

El valor para la concentración constante de sustrato s_0 es: 0.50 unidades.

El valor para el parámetro libre ϕ es: 161.00 unidades.

Las cruces marcan las posiciones de los estados estacionarios. Los estados estacionarios A y B son localmente inestables, mientras que el estado estacionario C es localmente estable.

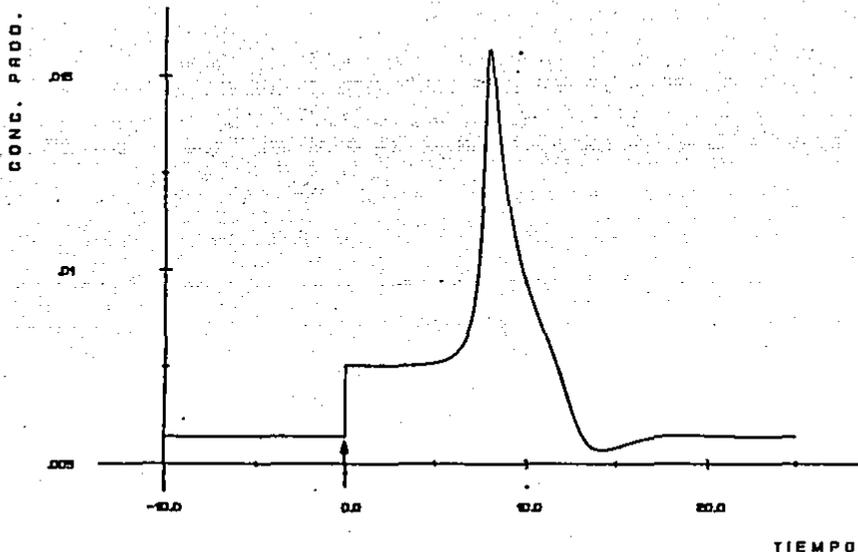
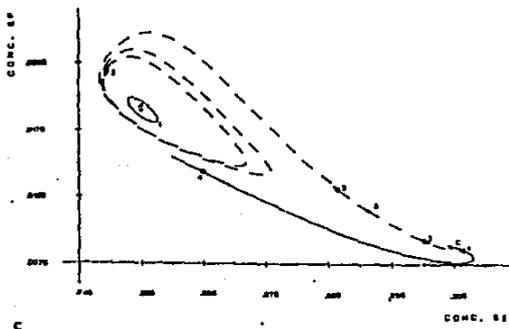
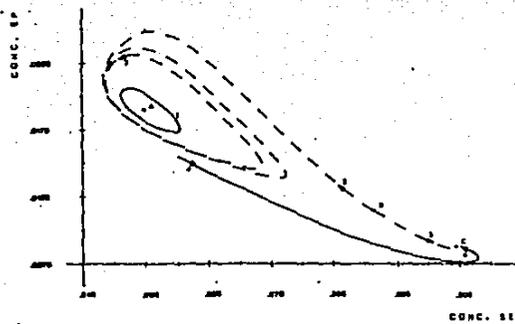
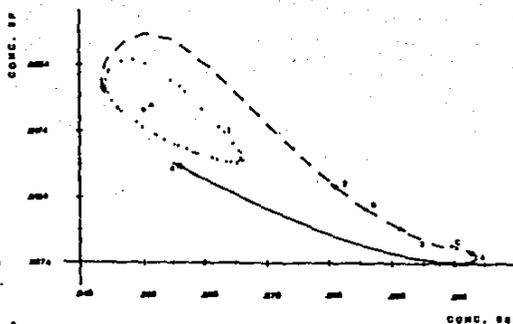


FIGURA 7.
DINÁMICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA, SISTEMA ABIERTO.
EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA CONCENTRACIÓN DE PRODUCTO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_1 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_2 = 6.50$ unidades.
El valor para la concentración constante de sustrato s_0 es: 0.50 unidades.
El valor para el parámetro libre ϕ es: 161.00 unidades.
La flecha señala el momento en el que se aplica la perturbación al sistema.



FIGURAS 8A, 8B Y 8C.
DINAMICA DE LA REACCION ENZIMATICA.
SISTEMA ABIERTO.
PLANO FASE: CONCENTRACION DE SE CONTRA
CONCENTRACION DE EP.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_3 = 0.50$ y $K_4 = 6.50$ unidades. El valor para la concentración constante de sustrato s_0 es: 0.50 unidades. Los valores para el parámetro libre ϕ son: fig. 8A) 161.011, fig. 8B) 161.040 y fig. 8C) 161.050 unidades.

Las cruces marcan las posiciones de los estados estacionarios. Los estados estacionarios A y B son localmente inestables, mientras que el estado estacionario C es localmente estable. La trayectoria cerrada (marcada como 1) corresponde al ciclo limite.

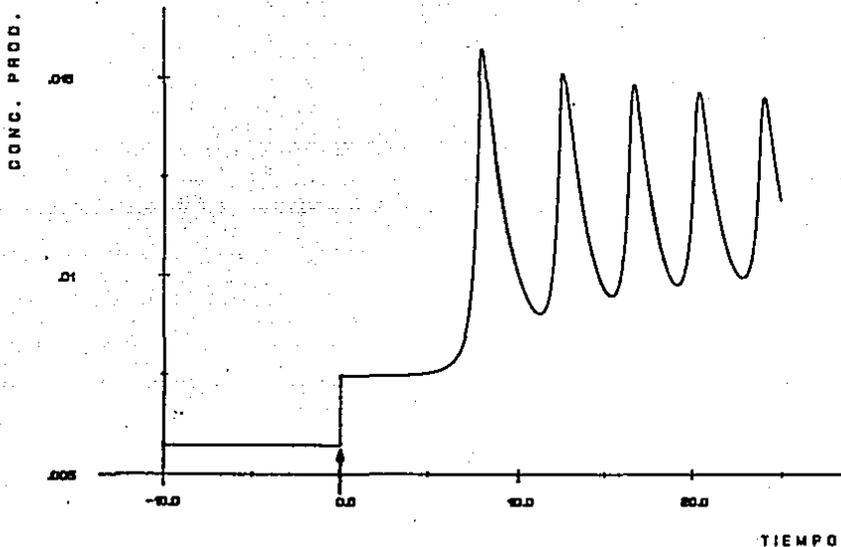


FIGURA 9.
DINAMICA DE LA REACCION ENZIMATICA. SISTEMA ABIERTO.
EVOLUCION TEMPORAL DE LA CONCENTRACION DE PRODUCTO.

Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_{-1} = 0.94$, $K_2 = 0.06$, $K_{-2} = 0.50$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

El valor para la concentración constante de sustrato s_0 es: 0.50 unidades.

El valor para el parámetro libre ϕ es: 161.040 unidades.

La flecha señala el momento en el cual se aplica la perturbación al sistema.

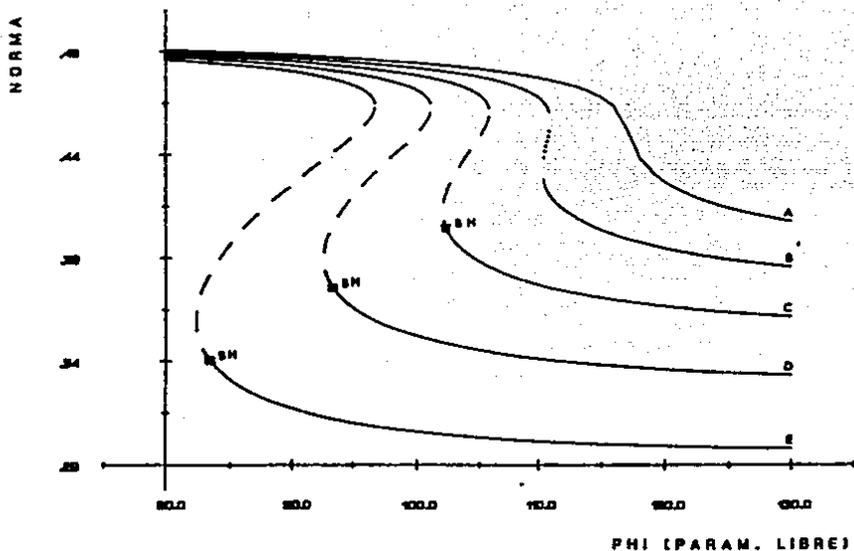


FIGURA 10.
CURVAS DE NORMA CONTRA PARÁMETRO LIBRE.

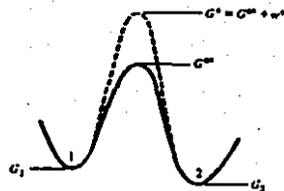
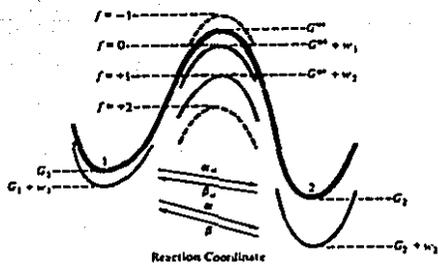
Los valores para los parámetros relacionados con las constantes de velocidad son: $K_1 = 0.94$, $K_2 = 0.06$ y $K_3 = 6.50$ unidades.

El valor para la concentración constante de sustrato s_0 es: 1.00 unidades.

Los valores para el parámetro K_{-2} son: A) 0.70, B) 0.60, C) 0.50, D) 0.40 y E) 0.30 unidades.

Las zonas que aparecen con trazo discontinuo corresponden a los estados estacionarios que son localmente inestables.

Simbolos: BH: punto de bifurcacion de Hopf.



FIGURAS A Y B.
EFECTO DE LAS INTERACCIONES INTERMOLECULARES SOBRE LOS NIVELES DE ENERGIA LIBRE DE GIBBS.

FIG. A) EFECTO TANTO SOBRE LOS NIVELES ENERGETICOS COMO SOBRE LA ALTURA DE LA BARRERA ENERGETICA. FIG. B) EFECTO EXCLUSIVAMENTE SOBRE LA ALTURA DE LA BARRERA ENERGETICA.

Bibliografía

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1983). *Molecular biology of the cell*. Garland, New York.
- Aman, Y., and Gó, N. (1978). Behavior of chemical reaction catalyzed by allosteric enzymes: Threshold phenomena and discontinuous transition to oscillatory state. *J. theor. Biol.* 72, 283-296.
- Aman, Y., and Gó, N. (1979). Solitary wave and spatially locked solitary pattern in a chemical reaction system. *J. theor. Biol.* 80, 171-183.
- Bianquet, P. R. (1978). Unifying heuristic model of transmembrane co-ordinate control for cell growth and cell movement. *J. theor. Biol.* 70, 345-399.
- Blumenthal, R. (1975). Instabilities, oscillations and chemical waves in an oligomeric model for membrane transport. *J. theor. Biol.* 49, 219-239.
- Brush, S. G. (1967). History of the Lenz-Ising model. *Rev. Mod. Phys.* 39, 883-893.
- Carnahan, B., Luther, H. A., and Wilkes, J. O. (1969). *Applied Numerical Methods*. Wiley, New York.
- Changeux, J. P., Thiery, J., Tung, I., and Kittel, C. (1967). On the cooperativity of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 335-341.
- Cheer, A., Vincent, J. P., Nuccitelli, R., and Oster, G. (1987). Cortical activity in vertebrate eggs I: The activation waves. *J. theor. Biol.* 124, 377-404.
- Doedel, E. (1984). The computer-aided bifurcation analysis of predator-prey models. *J. Math. Biology* 20, 1-14.
- Doedel, E. J., and Kernevez, J. P. (1985). Software for continuation problems in ordinary differential equations with applications. California Institute Of Technology.
- Ghosh, P. K., and Sengupta, D. (1978). A model for the temperature dependance of membrane excitability. *J. theor. Biol.* 73, 609-614.
- Goldbeter, A., and Segel, L.A. (1980). Control of development transitions in the cyclic AMP signalling system of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* 17, 127-135.
- Hase, A. (1982). Changes in phospholipid composition during the development of *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 219, 21-29.
- Hayashi, K., and Sakamoto, N. (1986). *Dynamic analysis of enzyme systems. An introduction*. Japan Scientific Societies Press, Tokio.
- Hill, T. L., and Chen, Y. (1984). Phase changes at the end of a microtubule with a GTP cap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5772-5776.
- Hill, T. L. (1985). *Cooperativity theory in biochemistry. Steady-state and equilibrium systems*. Springer-Verlag, New York.
- Jacobson, K., Ishihara, A. and Inman, R. (1987). Lateral diffusion of proteins in membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 49, 163-175.

- Kaczmarek, L. K. (1976). Frequency sensitive biochemical reactions. *Biophys. Chem.* 4, 249-251.
- Kaprelyants, A. S. (1988). Dynamic spatial distribution of proteins in the cell. *Trends Biochem. Sci.* 13, 43-46.
- Kijima, H., and Kijima, S. (1978). Co-operative response of chemically excitable membrane. I. Formulation: unified theory of co-operativity. *J. theor. Biol.* 71, 567-585.
- Kirsten, H., Gehrings, H., and Christen, P. (1983). Crystalline aspartate aminotransferase: Lattice-induced functional asymmetry of the two subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1807-1810.
- Lenaz, G. (1978). Organization and role of lipids in membranes. In Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D. H., and Tzagoloff, A. (eds.) *The molecular biology of membranes*. Chap. 3. Plenum Press, New York.
- Lin, C. C., and Segel, L. A. (1974). *Mathematics applied to deterministic problems of the natural sciences*. Macmillan, New York.
- Michelsen, M. L. (1976). An efficient general purpose method for the integration of stiff ordinary differential equations. *AIChE J.* 22, 594-597.
- Murray, J. D. (1977). *Lectures on nonlinear-differential-equation models in biology*. Clarendon Press, Oxford.
- Nicolis, G., and Prigogine, I. (1977). *Self-organization in nonequilibrium systems. From dissipative structures to order through fluctuations*. Wiley, New York.
- Odell, G. M. (1980). Qualitative theory of systems of ordinary differential equations, including phase plane analysis and the use of the Hopf bifurcation theorem. In Segel, L. A. (ed.), *Mathematical models in molecular and cellular biology*. Appendix A3. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ricard, J. and Noat, G. (1984). Subunit interactions in enzyme transition states. Antagonism between substrate binding and reaction rate. *J. theor. Biol.* 111, 737-753.
- Ricard, J., and Cornish-Bowden, A. (1987). Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on. *Eur. J. Biochem.* 166, 255-272.
- Rice, J. R. (1983). *Numerical methods, software, and analysis*. IMSL reference edition. McGraw-Hill, New York.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics*. Wiley, New York.
- Segel, L. A. (1988). On the validity of the steady state assumption of enzyme kinetics. *Bull. math. Biol.* 50, 579-593.
- Stráskler, S., and Kittel, C. (1965). Degeneracy and the order of the phase transformation in the molecular-field approximation. *Phys. Rev.* 139, A758-A760.
- Tagami, Y. (1978). A perm-selective model membrane exhibiting oscillatory behavior. *J. theor. Biol.* 73, 739-754.
- Iyson, J. J., and Light, J. C. (1973). Properties of two-component bimolecular and trimolecular chemical reaction systems. *J. Chem. Phys.* 59, 4164-4173.
- Vanderkoos, G. (1978). Organization of protein and lipid components in

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

membranes. In Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D. H., and Tzagoloff, A. (eds.) The molecular biology of membranes. Chap. 1. Plenum Press, New York.

Veenhuis, M., Harder, W., Van Diiken, P., and Mayer, F. (1981). Substructure of crystalline peroxisomes in methanol-grown *Hansenula polymorpha*: Evidence for an In Vivo crystal of alcohol oxidase. *Mol. Cell. Biol.* 1, 949-957.

Welch, G. R., Keleti, T., and Vértessy, B. (1988). The control of cell metabolism for homogeneous vs. heterogeneous enzyme systems. *J. theor. Biol.* 130, 407-422.

Wolf, D. E., Kinsey, W., Lennarz, W., and Edidin, M. (1981). Changes in the organization of the sea urchin egg plasma membrane upon fertilization: Indications from the lateral diffusion rates of lipid-soluble fluorescent dyes. *Dev. Biol.* 81, 133-138.