

6. Comportamiento oscilatorio en sistemas biológicos

6.1. Autoorganización a nivel temporal en los seres vivos

Cuando se habla de la estructura de los seres vivos, normalmente se hace referencia al aspecto espacial; es decir al modo más o menos complejo según el cual se disponen en el espacio los componentes que lo forman. Pero existe otro aspecto estructural tan importante como el anterior, que hace referencia a la organización en el tiempo: los *ciclos*, *ritmos*, *periodos vitales*, y demás manifestaciones dinámicas de un ser vivo. Como se ha visto en capítulos anteriores, estas dos formas de estructuración de un sistema son consecuencia de procesos irreversibles y en general vienen recogidas bajo el término autoorganización. En el presente capítulo vamos a presentar algunos de los ejemplos más significativos de esta organización a nivel temporal. Los aspectos, y consiguientes ejemplos, de la organización espacio-temporal, se verán en el próximo capítulo.

El fenómeno oscilatorio se manifiesta en muchos sistemas físicos. En este sentido los sistemas biológicos no son los únicos en presentar esta fenomenología, aunque dada su característica complejidad, sí son los más variados y numerosos. Este hecho ha llevado a que el estudio del comportamiento rítmico de los sistemas biológicos, y más concretamente de los seres vivos, haya sido centro de interés de numerosas disciplinas científicas. Este interés común llevó en 1960, en el simposio sobre "Relojes Biológicos" celebrado en Cold Spring Harbor (Nueva York), a acuñar el término *Cronobiología* para designar a la *disciplina que tiene por objeto el estudio de los ritmos biológicos*. Desde entonces se ha venido comprobando que el comportamiento periódico de los sistemas biológicos es la vía universal de organización y señalización entre ellos. Se ha comprobado que la ritmidad es la regla y no la excepción; es el estado que podríamos llamar normal de los seres vivos. En la tabla 6.1. se muestran algunos ejemplos de oscilaciones que tienen lugar a nivel celular. La existencia de estos relojes como estructura básica de la materia viva hay que entenderla como una consecuencia de la evolución y selección. Esta, digamos, ventaja selectiva del comportamiento periódico frente al estacionario, se debe a que dicho comportamiento le confiere al ser vivo, entre

TABLA 6.1. Ejemplos biológicos de oscilaciones ultradianas

TIPO	PERIODO	ORGANISMO-PREPARACION
Reacciones enzimáticas Flujo de amonio actividad ATPasa creatina-quinasa glicosis lactato deshidrogenasa oxidación transporte iónico en mitocondrias fotosíntesis respiración	1-3 min 1-2.5 min 3-10 min 2s - 3 h 1-3 min 1 min 1-3- min 1 h	<i>Scenedesmus</i> microsomas cerebro y riñón extracto músculo cardiaco células y extractos: levadura y músculo <i>Acetabularia</i> rábano mitocondrias de hígado de rata <i>Chlorella</i> y otras algas celulares <i>A. Castellanii</i>
Síntesis de proteínas aspartato y ornitina trans-carbamilasas, deshidrogenasa, histidasa β -galactosidasa, síntesis de piruvato α -glucosidasa, glutamato deshidrogenasa lactato y glucosa-6-P deshidrogenasas, aldolasa síntesis de proteínas proteína celular total	1 h 50-60 min 1.5-6.5 h 3-4 h 0.5-1 h 1 h	<i>Bacillus subtilis</i> <i>E. Coli</i> <i>S. cerevisiae</i> hamster embrión de erizo de mar <i>A. castellanii</i>
Potencial de membrana potencial de membrana hiperpolarización espontánea	6 s - 2 min 1 s	células L de fibroblasto de ratón <i>Neurospora, Nitella</i> páncreas

otras propiedades, mayor adaptabilidad, posibilidades de sincronización, reconocimiento y comunicación, permitiéndole además una mayor resistencia a fluctuaciones y perturbaciones ambientales.

Históricamente los ritmos biológicos se han dividido en dos grupos:

a) *Autónomos o internos*, aquellos que son producidos exclusivamente por un oscilador interno al propio ser vivo. En este grupo se encuentran numerosos ritmos biológicos que abarcan, a su vez, una amplia gama de periodicidades o frecuencias. Ordenados de menor a mayor periodo, como se muestra en la figura 6.1, se pueden destacar los siguientes ritmos:

- *Potencial eléctrico de neuronas*: oscilaciones ultrarrápidas del orden de milisegundos, y que son la base de la organización nerviosa y de la codificación de la señal neuronal.
- *Oscilaciones metabólicas*: oscilaciones de mayor periodo, donde se encuentran los ritmos bioquímicos propios del metabolismo intermediario (el ejemplo más conocido son las *oscilaciones glicolíticas*, que se estudiarán en detalle en el siguiente apartado). Presentan periodos que van desde segundos a minutos.

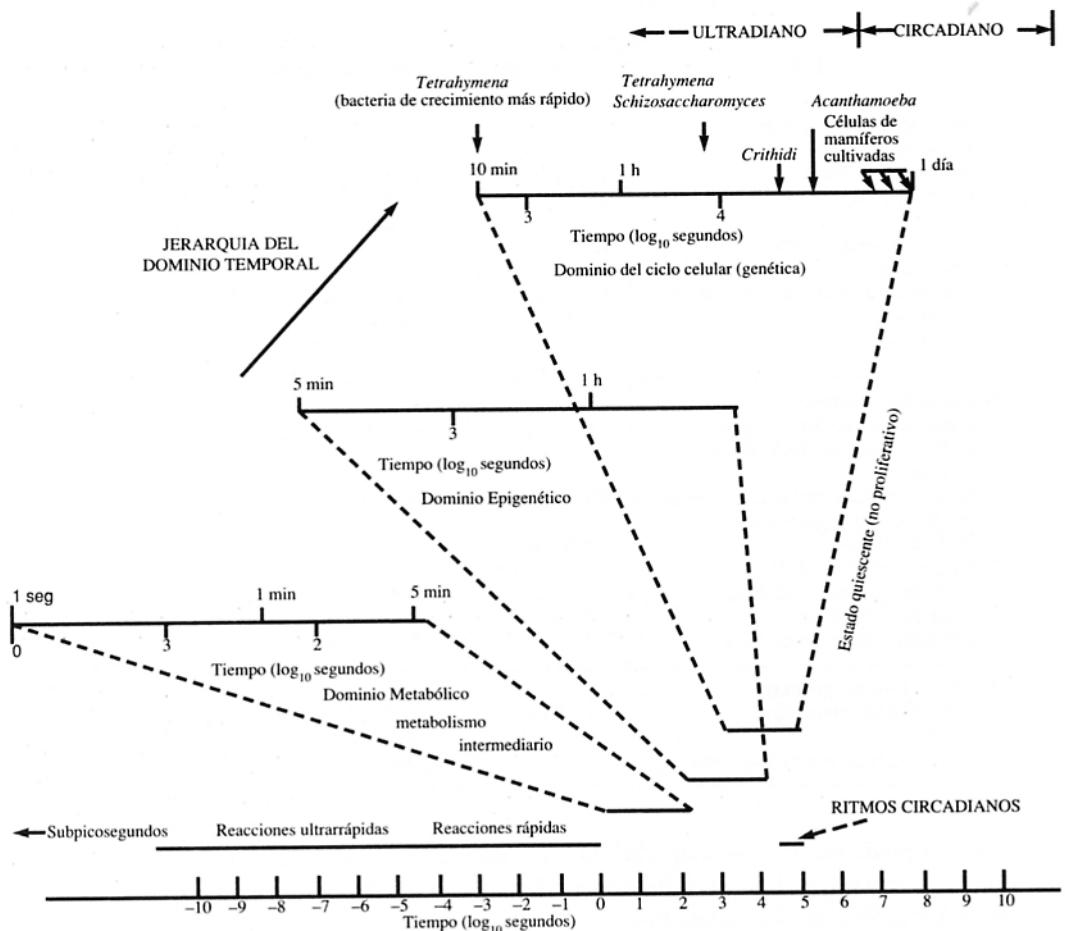


Figura 6.1. Representación de diferentes ritmos biológicos en función de su periodo. Adaptado de Lloyd y Edwards (1984).

- **Oscilaciones epigenéticas:** denominadas así porque son producidas mediante el control genético. Son del orden de las horas, y algunas de las cuales se postulan como base del ciclo celular. De este tipo de oscilaciones veremos un ejemplo en el operón *Lac* en el apartado 6.7.
- **Oscilaciones a nivel celular:** dominio que se encuentra solapando con el anterior en la escala de periodos, que comprenden desde varios minutos a varias horas. En este grupo se pueden incluir diversos tipos de comportamientos periódicos: *ciclo celular*, procesos de *comunicación celular* por pulsos (apartado 6.9), *señalización hormonal* en animales superiores, etc. En el grupo del ciclo celular se recogen ciclos que van desde varios minutos,

tal como ocurre en el ciclo celular de bacterias de crecimiento rápido, hasta varias horas, como el tiempo medio de división de células de mamíferos. Por último, también se encuentran ejemplos de ritmos autónomos de periodicidad superior a un día, como son los ciclos hormonales reproductivos mensuales.

- b) *Sincronizados o acoplados*, en los que el ritmo es resultado de la sincronización de un reloj interno con un oscilador externo. Este tipo de ritmos será objeto de estudio más detallado en el próximo capítulo. Los ritmos más significativos de este grupo son los llamados *ritmos circadianos*, acoplados al ciclo día-noche, y los *ritmos estacionales*, sincronizados con las variaciones anuales climatológicas, de temperatura o de horas de luz. Por último, en el campo biológico también existen ciclos de periodicidad superior a un año, como son, por ejemplo, los detectados en las variaciones periódicas en algunas poblaciones de animales y plantas, o en determinados ecosistemas.

6.2. Oscilaciones metabólicas: oscilaciones en la glicolisis

En un gran número de sistemas en los que se ha encontrado comportamiento periódico a nivel bioquímico o celular, los procesos enzimáticos del metabolismo juegan un papel más o menos relevante. También existen procesos oscilatorios a nivel celular que aunque no están directamente implicados en el metabolismo son, de alguna manera, consecuencia de los procesos que tienen lugar en él. Un ejemplo de ello se encuentra en los sistemas que implican transporte a través de membranas. Unos y otros componen el "Atlas de Oscilaciones Celulares" catalogado por Rapp (1979), en el que se incluyen unos 450 casos de comportamiento oscilatorio a nivel celular, no acoplado a ritmos externos y con períodos inferiores a una o dos horas. En la tabla 6.1. se muestran algunos ejemplos de estos ritmos.

En relación con las oscilaciones metabólicas, clásicamente se han estudiado cuatro sistemas: glicolisis, mitocondria, oscilaciones controladas por AMP cíclico (cAMP) en el moho del lodo *Dictyostelium discoideum* y la reacción de la peroxidasa. De estos cuatro sistemas vamos a estudiar en este apartado el de la glicolisis.

Las oscilaciones glicolíticas fueron descritas por primera vez por Ghosh y Chance en 1964 en cultivos de levadura *Sacaromices*, cuando el medio de cultivo, bajo agitación constante, era alimentado con glucosa a un flujo determinado. A partir de esa fecha numerosos autores han encontrado comportamiento oscilatorio en la ruta glicolítica de diferentes sistemas experimentales: extractos libres de células de levadura *Sacaromices* (periodos de oscilación comprendidos entre 3-8 minutos), cultivos de células de levadura (30-90 minutos), extractos musculares (5-10 minutos) e incluso en sistemas reconstituidos artificialmente a partir de las enzimas originales (3-8 minutos). Sin embargo no han sido detectadas oscilaciones

glicolíticas en sistemas o tejidos con marcada actividad de gluconeogénesis, como por ejemplo en hígado.

Las oscilaciones glicolíticas en extractos de levadura se obtienen cuando el sistema de reacción es alimentado externamente con alguno de los sustratos iniciales de la ruta. En la figura 6.2 se presenta un esquema de dicha ruta glicolítica, donde se incluyen también etapas propias de la gluconeogénesis. La oscilación de los intermediarios glicolíticos ocurre en el rango de concentraciones de 10^{-5} a 10^{-3} M, con períodos del orden de minutos. El fenómeno se puede seguir fácilmente de modo continuo registrando el espectro de fluorescencia de NADH (figura 6.3) o los cambios de pH. Mediante muestreo durante las oscilaciones y análisis de los diferentes intermediarios se ha comprobado la oscilación de todos ellos, aunque con diferente fase, según se muestra de modo esquemático en la figura 6.4.

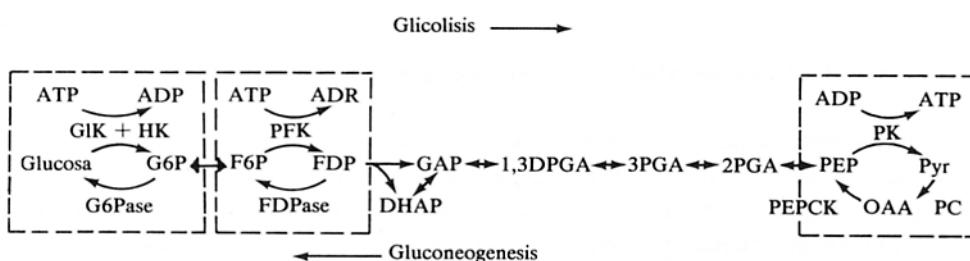


Figura 6.2. Esquema de la ruta glicolítica. Los recuadros representan los pasos irreversibles donde existen ciclos de substrato.

En cualquiera de los sistemas estudiados, el periodo y la amplitud de las oscilaciones depende de diversos factores, como la temperatura y la velocidad de suministro de sustrato desde el exterior. Sólo la adición de ADP en levadura y fructosa-1-6-difosfato (FDP), en músculo, producen desplazamientos de fase apreciables en la oscilación.

El análisis detallado de la ruta durante las oscilaciones mediante adición de inhibidores, sustratos de las distintas reacciones enzimáticas, y otros medios de control exterior, hicieron sospechar en principio en dos enzimas de la ruta como generadores de la oscilación: la fosfofructoquinasa (PFK) y la piruvicoquinasa (PK). Las sospechas cayeron más directamente en la PFK ya que el sustrato de su reacción, la fructosa-6-fosfato (F6P) es el último sustrato de la ruta capaz de inducir oscilación. La capacidad de producir oscilaciones de la PFK fue definitivamente probada al obtener dicho comportamiento en un sistema reconstituido *in vitro* con sólo dicha enzima y los sustratos de la reacción en el medio iónico adecuado.

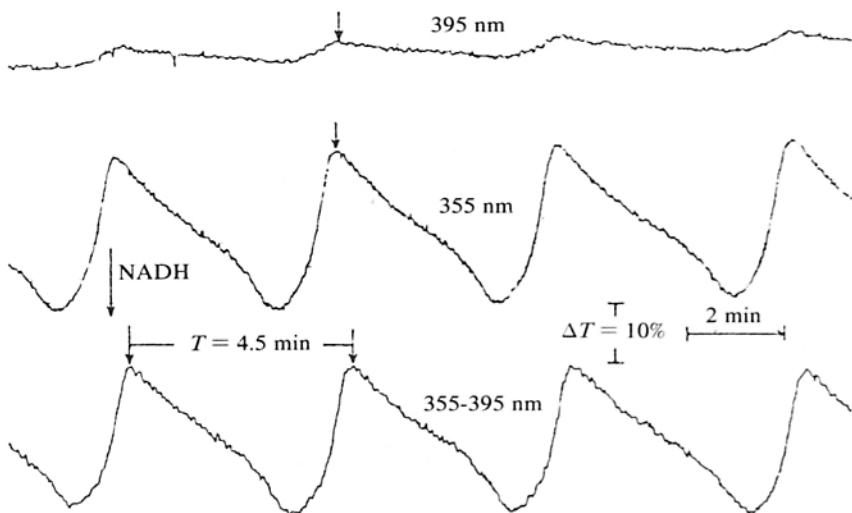


Figura 6.3. Oscilaciones glicolíticas. Registros de emisión de fluorescencia a varias longitudes de onda de extracto de levadura. Hess (1973).

Por último, se ha comprobado que esta enzima es, por otro lado, la que presenta mayor capacidad de activación-inhibición, y el paso que cataliza es casi irreversible. Además, la PFK es una enzima alóstérica capaz de ser regulada por gran número de metabolitos, entre otros los propios sustratos y productos de la reacción. En este sentido es especialmente importante la activación de la reacción por dos de los productos de la misma: ADP y FDP. Habrá que tener en cuenta todos estos datos a la hora de establecer el modelo que se explicará a continuación.

6.3. Modelo de oscilaciones glicolíticas

La elaboración de un modelo que explique y justifique las oscilaciones glicolíticas ha de hacerse teniendo en cuenta la información obtenida desde diferentes ángulos, tanto experimentales como teóricos, como se explicó en el capítulo anterior. Por un lado, los requisitos impuestos por la Termodinámica de Procesos Irreversibles y del análisis cinético para que aparezca autoorganización, y por otro los datos que configuran la trama experimental. Como veremos en este y otros modelos estudiados, la aparición de autoorganización implica tres condiciones básicas que siempre han de estar presentes: el sistema ha de ser abierto, alejado del equilibrio y en él se han de dar mecanismos generadores de inestabilidad que permitan la aparición de bifurcaciones.

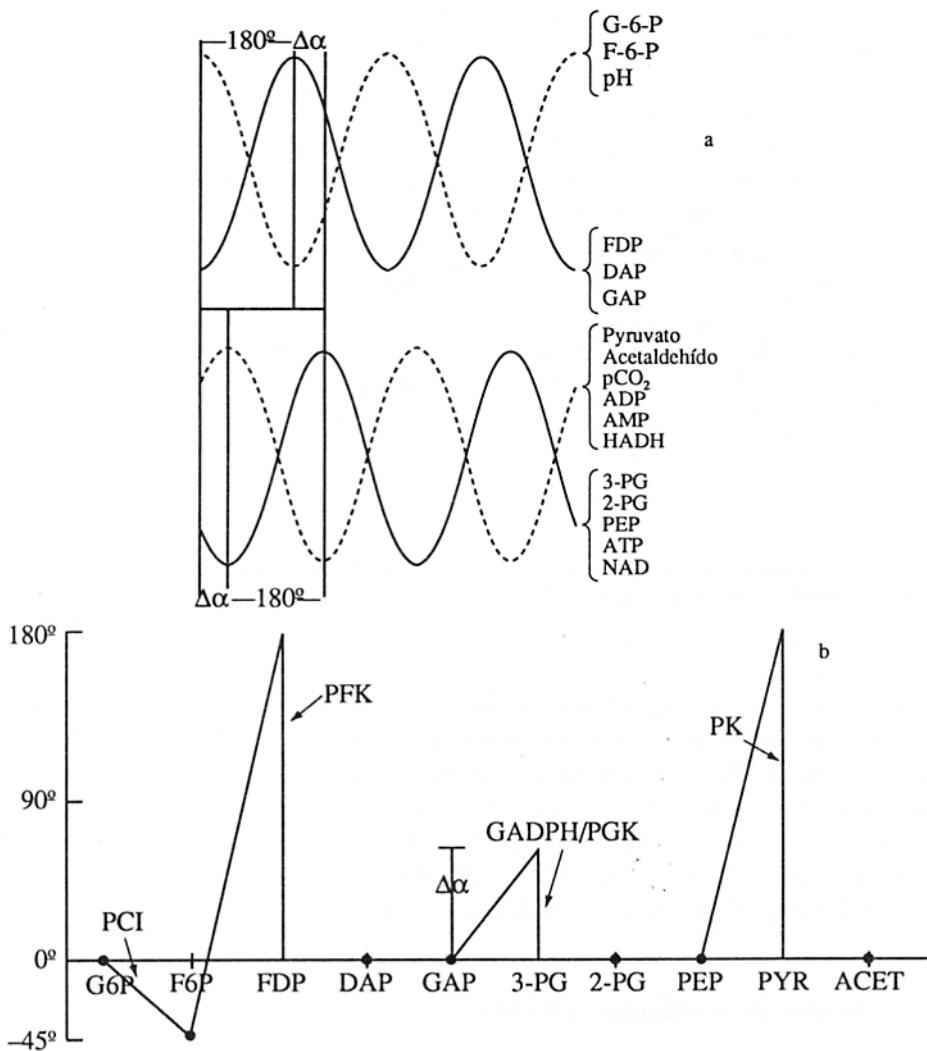


Figura 6.4. (a) Desfase de los intermediarios glicolíticos durante las oscilaciones. Las amplitudes están normalizadas. (b) Ángulo de desfase de los intermediarios glicolíticos durante las oscilaciones. Hess *et al.* (1969).

Desde el momento en que se determinó la reacción de la PFK como responsable de las oscilaciones glicolíticas, se propusieron diferentes modelos para explicar dicho comportamiento a la luz de los principios considerados anteriormente. El modelo que vamos a estudiar fue originalmente propuesto por Goldbeter y Lefever en 1972, aunque no es el único modelo propuesto para explicar las oscilaciones glicolíticas, aunque sí el más completo. Se pueden encontrar otros modelos en los

trabajos de Higgins (1964) y Sel'kov (1968). Más recientemente se han propuesto modelos que consideran el comportamiento no lineal de la ruta en su conjunto, como un sistema complejo interrelacionado cinéticamente, incluyendo efectos a larga distancia, relaciones de flujo, ramificaciones, etc.. En este tipo de modelos se ha encontrado oscilaciones de periodo muy largo (Dass y Busse, 1985) y la aparición de efectos de modulación y amplificación de las oscilaciones de la PFK por parte de la parte baja de la ruta glicolítica (García-Tejedor *et al.*, 1988). También en esta línea es llamativo la utilización de modelos eléctricos para simular el comportamiento oscilatorio de la glicolisis; en esta línea tenemos un ejemplo reciente en el trabajo de Boiteux y Busse (1989).

El modelo de Goldbeter y Lefever es un modelo simplificado que supone la activación de la PFK por el producto de la reacción mediante un mecanismo alóstérico según el modelo de Monod (Monod *et al.*, 1965). Las hipótesis y suposiciones del modelo se agrupan en dos:

- a) *Hipótesis estructural.* Esta hipótesis conduce al planteamiento del modelo cinético representado en la figura 6.5. En él se considera la PFK como una enzima alóstérica con dos subunidades, que cataliza la reacción:



donde, si se mantienen constantes F6P y FDP, el sistema se ve reducido a una reacción monosustrato, que transforma ATP (*S*) en ADP (*P*). Cada subunidad posee un centro activo que une sustrato y un centro alóstérico que une el producto, que es el regulador de la actividad de la enzima. Las subunidades pueden existir en dos conformaciones en equilibrio (constantes cinéticas k_1 y k_2), una activa *R* y otra menos activa *T* (inactiva en caso extremo), que difieren además por su afinidad por el sustrato y por el producto. La unión de producto al centro alóstérico o regulador de la enzima (constantes cinéticas *a* y *d*) desplaza el equilibrio a la forma activa de la enzima. Esto se contempla en el modelo cinético de la figura 6.5 suponiendo que el producto sólo se une a la conformación activa dando lugar al conjunto de formas rectangulares de la figura. Por simplicidad se supone que el sustrato se une al centro activo con las mismas constantes cinéticas, *a* y *d*, a la forma *R*, mientras que estas son diferentes para la forma *T* (*a'* y *d'*). Por último una vez unido el sustrato al centro activo se puede producir la reacción con una constante cinética *k*, para la forma *R* y *k'* para la *T*. Por supuesto en el mecanismo de activación del modelo está implícito que $k >> k'$, ya que la primera es la forma más activa; en el caso extremo si $k' = 0$, implicaría que la forma *T* es completamente inactiva.

b) *Hipótesis de entorno.* Se supone que el sistema es un sistema abierto, donde entra sustrato con una velocidad v_1 y se consume producto con velocidad proporcional a su concentración, siendo la constante cinética k_s .

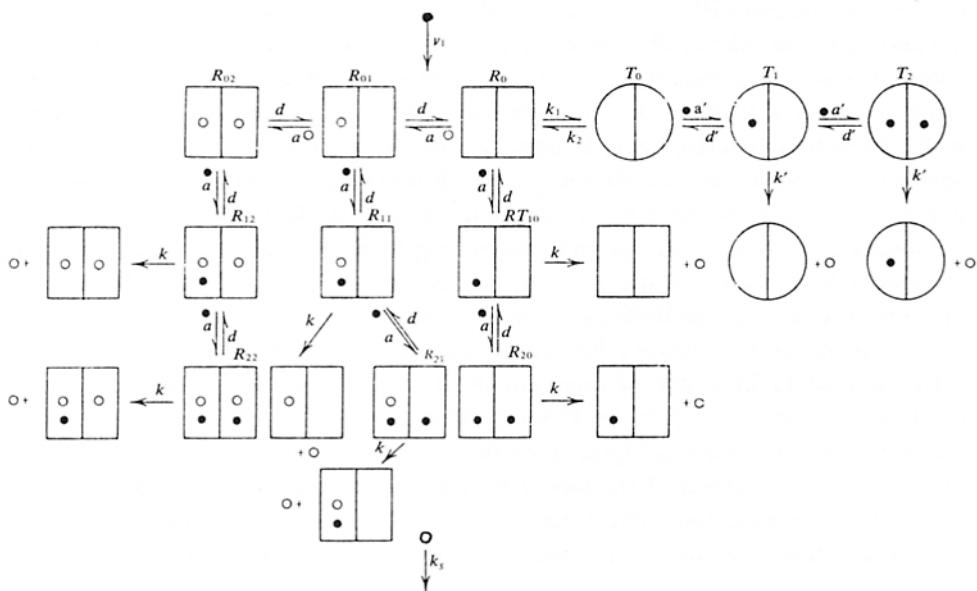


Figura 6.5. Modelo alostérico de activación de la enzima fosfo-fructo-quinasa por el producto de la reacción. La enzima se supone dimérica. Los círculos negros y blancos representan sustrato y producto, respectivamente. a y a' son las constantes de asociación del sustrato y producto a las formas R y T , respectivamente, mientras que d y d' representan las constantes de disociación. k y k' son las correspondientes constantes cinéticas del proceso de transformación de sustrato en producto. Goldbeter y Lefever (1972).

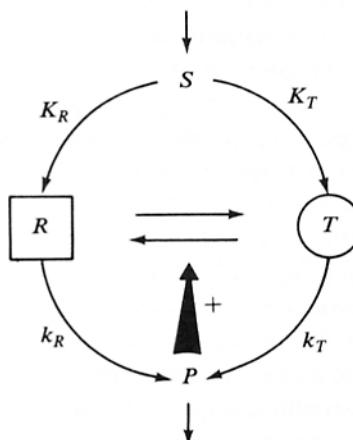


Figura 6.6. Modelo esquemático que representa el "feedback" positivo del producto en la reacción de la PFK. La presencia del producto desplaza el equilibrio desde la forma menos activa (T) a la más activa (R). Goldbeter y Martiel (1983).

El complejo modelo cinético de la figura 6.5 se puede representar de un modo más esquemático según se muestra en la figura 6.6. En ella se representan las dos conformaciones de la enzima PFK, a las cuales se puede unir sustrato con distinta afinidad K_R y K_T , dando lugar a dos procesos de reacción con constantes cinéticas diferentes k y k' . Por último la activación por parte del producto de la reacción se representa mediante la actuación de éste sobre el equilibrio $R-T$, desplazándolo hacia la forma más activa R .

A partir del modelo cinético planteado en la figura 6.5, se deducen las ecuaciones cinéticas correspondientes, que expresarán la variación en el tiempo de las diferentes especies moleculares presentes en el sistema, incluidos el sustrato y el producto; obteniéndose el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}
 \frac{dR_0}{dt} &= -k_1 R_0 + k_2 T_0 - 2aPR_0 + dR_{01} - 2aSR_0 + (d+k)R_{10} \\
 \frac{dR_{01}}{dt} &= 2aPR_0 - dR_{01} - aPR_{01} + 2dR_{02} - 2aSR_{01} + (d+k)R_{11} \\
 \frac{dR_{02}}{dt} &= aPR_{01} - 2dR_{02} - 2aSR_{02} + (d+k)R_{12} \\
 \frac{dR_{10}}{dt} &= 2aSR_0 - (d+k)R_{10} - aSR_{10} + 2(d+k)R_{20} \\
 \frac{dR_{11}}{dt} &= 2aSR_{01} - (d+k)R_{11} - aSR_{11} + 2(d+k)R_{21} \\
 \frac{dR_{12}}{dt} &= 2aSR_{02} - (d+k)R_{12} - aSR_{12} + 2(d+k)R_{22} \\
 \frac{dR_{20}}{dt} &= aSR_{10} - 2(d+k)R_{20} \\
 \frac{dR_{21}}{dt} &= aSR_{11} - 2(d+k)R_{21} \\
 \frac{dR_{22}}{dt} &= aSR_{12} - 2(d+k)R_{22} \\
 \frac{dT_0}{dt} &= k_1 R_0 - k_2 T_0 - 2a' ST_0 + (d' + k')T_1 \\
 \frac{dT_1}{dt} &= 2a' ST_0 - (d' + k')T_1 - a' ST_1 + 2(d' + k')T_2 \\
 \frac{dT_2}{dt} &= a' ST_1 - 2(d' + k')T_2 \\
 \frac{dS}{dt} &= v_1 - 2aS\Sigma_1 + (d-aS)\Sigma_2 + 2d\Sigma_3 - 2a'ST_0 + (d'-a'S)T_1 + 2d'T_2 \\
 \frac{dP}{dt} &= -2aPR_0 + (d-aP)R_{01} + 2dR_{02} + k\Sigma_2 + 2k\Sigma_3 + k'T_1 + 2k'T_2 - k_s P
 \end{aligned} \tag{6.2}$$

donde se han agrupado algunas de las formas enzimáticas según las igualdades:

$$\begin{aligned}\Sigma_1 &= R_0 + R_{01} + R_{02} \\ \Sigma_2 &= R_{10} + R_{11} + R_{12} \\ \Sigma_3 &= R_{20} + R_{21} + R_{22}\end{aligned}\quad [6.3]$$

Evidentemente, el análisis de este sistema con tal número de variables es tarea difícil. Para facilitarlo se puede proceder a hacer algunas simplificaciones y suposiciones, que si bien alejan más el modelo de la realidad, al menos lo hacen más tratable. Una primera suposición no demasiado restrictiva es suponer que durante el transcurso de la reacción la concentración de enzima no varía, por tanto ha de cumplirse la siguiente relación de conservación:

$$D_0 = \Sigma_R + \Sigma_T \quad [6.4]$$

donde se ha agrupado la concentración de las formas enzimáticas R y T :

$$\begin{aligned}\Sigma_R &= \Sigma_1 + \Sigma_2 + \Sigma_3 \\ \Sigma_T &= T_0 + T_1 + T_2\end{aligned}\quad [6.5]$$

Una segunda simplificación, algo más restrictiva, es suponer que se cumple la *hipótesis de estado cuasiestacionario* para las formas enzimáticas. Esta hipótesis consiste en suponer que la variación de concentración de las diferentes formas enzimáticas con el tiempo no es apreciable si se "mira" el sistema desde la escala de tiempos de evolución de la concentración de sustrato y producto. Es decir, que la concentración de aquellas permanece en estado estacionario. Esta aproximación puede hacerse si se considera que los procesos de cambio conformacional, que tienen lugar en la enzima por asociación y disociación de sustrato, transcurren mucho más rápido que los implicados en la reacción enzimática de transformación de sustrato en producto. Por tanto, en los procesos cinéticos del sistema de ecuaciones [6.2] aparecen dos escalas de tiempo, una muy rápida para los que implican cambios en el tiempo de formas enzimáticas, y otra, más lenta, para las dos ecuaciones que implican variación de S y P . Por tanto, en el sistema [6.2] las ecuaciones de velocidad que implican variación de formas enzimáticas con el tiempo se pueden aproximar a cero, quedando reducidas a ecuaciones algebraicas que permitirán expresar las concentraciones enzimáticas en términos de los metabolitos participantes S y P . De esta forma se puede reducir el sistema a un *sistema de dos variables*.

Por otro lado, si se tiene en cuenta que la concentración de sustrato y producto suele ser mucho mayor que la de enzima total, es decir $S \gg D_0$ y $P \gg D_0$, se pueden considerar las concentraciones de sustrato y producto libres aproximadamente igual a sus respectivas concentraciones totales en cada instante de tiempo; despreciando las pequeñas cantidades de producto y substrato unidos a la enzima.

Por último se va a someter al sistema [6.2] a un tratamiento adicional, que no supone otra aproximación sino una simplificación de las ecuaciones; consiste en la normalización del sistema mediante el procedimiento de adimensionar las variables y constantes del mismo. Este proceso simplifica las ecuaciones resultantes y facilita su estudio posterior. Se lleva a cabo mediante un adecuado cambio de variables.

Con el objeto de mostrar en detalle el procedimiento seguido habitualmente para adimensionar y resolver este tipo de sistemas, a continuación vamos a describir paso a paso el proceso inicialmente seguido por sus autores, según se presenta en el trabajo de Goldbeter y Nicolis (1976). Se normaliza sustituyendo las variables S y P por otras (α y γ , respectivamente), resultado de dividir por sus respectivas constantes de disociación de los complejos con la forma R de la enzima, según las expresiones:

$$\begin{aligned}\alpha &= \frac{S}{K_{R(S)}} \\ \gamma &= \frac{P}{K_{R(P)}}\end{aligned}\quad [6.6]$$

En este sistema, las constantes de disociación de S y P se suponen iguales, por tanto:

$$K_{R(S)} = K_{R(P)} = \frac{d}{a} \equiv K_R \quad [6.7]$$

Teniendo en cuenta todas las simplificaciones y cambios de variable anteriores, las dos últimas ecuaciones del sistema [6.2] quedan de la forma:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha}{dt} &= \frac{v_1}{K_R} - 2a\alpha\Sigma_1 + \frac{d\Sigma_2}{K_R} - a\alpha\Sigma_2 + \frac{2d\Sigma_3}{K_R} - 2a'\alpha T_0 + \frac{dT_1}{K_R} - a'\alpha T_1 + \frac{2dT_2}{K_R} \\ \frac{d\gamma}{dt} &= -2a\gamma R_0 + \frac{dR_{01}}{K_R} - a\gamma R_{01} + \frac{2dR_{02}}{K_R} + \frac{k\Sigma_2}{K_R} + \frac{2k\Sigma_3}{K_R} + \frac{k'T_1}{K_R} + \frac{2k'T_2}{K_R} - k\gamma\end{aligned}\quad [6.8]$$

La constante de disociación del complejo enzima-sustrato en la forma T viene dada por:

$$K_{T(S)} = \frac{d'}{a'} \quad [6.9]$$

De acuerdo con la notación de Monod *et al.* (1965) se introducen los siguientes parámetros, relacionados con la cooperatividad de la cinética enzimática:

$$\begin{aligned} L &= \frac{k_1}{k_2} \\ c &= \frac{K_{R(S)}}{K_{T(S)}} \end{aligned} \quad [6.10]$$

Donde L es la constante alostérica, que representa el equilibrio entre las dos formas enzimáticas T_0 y R_0 en ausencia de metabolitos; mientras que el parámetro c nos da una idea de la afinidad relativa del sustrato por ambas formas enzimáticas.

Agrupando variables según las ecuaciones:

$$\begin{aligned} \varepsilon &= \frac{k}{d} \\ \varepsilon' &= \frac{k'}{d'} \end{aligned} \quad [6.11]$$

y suponiendo estado cuasiestacionario para las formas enzimáticas, como se mencionó anteriormente, se obtienen las siguientes igualdades:

$$\begin{aligned} \Sigma_1 &= \frac{D_0(1+\gamma)^2}{L\left(1+\frac{c\alpha}{\varepsilon'+1}\right)^2 + (1+\gamma)^2\left(1+\frac{\alpha}{\varepsilon+1}\right)^2} \\ \Sigma_2 &= \frac{2D_0\left(\frac{\alpha}{\varepsilon+1}\right)(1+\gamma)^2}{L\left(1+\frac{c\alpha}{\varepsilon'+1}\right)^2 + (1+\gamma)^2\left(1+\frac{\alpha}{\varepsilon+1}\right)^2} \\ \Sigma_3 &= \frac{D_0\left(\frac{\alpha}{\varepsilon+1}\right)^2(1+\gamma)^2}{L\left(1+\frac{c\alpha}{\varepsilon'+1}\right)^2 + (1+\gamma)^2\left(1+\frac{\alpha}{\varepsilon+1}\right)^2} \end{aligned} \quad [6.12]$$

Sustituyendo en las ecuaciones [6.8] los cambios y de variables anteriores y operando convenientemente, resulta el sistema de dos ecuaciones diferenciales con dos variables siguiente:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha}{dt} &= \frac{v_1}{K_R} - \left(\frac{2kD_0}{K_R} \right) \varphi(\alpha, \gamma) \\ \frac{d\gamma}{dt} &= \left(\frac{2kD_0}{K_R} \right) \varphi(\alpha, \gamma) - k_s \gamma\end{aligned}\quad [6.13]$$

siendo la función $\varphi(\alpha, \gamma)$:

$$\varphi(\alpha, \gamma) = \frac{\left(\frac{\alpha}{\varepsilon+1} \right) \left(1 + \frac{\alpha}{\varepsilon+1} \right) (1+\gamma)^2 + L\theta \left(\frac{c\alpha}{\varepsilon'+1} \right) \left(1 + \frac{c\alpha}{\varepsilon'+1} \right)}{L \left(1 + \frac{c\alpha}{\varepsilon'+1} \right)^2 + (1+\gamma)^2 \left(1 + \frac{\alpha}{\varepsilon+1} \right)^2} \quad [6.14]$$

donde se ha incluido una nueva variable θ :

$$\theta = \frac{k'}{k} \leq 1 \quad [6.15]$$

que representa la razón de las constantes cinéticas de las formas inactiva y activa; por tanto, en buena lógica, su valor ha de ser menor que la unidad. El caso ideal de inactividad de la forma T vendría representado por $k'=0$ y por tanto $\theta=0$. Otro parámetro relacionado es c , para el cual un valor superior a 1 implicaría mayor afinidad del sustrato por la forma T , dando lugar a que un exceso de sustrato provoque el desplazamiento a esta forma menos activa y, por tanto, se producirá un efecto de inhibición por sustrato. En el caso de ausencia de inhibición por parte de sustrato, este parámetro sería igual a cero.

El sistema [6.13] se puede simplificar un poco más agrupando términos según las expresiones:

$$\begin{aligned}\sigma_M &= \frac{2kD_0}{K_R} = \frac{V_M}{K_R} \\ \sigma_1 &= \frac{v_1}{K_R}\end{aligned}\quad [6.16]$$

obteniéndose, finalmente, el sistema de dos ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha}{dt} &= \sigma_1 - \sigma_M \varphi(\alpha, \gamma) \\ \frac{d\gamma}{dt} &= \sigma_M \varphi(\alpha, \gamma) - k_s \gamma\end{aligned}\quad [6.17]$$

El sistema [6.17] expresa la evolución en el tiempo de las concentraciones de sustrato (α) y producto (γ). Como se aprecia en dicho sistema, pese a la gran complejidad de la función de velocidad [6.14], $\varphi(\alpha, \gamma)$, se guarda una cierta lógica desde el punto de vista del mecanismo de la reacción. La variación de sustrato con el tiempo (ecuación [6.17.a]) es el resultado de calcular "lo que entra" de sustrato en el sistema desde el exterior, menos "lo que se consume" del mismo, debido a la reacción enzimática de la PFK, que depende no solo de la concentración de sustrato, sino también de la de producto, ya que éste es un regulador de la reacción. Del mismo modo la variación de producto con el tiempo, [6.17.b], es igual a "lo que se produce" del mismo, por medio de la reacción de la PFK, menos "lo que sale" del sistema, de modo proporcional a su propia concentración.

La solución del sistema de ecuaciones diferenciales [6.17] no puede hacerse de modo analítico, ya que presenta un carácter marcadamente no lineal. Por tanto su estudio ha de hacerse empleando la metodología de ecuaciones diferenciales explicada en el capítulo 3. En resumen, se han de seguir los siguientes pasos:

- 1) Se calculan los *estados estacionarios*.
- 2) Se analiza su estabilidad en función de los parámetros de control, mediante el estudio del *sistema variacional linealizado* alrededor de cada estado. De esta forma se puede construir un *diagrama de bifurcaciones* del sistema.
- 3) Seleccionar los valores de parámetros adecuados y proceder al estudio de la dinámica del sistema, mediante la integración numérica del sistema por alguno de los métodos al uso, según se explicó en el capítulo 3.

A continuación vamos a realizar el estudio de este sistema, orientado, preferentemente, a la aparición de comportamiento oscilatorio, que es el objetivo del presente capítulo. (Para un estudio más profundo ver: Goldbeter y Lefever, 1972; Goldbeter y Nicolis, 1976; Nicolis y Prigogine, 1977.)

El cálculo de los estados estacionarios del sistema se lleva a cabo igualando las ecuaciones del sistema [6.17] a cero, obteniendo el siguiente sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas, en función de los parámetros de control:

$$\begin{aligned}\sigma_1 - \sigma_M \varphi(\alpha, \gamma) &= 0 \\ \sigma_M \varphi(\alpha, \gamma) - k_s \gamma &= 0\end{aligned}\quad [6.18]$$

Sumando ambas ecuaciones y despejando γ se obtiene:

$$\gamma^0 = \frac{\sigma_1}{k_s} \quad [6.19]$$

que es la concentración de producto en el estado estacionario. Sustituyendo la expresión [6.19] en [6.18.a] y operando adecuadamente, se obtiene la ecuación de segundo grado en α :

$$\begin{aligned} & \alpha^{0^2} \left[L'(\sigma_1 - \sigma_M \theta) \left(\frac{c}{\varepsilon' + 1} \right)^2 + (\sigma_1 - \sigma_M) \left(\frac{1}{\varepsilon + 1} \right)^2 \right] \\ & + \alpha^0 \left[L' (2\sigma_1 - \sigma_M \theta) \left(\frac{c}{\varepsilon' + 1} \right) + (2\sigma_1 - \sigma_M) \left(\frac{1}{\varepsilon + 1} \right) \right] \\ & + \sigma_1 (L' + 1) = 0 \end{aligned} \quad [6.20]$$

donde

$$L' = \frac{L}{(1 + \gamma^0)^2} \quad [6.21]$$

De la ecuación [6.20] se puede deducir el valor de la concentración de sustrato en el estado estacionario, α^0 , en función de los parámetros y de la concentración de γ^0 . Para valores positivos de las constantes y parámetros, el análisis detallado de esta ecuación pone de manifiesto que siempre que se cumpla la condición

$$\sigma_1 < \sigma_M \quad [6.22]$$

es decir, cuando la velocidad de entrada de sustrato, v_1 , no excede la velocidad máxima de la enzima, V_M , la ecuación de segundo grado [6.20] presentará una única solución real positiva (y por tanto con sentido físico). Por contra, si la desigualdad [6.22] fuera al revés, no aparecerían soluciones reales positivas, con lo que desde el punto de vista físico el sistema [6.17] no tendría solución estacionaria, ya que se acumularía sustrato en el medio de reacción. Esto quiere decir que el sistema [6.18] sólo presentará una única solución real positiva.

El análisis de estabilidad del estado estacionario del sistema [6.17] se debería hacer en función de todos los parámetros del mismo. Pero esta tarea es realmente compleja, ya que existen muchos parámetros. Un modo más simple de operar es variar un parámetro, manteniendo el resto en valores constantes, y trazando el diagrama de bifurcación del sistema frente al parámetro seleccionado. Desde el punto de vista de la adecuación del modelo a los resultados experimentales, existen parámetros que es lógico suponer constantes, como por ejemplo la constante alóstérica, L , de la enzima. Sin embargo, existen otros parámetros que son realmente manejables experimentalmente, como es, por ejemplo, la velocidad de inyección de sustrato al medio de reacción, v_1 .

En la figura 6.7 se muestran en forma esquemática tres posibles diagramas de bifurcación en función de σ_1 , obtenidos para diferentes valores de los demás parámetros. Mientras que en los casos (a) y (c) no aparece inestabilidad, en el caso (b) sí. Esta inestabilidad aparece por medio de una *bifurcación de Hopf*, que lleva consigo la aparición de una solución periódica *orbitalmente asintóticamente estable*: un *ciclo límite*. Por tanto, dando a σ_1 el valor adecuado, el estado estacionario se encontrará en la región de inestabilidad y podrá aparecer comportamiento oscilatorio. Hay que señalar que la inestabilidad sólo aparece en un estrecho margen del valor de los parámetros del sistema, aspecto que está de acuerdo con los datos experimentales mencionados en el apartado 6.2.

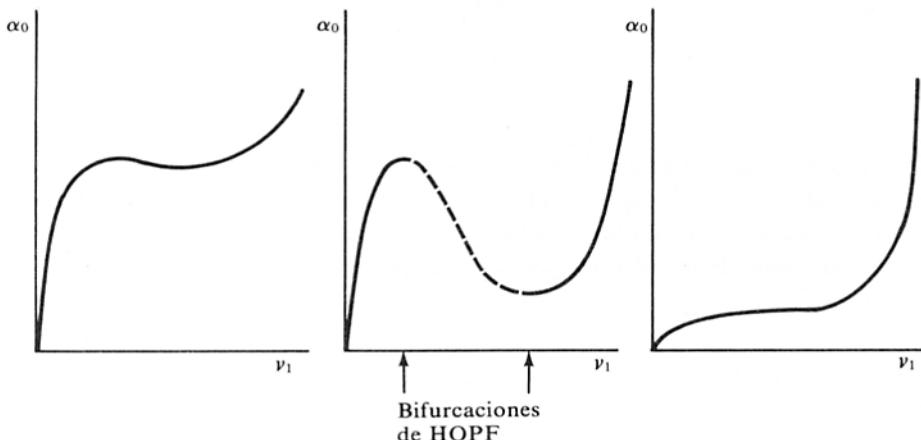


Figura 6.7. Aspecto de la nulclina $d\psi/dt=0$, del modelo de Goldbeter y Lefever (1972), para diferentes valores de los parámetros de control. En la parte central de la figura se muestran dos bifurcaciones de Hopf y la correspondiente región de inestabilidad, asociada a la zona de pendiente negativa de la curva.

Una vez realizado el estudio de estabilidad, y habiendo comprobado que puede haber comportamiento oscilatorio, se selecciona el conjunto de valores de parámetros que conducen a la situación de *inestabilidad del estado estacionario*,

y se integra numéricamente el sistema de ecuaciones diferenciales [6.17]. En efecto, si partimos del estado estacionario y lo perturbamos ligeramente, se seguirá una trayectoria que tenderá a alejarse de él, hasta caer en el ciclo límite. Las órbitas obtenidas en un caso concreto se muestran en el plano fase representado en la figura 6.8, donde se observa el progresivo acercamiento al ciclo límite. Si el sistema, en lugar de partir de las proximidades del estado estacionario, parte de un punto situado fuera del ciclo límite, la órbita también evoluciona hasta caer en el ciclo límite, ya que es éste el *único atractor* presente en el sistema, bajo dichas condiciones. Si se representan las trayectorias, una vez alcanzado el ciclo límite se obtiene un comportamiento periódico sostenido (figura 6.9).

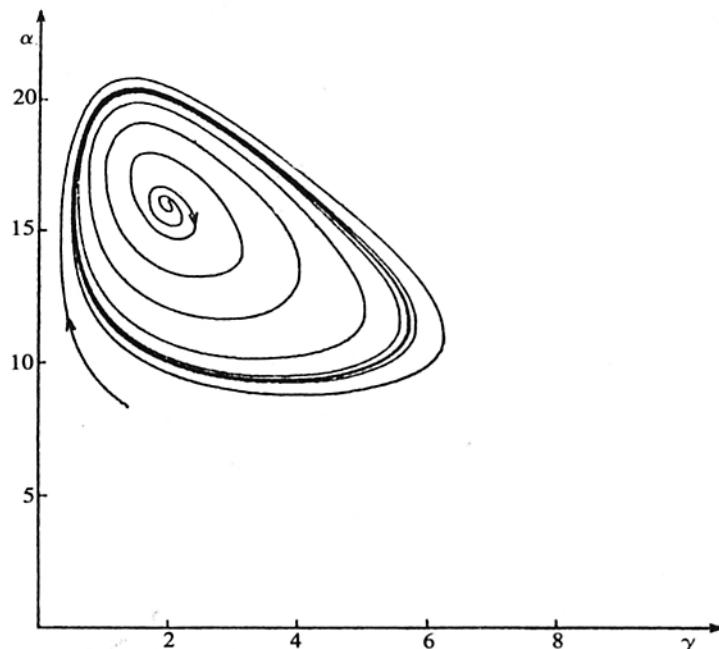


Figura 6.8. Ciclo límite estable del modelo de oscilaciones glicolíticas. Goldbeter y Lefever (1972).

6.4. Modelo mínimo de sistema bioquímico autorregulado

En el presente apartado nos proponemos sentar las bases para un *modelo mínimo* que permita la aparición de oscilaciones y otros tipos de comportamiento no lineal organizado en el tiempo, en un sistema bioquímico autorregulado. En este sentido, vamos a considerar un sistema autorregulado en la forma más simplificada que permitirá, por otro lado, ser el núcleo generador de inestabilidad en otros muchos sistemas más complejos.

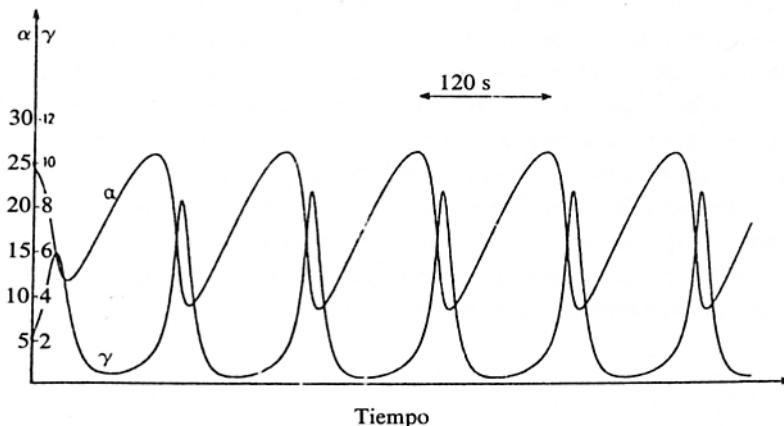


Figura 6.9. Oscilaciones sostenidas de α (sustrato) y γ (producto), como consecuencia de la existencia de un ciclo límite estable en el modelo de oscilaciones glicolíticas. Goldbeter y Lefever (1972).

Un sistema capaz de producir oscilaciones ha de considerarse como sistema abierto y sometido a restricciones externas que lo mantengan alejado del equilibrio. Un modelo de reacción enzimática que cumple estos requisitos se esquematiza en la figura 6.10. En ella se contempla un sistema modelo bioquímico compuesto por una reacción enzimática (E) que transforma un sustrato S en producto P , activada por éste último, y que se mantiene abierto mediante el suministro de sustrato con velocidad v_1 y la salida de producto de modo proporcional (k_s) a su concentración.

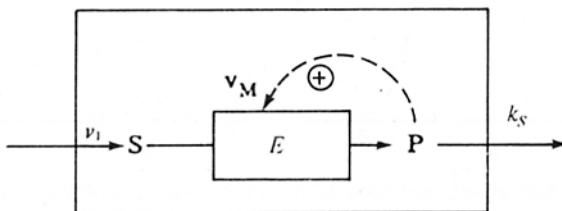


Figura 6.10. Modelo cinético de autocatálisis o activación por producto.

Se puede obtener una formulación simplificada de este sistema partiendo de un modelo alostérico idéntico al explicado en el apartado anterior, donde se van a efectuar otros cambios de variable y se van a realizar algunas simplificaciones. En primer lugar, vamos a suponer que la conformación menos activa de la enzima es completamente inactiva. Es decir, en términos del modelo anterior (figuras 6.5 y 6.6), la constante $k'=0$. Esto hace que las constantes θ y ϵ' también lo sean. Si además el cambio de variable del sustrato, en lugar de utilizar la expresión de la

ecuación [6.6], se hace dividiendo por la constante aparente de Michaelis-Menten de la enzima respecto al sustrato (y la denominamos K_s), resulta:

$$\alpha' = \frac{S}{K_s} \quad [6.23]$$

En términos de las constantes cinéticas del modelo, la constante de Michaelis-Menten se expresa como:

$$K_s = \frac{k+d}{a} \quad [6.24]$$

Si sustituimos la expresión [6.24] en [6.23], se obtiene:

$$\alpha' = S \frac{a}{k+d} = \frac{S}{\frac{d}{a}} \frac{1}{\frac{k}{d} + 1} \quad [6.25]$$

que de acuerdo con las igualdades [6.7] y [6.11], resulta:

$$\alpha' = \frac{S}{K_{R(S)}} \frac{1}{\varepsilon + 1} = \frac{\alpha}{\varepsilon + 1} \quad [6.26]$$

Es decir, que la nueva variable adimensionada, α' , es igual a la antigua dividida por $\varepsilon + 1$. Operando del mismo modo con las otras variables, resulta el conjunto de cambios de variable siguiente:

$$\begin{aligned} \sigma'_1 &= \frac{v_1}{K_s} = \frac{\sigma_1}{\varepsilon + 1} \\ \sigma'_M &= \frac{V_M}{K_s} = \frac{\sigma_M}{\varepsilon + 1} \\ c' &= \frac{K_s}{K_{T(S)}} = c(\varepsilon + 1) \end{aligned} \quad [6.27]$$

Para introducir este nuevo cambio de variable, se divide ambos miembros de la ecuación [6.17.a] por $\epsilon+1$, y sustituyendo adecuadamente, queda el sistema:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha'}{dt} &= \sigma'_1 - \sigma'_M \varphi(\alpha', \gamma) \\ \frac{d\gamma}{dt} &= q \sigma'_M \varphi(\alpha', \gamma) - k_s \gamma\end{aligned}\quad [6.28]$$

donde aparece en la segunda ecuación diferencial una nueva constante, q , resultado de la nueva definición de σ_M' :

$$\sigma_M' = \frac{V_M}{K_R} = \frac{V_M K_S}{K_S K_R} = \sigma_M' q \quad [6.29]$$

siendo

$$q = \frac{K_S}{K_R} \quad [6.30]$$

que representa la relación de afinidades por la enzima de sustrato y producto. Además, este parámetro, q , actúa como un posible *factor de escala* entre las dos ecuaciones, ya que al aparecer sólo en la segunda ecuación de velocidad, variando su valor se puede hacer que las velocidades de transformación de sustrato y producto sean todo lo diferentes que queramos. (En el apartado 6.9 veremos el papel de este parámetro en fenómenos de excitabilidad.)

Por último, la función φ también queda modificada de acuerdo con las nuevas variables y las simplificaciones incluidas, resultando:

$$\varphi(\alpha', \gamma) = \frac{\alpha'(1+\alpha')(1+\gamma)^2}{L(1+c'\alpha')+(1+\alpha')^2(1+\gamma)^2} \quad [6.31]$$

expresión a todas luces mucho más manejable que la [6.14].

La anterior ecuación se puede simplificar todavía más si se supone que el sustrato no se une a la forma inactiva T (este hecho conduce a que no exista inhibición de la reacción enzimática por exceso de sustrato). Por tanto, el parámetro c' será igual a cero y la ecuación [6.31] se verá simplificada a:

$$\varphi(\alpha', \gamma) = \frac{\alpha'(1+\alpha')(1+\gamma)^2}{L+(1+\alpha')^2(1+\gamma)^2} \quad [6.32]$$

En términos generales, la expresión anterior representa la velocidad de reacción de un proceso catalizado por su producto, cuando la concentración de enzima es despreciable frente a la de los metabolitos de la reacción. Debido al proceso de normalización, dicha función está acotada entre 0 y 1. En efecto:

$$\begin{aligned}\alpha' = 0 &\Rightarrow \varphi = 0 \\ \alpha' \rightarrow \infty &\Rightarrow \varphi \rightarrow 1\end{aligned} \quad [6.33]$$

y siempre que sea $\alpha' > 0$, la velocidad de reacción dependerá del grado de activación, es decir, de la concentración de producto, γ :

$$\begin{aligned}\gamma = 0 &\Rightarrow \varphi = \frac{\alpha'(1+\alpha')}{L+(1+\alpha')^2} \\ \gamma \rightarrow \infty &\Rightarrow \varphi \rightarrow 1\end{aligned} \quad [6.34]$$

Como se mostró en el apartado anterior, este tipo de ecuaciones es capaz de conducir a soluciones de inestabilidad del estado estacionario; consecuencia de la introducción de no linealidad en las ecuaciones de velocidad, debido al término φ .

6.5. Condiciones generales de inestabilidad de sistemas autorregulados

En el estudio de sistemas catalíticos en general, es frecuente recurrir a modelos cinéticos en los cuales dentro de una ruta más compleja, se "aisla" la reacción o proceso que se trata de analizar, reduciendo el sistema a una entrada de sustrato, un proceso de transformación de sustrato en producto y una salida de producto (figura 6.11). Hay que señalar que aunque lo más frecuente es que el proceso de

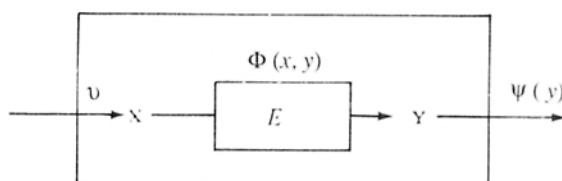


Figura 6.11. Modelo general para la transformación enzimática de sustrato (X) en producto (Y).

"transformación" consista en una reacción química (catalizada o no), no siempre ha de ser así; podría tratarse, por ejemplo, de un proceso de transporte a través de membrana, en cuyo caso "sustrato" y "producto" serían concentración del metabolito en ambos lados de la membrana.

Por lo dicho anteriormente, en el estudio del comportamiento oscilatorio en sistemas bioquímicos resulta útil intentar generalizar los requisitos necesarios y suficientes para que aparezcan inestabilidades que conduzcan a dicho comportamiento dinámico. Para ello vamos a partir del modelo cinético mostrado en la figura 6.11, donde se considera un sistema abierto con un proceso de transformación de una sustancia X en otra Y , un suministro continuo de X , y una reacción sumidero de Y . En términos generales la velocidad de reacción puede depender de la concentración de ambas sustancias (que denominaremos con letras minúsculas: x e y). Que la velocidad de reacción dependa de la concentración de sustrato no es relevante, pero si lo es el que el propio producto influya en la cinética de su propia formación. Este es el sentido que queremos dar al término *autorregulación*, dentro de este apartado. Hay que tener en cuenta que este hecho no es infrecuente, pues puede tratarse, por ejemplo, de un sistema activado por producto, como se veía en el apartado anterior. Por último, también parece lógico suponer el proceso de desaparición de Y dependiente de su concentración, y .

A continuación vamos a demostrar un teorema que permite comprobar de modo directo si en un sistema autorregulado del tipo mencionado anteriormente se cumplen las condiciones necesarias y suficientes para que aparezca comportamiento oscilatorio. Para ello habrá que emplear las condiciones derivadas del análisis de estabilidad del sistema variacional linealizado en el estado estacionario, expuestas en el capítulo 3.

A partir del modelo de la figura 6.11 se puede deducir, en términos generales, el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales que gobierna la evolución en el tiempo de las dos variables, x e y :

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= v - \phi(x,y) \equiv F_x(x,y) \\ \frac{dy}{dt} &= q\phi(x,y) - \psi(y) \equiv F_y(x,y)\end{aligned}\quad [6.35]$$

* *Teorema 6.1:* En todo sistema del tipo [6.35], siempre que en el *estado estacionario*, (x^0, y^0) , se cumplan las dos desigualdades siguientes:

$$\begin{aligned}\left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_0 &> 0 \\ \left(\frac{\partial \psi}{\partial y} \right)_0 &> 0\end{aligned}\quad [6.36]$$

la condición *necesaria y suficiente* para que dicho estado estacionario sea *inestable* y aparezca en el sistema al menos una *solución periódica orbitalmente asintóticamente estable*, es que *en el estado estacionario, la isoclina (o mejor dicho, nulclina) $dy/dt=0$* , cuya ecuación es

$$q\phi(x,y)-\psi(y) = 0 \quad [6.37]$$

tenga una pendiente, en el plano cartesiano yx , menor que $-1/q$, es decir, que se cumpla

$$\left(\frac{dx}{dy}\right)_b < -\frac{1}{q} \quad [6.38]$$

Antes de proceder a la demostración de este teorema quisieramos resaltar dos aspectos del enunciado. En primer lugar las desigualdades [6.36] representan las derivadas parciales de cada uno de los dos procesos cinéticos, con respecto a su sustrato en el estado estacionario. Por tanto, si han de ser mayores que cero quiere decir que las velocidades de reacción aumentan si aumenta la concentración de su correspondiente sustrato, condición en principio nada restrictiva ya que se cumple en la mayoría de los procesos cinéticos (en concreto, siempre que no haya inhibición por sustrato). En segundo lugar, recalcar que en la ecuación [6.38] nos estamos refiriendo a la pendiente de la propia nulclina (representada por la función [6.37], que depende de x e y), y no a la pendiente de las órbitas en los puntos de la nulclina, que en el plano cartesiano de referencia (yx) valdrán infinito, como se explicó en el capítulo 3 al referirnos a las técnicas de plano fase.

De acuerdo con el análisis de estabilidad, para que aparezca inestabilidad a partir de una bifurcación de Hopf (y por tanto, aparezca una solución periódica asociada), el sistema [6.35] ha de cumplir que:

$$\begin{aligned} T &\geq 0 \\ \Delta &> 0 \end{aligned} \quad [6.39]$$

siendo T la traza de la *matriz característica* (Jocobiano) y Δ el determinante. El caso $T=0$ representa el mismo punto de bifurcación y una solución tipo *centro*. La expresión de T será:

$$\begin{aligned} T &= a_{11}+a_{22} \\ &= \left(\frac{\partial F_x}{\partial x}\right)_b + \left(\frac{\partial F_y}{\partial y}\right)_b \\ &= q\left(\frac{\partial \phi}{\partial y}\right)_b - \left(\frac{\partial \psi}{\partial y}\right)_b - \left(\frac{\partial \phi}{\partial x}\right)_b > 0 \end{aligned} \quad [6.40]$$

que para que sea mayor que cero ha de cumplirse que:

$$q \left(\frac{\partial \phi}{\partial y} \right)_b - \left(\frac{\partial \psi}{\partial y} \right)_b > \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_b \quad [6.41]$$

El determinante será:

$$\begin{aligned} \Delta &= a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} \\ &= \left(\frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_b \left(\frac{\partial F_y}{\partial y} \right)_b - \left(\frac{\partial F_x}{\partial y} \right)_b \left(\frac{\partial F_y}{\partial x} \right)_b \\ &= \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_b \left(\frac{\partial \psi}{\partial y} \right)_b > 0 \end{aligned} \quad [6.42]$$

expresión que siempre es mayor que cero, si se cumplen las relaciones [6.36] del planteamiento del teorema. Por tanto, la única condición que ha de cumplirse para que el estado estacionario sea inestable, es la desigualdad [6.41].

Por otro lado, diferenciando la ecuación [6.37] (nulclina $dy/dt=0$), queda:

$$q \frac{\partial \phi}{\partial x} dx + \left(q \frac{\partial \phi}{\partial y} - \frac{\partial \psi}{\partial y} \right) dy = 0 \quad [6.43]$$

a partir de esta expresión, la pendiente de dicha nulclina en el estado estacionario será:

$$\left(\frac{dx}{dy} \right)_b = - \frac{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial y} \right)_b - \left(\frac{\partial \psi}{\partial y} \right)_b}{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_b} \quad [6.44]$$

Si imponemos la condición de inestabilidad, deducida anteriormente, según la desigualdad [6.41], sustituyendo en el numerador obtenemos:

$$\left(\frac{dx}{dy} \right)_b < - \frac{\left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_b}{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right)_b} \quad [6.45]$$

que simplificando resulta la condición de inestabilidad que queríamos demostrar:

$$\left(\frac{dx}{dy} \right)_b < -\frac{1}{q} \quad [6.46]$$

Por tanto, según este teorema, un medio para detectar regiones de inestabilidad en sistemas modelo del tipo de la figura 6.11, se reduce a dibujar la isoclina correspondiente a la segunda ecuación diferencial (en este caso correspondiente al producto) y buscar zonas de pendiente suficientemente negativa. Para obtener comportamiento oscilatorio, habrá que seleccionar en el modelo los valores de los parámetros adecuados para que el estado estacionario se localice en la región de pendiente negativa de la nulclina. Como se vio anteriormente, el parámetro que se suele utilizar es v . Esto es así por varias razones; entre otras, porque es un parámetro controlable desde el "exterior" y porque su variación afecta sólo a la primera función derivada, como se ve en el propio sistema [6.35]. Por tanto, si se detecta una región de pendiente negativa en la nulclina $dy/dt=0$, variando v se podrá modificar la otra nulclina, $dx/dt=0$, hasta conseguir (si ello fuera posible) que se crucen en dicha región, obteniéndose un estado estacionario inestable.

6.6. Comportamiento oscilatorio en procesos enzimáticos típicos

Haciendo uso del teorema anterior vamos a estudiar la posibilidad de inestabilidad en dos clases de mecanismos enzimáticos, frecuentes en las rutas metabólicas: en procesos que siguen cinéticas de Michaelis-Menten (M-M) y en ciclos de sustrato.

En primer lugar, es fácil comprobar que en una reacción catalizada por una enzima que sigue una cinética de M-M, no es posible encontrar comportamiento oscilatorio sostenido. En este caso, se puede plantear un sistema de ecuaciones diferenciales similar al [6.28], considerando que en el modelo cinético de la figura 6.10 no existe activación por el producto. La función de velocidad, una vez realizado el proceso de normalización dividiendo por la propia constante de M-M, K_s , se podrá expresar como:

$$\phi(\alpha) = \sigma_M \frac{\alpha}{1+\alpha} \quad [6.47]$$

donde, como es lógico por tratarse de una simple cinética de M-M, no aparece dependencia con la concentración de producto.

Aplicando el teorema anterior calculamos la pendiente de la nulclina $d\alpha/dt=0$:

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\alpha}{d\gamma} \right)_b &= - \frac{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial \gamma} \right)_b - k_s}{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial \alpha} \right)_b} \\ &= \frac{k_s}{q \left(\frac{\partial \phi}{\partial \alpha} \right)_b} = \frac{k_s}{q \sigma_M} (1 + \alpha)^2 \geq 0 \end{aligned} \quad [6.48]$$

es decir, que es siempre positiva. Luego, se puede asegurar que en un sistema enzimático regulado sólo por cinéticas de M-M, no hay ninguna posibilidad de que aparezca comportamiento oscilatorio.

Un *ciclo fútil o de sustrato* es aquel en el que se da la transformación de sustrato en producto y producto en sustrato mediante dos procesos enzimáticos diferentes, catalizados por dos enzimas diferentes (figura 6.12). Este tipo de ciclos es frecuente en rutas metabólicas, ya que presenta mayores posibilidades de control que una sola reacción enzimática reversible. Como ejemplo, en la figura 6.2 se han remarcado tres ciclos fútiles presentes en la ruta glicolítica.

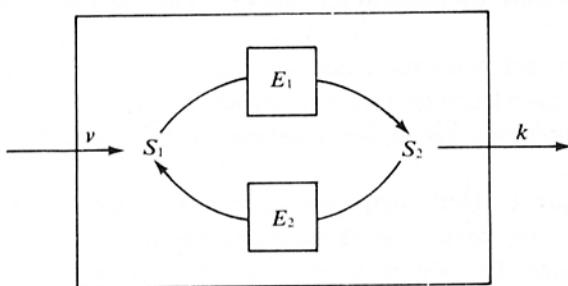


Figura 6.12. Modelo cinético de ciclo de sustrato.

El análisis cinético del modelo de la figura 6.12 conduce al siguiente sistema de dos ecuaciones diferenciales, que refleja la variación en el tiempo de las concentraciones de los dos sustratos:

$$\frac{dS_1}{dt} = V - V_{E1} + V_{E2} \quad [6.49]$$

$$\frac{dS_2}{dt} = V_{E1} + V_{E2} - kS_2$$

donde V_{E1} y V_{E2} representan las velocidades de reacción de las dos enzimas; V la velocidad de entrada de sustrato; y k la constante cinética del proceso sumidero de S_2 . Una vez adimensionado el sistema [6.49], dividiendo una y otra ecuación por las respectivas constantes aparentes de M-M de cada sustrato, resulta:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha_1}{dt} &= \sigma - \sigma_1 \varphi_1 + \sigma_2 \varphi_2 \\ \frac{d\alpha_2}{dt} &= q(\sigma_1 \varphi_1 - \sigma_2 \varphi_2) - k \alpha_2\end{aligned}\quad [6.50]$$

donde los parámetros adimensionados representan: α_1 y α_2 , las concentraciones de los sustratos; σ , la velocidad de entrada de sustrato S_1 ; σ_1 y σ_2 , la velocidad máxima de las enzimas E_1 y E_2 , respectivamente; y por último, q , la relación entre las dos constantes de M-M.

Es fácil apreciar la similitud del sistema [6.50] con el [6.35] si se agrupan las funciones de velocidad como sigue:

$$\begin{aligned}\phi(\alpha_1, \alpha_2) &= \sigma_1 \varphi_1 - \sigma_2 \varphi_2 \\ \psi(\alpha_2) &= k \alpha_2\end{aligned}\quad [6.51]$$

Siempre que dichas funciones de velocidad sean tales que cumplan la condición [6.36.a] (pues la condición [6.36.b] es evidente por la igualdad [6.51.b]), se podrá hacer uso del teorema anteriormente explicado, para estudiar la posibilidad de aparición de soluciones periódicas, según el cual la pendiente de la nulclina $d\alpha_2/dt=0$. Es decir:

$$\left(\frac{d\alpha_1}{d\alpha_2} \right)_0 = - \frac{\sigma_1 \left(\frac{\partial \varphi_1}{\partial \alpha_2} \right)_0 - \sigma_2 \left(\frac{\partial \varphi_2}{\partial \alpha_2} \right)_0 - k}{q \left[\sigma_1 \left(\frac{\partial \varphi_1}{\partial \alpha_1} \right)_0 - \sigma_2 \left(\frac{\partial \varphi_2}{\partial \alpha_1} \right)_0 \right]} \quad [6.52]$$

ha de ser $<-1/q$ en el estado estacionario.

Si suponemos, por ejemplo, que E_1 y E_2 siguen cinéticas de M-M, es fácil comprobar, de modo similar al caso anterior, que el sistema no va a presentar

inestabilidad. En efecto, si se calculan las derivadas de las funciones de velocidad en este caso resultan:

$$\left\{ \begin{array}{l} \left. \frac{\partial \varphi_1}{\partial \alpha_2} \right)_0 = 0 \\ \left. \frac{\partial \varphi_2}{\partial \alpha_2} \right)_0 = \frac{1}{(1+\alpha_2^0)^2} \\ \left. \frac{\partial \varphi_1}{\partial \alpha_1} \right)_0 = \frac{1}{(1+\alpha_1^0)^2} \\ \left. \frac{\partial \varphi_2}{\partial \alpha_1} \right)_0 = 0 \end{array} \right. \quad [6.53]$$

por tanto sustituyendo en [6.52] queda que la pendiente de la nulclina en el estado estacionario es:

$$\left. \frac{d\alpha_1}{d\alpha_2} \right)_0 = \frac{\frac{1}{(1+\alpha_2^0)^2} + k}{\frac{q}{(1+\alpha_1^0)^2}} > 0 \quad [6.54]$$

que es siempre positiva.

La única vía para que aparezca inestabilidad será, pues, hacer que la pendiente de la nulclina, expresada en la ecuación [6.52], llegue a ser suficientemente negativa en algún punto. Una de las vías para ello es que las funciones φ_1 y φ_2 sean "particularmente no lineales". Es decir, que alguna de las derivadas [6.53.a] o [6.53.d] no sean cero. Suponer estas condiciones es lo mismo que suponer que o bien el proceso E_1 o el E_2 , o ambos simultáneamente, dependen no sólo de la concentración de sus respectivos sustratos, sino también de la de su producto. Es decir, que exista regulación por el producto de la reacción, como en el ejemplo de la PFK.

Aunque no lo vamos a demostrar aquí, se puede comprobar que también es posible encontrar inestabilidad en un ciclo fútil si alguna de las derivadas parciales [6.53.b] o la [6.53.c] fueran en algún punto menores que cero. Como estas derivadas representan la variación de la ecuación de velocidad de cada enzima en función de su propio sustrato, un valor negativo implicaría una disminución de la

velocidad al aumentar la concentración de su sustrato. Es decir que estaríamos contemplando un caso de *inhibición por "exceso" de sustrato*. Los ciclos fútiles son, pues, uno de los pocos sistemas donde se puede encontrar inestabilidad mediante mecanismos de inhibición (por sustrato) en lugar de activación (por producto).

6.7. Oscilaciones epigenéticas

Otro proceso bioquímico donde aparece comportamiento dinámico complejo es aquél relacionado con los procesos de control genético de la síntesis de proteínas. Como es bien conocido, los mecanismos genéticos implicados en la síntesis de proteínas incluyen complicados procesos de autocontrol y autorregulación a muy diferentes niveles. Estos mecanismos producen la suficiente no linealidad en los procesos genéticos como para dar lugar a la aparición de fenómenos cooperativos, transiciones todo o nada, inestabilidad y oscilaciones llamadas epigenéticas. Este tipo de oscilaciones puede involucrar también a los niveles de proteínas que, en este caso, al contrario del anterior, podrían considerarse variables.

La importancia de la autoorganización temporal a nivel genético radica en que, por sus características de origen y períodos de duración, las oscilaciones epigenéticas son firmes candidatos a *marcapasos celulares* que de alguna forma participen en la regulación y duración del ciclo celular. La coincidencia en periodo de éstas con el ciclo celular podría ser más que una simple coincidencia. Por otra parte, esta coincidencia hace difícil su caracterización experimental, pues una vez completado el ciclo celular la célula se divide, modificando de golpe todos los niveles enzimáticos. Es decir, el posible comportamiento oscilatorio como consecuencia de estos procesos se puede ver apantallado por la división celular.

En el presente apartado vamos a ver un ejemplo de este tipo de comportamiento oscilatorio en un sistema bien estudiado y caracterizado experimentalmente: las proteínas y metabolitos relacionados con los genes que componen el *operón lac* en la bacteria *Escherichia coli*.

Como es bien sabido, la regulación y síntesis de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa se lleva a cabo en una región bien determinada del genoma de la bacteria conocido como operón lac. Este operón contiene tres genes estructurales que codifican las siguientes proteínas: *β-galactosidasa*, que hidroliza lactosa en sus componentes monosacáridos glucosa y galactosa; *galactósido-permeasa*, que media la entrada de lactosa a través de la membrana celular; *tiogalactósido-transacetilasa*, no esencial en el metabolismo de la lactosa; y otras enzimas que participan en la conversión de galactosa en un derivado de la glucosa. Un esquema del operón se muestra en la figura 6.13, que consiste en: un gen inductor (*i*) que codifica la síntesis de una proteína represora *I*; los genes reguladores promotor (*p*) y operador (*o*), al que se une el represor activo; y los

genes estructurales (z , y , a), que codifican la síntesis de β -galactosidasa (E), permeasa (M) y tiogalactósido-transacetilasa (A).

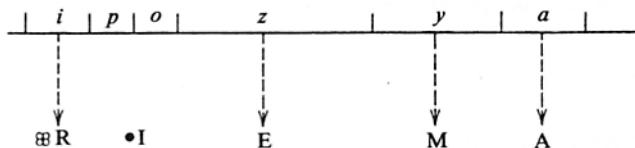


Figura 6.13. Representación esquemática del operón *Lac*. Nicolis y Prigogine (1977).

El mecanismo de control del operón lac implica dos procesos de autorregulación (o "feedback"), uno positivo y otro negativo. La presencia de inductor en la célula libera el represor, permitiendo la expresión de los genes estructurales. Entre las enzimas sintetizadas está presente la permeasa, que favorece la entrada de inductor ("feedback" positivo), pero también está presente la β -galactosidasa, que puede hidrolizar el inductor, si este es la lactosa ("feedback" negativo).

A continuación, pasamos a presentar algunos de los resultados que configurarán la trama experimental sobre la cual se propondrá el modelo:

- 1) Al cultivar *E. coli* en presencia de glucosa y en ausencia de lactosa, no se detectan niveles importantes de las enzimas codificadas por los genes estructurales del operón: β -galactosidasa, galactósido-permeasa y tiogalactósido-transacetilasa. Por lo que se deduce que en ausencia de lactosa el operón ha de encontrarse reprimido.
- 2) Si se añade lactosa a un cultivo de *E. coli* crecido en presencia de glucosa, se desencadena la producción de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa.
- 3) En determinadas condiciones se ha detectado la *síntesis periódica* de β -galactosidasa en medios de cultivo tamponados con lactosa (Knorre, 1968; Goodwin, 1969).
- 4) Existe una serie de inductores del operón que no son hidrolizados por la β -galactosidasa. Son los llamados inductores gratuitos, entre los que se encuentran el TMG (metil- β -D-tiogalacto-piranósido), el TDG (β -D-galacto-I-s-tio- β -D-galactósido) o el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido). Si se tampona el medio de cultivo con alguno de estos inductores en lugar de con lactosa, no aparece comportamiento oscilatorio, aunque sí fenómenos cooperativos y respuestas todo-nada en los niveles de β -galactosidasa, ante ligeros incrementos de la concentración de inductor.

6.8. Modelo de autorregulación del operón lac

A continuación vamos a estudiar el modelo propuesto por Babloyantz y Sanglier (1972), para explicar el comportamiento no lineal observado experimentalmente, basándose en el modelo de autorregulación del operón lac. Primero vamos a considerar el mecanismo básico de inducción empleando inductores gratuitos, para a continuación incluir las modificaciones necesarias para el caso del inductor natural.

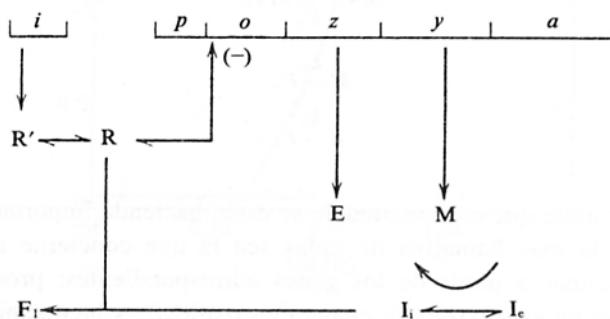
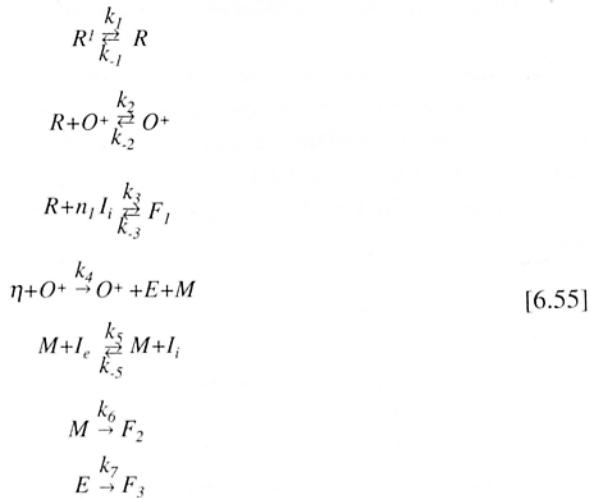


Figura 6.14. Modelo cinético propuesto para la inducción del operón Lac por inductores gratuitos. Nicolis y Prigogine (1977).

En la figura 6.14 se presenta el esquema cinético del modelo del operón lac en presencia de inductores gratuitos. Inicialmente, el operador está reprimido (O^-) por acción del represor activo R . El represor puede estar presente en dos formas: activa (R), e inactiva (R'). Aunque en principio no existe un transportador específico del inductor en la membrana, siempre es posible esperar ciertos niveles de transporte por simple difusión. Por tanto, la presencia de inductor en el medio externo (I_e) puede conducir a que algo traspase la membrana, dando lugar a una cierta concentración de inductor en el interior de la célula (I_i). Este inductor, una vez en el interior de la membrana, es capaz de unirse al represor dando un complejo inactivo (F_1) que libera el operador (O^+), permitiendo que se expresen los genes estructurales, produciéndose las enzimas E y M , que con el paso del tiempo son degradadas en componentes terminales, F_2 y F_3 (péptidos y aminoácidos no activos). De acuerdo con este modelo se pueden suponer, de modo simplificado, las siguientes reacciones, con sus correspondientes constantes de velocidad (k_i):



Hay que hacer notar que en este modelo se están haciendo importantes simplificaciones. Quizá la más llamativa de todas sea la que concierne a las etapas de síntesis de enzimas a partir de los genes correspondientes; proceso que se ha simplificado en un solo paso (d), cuando en realidad es bien sabido que implica mecanismos complicados: todo el proceso de transcripción y traducción.

A partir de este esquema cinético se pueden deducir las siguientes ecuaciones de velocidad en forma de sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}
 \frac{dR}{dt} &= k_1 R' - k_1' R - k_3' R I_i^n + k_3' F_1 - k_2' R O^+ + k_2' O^+ \\
 \frac{dO}{dt} &= -k_2' R O^+ + k_2' O^+ \\
 \frac{dE}{dt} &= \eta k_4 O^+ - k_7 E \quad [6.56] \\
 \frac{dM}{dt} &= \eta k_4 O^+ - k_6' M \\
 \frac{dI_i}{dt} &= k_5' I_e M - k_5' I_i M - n_I k_3' R I_i^n + n_I k_3' F_1
 \end{aligned}$$

donde aparecen cinco variables, ya que se ha supuesto que la concentración total de operón (relativo al contenido genético de la célula) no varía durante el transcurso del proceso. Es decir:

$$O^+ + O^- = \text{constante} \quad [6.57]$$

Es importante recalcar que en este sistema la concentración de enzimas se considera variable, al contrario de lo que hacíamos en el modelo de la PFK.

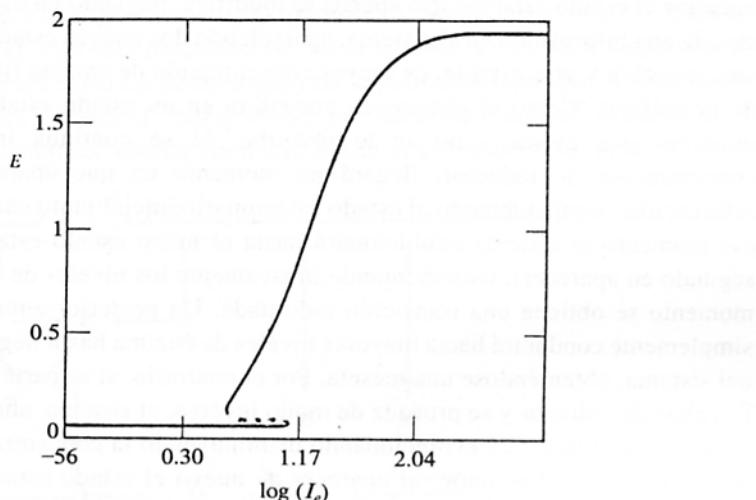


Figura 6.15. Diagrama de bifurcación obtenido para el modelo del operón *Lac*, a partir del sistema de EDOs [6.56]. Se representa la concentración de enzima E en el estado estacionario, en función de la concentración de inductor externo. La zona de trazos representa el estado estacionario inestable. Nicolis y Prigogine (1977).

Una vez fijados los valores de los parámetros del sistema, calculados o estimados de acuerdo a los datos experimentales disponibles, se procede a su estudio en función del parámetro de control, que en este caso es la concentración de inductor externo.

Un resultado típico se presenta en el diagrama de bifurcaciones de la figura 6.15, donde aparece la concentración de enzima β -galactosidasa en el estado estacionario en función de la concentración de inductor. Del estudio del diagrama se aprecia que, como es lógico, concentraciones bajas de inductor conducen a niveles bajos de enzima, mientras que concentraciones altas producen niveles altos, observándose además una transición abrupta. Ahora bien, en la zona intermedia aparece un fenómeno de biestabilidad; es decir, la coexistencia de dos estados estacionarios estables, bajo el mismo conjunto de parámetros de control.

En el sistema habrá una barrera separatrix que diferenciará las cuencas de atracción de ambos estados (que en el diagrama de bifurcaciones coincide con el estado estacionario inestable representado en línea de trazos). Por tanto el sistema alcanzará uno u otro estado estacionario estable dependiendo de las condiciones iniciales.

Con este tipo de diagramas de bifurcación están asociados fenómenos de histéresis. En efecto, si el sistema parte de unas condiciones bajas de inductor, donde sólo existe un estado estacionario de baja concentración de enzima, se alcanzará dicho estado. Si vamos aumentando poco a poco la concentración de inductor el estado estacionario apenas se modifica, llegando un momento en el que sucede una bifurcación en el sistema, apareciendo dos nuevos estados estacionarios: uno inestable y otro estable, de mayor concentración de enzima (región intermedia de la gráfica). Como el sistema se encuentra en un estado estable en él seguirá mientras éste exista y no se le perturbe. Si se continúa incrementando la concentración de inductor, llegará un momento en que aparecerá una nueva bifurcación, desapareciendo el estado estacionario inicial junto con el inestable. En ese momento el sistema evolucionará hasta el único estado estable existente (el segundo en aparecer), incrementando bruscamente los niveles de enzima E . En ese momento se obtiene una transición todo-nada. Un posterior aumento de inductor simplemente conducirá hacia mayores niveles de enzima hasta llegar a la saturación del sistema, obteniéndose una meseta. Por el contrario, si se parte de concentraciones altas de inductor y se procede de modo inverso, el sistema, ahora en el segundo estado estacionario, irá evolucionando disminuyendo la concentración de E . En el momento de la bifurcación, al aparecer de nuevo el estado estacionario primero, el sistema permanecerá en el que se encuentra en ese momento, ya que es estable. Y así hasta que dicho estado deje de existir, con lo que el sistema volverá al primer estado, dándose una disminución brusca en los niveles de enzima. Como se observa el sistema no ha recorrido el mismo camino en un sentido que en otro, obteniéndose un fenómeno de histéresis: el sistema guarda memoria del estado anterior.

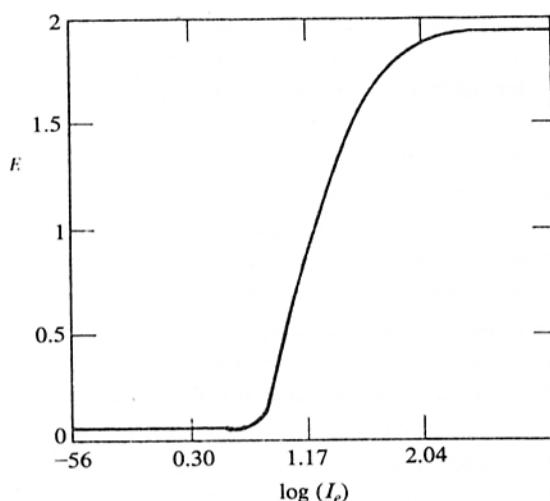


Figura 6.16. Registro aproximado del diagrama de bifurcación del modelo del operón Lac en el caso de mutante criptico (y).

Existe una variedad mutante de *E. coli* llamada *y* (mutante críptico), que no produce la permeasa *M*. En este caso se observa experimentalmente que el cultivo no presenta fenómenos de histéresis al variar la concentración de inductor gratuito. Analizando el modelo convenientemente modificado (suprimiendo del sistema [6.56] la variable correspondiente a la permeasa), se observa que no aparece biestabilidad en el sistema, obteniéndose un diagrama de bifurcación como el mostrado en la figura 6.16. La desaparición de la permeasa hace que el sistema no presente "feedback" positivo, perdiéndose no linealidad en las ecuaciones y obteniéndose un resultado menos complejo desde el punto de vista dinámico.

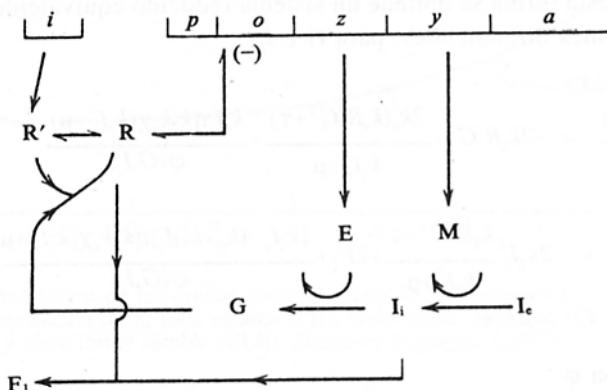


Figura 6.17. Modelo cinético del operón *Lac* en el caso de inducción por β -galactosa, incluyendo represión catabólica. Nicolis y Prigogine (1977).

Por último, vamos a estudiar la dinámica del sistema cuando se añade el inductor natural del operón. En este caso hay que modificar el modelo (según se recoge en la figura 6.17) para incluir el proceso de hidrólisis de la lactosa por la β -galactosa, dando glucosa (*G*) y galactosa (*F*). La aparición de glucosa incluye, además, un nuevo mecanismo ya que se puede unir a la forma inactiva del represor (*R'*) activándolo (forma *R*), con lo cual aparece un mecanismo de "feedback" negativo. Las dos nuevas ecuaciones cinéticas que aparecen serán, pues:



Que suponen la inclusión de una nueva ecuación diferencial en el sistema [6.56]:

$$\frac{dG}{dt} = k_8' RD - k_8 R' G^{n_G} + k_9 I_i E \quad [6.59]$$

Con el fin de poder estudiar y analizar la estabilidad y el comportamiento dinámico del nuevo sistema es necesario reducir el número de variables. Para ello puede emplearse la aproximación de estado cuasiestacionario para las formas enzimáticas, de modo similar a como se hacía en el modelo de oscilaciones glicolíticas. Esta aproximación puede hacerse si se supone que las variaciones en concentración de enzimas son procesos que ocurren en una escala de tiempos diferente a la variación de concentración de metabolitos. De acuerdo con esta suposición, las ecuaciones que gobiernan cambios enzimáticos se pueden aproximar a cero, despejando las concentraciones de enzimas en función de los sustratos implicados. De esta forma se obtiene un sistema reducido equivalente que contiene sólo dos ecuaciones diferenciales, para G e I_i :

$$\begin{aligned} \frac{dG}{dt} &= -2k_8R/G^2 + \frac{2k'_8(k_8R/G^2 + \tau)}{k_3I_i^2 + \mu} + \frac{k_9I_i\eta k'_2k'_4\chi(k_3I_i^2 + \mu)}{\varphi(G, I_i)} \\ \frac{dI_i}{dt} &= -2k_3I_i^2 \frac{k_8R/G^2 + \tau}{k_3I_i^2 + \mu} + 2F_1 + \frac{[k_5I_i - (k_9 + k'_5)I_i]\eta k'_2k'_4\chi(k_3I_i^2 + \mu)}{\varphi(G, I_i)} \end{aligned} \quad [6.60]$$

siendo la función φ

$$\varphi(D, I_i) = k_7[k_2(k_8R/G^2 + \tau) + k'_2(k_3I_i^2 + \mu)] \quad [6.61]$$

y donde se han agrupado parámetros de la forma:

$$\begin{aligned} \chi &= k'_8D \\ \mu &= k'_1 + k'_2 \\ \tau &= k_1R' + F_1 \end{aligned} \quad [6.62]$$

En función de los parámetros seleccionados se puede obtener un comportamiento dinámico mucho más complejo que el del sistema anterior. En concreto, pueden aparecer fenómenos tales como *biestabilidad*, *excitabilidad*, *excitación dura* y *oscilaciones*. A continuación mostramos algunos de los resultados obtenidos de la integración numérica del sistema [6.60].

La figura 6.18 muestra en el plano fase un claro resultado de excitación dura, donde un estado estacionario estable está rodeado de un ciclo límite inestable que, a su vez, está rodeado de un ciclo límite estable. Si se comienza la integración dentro del ciclo límite inestable, la órbita evoluciona hacia el estado estaciona-

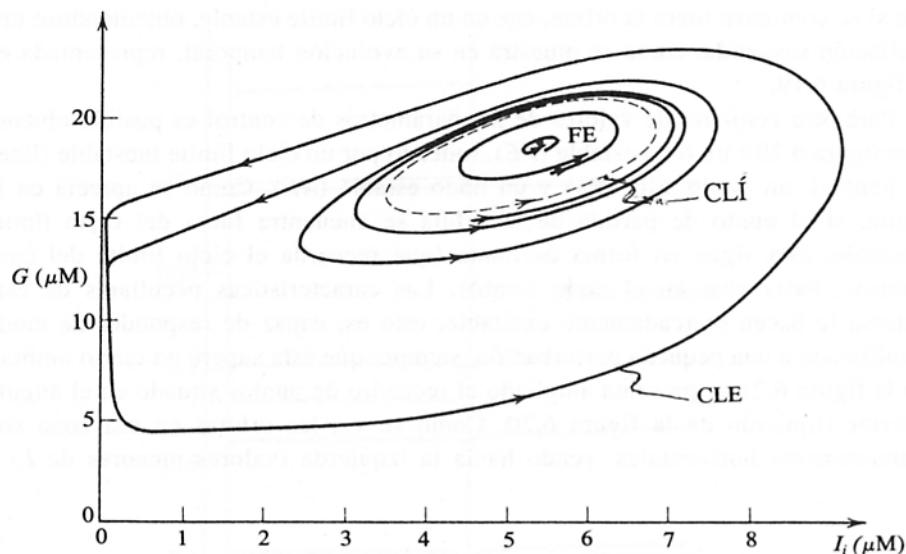


Figura 6.18. Proyección de las órbitas sobre el plano de las variables I_i y G . Se ha señalado la existencia de excitación dura: foco estable (FE), ciclo límite inestable (CLI, marcado mediante línea a trazos) y ciclo límite estable (CLE). Nicolis y Prigogine (1977).

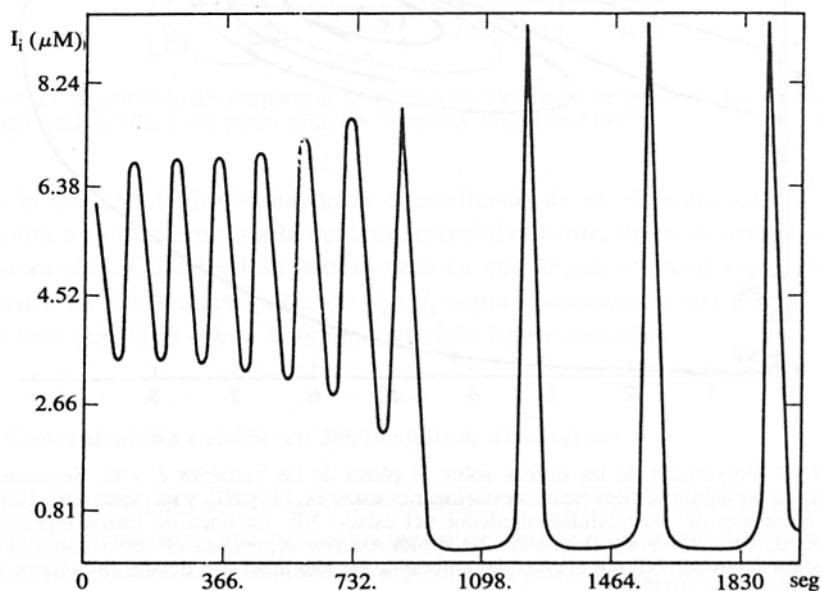


Figura 6.19. Evolución temporal de la concentración de inductor interno, I_i , hasta alcanzar una oscilación sostenida. Nicolis y Prigogine (1977).

rio; si se comienza fuera la órbita, cae en un ciclo límite estable, obteniéndose una oscilación sostenida, como se muestra en su evolución temporal, representada en la figura 6.19.

Para otro conjunto de valores de los parámetros de control es posible obtener (ver figura 6.20): un foco estable (*FE*), rodeado por un ciclo límite inestable (línea de puntos), un punto silla (*PS*) y un nodo estable (*NE*). Como se aprecia en la figura, si el punto de partida de la órbita se encuentra fuera del ciclo límite inestable, ésta sigue en forma oscilante (que recuerda el ciclo límite del caso anterior) hasta caer en el nodo estable. Las características peculiares de este sistema le hacen marcadamente excitabile, esto es, capaz de responder de modo amplificado a una pequeña perturbación, siempre que ésta supere un cierto umbral. En la figura 6.21 se presenta ampliado el recuadro de puntos situado en el ángulo inferior izquierdo de la figura 6.20. Como se ve, las órbitas en esa zona son marcadamente horizontales, yendo hacia la izquierda (valores menores de I_i) o

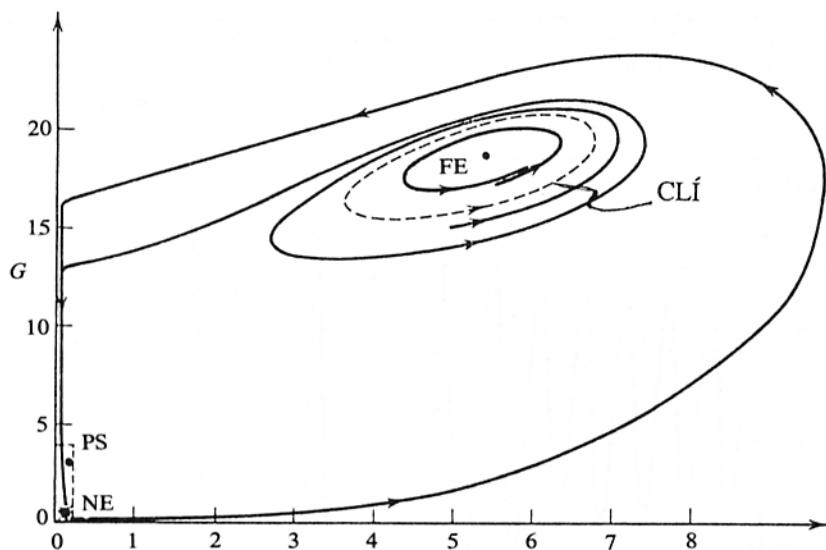


Figura 6.20. Proyección de las órbitas sobre el plano de las variables I_i y G . Se muestra la existencia de biestabilidad (dos estados estacionarios estables, *FE* y *NE*, y un punto silla, *PS*) junto con un fenómeno de excitabilidad alrededor del estado *NE*. La línea de trazos representa la existencia de un ciclo límite inestable. La órbita exterior representa el curso que sigue una perturbación del estado *NE* por encima del umbral de excitabilidad (ver detalle en la figura 6.21). Nicolis y Prigogine (1977).

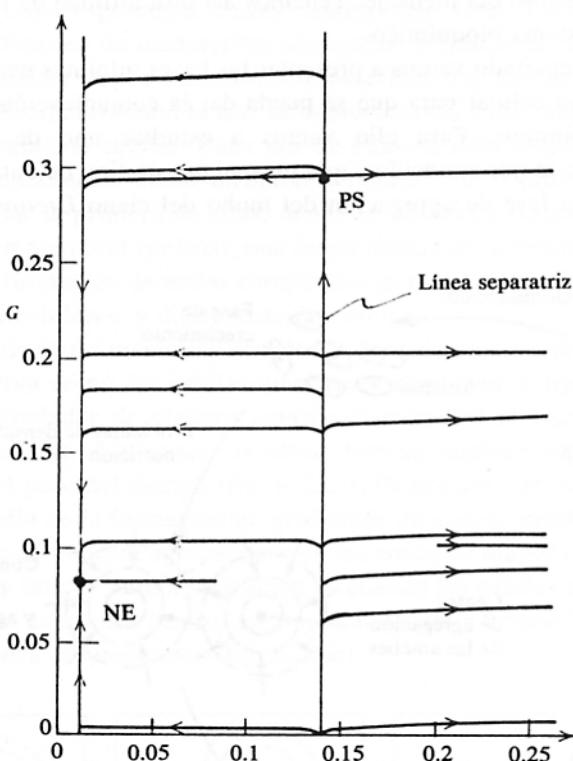


Figura 6.21. Ampliación de una parte de la figura 6.20. Detalle de las órbitas en las inmediaciones del nodo estable, NE, y del punto silla, PS. Nicolis y Prigogine (1977).

hacia la derecha (valores mayores) dependiendo de si el punto de partida se encuentra a la izquierda o a la derecha, respectivamente, de la separatriz vertical del punto silla. Obteniéndose para el caso en que el punto inicial supera la línea separatrix un descomunal pulso de G e I_i como consecuencia del periplo por el plano fase que da la órbita al bordear el ciclo límite inestable.

6.9. Comunicación celular en *Dictyostelium discoideum*

Como se comentó al principio del capítulo, la comunicación entre células (o sistemas pluricelulares) por pulsos de concentración de algún metabolito es bastante frecuente, apareciendo en sistemas de muy diversa procedencia. En este mecanismo de intercomunicación, los elementos trasportadores de información lo hacen, no por su concentración más o menos alta, sino por las variaciones periódicas de ella. Se obtiene así un *código de frecuencias* que el receptor es capaz de interpretar de

acuerdo con el objetivo del mensaje. Tenemos así otra utilidad de la organización temporal de un sistema bioquímico.

En el presente apartado vamos a presentar las bases mínimas necesarias que ha de tener un sistema celular para que se pueda dar la comunicación por pulsos de mensajeros bioquímicos. Para ello vamos a estudiar uno de los ejemplos, experimentalmente mejor conocidos, que presentan este tipo de autoorganización. Nos referimos a la fase de agregación del moho del cieno *Dictiostelium discoideum*.

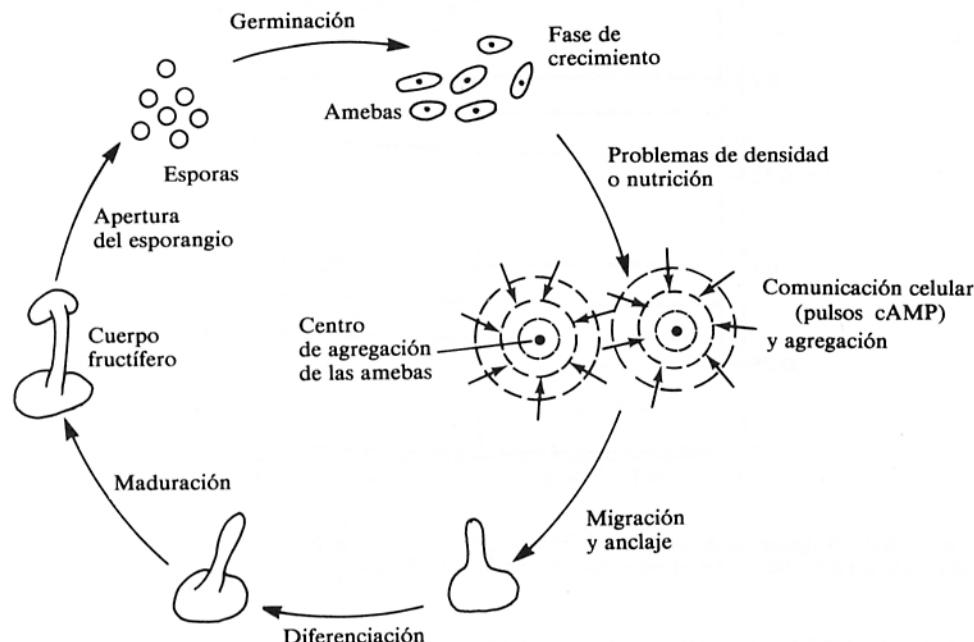


Figura 6.22. Ciclo de vida del moho *Dictiostelium discoideum*.

El ciclo vital de *D. discoideum* comprende diferentes fases bien diferenciadas, según se muestra en la figura 6.22. Cuando las esporas del moho encuentran un medio favorable dan lugar a células en forma ameboide que crecen y se multiplican (fase de crecimiento), en tanto en cuanto existan nutrientes en el medio y la densidad celular no sobrepase un valor crítico. Cuando alguno de los requisitos anteriores falla, aparece una fase de comunicación donde unas amebas se erigen como centros, alrededor de los cuales empiezan a migrar las células de su entorno (a esta fase se le llama también periodo de inanición). El resultado de esta agregación son masas pluricelulares no diferenciadas que migran por el medio hasta encontrar un lugar de fijación. Entonces se produce un fenómeno de diferenciación celular que da lugar a un organismo pluricelular diferenciado llamado cuerpo

fructífero, en cuyo esporangio crecen esporas que serán liberadas al medio en espera de condiciones de maduración adecuadas, cerrando el ciclo.

En las diferentes etapas anteriormente descritas, hay tres en las cuales existen procesos de autoorganización: la fase de comunicación, la de migración-agregación y la de diferenciación celular. Cada una de ellas ha sido ampliamente estudiadas tanto experimentalmente como mediante modelos. En el presente apartado sólo vamos a estudiar la primera de ellas, donde se observa básicamente el fenómeno de organización temporal (pulsos), que luego conducirá a fenómenos de organización espacial (formación de ondas compuestas por una mayor densidad de células, agregados pluricelulares, y diferenciación celular).

Tras un periodo de inanición, aparece la fase de agregación (ver figura 6.23) donde se observa cómo las células ameboideas empiezan a organizarse en ondas concéntricas alrededor de algunos centros distribuidos al azar por el medio de cultivo (fig. 6.23.a). A veces estas ondas forman también espirales que se van abriendo con el paso del tiempo (fig. 6.23.b). Parece ser que esta organización se realiza por medio de la formación de gradientes de alguna sustancia quimiotáctica que las amebas reconocen, agrupándose en las zonas de mayor concentración. Una vez pasada esta fase de autoorganización es cuando las células empiezan a migrar, alrededor de los anteriores centros emisores, llegando a formar "canales" en forma de ramificaciones arborescentes (fig. 6.23.c).

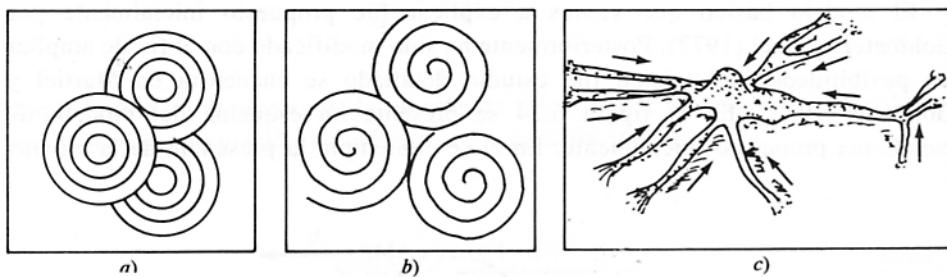


Figura 6.23. Diferentes etapas del proceso de comunicación celular y agregación de *D. discoideum*. Emisión de pulsos de cAMP: concéntricos (a) y espirales (b). Aspecto de los canales o brazos por donde se trasladan las amebas hacia un centro de agregación (c).

Experimentalmente está claramente demostrado que en la fase de comunicación la sustancia que actúa como agente quimiotáctico es el cAMP (Konijn et al. 1967). De modo que los desencadenantes del proceso de comunicación hacen que algunas células empiecen a emitir pulsos periódicos de cAMP con periodicidad de varios minutos (Gerisch y Wick 1975). Los pulsos detectados de cAMP son suficientemente largos como para involucrar un área de radio aproximado a 1 cm (Roos et al. 1975). Dado que el diámetro medio de las amebas de *D. discoideum* es de unas 50 μm , parece lógico pensar que tal cantidad de cAMP originada en los pulsos no

proceda de la célula central emisora. Por tanto deberá existir un mecanismo de respuesta por medio del cual las células de alrededor, al recibir un pulso de cAMP, respondan con un nuevo pulso (respuesta de excitabilidad), y así sucesivamente, ampliando el radio de acción de la onda de cAMP. Ahora bien, para que se formen ondas concéntricas es necesario que las células excitables (también llamadas células relé) pasen por una fase refractaria a pulsos de cAMP, que además ha de tener un periodo aproximado al periodo de oscilación de las células centro. De otra forma, si cada célula emite un pulso en cualquier momento, se mezclarían los pulsos de unas y otras, promediando los niveles de cAMP, con lo que no se formarían gradientes ni ondas.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente y con la trama experimental, el modelo bioquímico capaz de explicar el comportamiento de la fase pulsátil habrá de explicar al menos tres aspectos:

- 1) *Emisión periódica* de pulsos en las células centro.
- 2) *Mecanismo de relé* de las células que no están emitiendo pulsos periódicos.
- 3) *Fase o periodo refractario* después de la emisión de un pulso.

a) *Modelo alostérico*

El modelo básico que vamos a explicar fue propuesto inicialmente por Goldbeter y Segel (1977). Posteriormente ha sido modificado con el fin de ampliar las posibilidades del mismo (un estudio detallado se encuentra en Martiel y Goldbeter 1987). En la figura 6.24 se presenta un esquema del modelo de membrana propuesto inicialmente. En él se contempla la presencia de la enzima

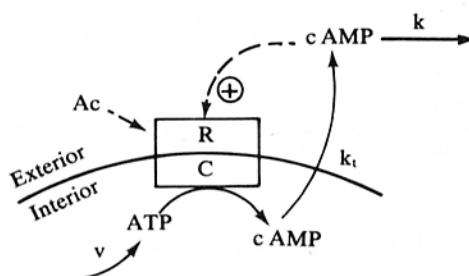


Figura 6.24. Modelo alostérico para la síntesis de cAMP en *D. discoideum*. Goldbeter y Segel (1977).

adenilato-ciclasa (AC) inserta en la membrana celular, con dos subunidades: una exterior, reguladora (R), que posee receptores de cAMP, y una interior, catalítica (C) que cataliza la transformación de ATP en cAMP. Por otro lado, el cAMP

interior a la membrana puede transportarse fuera con una constante de transporte k_r . El sistema se mantiene abierto suponiendo un aporte continuo de ATP (v) a las inmediaciones de la cara interna de la membrana, y una eliminación proporcional a su concentración (k) del cAMP exterior, fundamentalmente por acción de alguna fosfo-diesterasa (PD). Como se puede observar, este modelo implica serias simplificaciones, como son, entre otras, suponer las dos subunidades de la AC siempre unidas, o no incluir metabolismo de ATP o hidrólisis por fofodiesterasas del cAMP interior a la célula.

El análisis cinético del modelo puede hacerse suponiendo una activación de la AC por parte del cAMP externo, de carácter alóstérico similar al estudiado para la PFK en los apartados 6.3 y 6.4. De esta forma, haciendo un tratamiento simplificado similar al empleado en la deducción del sistema de ecuaciones [6.28], se puede obtener el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}\frac{d\alpha}{dt} &= v - \sigma\varphi(\alpha, \gamma) \\ \frac{d\beta}{dt} &= q\sigma\varphi(\alpha, \gamma) - k_r\beta \\ \frac{d\gamma}{dt} &= \frac{k_r\beta}{h} - k\gamma\end{aligned}\quad [6.63]$$

donde la función φ representa la función de velocidad de una reacción activada por producto, cuya expresión es idéntica a la ecuación [6.32]:

$$\varphi(\alpha, \gamma) = \frac{\alpha(1+\alpha)(1+\gamma)^2}{L + (1+\alpha)^2(1+\gamma)^2} \quad [6.64]$$

Las concentraciones de sustratos se han adimensionado de acuerdo al siguiente cambio de variables:

$$\begin{aligned}\alpha &= \frac{[ATP]}{K_m} \\ \beta &= \frac{[cAMP]_{int}}{K_p} \\ \gamma &= \frac{[cAMP]_{ext}}{K_p}\end{aligned}\quad [6.65]$$

donde K_m es la constante aparente de M-M de la enzima (AC) para el sustrato (ATP) y K_p la constante de disociación del producto (cAMP). El parámetro q aparece como consecuencia del proceso de normalización y es igual a K_m/K_p ; h es un parámetro que incluye el factor de dilución de cAMP al pasar del interior al exterior, donde el volumen es mayor; L es la constante alóstérica de la AC; y σ la velocidad máxima de la reacción enzimática, V_M , dividido por K_M .

El modelo se puede analizar directamente con tres variables, calculando los estados estacionarios (que para la mayoría de valores de parámetros es único), su estabilidad en función de los parámetros de control y, posteriormente, la integración numérica del sistema [6.63] para los valores de parámetros seleccionados de acuerdo con el análisis de estabilidad. Ahora bien, por razones de facilidad en la representación y con el fin de poder utilizar las técnicas de plano fase, se puede simplificar el sistema a otro equivalente de dos ecuaciones diferenciales con dos variables. En efecto, si despejamos q en la ecuación [6.61.b], queda:

$$\frac{1}{q} \frac{d\beta}{dt} = \sigma\varphi(\alpha, \gamma) - \frac{k_i}{q}\beta \quad [6.66]$$

si ahora se considera que $q \gg 1$, se puede aproximar la anterior ecuación [6.66] a cero:

$$\sigma\varphi(\alpha, \gamma) - \frac{k_i}{q}\beta \approx 0 \quad [6.67]$$

de donde se puede despejar el valor *cuasiestacionario* de β :

$$\beta^* \approx \frac{q\sigma}{k_i}\varphi(\alpha, \gamma) \quad [6.68]$$

que sustituido en [6.63.c] da lugar al nuevo sistema reducido:

$$\begin{aligned} \frac{d\alpha}{dt} &= v - \sigma\varphi(\alpha, \gamma) \\ \frac{d\gamma}{dt} &= \frac{q\sigma}{h}\varphi(\alpha, \gamma) - k\gamma \end{aligned} \quad [6.69]$$

La estructura del sistema es similar al propuesto de acuerdo con el modelo mínimo contemplado en el apartado 6.4, por lo que podemos utilizar para su análisis de estabilidad el teorema deducido en el apartado 6.5. Por tanto, el sistema presentará inestabilidad siempre que la isoclina $d\gamma/dt=0$ presente pendiente

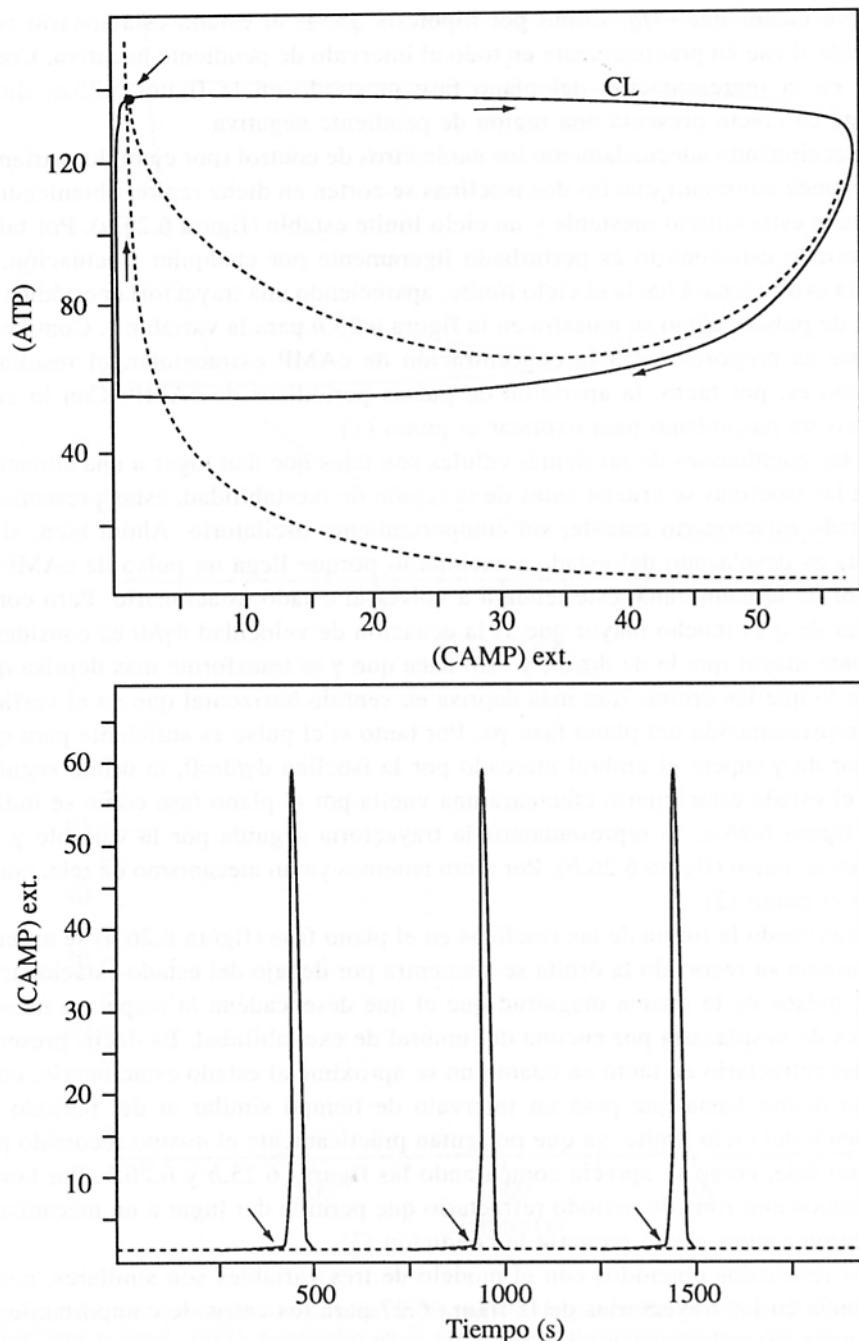


Figura 6.25. Comportamiento oscilatorio del modelo de Goldbeter y Segel (1977) para pulsos de cAMP en *D. discoideum*. Modelo de dos variables [6.69]: (a) plano fase, donde se muestra el ciclo límite estable; (b) evolución temporal de cAMP externo.

negativa menor que $-1/q$. Como por hipótesis $q >> 1$, el estado estacionario será inestable si cae en prácticamente en todo el intervalo de pendiente negativa. Como se ve en la representación del plano fase mostrado en la figura 6.25.a, dicha isoclinia en efecto presenta una región de pendiente negativa.

Seleccionando adecuadamente los parámetros de control (por ejemplo, variando v), se puede conseguir que las dos isoclinas se corten en dicha región obteniéndose un estado estacionario inestable y un ciclo límite estable (figura 6.25.a). Por tanto si el estado estacionario es perturbado ligeramente por cualquier fluctuación, el sistema evolucionará hacia el ciclo límite, apareciendo una trayectoria periódica en forma de pulsos, como se muestra en la figura 6.25.b para la variable γ . Como esta variable es proporcional a la concentración de cAMP extracelular, el resultado obtenido es, por tanto, la aparición de pulsos periódicos de cAMP. Con lo cual tenemos un mecanismo para explicar el punto (1).

Si las condiciones de las demás células son tales que dan lugar a una situación donde las isoclinas se cruzan antes de la región de inestabilidad, éstas presentarán un estado estacionario estable, sin comportamiento oscilatorio. Ahora bien, si el sistema es desplazado del estado estacionario porque llega un pulso de cAMP al exterior de la membrana, éste tenderá a volver al estado estacionario. Pero como el valor de q es mucho mayor que 1, la ecuación de velocidad $d\gamma/dt$ es considerablemente mayor que la de $d\alpha/dt$, y esto hace que γ se transforme más deprisa que α , con lo que las órbitas irán más deprisa en sentido horizontal que en el vertical en la representación del plano fase $\gamma\alpha$. Por tanto si el pulso es suficiente para que el valor de γ supere el umbral marcado por la isoclinia $d\gamma/dt=0$, la órbita seguida hasta el estado estacionario efectuará una vuelta por el plano fase como se indica en la figura 6.26.a. Si representamos la trayectoria seguida por la variable γ , se observa un pulso (figura 6.26.b). Por tanto tenemos ya un mecanismo de relé, como exigía el punto (2).

Observando la forma de las isoclinas en el plano fase (figura 6.26.a) se aprecia que durante su recorrido la órbita se encuentra por debajo del estado estacionario, donde pulsos de la misma magnitud que el que desencadena la respuesta no son capaces de desplazarla por encima del umbral de excitabilidad. Es decir, presenta carácter refractario en tanto en cuanto no se aproxime al estado estacionario, cosa que no ocurre hasta que pasa un intervalo de tiempo similar al del periodo de oscilación del ciclo límite, ya que presentan prácticamente el mismo recorrido por el plano fase, como se aprecia comparando las figuras 6.25.b y 6.26.b. Por tanto, ya tenemos una zona de periodo refractario que permite dar lugar a un mecanismo de sincronización, como requería la condición (3).

Los resultados obtenidos con el modelo de tres variables son similares, como se aprecia en las trayectorias de la figura 6.27 para los casos de comportamiento oscilatorio (a) y de excitabilidad (b).

Queda por explicar el proceso seguido por las células que primero no presentan comportamiento oscilatorio y que, de pronto, comienzan a oscilar. El

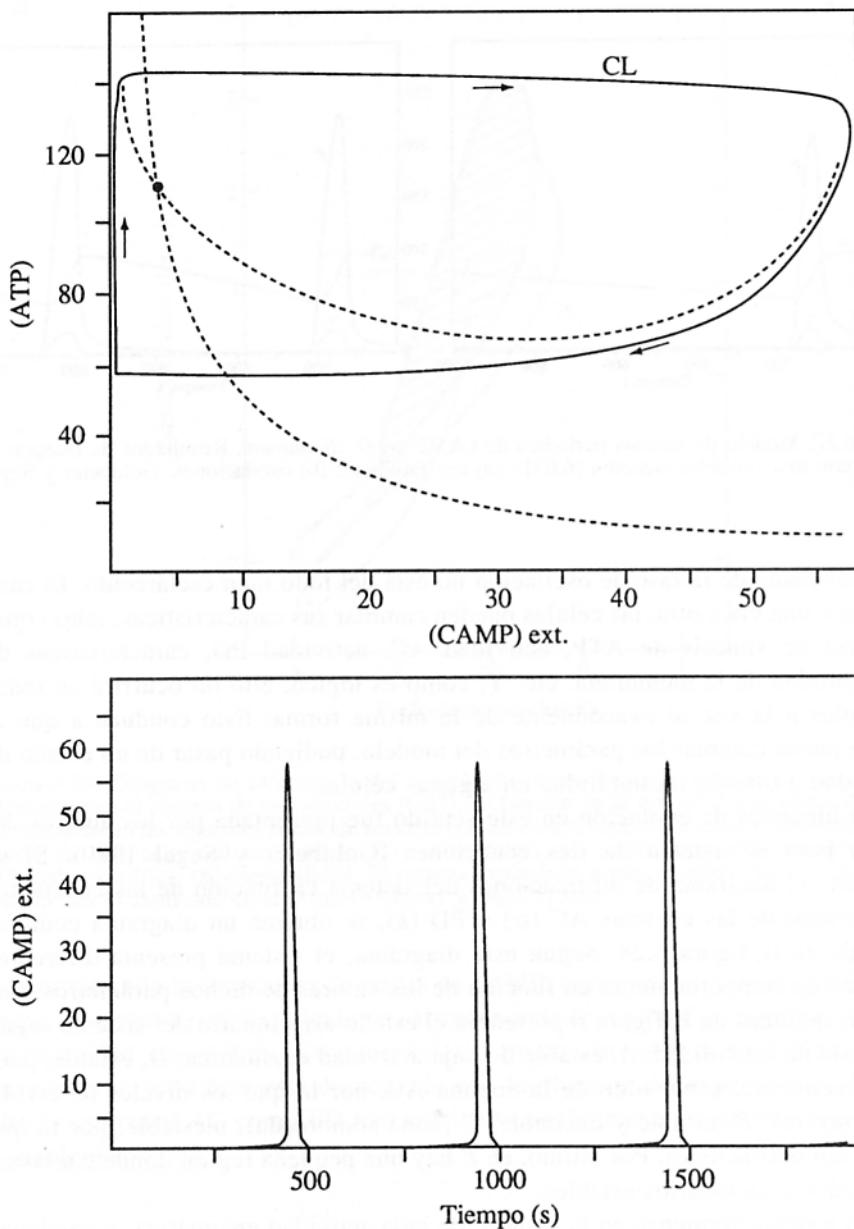


Figura 6.26. Comportamiento excitible en el modelo de pulsos de cAMP en *D. discoideum* (Goldbeter y Segel, 1977). Resultados de la integración del modelo reducido de dos variables (ecuaciones [6.69]): (a) plano fase donde se muestra la órbita seguida tras una perturbación por encima del umbral; (b) evolución temporal de cAMP externo, donde se muestran tres perturbaciones sucesivas, marcadas por las flechas.

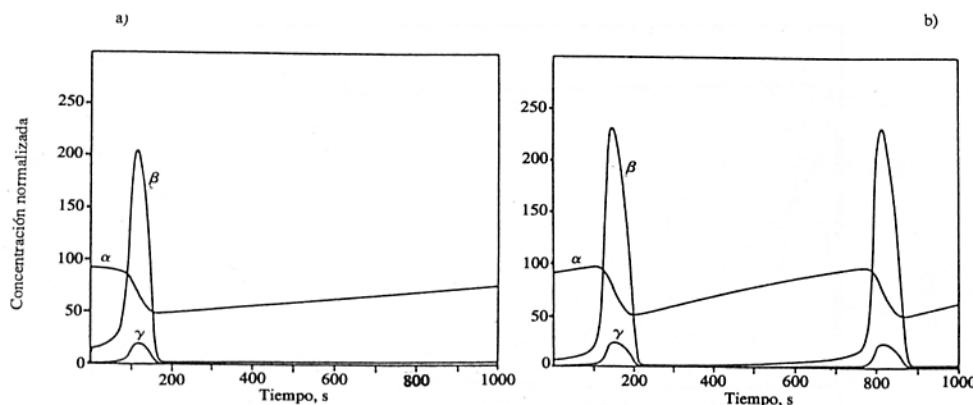


Figura 6.27. Modelo de síntesis periódica de cAMP en *D. discoideum*. Resultados de integrar el modelo con tres variables (sistema [6.63]): (a) excitabilidad; (b) oscilaciones. Goldbeter y Segel (1977).

desencadenante de la fase de oscilación no está del todo bien esclarecido. El caso es que por una vía u otra, las células pueden cambiar sus características, tales como velocidad de síntesis de ATP, actividad AC, actividad PD, características de permeabilidad de la membrana, etc. Y, como es lógico, ello no ocurrirá en todas las células a la vez ni exactamente de la misma forma. Esto conduce a que el sistema puede cambiar los parámetros del modelo, pudiendo pasar de un estado de estabilidad a otro de inestabilidad en algunas células.

Una hipótesis de evolución en este sentido fue presentada por los autores del modelo para el sistema de tres ecuaciones (Goldbeter y Segel 1980). Si se representa el diagrama de bifurcaciones del sistema en función de las constantes de velocidad de las enzimas AC (σ) y PD (k), se obtiene un diagrama como el mostrado en la figura 6.28. Según este diagrama, el sistema presenta diferentes dominios de comportamiento en función de los valores de dichos parámetros. Las distintas regiones de la figura representan el estado estacionario del sistema según el análisis de estabilidad: *A*, estable de baja actividad enzimática; *D*, estable, pero de alta actividad, sobre todo de la enzima AC, por lo que los niveles de cAMP serán mayores; *B*, estable y excitable; *C* (zona sombreada), inestable, por lo que aparecerán oscilaciones. Por último, en *E* hay una pequeña región donde coexisten dos estados estacionarios estables.

Si el sistema comienza en la zona *A*, de baja actividad enzimática, y comienza a incrementar simultáneamente ambas actividades, pasará de la zona estable a la excitable, (*B*), y luego al dominio de las oscilaciones, (*C*). Es decir, de la región donde no se produce actividad relé, a la región de actividad relé y luego a la de pulsos periódicos. Una vez que algunas células han alcanzado esta región, lo probable es que el resto se encuentre ya en la zona *B*, por lo que actuarán de

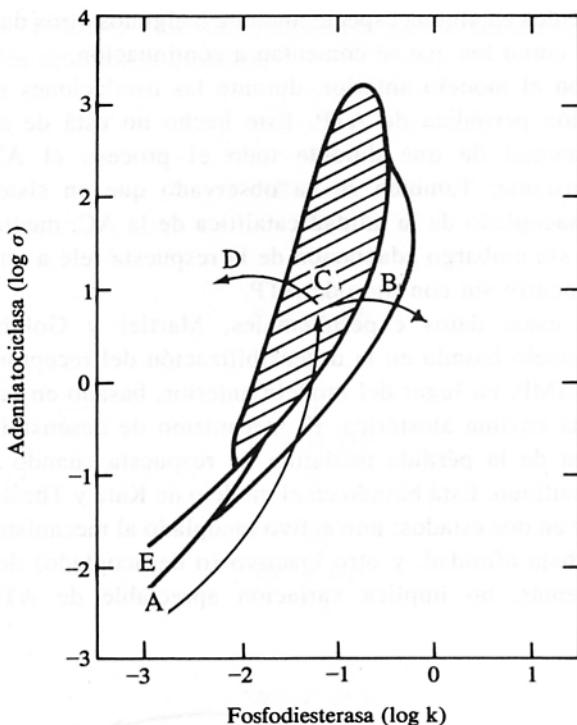


Figura 6.28. Diagrama de bifurcación del modelo de comunicación celular de *D. discoideum*, calculado para el sistema de tres variables [6.63], en función de la actividad enzimática de FD y AC. Se destacan las siguientes zonas, de acuerdo con las características del estado estacionario: (A) estable de baja actividad enzimática; (B) excitabilidad; (C) oscilaciones; (D) estable de alta actividad enzimática; (E) biestabilidad. El sistema evoluciona según se indica por las flechas, de acuerdo con lo explicado en el texto. Goldbeter y Segel (1980).

relé permitiendo la formación de ondas de cAMP, como veíamos al principio. Por último, el sistema podrá evolucionar, abandonando la región C, a la región D, con alta actividad enzimática. Este mecanismo propuesto para la evolución de *D. discoideum* en esta fase está de acuerdo con la observación experimental de que tanto la actividad AC como PD van creciendo paulatinamente durante el periodo de inanición.

b) *Modelo de desensibilización del receptor de membrana*

Aunque el modelo de Goldbeter y Segel permite explicar de un modo razonable la aparición de comportamiento oscilatorio y excitable en *D. discoideum*, no es capaz de justificar algunos puntos concretos, como es la aparición de pulsos

aperiódicos detectados en alguna especie mutante o algunos otros datos experimentales importantes, como los que se comentan a continuación.

De acuerdo con el modelo anterior, durante las oscilaciones se observa una apreciable variación periódica de ATP. Este hecho no está de acuerdo con la evidencia experimental de que durante todo el proceso el ATP permanece prácticamente constante. También se ha observado que en sistemas donde el receptor se ha desacoplado de la unidad catalítica de la AC, mediante la adición de cafeína, existe sin embargo adaptación de la respuesta relé a una estimulación constante, y esto ocurre sin consumo de ATP.

Para explicar estos datos experimentales, Martiel y Goldbeter en 1984 propusieron un modelo basado en la desensibilización del receptor de membrana después de unir cAMP, en lugar del modelo anterior, basado en la suposición de que la AC era una enzima alostérica. El mecanismo de desensibilización de un receptor da cuenta de la pérdida paulatina de respuesta cuando se estimula el mismo de modo continuo. Está basado en el modelo de Katz y Thesleff (1957), que supone al receptor en dos estados: uno activo (acoplado al mecanismo de respuesta fisiológico) y de baja afinidad, y otro inactivo (o desacoplado) de alta afinidad. Este modelo, además, no implica variación apreciable de ATP durante las oscilaciones.

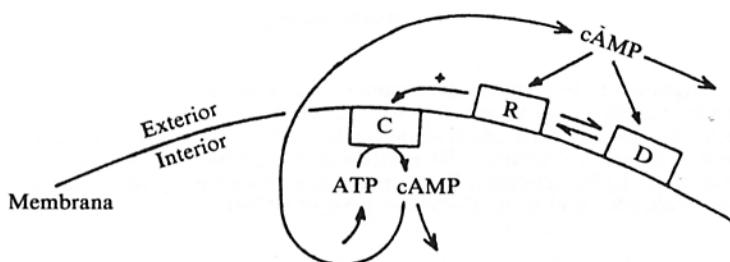
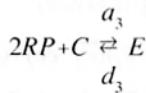
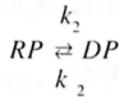
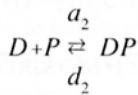
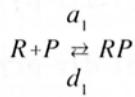


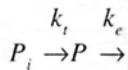
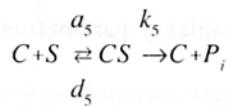
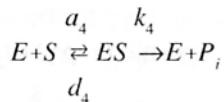
Figura 6.29. Modelo para la síntesis de cAMP en *D. discoideum* basado en la desensibilización del receptor de membrana. Martiel y Goldbeter (1984).

En la figura 6.29 se presenta un esquema del modelo propuesto. Como se ve, el receptor, por fuera de la membrana, está en equilibrio conformacional entre dos estados, *R* y *D*. Sólo el estado *R* es capaz de activar la AC. El cAMP exterior (*P*) se une con diferente afinidad a una u otra forma, hecho que se incluirá en las ecuaciones cinéticas manejando adecuadamente los valores de las constantes cinéticas. Además, tanto el cAMP interno como el ATP pueden ser hidrolizados en el interior de la célula. El resto del modelo es similar al de Goldbeter y Segel propuesto anteriormente.

Los distintos procesos cinéticos propuestos por el modelo se pueden explicitar en las siguientes reacciones cinéticas:



[6.70]



Como se deduce de las ecuaciones [6.70.f] y [6.70.g], existen dos formas enzimáticas que transforman ATP (S) en cAMP en el interior de la membrana (P_i).

De acuerdo con el modelo, la forma enzimática más activa de la AC, E , resulta de la unión de dos subunidades de receptor activas unidas a dos moléculas de cAMP externo ($2RP$) a la subunidad catalítica C .

El análisis cinético de este conjunto de reacciones conduce al siguiente sistema de nueve ecuaciones diferenciales con nueve incógnitas:

$$\begin{aligned}
 \frac{d\rho}{dt} &= k_1(L_1\delta - \rho) + d_1(x - \rho\gamma) \\
 \frac{d\delta}{dt} &= k_1(\rho - L_1\delta) + d_2(y - \rho c\gamma) \\
 \frac{dx}{dt} &= k_2(L_2y - x) + d_1(\rho\gamma - x) + \frac{2\mu}{h}d_3(\bar{e} - \varepsilon x^2\bar{c}) \\
 \frac{dc}{dt} &= d_3(\bar{e} - \varepsilon x^2\bar{c}) + (d_5 + k_5)(\bar{cs} - \bar{c}\alpha\theta) \\
 \frac{d\bar{e}}{dt} &= d_3(\varepsilon x^2\bar{c} - \bar{e}) + (d_4 + k_4)(\bar{es} - \bar{e}\alpha) \\
 \frac{des}{dt} &= (d_4 + k_4)(\bar{e}\alpha - \bar{es}) \\
 \frac{d\alpha}{dt} &= v - k'\alpha - \rho(\bar{es} + \lambda\bar{cs}) \\
 &\quad + \theta_E [(d_4 + k_4)(\bar{es} - \bar{ec}) + (d_5 + k_5)(\bar{cs} - \bar{c}\alpha\theta)] \\
 \frac{d\beta}{dt} &= q\sigma(\bar{es} + \lambda\bar{cs}) - (k_i + k_j)\beta \\
 \frac{d\gamma}{dt} &= \frac{k_i}{h}\beta - k_i\gamma + \eta[d_1(x - \rho\gamma) + d_2(y - \delta c\gamma)]
 \end{aligned} \tag{6.71}$$

donde se han normalizado variables y parámetros de acuerdo con los siguientes cambios de variable:

$$\begin{aligned}
 \rho &= \frac{R}{R_T} & \delta &= \frac{D}{R_T} \\
 x &= \frac{RP}{R_T} & y &= \frac{DP}{R_T} \\
 \bar{e} &= \frac{E}{E_T} & \bar{es} &= \frac{ES}{E_T} \\
 c &= \frac{C}{R_T} & \bar{cs} &= \frac{CS}{R_T}
 \end{aligned} \tag{6.72}$$

donde R_T y E_T representan la concentración total de receptor y AC, respectivamente. Las variables α , β y γ están definidas de igual forma a como se hizo en el

modelo anterior, según las igualdades [6.65], donde $K_R = d_1/a_1$ y $K_m = (d_4 + k_4)/a_4$. Si se supone que la concentración total de enzima no varía, las variables x e y están relacionadas linealmente, por lo que en el sistema [6.71] se ha omitido la expresión de la variación de y . Algunos de los parámetros también han sido adimensionados y agrupados de la siguiente forma: $L_1 = k_{11}/k_1$, que representa la relación de equilibrio entre los estados R y D en ausencia de ligando, mientras que $L_2 = k_{22}/k_2$; $c = K_R/K_D$, donde $K_D = d_2/a_2$ es el coeficiente de asociación no exclusiva de cAMP extracelular a los dos estados del receptor; por último, $v = v_i/K_m$, representa la llegada de sustrato al sistema. Otros parámetros, como h y q , por ejemplo, tienen el mismo significado que en el modelo explicado anteriormente.

Debido al elevado número de parámetros y variables, el análisis y estudio de este sistema, tal como está, es sumamente complicado, por lo que se puede proceder a su simplificación haciendo la habitual suposición de estado cuasiestacionario para las formas enzimáticas. Después de este proceso resulta un sistema más reducido de cuatro ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned} \frac{d\rho}{dt} &= f_2(\gamma)(1-\rho) - f_1(\gamma)\rho \\ \frac{d\alpha}{dt} &= v - k'\alpha - \sigma\phi(\rho, \gamma, \alpha) \\ \frac{d\beta}{dt} &= q\sigma\phi(\rho, \gamma, \alpha) - (k_1 + k_r)\beta \\ \frac{d\gamma}{dt} &= \frac{k_t}{h}\beta - k_e\gamma \end{aligned} \quad [6.73]$$

donde se han agrupado variables y parámetros, según las siguientes igualdades:

$$\begin{aligned} f_1(\gamma) &= \frac{k_1 + k_2\gamma}{1 + \gamma} \\ f_2(\gamma) &= \frac{k_1 L_1 + k_2 L_2 c \gamma}{1 + c \gamma} \\ \phi(\rho, \gamma, \alpha) &= \frac{\alpha(\lambda\theta + \varepsilon Y^2)}{1 + \alpha\theta + \varepsilon Y^2(1 + \alpha)} \\ Y &= \frac{\rho\gamma}{1 + \gamma} \end{aligned} \quad [6.74]$$

El anterior sistema es capaz de presentar, por supuesto, el tipo de comportamiento oscilatorio y de relé esperado. Una muestra del comportamiento oscilatorio

se puede apreciar en las trayectorias representadas en la figura 6.30, donde se puede resaltar el hecho de que durante las oscilaciones los niveles de ATP (α) no varían apreciablemente. Además, este sistema también es capaz de explicar fenómenos de desensibilización del receptor cuando se estimula el sistema de modo constante. Por último, un estudio más detallado del mismo revela la existencia de varias regiones de inestabilidad, donde puede aparecer comportamiento oscilatorio complejo del tipo oscilaciones a ráfagas (figura 6.31) e incluso comportamiento caótico (una muestra de ello se puede observar en el capítulo 10 en las figuras 10.15 y 10.16).

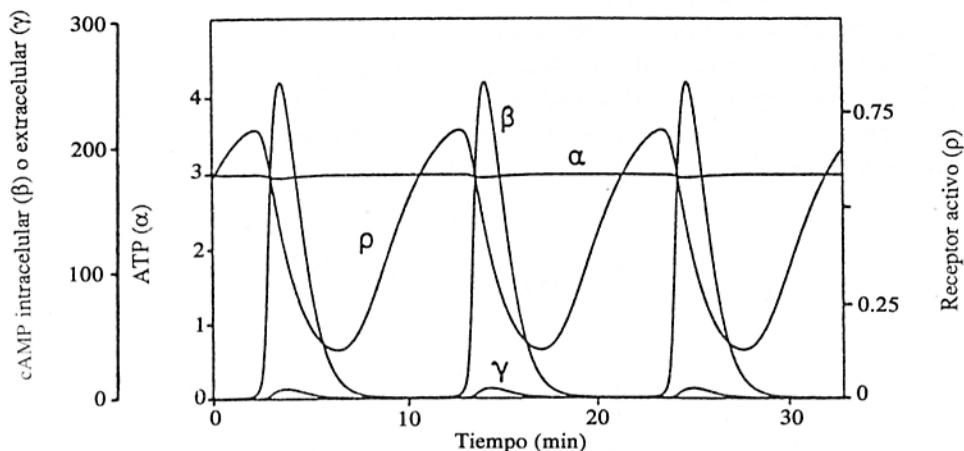


Figura 6.30. Comportamiento oscilatorio de las cuatro variables del sistema [6.73], deducido para el modelo de comunicación celular de *D. discoideum*. Martiel y Goldbeter (1987).

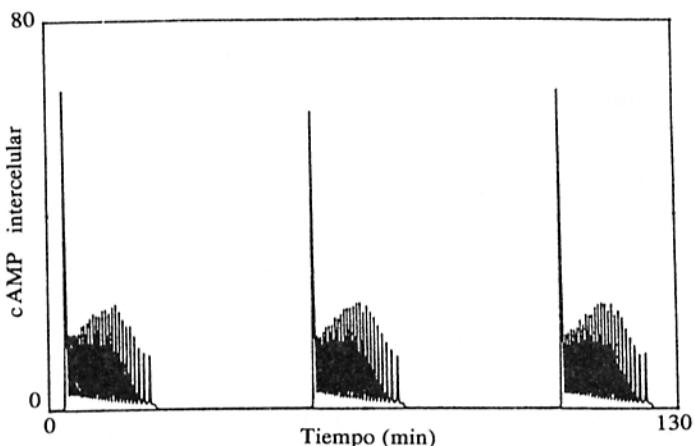


Figura 6.31. Oscilaciones a ráfagas observadas en el sistema [6.73], en los niveles de cAMP intracelular, de *D. discoideum*. Martiel y Goldbeter (1985).

LECTURAS RECOMENDADAS

- COSNARD, M.; DEMONGEOT, J.; y LE BRETON, A. (eds.): *Rhythms in biology and other fields of application: deterministic and stochastic approaches*, Berlín, Springer-Verlag, 1983.
- CHANCE, B.; PYE, E. K.; GHOSH, A. K.; y HESS, B. (eds.): *Biological and biochemical oscillators*, Academic Press, Nueva Yor, 1973.
- DE ANGELIS, D. L.; POST, W. M.; y TRAVIS, C. C.: *Positive feedbaack in natural systems*, Berlín, Springer-Verlag, 1986.
- EDMUN, L. N., Jr. (ed): *Cell cycle clocks*, Nueva York, Marcel Dekker, 1984.
- GLASS, L.; y MACKEY, M. C.: *From clocks to chaos. The rhytms of life*, Princeton, Princeton University Press, 1988.
- GOLDBETER, A. (ed.): *Cell to cell signalling*, Nueva York, Academic Press, 1989.
- GOLDBETER, A.: *Rithmes et chaoas dans les systèmes biochimiques et cellulaires*, París, Masson, 1990.
- OTHMER, H. G. (ed): *Nonlinear oscillations in biology and chemistry*, Berlín, Springer-Verlag, 1985.
- RICARD, J.; y CORNISH-BOWDEN, A. (ed): *Dynamics of biochemical systems*, Nueva York, Plenum Press, 1984.
- WELLCH, G. R.; y CLEGG, J. S. (eds.): *The organization of cell metabolism*, Nueva York, Plenum Press, 1986.