

TESIS DE MAESTRIA

**DESARROLLO Y ESTUDIO DE UN MODELO CINETICO DE
ACOPLAMIENTO ENERGETICO EN MEMBRANAS**

Ernesto Cristina

Orientador: Dr. Julio A. Hernández

Laboratorio: Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay

Tribunal: Dr. Eduardo Mizraji, Dr. Luis Acerenza, Dr. Gonzalo Pizarro.

Marzo de 2000

INDICE

RESUMEN	4
1 INTRODUCCION	6
Glosario de Símbolos	12
2 MODELO MATEMATICO	13
3 RESULTADOS NUMERICOS Y DISCUSION	17
3.1 Métodos Numéricos	17
3.2 Estados de Referencia	19
3.3 Estudios de Estado Estacionario	21
3.3.1 Efectos causados por modificaciones en S_1 y en ϕ_{\max}	21
3.3.2 Efectos causados por modificaciones en la densidad de las enzimas electrogénicas (N_T y M_T)	24
3.3.3 Efectos causados por modificaciones en P_C	27
3.4 Estudios Dinámicos	29
3.4.1 Efectos dinámicos causados por modificaciones en S_1 y en ϕ_{\max}	29
3.4.2 Efectos dinámicos causados por “pulsos” de S_1 , manteniendo V_m o C_i constantes	33
4 CONCLUSIONES	38
5 PERSPECTIVAS	41

APENDICE I	
Flujos de C mediados por las enzimas electrogénicas	44
APENDICE II	
Solución estacionaria para V_m	49
APENDICE III	
Determinación de los valores de estado estacionario	52
APENDICE IV	
Diferencias en el consumo de S_1 y de S_2	54
APENDICE V	
Consideraciones termodinámicas	56
APENDICE VI	
Procesos de “slippage”	59
BIBLIOGRAFIA	61
TABLA I	
Valores numéricos de los parámetros	65

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis consiste en contribuir a la comprensión de las propiedades cinéticas fundamentales de los procesos de acoplamiento energético que tienen lugar en las membranas biológicas. Para ello hemos desarrollado y estudiado un modelo que describe las características básicas de un sistema elemental de acoplamiento quimiosmótico, de la clase de los que existen en la membrana plasmática de ciertos microorganismos que emplean el gradiente electroquímico de Na^+ como intermediario energético (véase por ejemplo, Stoeckenius, 1985; Gottschalk y Blaut, 1990; Skulachev, 1992; Dimroth, 1992; 1997). Específicamente, hemos considerado un modelo de microorganismo que expresa en su membrana interna: a) dos enzimas electrogénicas (E_1 y E_2), las cuales transportan el mismo catión monovalente (C), y b) rutas específicas para la electrodifusión de C y de un anión monovalente (A). A su vez, las enzimas E_1 y E_2 acoplan el transporte de C a las reacciones $S_1 \leftrightarrow P_1$ y $S_2 \leftrightarrow P_2$, respectivamente (S_1 , P_1 : especies moleculares intracelulares del nutriente S_1 y de su respectivo producto degradativo P_1 ; S_2 , P_2 : especies moleculares intracelulares del metabolito energético S_2 y de su respectivo producto degradativo P_2).

En base a estas suposiciones se desarrolla un modelo matemático que describe la velocidad de cambio de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, de las concentraciones internas de C y de A, y de las concentraciones de S_2 y de P_2 . Una de las características más relevantes del modelo estudiado consiste en la incorporación de las enzimas electrogénicas bajo la forma de diagramas cinéticos explícitos, lo cual permite obtener expresiones para los flujos iónicos determinados por estas enzimas que son, a su

vez, funciones explícitas de los parámetros cinéticos y de las concentraciones de las especies intervinientes. Mediante el empleo de este tipo de estrategia resulta posible evaluar los efectos cinéticos mediados por las enzimas electrogénicas sobre las variables fisicoquímicas del modelo (por ejemplo, el potencial de membrana o la concentración interna de C). Aunque el diseño del modelo estudiado en esta tesis puede resultar elemental desde un punto de vista biológico, constituye sin embargo una plausible representación para el estudio de los sistemas transductores de energía existentes en las membranas de algunos microorganismos (ver más arriba). Asimismo, el desarrollo y análisis de modelos dinámicos que contemplan un número reducido de variables relevantes en los procesos de acoplamiento energético, y que incorporan a las enzimas intervinientes mediante diagramas cinéticos explícitos, permiten ahondar en la comprensión del rol específico desempeñado por los diversos participantes en estos complejos procesos. En términos generales, los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a apoyar la idea de que el potencial de membrana constituye el intermediario cinético relevante en el proceso global de acoplamiento entre la reacción $S_1 \leftrightarrow P_1$ y la síntesis de S_2 .

1 INTRODUCCIÓN

Algunas de las propiedades más importantes vinculadas al estado estacionario celular son el resultado de complejos procesos de transporte que ocurren a través de las membranas de las células. En particular, ciertas variables fisicoquímicas celulares, como por ejemplo la diferencia de potencial eléctrico (DP) a través de la membrana plasmática, el volumen celular, y las concentraciones iónicas intracelulares, dependen críticamente de la actividad de los sistemas de transporte presentes en dicha membrana. Específicamente, los sistemas de transporte activo de iones inorgánicos cumplen un rol fundamental en el mantenimiento del estado estacionario de las variables mencionadas (Byrne y Schultz, 1988). Estos sistemas están constituidos por bombas iónicas capaces de acoplar una fuente de energía libre al transporte de iones contra gradientes electroquímicos. La mayor parte de las bombas iónicas son enzimas electrogénicas (EE) (Lüger, 1991), debido a que generan un movimiento neto de cargas eléctricas a través de la membrana. Algunos ejemplos notorios de EE son la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la membrana plasmática de las células animales, la $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPasa}$ y la citocromo oxidasa de la membrana interna mitocondrial, y diversas $\text{H}^+\text{-ATPasas}$ de las membranas de muchos microorganismos (para una revisión, véase Lüger, 1991). En virtud de su carácter electrogénico estas enzimas realizan una doble contribución a la DP a través de las membranas: una contribución “directa” debida a su condición de fuente de corriente eléctrica, y una contribución “indirecta” debida a que mantienen gradientes electroquímicos estacionarios de iones difusibles.

El análisis teórico de modelos que integran diversos aspectos del transporte a través de membranas se ha convertido en una poderosa herramienta para la interpretación y la

predicción del comportamiento de diversos procesos celulares. Este tipo de estudios constituye un área temática clásica en la biofísica de membranas. Diversos autores han desarrollado modelos fisicoquímicos para el análisis de la contribución “directa” de las EE a la DP existente a través de las membranas biológicas, en particular de la membrana plasmática de las células animales. La mayor parte de estos modelos considera aspectos vinculados a los flujos activos y pasivos de los iones involucrados. Dentro de esta categoría de modelos, muchos de ellos incluyen a las EE bajo la forma de expresiones cinéticas empíricas o relaciones termodinámicas que representan aspectos fenomenológicos determinados experimentalmente (Mullins y Noda, 1963; Frumento, 1965; Moreton, 1969; Jacquez, 1971; Jacquez y Schultz, 1974; Jacob et al., 1984). Un enfoque diferente se basa en el estudio de modelos que incorporan a las EE mediante diagramas cinéticos explícitos (Chapman et al., 1983; Hernández et al., 1989; Lemieux et al., 1990; Borst-Pauwels, 1993). Este tipo de estrategia permite, por ejemplo, evaluar el efecto cinético de diversos ligandos de la enzima (en diversas EE, del ATP) sobre la DP. Otros investigadores han abordado situaciones más complejas, donde además de la DP se consideran otras variables del estado estacionario celular. A modo de ejemplo podemos mencionar el estudio de modelos en los cuales se vinculan el volumen, las concentraciones iónicas, y las propiedades eléctricas de la membrana celular, a la actividad de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$ (Jakobson, 1980; Scriven, 1981; Weinstein, 1997). En estos modelos, las EE son incorporadas bajo la forma de expresiones empíricas. Excepcionalmente, algunos autores han estudiado modelos de procesos dinámicos celulares donde los sistemas de transporte mediado son incorporados bajo la forma de diagramas cinéticos explícitos (Lemieux, 1990; 1992; Hernández y Cristina, 1998).

El acoplamiento energético que tiene lugar en las membranas de organelos y microorganismos constituye una importante clase de fenómenos celulares que depende de la participación simultánea de diversos sistemas de transporte activo (Caplan y Essig, 1983). Estos sistemas transductores de energía suelen ser agrupaciones macromoleculares que se hallan integradas a las membranas y que están fundamentalmente constituidas por enzimas transportadoras. La mayoría de estas enzimas son electrogénicas (Laüger, 1991); poseen la capacidad de acoplar una fuente química de energía libre (por ejemplo, una reacción de óxido-reducción) al movimiento neto de carga resultante del transporte de una determinada especie iónica (por ejemplo, H^+ o Na^+) a través de la membrana. Estos procesos de acoplamiento energético en membranas biológicas pueden interpretarse en términos de la teoría quimiosmótica propuesta por Mitchell (Mitchell, 1961). En el marco de dicha teoría, el sistema macromolecular responsable del proceso puede considerarse esquemáticamente constituido por dos grupos de proteínas (Apéndice V). Uno es el generalmente denominado “ATP sintetasa”, que cataliza la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico, acoplada energéticamente al transporte de H^+ (o de Na^+) a favor de gradiente. El otro grupo de proteínas es el responsable de la generación del gradiente electroquímico de protones (o de iones sodio). Para ello, emplea fuentes energéticas características de cada organismo. Se ha sugerido que la disipación del gradiente electroquímico desacoplada de la síntesis de ATP (“leak”) constituye un componente esencial en el proceso de respiración celular. Su rol fisiológico es objeto de intensa discusión e investigación (Nedergaard y Cannon, 1992; Brand et al., 1994).

Diversos autores han estudiado modelos teóricos de los procesos de acoplamiento energético en membranas. Dichos modelos han empleado fundamentalmente enfoques

fenomenológicos. Los formalismos más utilizados han sido aquellos que provienen de la Termodinámica Lineal de Procesos Irreversibles (Caplan y Essig, 1983; Walz, 1990; Westerhoff y van Dam, 1992). Estos modelos han permitido profundizar en algunas propiedades del acoplamiento energético, como por ejemplo en el grado de acoplamiento y eficiencia termodinámicas en la fosforilación oxidativa y en la fotosíntesis, tanto en organelos de células animales y vegetales como en microorganismos. Más recientemente se han desarrollado modelos que emplean el formalismo de la Teoría del Control Metabólico (Westerhoff y van Dam, 1992). Los estudios realizados en la mayoría de estos trabajos se encuentran generalmente restringidos al dominio lineal cercano a la situación de equilibrio del sistema (en los modelos termodinámicos), o al entorno de sus estados estacionarios (en el marco de la Teoría del Control Metabólico). Algunos autores han asimismo desarrollado modelos dinámicos más explícitos para representar el proceso de acoplamiento energético (Holzhütter et al., 1985; Korzeniewski y Froncisz, 1991; 1992), extendiendo de esta manera el análisis hacia la región no lineal. En la mayoría de los casos, el carácter fuertemente no lineal de estos modelos impone que los estudios, tanto los de estado estacionario como los dependientes del tiempo, se realicen mediante simulaciones numéricas. En estos últimos modelos, los flujos activos y pasivos de los iones involucrados son usualmente representados por expresiones empíricas consistentes con algunas propiedades cinéticas. Una contribución importante al análisis teórico del proceso de acoplamiento energético en membranas se lograría mediante el estudio de modelos que incorporan a las EE participantes bajo la forma de diagramas cinéticos explícitos (Hansen et al., 1981; Läuger, 1991). Esto permitiría evaluar los efectos cinéticos mediados por las EE sobre algunas de las variables fisicoquímicas relevantes en este fenómeno. Así, por ejemplo, podría

estudiarse cómo la variación en la concentración de estas enzimas y sus ligandos afectaría a la DP a través de la membrana o a la concentración del metabolito energético sintetizado.

El objetivo general de la presente tesis consiste en contribuir al estudio teórico y a la comprensión de las propiedades básicas de los procesos de acoplamiento energético en membranas biológicas. En particular, el objetivo específico de este trabajo consistió en analizar el rol que desempeñan desde el punto de vista cinético, los principales participantes en estos procesos, es decir, la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana y la diferencia de concentración del ion transportado. Como fuera mencionado, muchos de los estudios teóricos se han desarrollado para comprender el fenómeno en sistemas con un alto grado de complejidad, como los que existen en organelos y en diversos microorganismos (Caplan y Essig, 1983; Groen et al., 1990; Korzeniewski y Froncisz, 1991; 1992). Para el modelado esquemático del proceso mediante el empleo del formalismo cinético estos sistemas de acoplamiento energético resultan ser extremadamente complejos. Por esta razón, el modelo estudiado en el marco de esta tesis ha sido desarrollado para describir situaciones más sencillas, como las que tienen lugar en algunos microorganismos que emplean el gradiente electroquímico de Na^+ como intermediario energético (Stoeckenius, 1985; Gottschalk y Blaut, 1990; Skulachev, 1992; Dimroth, 1992; 1997). Teniendo en cuenta estos casos más simples, se ha asumido que el proceso de acoplamiento energético ocurre a nivel de la membrana plasmática de un microorganismo ideal, mediado por el funcionamiento integrado de dos EE. Para este caso concreto, ha sido desarrollado y estudiado un modelo dinámico que describe la velocidad de cambio de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, de las concentraciones internas de un cation monovalente (C) y de un anion monovalente (A), y de las concentraciones de un metabolito

energético (S_2) y de su respectivo producto degradativo (P_2). En este modelo no se han considerado mecanismos de control del tipo “feedback”. Las dos enzimas electrogénicas, E_1 y E_2 , acoplan el transporte de C a las reacciones químicas $S_1 \leftrightarrow P_1$ y $S_2 \leftrightarrow P_2$, respectivamente. Tanto C como A experimentan electrodifusión. Las dos EE están representadas por medio de modelos cinéticos de dos estados que incorporan explícitamente el efecto de la DP a través de la membrana (Hansen et al., 1981). Es importante señalar que la representación de las EE mediante diagramas cinéticos explícitos constituye uno de los aspectos originales fundamentales del modelo aquí estudiado, pues permite obtener expresiones para los flujos iónicos determinados por estas enzimas que son funciones explícitas de los parámetros cinéticos y de las concentraciones de las especies intervinientes. Uno de los objetivos particulares de este trabajo ha consistido en evaluar la idea de que, de los dos componentes del gradiente electroquímico intermediario, la DP a través de la membrana representa una fuente de energía libre más rápida y de utilización más eficiente que la diferencia de concentración del ion transportado (Laüger, 1991). El diseño específico del modelo empleado basado en las dos EE consideradas puede resultar elemental desde una perspectiva biológica, sin embargo es ya lo suficientemente complejo para propósitos analíticos. Además, el hallazgo de que este tipo elemental de sistemas ciertamente opera en algunas bacterias que utilizan el gradiente electroquímico de Na^+ como intermediario en el proceso de acoplamiento energético (Hilpert et al., 1984; Laubinger y Dimroth, 1989; Dimroth, 1992; 1997), justifica el estudio del modelo mínimo introducido en esta tesis.

Glosario de Símbolos

I) Variables:

C_i, A_i : concentraciones intracelulares del cation (C) y del anion (A).

S_2, P_2 : concentraciones intracelulares de S_2 y de P_2 .

V_m : diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

t : tiempo.

II) Parámetros:

A_C : área de la superficie del microorganismo.

V_C : volumen del microorganismo.

P_C, P_A : coeficientes de permeabilidad iónica de C y de A.

C_e, A_e : concentraciones extracelulares de C y de A.

N_T, M_T : densidad total de las enzimas E_1 y E_2 , respectivamente.

S_1, P_1 : concentraciones intracelulares de S_1 y de P_1 .

$k_{01}, k_{10}, l_{01}, l_{10}$: constantes de velocidad que gobiernan las transiciones de E_1 .

$p_{01}, p_{10}, q_{01}, q_{10}$: constantes de velocidad que gobiernan las transiciones de E_2 .

K_1 : constante de equilibrio (disociación) de la reacción $S_1 \leftrightarrow P_1$.

K_2 : constante de equilibrio (disociación) de la reacción $S_2 \leftrightarrow P_2$.

ϕ_{\max}, K_{S_2} : flujo máximo y constante de semi-saturación, respectivamente, del consumo metabólico de S_2 .

T_2 : suma de S_2 y P_2 .

q : diferencia entre C_i y A_i .

2 MODELO MATEMATICO

El modelo de microorganismo empleado para la obtención del modelo matemático posee las siguientes características esenciales:

1) El microorganismo consiste en un compartimiento homogéneo rodeado por una membrana, inmerso en un medio también homogéneo y de composición constante. Solamente se han considerado algunos eventos específicos de transporte que tienen lugar en la membrana del mismo.

2) El volumen del microorganismo permanece constante debido a la acción de mecanismos accesorios de regulación del volumen, los cuales no afectan a las variables consideradas en el modelo. Por ejemplo, la regulación del volumen podría ocurrir mediante el transporte inducido de osmolitos orgánicos electroneutros (Yancey et al., 1982; Kwon y Handler, 1995). Como consecuencia, el área de la superficie del microorganismo (A_C) también se considera constante.

3) La membrana plasmática (Fig. 1) posee rutas específicas e independientes para la difusión del cation (C) y del anion (A), y dos enzimas electrogénicas en paralelo (E_1 y E_2), una de las cuales (E_1) funciona en condiciones fisiológicas creando un gradiente electroquímico de C (por ejemplo, Na^+), a partir de la energía obtenida de la reacción $S_1 \leftrightarrow P_1$ [para el caso de *Propionigenium modestum* (Dimroth, 1992) el par (S_1/P_1) podría representar al par (succinil CoA/propionil CoA), ver Sección 3.2], mientras que la otra (E_2) emplea la energía almacenada en dicho gradiente para la síntesis de un metabolito

energético S_2 (por ejemplo, ATP). Se ha considerado, por simplicidad, que las relaciones estequiométricas moleculares C/S_1 y C/S_2 características de E_1 y E_2 son iguales a la unidad.

Probablemente esta condición no sea la usual para los sistemas bacterianos que emplean el gradiente electroquímico de Na^+ como el intermediario energético (Dimroth, 1992; 1997).

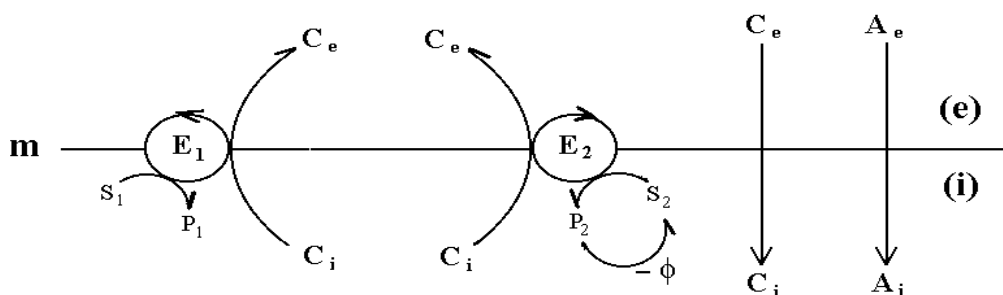


Fig. 1. Modelo de sistema de acoplamiento energético en la membrana plasmática (m) del microorganismo. (e), (i): compartimientos extra e intracelulares, respectivamente. Ver texto para mayores detalles.

Teniendo en cuenta estas hipótesis, el siguiente modelo matemático gobierna la velocidad de cambio de las concentraciones intracelulares de C, A, S_2 y P_2 (C_i , A_i , S_2 , P_2), y de la DP a través de la membrana plasmática (V_m , definida como $V_m = V_{\text{exterior}} - V_{\text{interior}}$) (véase Glosario de Símbolos):

$$dC_i/dt = (A_C / V_C) (-J_1 - J_2 + J_C)$$

$$dA_i/dt = (A_C / V_C) (J_A)$$

(1a)

$$dS_2/dt = (A_C / V_C) (-J_2 - \phi) = -dP_2/dt$$

$$dV_m/dt = (F / C_m) (J_1 + J_2 - J_C + J_A).$$

En las Ecs. (1a) y (1b), J_1 y J_2 están definidos por las Ecs. (A1) y (A5) (Apéndice I), representando los flujos del cation mediados por E_1 y E_2 respectivamente; J_C y J_A representan los correspondientes flujos electrodifusionales de C y de A (Fig. 1); ϕ representa la velocidad de consumo de S_2 debida a la actividad metabólica (Fig. 1); A_C y V_C el área de la superficie y el volumen del microorganismo, respectivamente; F es la constante de Faraday, y C_m la capacidad de la membrana. Al realizar una inspección del sistema de Ecs. (1), se puede apreciar que la situación de estado estacionario implica la igualdad en la magnitud de los flujos activos y pasivos de C, equilibrio electroquímico de A, y un balance exacto entre la producción de S_2 por medio del acoplamiento quimiosmótico y su utilización metabólica. Las Ecs. (1) muestran también que el consumo de S_2 , expresado mediante el flujo metabólico ϕ , promueve directamente la síntesis de P_2 .

La ecuación que describe la velocidad de cambio del potencial de membrana (dV_m/dt) es reemplazada por la aproximación estacionaria, en virtud de las diferentes escalas de tiempo que gobiernan las variaciones en V_m respecto a las de las otras variables (Apéndice II):

$$J_1 + J_2 - J_C + J_A = 0. \quad (1b)$$

El sistema dado por las Ecs. (1) implica además las siguientes condiciones de conservación:

$$S_2 + P_2 = T_2 \quad y \quad C_i - A_i = q, \quad (2)$$

donde T_2 y q son constantes. La segunda ecuación es una consecuencia de la electroneutralidad macroscópica; la carga q se considera positiva y se halla compensada por una cantidad equivalente de cargas negativas debidas a la existencia de aniones intracelulares no difusibles (cargas “fijas”).

Se ha asumido que los flujos electrodifusionales de C y de A están dados por la ecuación de flujo de Goldman-Hodgkin-Katz (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), la que expresamos de la siguiente forma:

$$J_C = P_C \varepsilon_m [C_e \exp (u / 2) - C_i \exp (-u / 2)] \quad (3)$$

$$J_A = P_A \varepsilon_m [A_e \exp (-u / 2) - A_i \exp (u / 2)],$$

donde J_C y J_A se consideran positivos en la dirección entrante. En las Ecs. (3), $u = FV_m / RT$ y $\varepsilon_m = u / [\exp (u / 2) - \exp (-u / 2)]$, siendo R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta y P_i el coeficiente de permeabilidad iónica ($i = C, A$). Bajo condiciones específicas ($C_e = C_i$), estas ecuaciones satisfacen rectificación óhmica (Hille,

1992). En algunos procesos de acoplamiento energético mediados por un gradiente electroquímico de protones, en los que el flujo desacoplado (“leak”) parece ser no-ohmico, la electrodifusión suele ser descrita por ecuaciones que contemplan esta particular característica (Garlid et al., 1989).

También se ha asumido que, en condiciones fisiológicas, el consumo metabólico de S_2 está gobernado por una cinética de tipo Michaeliana:

$$- \phi = \phi_{\max} S_2 / (K_{S_2} + S_2), \quad (4)$$

donde ϕ_{\max} representa el flujo máximo de consumo de S_2 y K_{S_2} la constante de Michaelis.

3 RESULTADOS NUMERICOS Y DISCUSION

En las siguientes secciones se presentan los estudios numéricos desarrollados con el modelo para situaciones como las de algunas bacterias que emplean el gradiente electroquímico de sodio como intermediario en el proceso de acoplamiento energético (Hilpert et al., 1984; Dimroth, 1992; Dybas y Konisky, 1992; Skulachev, 1992; Hayashi et al., 1996). Los estudios realizados exploran los siguientes aspectos: a) la dependencia del estado estacionario con respecto a los parámetros del modelo; b) los efectos dinámicos ocasionados por decrementos en S_1 y la subsiguiente restitución del mismo (“pulso” de S_1); c) los efectos dinámicos provocados por modificaciones en la velocidad de consumo metabólico de S_2 ; y d) los efectos dinámicos debidos a “pulsos” de S_1 , para las situaciones

particulares en que V_m o C_i permanecen constantes (“clampeo” de voltaje y “clampeo” de concentración del cation, respectivamente). En términos generales, los efectos dinámicos producidos por estas perturbaciones son evaluados a través de los cambios que se verifican sobre V_m , sobre C_i y sobre la concentración del metabolito energético S_2 .

3.1 Métodos Numéricos

Para el desarrollo de las simulaciones, se efectuó la integración numérica del sistema de Ecs. (1a) empleando el método de Runge-Kutta de cuarto orden (Iriarte, 1990), excepto para la determinación de V_m . Como fuera mencionado, luego de cada paso de integración se calculó V_m asumiendo la aproximación estacionaria de la condición de electroneutralidad [Ec. (1b)] (Sección 2.2.1; Apéndice II) (Hernández et al., 1989). Los valores de estado estacionario de las variables fueron inicialmente obtenidos a partir de las correspondientes integraciones temporales, y luego confirmados por medio del procedimiento iterativo descrito en el Apéndice III. En el caso de los estudios dinámicos, se asumió además que cualquier modificación en los requerimientos metabólicos de S_2 ocurre a través de cambios instantáneos en la velocidad máxima ϕ_{max} . En lo que respecta a las modificaciones inducidas en el sustrato S_1 , se introdujo la siguiente ecuación para describir el curso temporal de estos cambios en forma más realista (ver Apéndice IV):

$$S_1(t) = S_1(\infty) [1 - \exp(-t/\theta)] + S_1(0) \exp(-t/\theta), \quad (5)$$

donde $S_1(0)$ y $S_1(\infty)$ representan el valor inicial (referencia) y el valor final (inducido) de S_1 respectivamente, y θ es la constante de tiempo (ver Tabla I).

Los cálculos se implementaron en un computador personal (procesador Pentium de 60 MHz), empleándose programas desarrollados específicamente para tales propósitos en lenguaje Pascal (Turbo Pascal versión 6.0).

3.2 Estados de Referencia

Los valores numéricos de los parámetros empleados en las simulaciones son los que figuran en la Tabla I. En el caso de las permeabilidades iónicas (P_C y P_A), estos valores se hallan dentro del rango experimental aceptable para los coeficientes de permeabilidad iónica de Na^+ y Cl^- (Sperelakis, 1995). Los valores de las concentraciones iónicas extracelulares (C_e y A_e), podrían corresponder a aquellos de un ambiente salino externo, por ejemplo, a las condiciones requeridas (concentraciones de Na^+ y Cl^-) para el óptimo crecimiento de cierta clase de bacterias (Laubinger y Dimroth, 1989). La densidad total de las enzimas electrogénicas (N_T y M_T) también se encuentra dentro del rango experimental (Gradmann et al., 1982; Slayman y Sanders, 1984). Los valores elegidos para K_1 y K_2 son arbitrarios; sin embargo presentan el orden de magnitud de las constantes de equilibrio de varias reacciones que constituyen fuentes de energía para el transporte activo de iones en diversos organelos y microorganismos, como la hidrólisis del ATP (Nicholls, 1987), la descarboxilación de succinato a propionato (Hilpert et al., 1984) o la oxidación de NADH a NAD^+ (Lehninger et al., 1993). Así, por ejemplo, para el caso de *Propionigenium*

modestum (Dimroth, 1992) el par (S_1/P_1) podría representar al par (succinil CoA/propionil CoA), mientras que (S_2/P_2) correspondería al par (ATP/ADP).

Un microorganismo esférico con un radio de 1.4×10^{-4} cm ($1.4 \mu\text{m}$) tendría un volumen de aproximadamente 1.15×10^{-11} cm³ y un área de superficie total de 6.16×10^{-8} cm². Se ha asumido que el área permeante efectiva (A_C) es ligeramente menor que este valor (ver Tabla I).

El resto de los valores de los parámetros del modelo fueron obtenidos empíricamente siguiendo un procedimiento de “ensayo y error”. Los valores de las constantes de velocidad de las reacciones enzimáticas se ajustaron para obtener valores de los parámetros cinéticos (por ejemplo, flujos máximos y constantes de semi-saturación, Apéndice I) consistentes con aquellos determinados experimentalmente para diversas enzimas electrogénicas (Gradmann et al., 1982; Slayman y Sanders, 1984). Los valores de los parámetros cinéticos relativos al consumo metabólico de S_2 (ϕ_{max} y K_{S_2}) fueron elegidos arbitrariamente; el único criterio restrictivo empleado consistió en la obtención de valores de las variables comprendidos dentro del rango fisiológico para la situación de estado estacionario.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, fueron determinados dos estados de referencia (estados estacionarios), MI y MII, correspondientes a valores de S_1 iguales a 5×10^{-6} (Tabla I) y 10^{-7} mol cm⁻³ respectivamente (el resto de los valores de los parámetros según Tabla I):

$$\begin{aligned}
\text{MI: } V_m(0) &= 0.1653 \text{ V}; C_i(0) = 9.1558 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}; \\
A_i(0) &= 2.863 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}; S_2(0) = 5.06 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}; \\
P_2(0) &= 2.18 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3};
\end{aligned} \tag{6a}$$

$$\begin{aligned}
\text{MII: } V_m(0) &= 0.0071 \text{ V}; C_i(0) = 18.6319 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}; \\
A_i(0) &= 9.7743 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}; S_2(0) = 0.093 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}; \\
P_2(0) &= 2.135 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3};
\end{aligned} \tag{6b}$$

El estado de referencia MI representaría un estado de mayor energía en relación al estado de referencia MII, lo cual se refleja fundamentalmente en la diferencia de magnitud de la energía libre almacenada bajo la forma del componente eléctrico en ambos estados (ver Apéndice V). Debido a que no existe suficiente evidencia experimental para justificar su consideración como posibles estados fisiológicos de algún microorganismo en particular, estos estados de referencia son arbitrarios y han sido empleados exclusivamente con el fin de evaluar el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones del intermediario energético (ver Sección 3.4.2).

3.3 Estudios de Estado Estacionario

3.3.1 Efectos causados por modificaciones en S_1 y en ϕ_{\max}

Los gráficos que se presentan en la Fig. 2 muestran la dependencia del estado estacionario del sistema (estado de referencia MI) con respecto a dos parámetros que reflejan la condición metabólica del microorganismo: la concentración interna de nutriente (S_1) y la velocidad máxima de consumo del metabolito energético S_2 (ϕ_{\max}), respectivamente. Para

el intervalo de valores considerado, se observa un notorio incremento de V_m y un marcado descenso de C_i (Fig. 2-A) con S_1 . A su vez, se verifica aumento de S_2 . El sistema además exhibe cinética de saturación para V_m , una propiedad característica de los modelos cinéticos de generación electrogénica de la DP (Hernández et al., 1989). En consecuencia, se pierde la capacidad de almacenar energía a través del intermediario energético más allá de un determinado valor de S_1 (aproximadamente igual a 10^{-5} mol cm^{-3}), debido básicamente a que por encima de este valor no se registran cambios en ninguno de los dos componentes del intermediario energético (C_i y V_m) (ver Apéndice V). En la Fig. 2-B se aprecia el descenso de S_2 al incrementarse ϕ_{max} , en tanto que prácticamente no se registran cambios en V_m ni en C_i . Se puede anticipar que esto se debe fundamentalmente a que E_1 es la principal enzima electrogénica para los valores específicos de los parámetros considerados (Tabla I), es decir, es la que contribuye en mayor término a la DP (véase más adelante, discusión de la Fig. 3). La Fig. 2-B también revela que, dentro del rango explorado, el sistema es capaz de tolerar importantes incrementos en la demanda metabólica (mantener valores de S_2 mayores que cero) sin que esto afecte en forma significativa su capacidad energética (V_m y C_i no experimentan modificaciones sustanciales). Además, los cambios promovidos por ϕ_{max} sobre S_2 no afectan a ninguno de los componentes del intermediario energético.

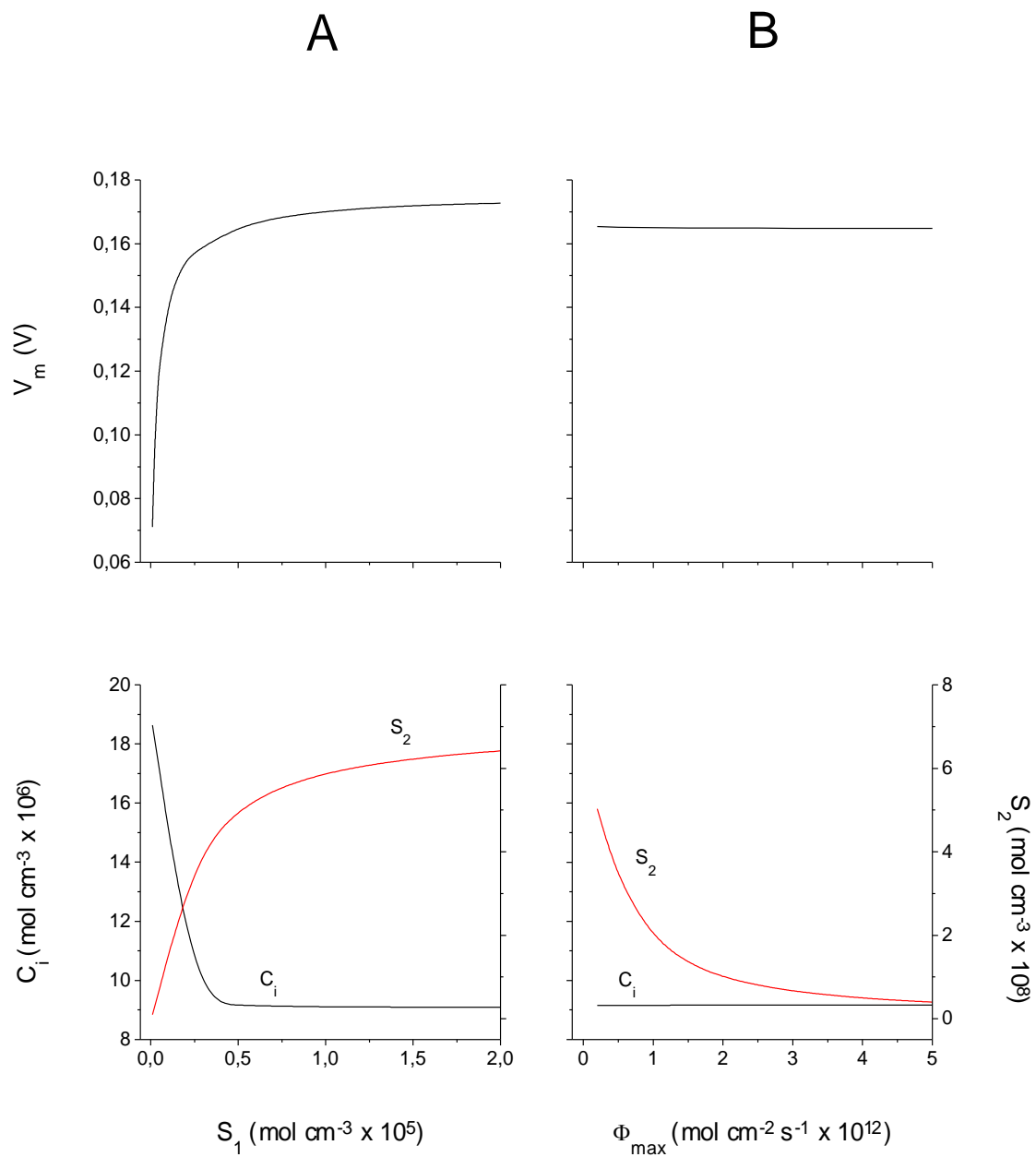


Fig. 2. Gráficos de los valores de estado estacionario de V_m , C_i , y S_2 vs S_1 (Fig. 2-A) y vs Φ_{max} (Fig. 2-B). Valores de los demás parámetros según Tabla I.

3.3.2 Efectos causados por modificaciones en la densidad de las enzimas electrogénicas (N_T y M_T)

Las Figs. 3-A y 3-B muestran la dependencia del estado estacionario del sistema (estado de referencia MI) con respecto a las densidades de membrana de las dos EE (N_T y M_T). Como fuera mencionado (sección anterior), E_1 resulta ser la principal enzima electrogénica para los valores considerados de los parámetros (Tabla I). En efecto, el estado estacionario implica que (Apéndice III): $J_A = 0$, $-J_2 = \phi$ y $-J_1 - J_2 + J_C = 0$. Entonces, a partir de la Ec. (4) se satisface que: $-J_2 \leq \phi_{\max}$. Para los valores empleados de los parámetros (Tabla I), se comprueba que: $J_1 \gg \phi_{\max}$ y $J_C \gg \phi_{\max}$. Entonces, $-J_1 - J_2 + J_C \sim -J_1 + J_C$. Por consiguiente, en la solución estacionaria para $V_m(t)$ (Apéndice II) E_1 y la electrodifusión de C resultan ser los participantes fundamentales. Como consecuencia, y como se aprecia en la Fig. 3-A, modificaciones en la densidad de E_1 (N_T) promueven importantes cambios en ambos componentes del intermediario energético, siendo particularmente notorios sobre el componente eléctrico, ya que la DP (V_m) aumenta significativamente con N_T a lo largo de todo el intervalo estudiado. En relación a esto último, es interesante señalar que se encuentra una dependencia aproximadamente lineal entre V_m y la densidad de la enzima electrogénica relevante del sistema, para un rango de valores de densidad relativamente amplio correspondiente a la fase inicial de la curva (Hernández et al., 1989). A su vez, C_i decrece marcadamente con N_T hacia un valor asintótico mínimo (igual a q), determinado por la condición de conservación establecida por la Ec. (2). Este valor asintótico se alcanza a valores relativamente bajos de N_T , y como la permeabilidad del cation (P_C) permanece constante, resulta que el potencial de difusión (V_{Goldman}) también alcanza un

valor asintótico para esos mismos valores de N_T [ver Ec. (A10)]. Para todo el intervalo estudiado, S_2 verifica un aumento prácticamente lineal con respecto a N_T . Por otro lado, los cambios en la densidad de M_T no afectan a ninguno de los componentes del intermediario energético (Fig. 3-B), por lo tanto las modificaciones que se verifican sobre S_2 pasan a ser de índole puramente cinética, obedeciendo específicamente a una cinética de saturación gobernada por ϕ_{\max} [ver Ecs. (1a) y (4)].

En base a los resultados aquí presentados, y para los valores considerados de los parámetros (Tabla I), podemos concluir que la energía almacenada en el intermediario energético depende principalmente de la actividad de la enzima E_1 . Se concluye esto debido fundamentalmente a que las modificaciones ocurridas sobre la densidad de esta enzima promueven drásticos cambios en las magnitudes de los dos componentes del intermediario energético (V_m y C_i), los cuales no se verifican para la enzima E_2 (en este caso los valores de V_m y C_i permanecen prácticamente constantes).

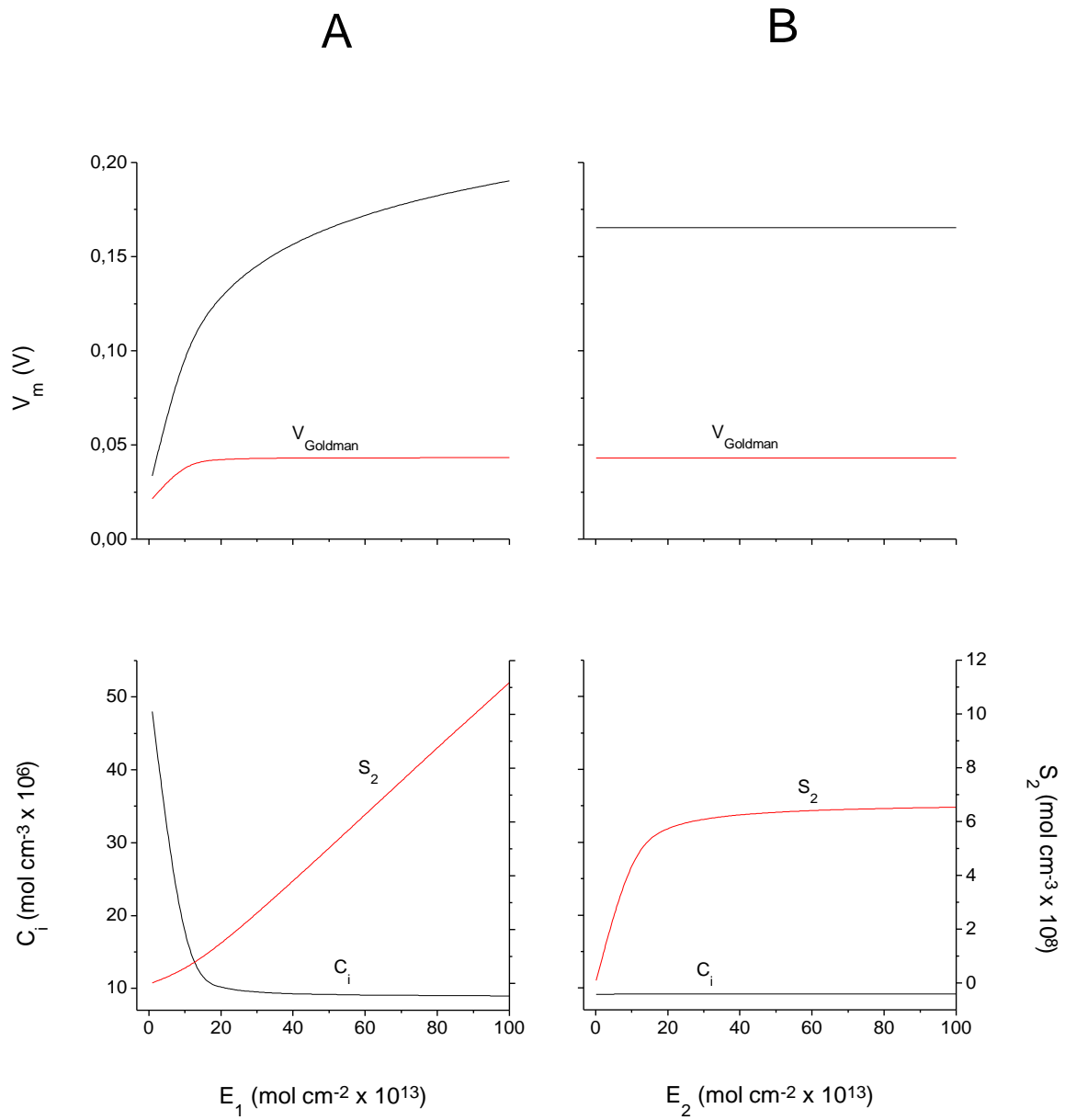


Fig. 3. Gráficos de los valores de estado estacionario de V_m , C_i , y S_2 vs la densidad de membrana de E_1 (N_T) (Fig. 3-A) y vs la densidad de membrana de E_2 (M_T) (Fig. 3-B). Valores de los demás parámetros de acuerdo a la Tabla I.

3.3.3 Efectos causados por modificaciones en P_C

La Fig. 4 muestra la dependencia del estado estacionario del sistema (estado de referencia MI) con la permeabilidad iónica del cation (P_C). Se aprecia claramente que, como resultado de aumentar la permeabilidad (P_C), se produce un marcado incremento en C_i , provocando a su vez la disminución del gradiente electroquímico del cation, y por lo tanto, un significativo descenso tanto en la DP total (V_m) como en su componente electrodifusivo (V_{Goldman}). Al analizar los resultados de las Figs. 2 y 3, se puede apreciar que S_2 resulta ser extremadamente sensible a los cambios que se producen sobre V_m ; en consecuencia, su concentración en estado estacionario disminuirá a un valor mínimo prácticamente despreciable, en respuesta a un aumento en la permeabilidad del cation. La Fig. 4 muestra, además, que el sistema es particularmente sensible a los cambios ocasionados sobre P_C en el entorno de sus valores de referencia (Tabla I). Es así que un descenso en la permeabilidad iónica puede causar un importante incremento en la cantidad de energía almacenada por el intermediario energético, fundamentalmente a través de su componente eléctrico. A su vez, se verifica un significativo aumento en S_2 al disminuir P_C .

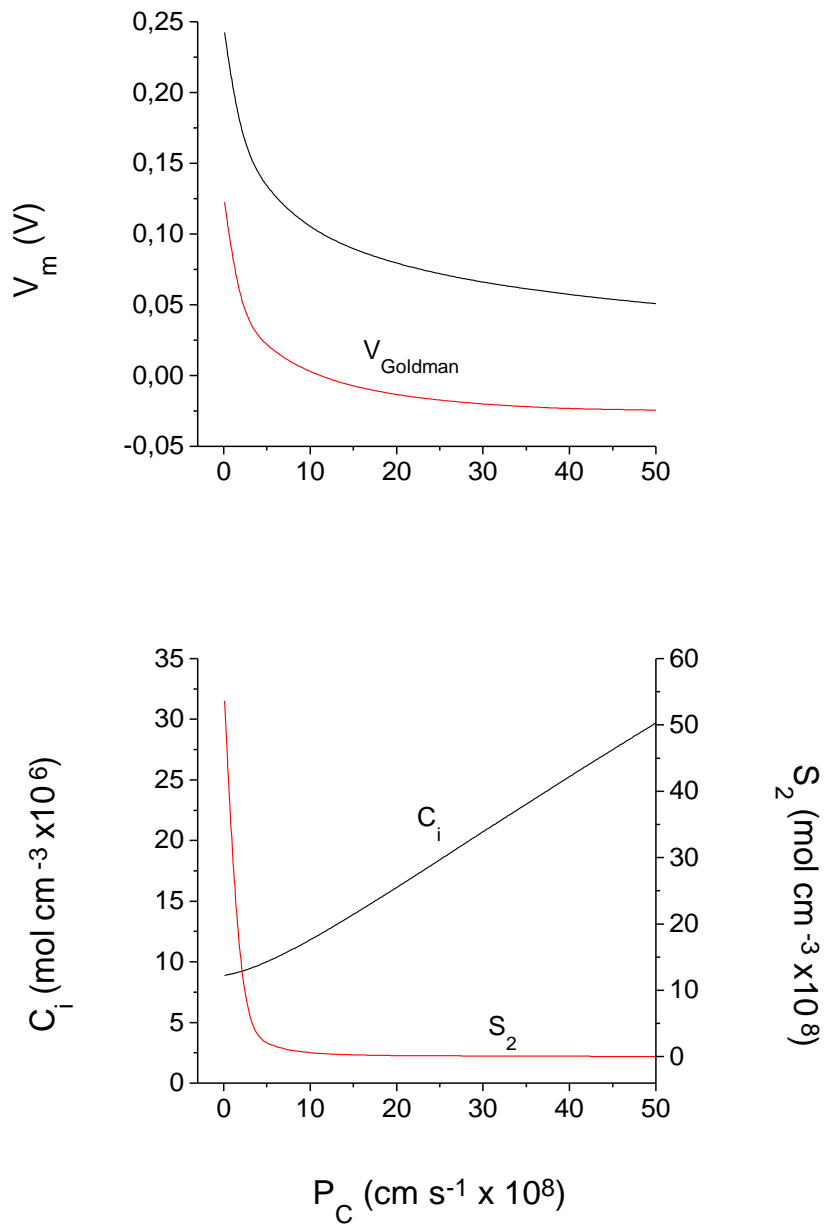


Fig. 4. Gráficos de los valores de estado estacionario de V_m , C_i y S_2 vs la permeabilidad ionica de C (P_C). Valores de los demás parámetros según Tabla I. V_{Goldman} representa el potencial de difusión de la membrana [Ec. (A10)].

3.4 Estudios Dinámicos

3.4.1 Efectos dinámicos causados por modificaciones en S_1 y en ϕ_{\max}

La Fig. 5-A muestra el efecto ocasionado por un descenso significativo en S_1 [de $S_1(0) = 5 \times 10^{-6}$ a $S_1(\infty) = 5 \times 10^{-7}$ mol cm^{-3} ; Ec. (5)] sobre la dinámica del sistema, para el caso en el cual las condiciones iniciales corresponden a las del estado de referencia MI. Se puede apreciar que, como consecuencia de la disminución en el nutriente (S_1), el efecto principal se verifica sobre V_m , el cual experimenta un notorio descenso debido a que E_1 es la enzima electrogénica predominante, y por lo tanto la que contribuye en mayor término a la DP, junto a la permeabilidad del catión (P_C) [ver discusión Figs. 2, 3-A, 4 y Ec. (A9)]. Esta disminución en V_m provoca a su vez un significativo descenso en S_2 . Como fuera mencionado (Sección 3.3.3), del análisis de las Figs. 2 y 3 se desprende que S_2 es especialmente sensible a los cambios que se producen en V_m . El leve incremento que sufre C_i es consecuencia de la aún importante contribución de E_1 a V_m [un aumento en P_C determinaría un influjo más importante del catión (ver Fig. 4)]. Cuando S_1 recupera su valor inicial [de $S_1(0) = 5 \times 10^{-7}$ a $S_1(\infty) = 5 \times 10^{-6}$ mol cm^{-3} ; Fig. 5-B], las tres variables (V_m , C_i y S_1) recobran sus valores correspondientes al estado de referencia MI. En este experimento de “pulso” de S_1 , el estado inicial del sistema corresponde al estado final del experimento presentado en la Fig. 5-A, luego de 2000 segundos de “corrida” del programa de cálculo.

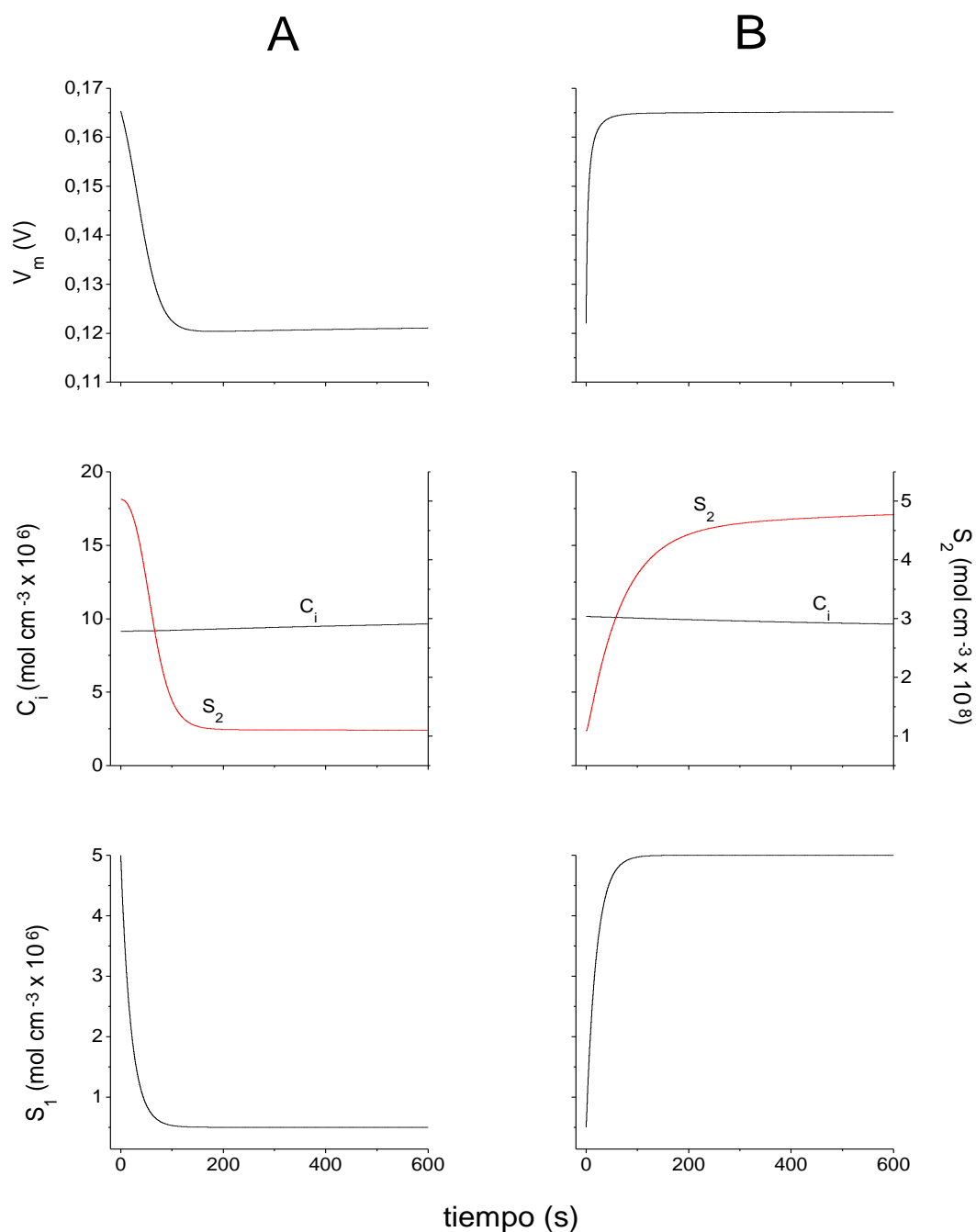


Fig. 5. Respuesta dinámica del modelo a un decremento en S_1 [de $S_1(0) = 5 \times 10^{-6}$ a $S_1(\infty) = 5 \times 10^{-7}$ mol cm^{-3} ; Ec. (5)] (Fig. 5-A), y a un posterior incremento en este parámetro [de $S_1(0) = 5 \times 10^{-7}$ a $S_1(\infty) = 5 \times 10^{-6}$ mol cm^{-3} ; Ec. (5)] (Fig. 5-B). V_m , C_i y S_2 aparecen graficados en función del tiempo. Estado inicial para la Fig. 5-A: estado de referencia MI (6a). Estado inicial para la Fig. 5-B: valores finales de V_m , C_i , S_2 , A_i y P_2 luego de 2000 segundos de “corrida” bajo las condiciones de la Fig. 5-A. Valores de los demás parámetros según Tabla I.

La Fig. 6-A muestra el efecto ocasionado por un importante incremento en ϕ_{\max} [de 2×10^{-13} a 2×10^{-12} mol cm⁻² s⁻¹] sobre la dinámica del sistema, también para el caso en el cual las condiciones iniciales corresponden a las del estado de referencia MI. El único efecto significativo ocurre sobre S_2 , sin estar éste asociado a cambios en el intermediario energético (o sea, sobre V_m o sobre C_i). A su vez, el único efecto dinámico causado por un notorio decremento en ϕ_{\max} [de 2×10^{-13} a 2×10^{-14} mol cm⁻² s⁻¹, Fig. 6-B], sobre el estado de referencia MI, se manifiesta por un incremento en S_2 . En forma similar a la situación generada por los cambios en S_1 (Figs. 5-A y 5-B), las fases transitorias provocadas por las perturbaciones en el sistema consisten en relajaciones monótonas hacia nuevos estados estacionarios.

Los resultados presentados en esta sección muestran que, como consecuencia del rol que desempeña la enzima E_1 en la generación de la DP a través de la membrana, su actividad incide directamente en la síntesis del metabolito energético S_2 (Fig. 5, ver también discusiones Figs. 2, 3 y 4). Además, los cambios debidos a modificaciones en ϕ_{\max} prácticamente no afectan a ninguno de los dos componentes del intermediario energético (Fig. 6, ver también discusión Fig. 2).

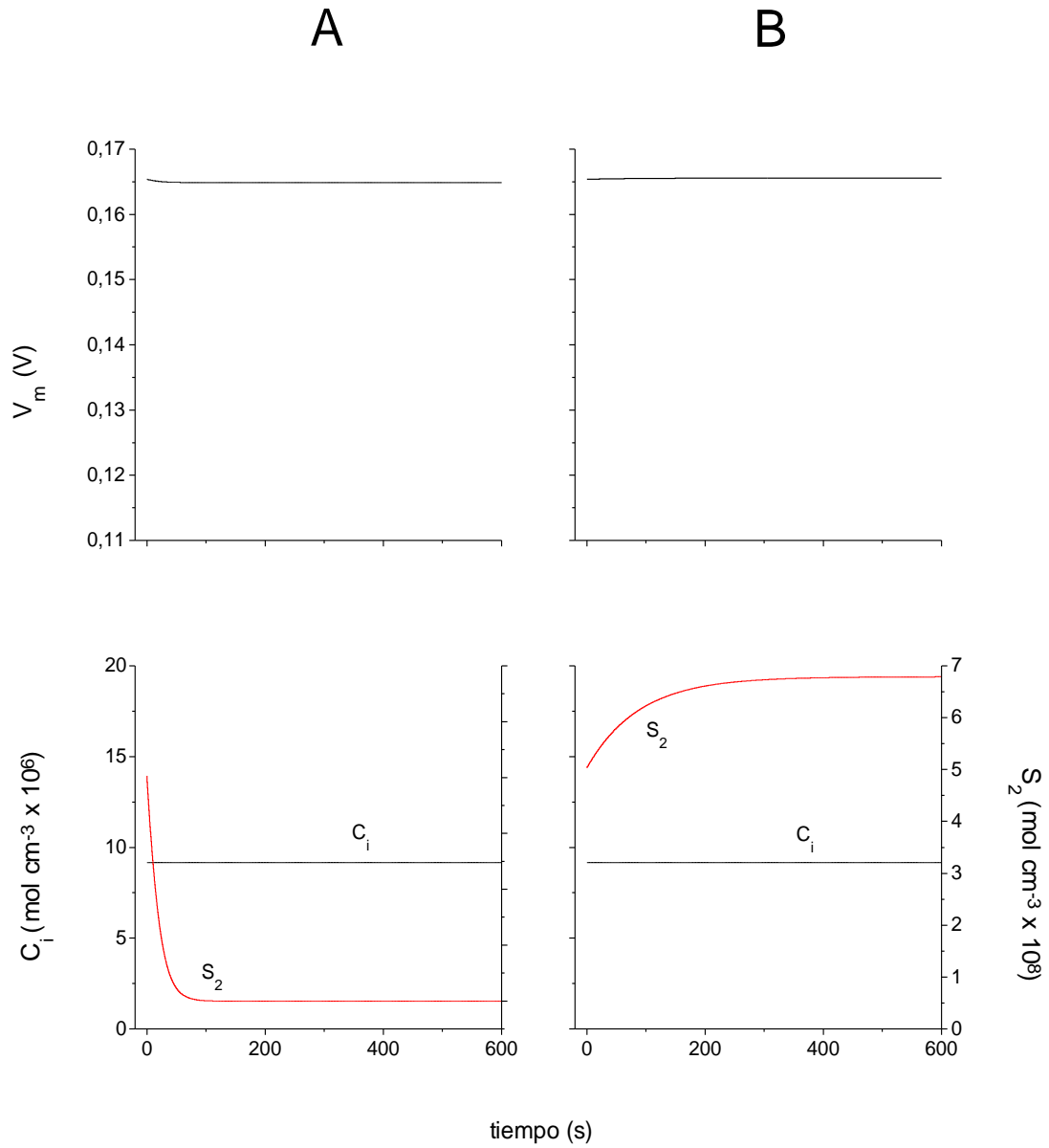


Fig. 6. Respuesta dinámica del modelo a un incremento en ϕ_{\max} [de 2×10^{-13} a 2×10^{-12} mol $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$] (Fig. 6-A) y a un decremento en ϕ_{\max} [de 2×10^{-13} a 2×10^{-14} mol $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$] (Fig. 6-B). V_m , C_i y S_2 aparecen graficados en función del tiempo. Estado inicial para las Figs. 6-A y 6-B: estado de referencia MI (6a). Valores de los demás parámetros según Tabla I.

3.4.2 Efectos dinámicos causados por “pulsos” de S_1 , manteniendo V_m o C_i constantes

Las Figs. 7-A y 7-B muestran los efectos provocados por un incremento en S_1 sobre la conducta temporal del sistema, para casos en los cuales: a) C_i fue mantenido constante (experimentos de “clampeo” de concentración del cation, Figs. 7-A y 7-B, gráficos superiores), y b) V_m fue mantenido constante (experimentos de “clampeo” de voltaje, Figs. 7-A y 7-B, gráficos inferiores). Para las simulaciones cuyos resultados aparecen en la Fig. 7-A, las condiciones iniciales del sistema corresponden a las del estado de referencia MII, mientras que para los que se muestran en la Fig. 7-B, las condiciones iniciales son las del estado de referencia MI. En ambos casos, el “pulso” de S_1 fue fijado en un valor de 10^{-7} mol cm^{-3} . Por lo tanto, para los gráficos que aparecen en la Fig. 7-A, S_1 cambia de $S_1(0) = 10^{-7}$ a $S_1(\infty) = 2 \times 10^{-7}$ mol cm^{-3} , mientras que para aquellos que se muestran en la Fig. 7-B, lo hace desde $S_1(0) = 5 \times 10^{-6}$ a $S_1(\infty) = 5.1 \times 10^{-6}$ mol cm^{-3} [Ec. (5)]. Se han calculado, además, las variaciones de energía libre producidas en los diferentes casos, de acuerdo a las siguientes expresiones (Apéndice V):

$$\Delta \varepsilon_{\text{elec}} = F [(V_m)_{\text{final}} - (V_m)_{\text{inicial}}] \quad (6)$$

$$\Delta \varepsilon_{\text{conc}} = R T [\ln (C_e/C_i)_{\text{final}} - \ln (C_e/C_i)_{\text{inicial}}],$$

donde $\Delta \varepsilon_{\text{elec}}$ y $\Delta \varepsilon_{\text{conc}}$ representan los cambios de energía libre en los componentes eléctrico y de concentración, respectivamente, del gradiente electroquímico del cation C, y donde F, R y T ya han sido definidos (Sección 2.2.1).

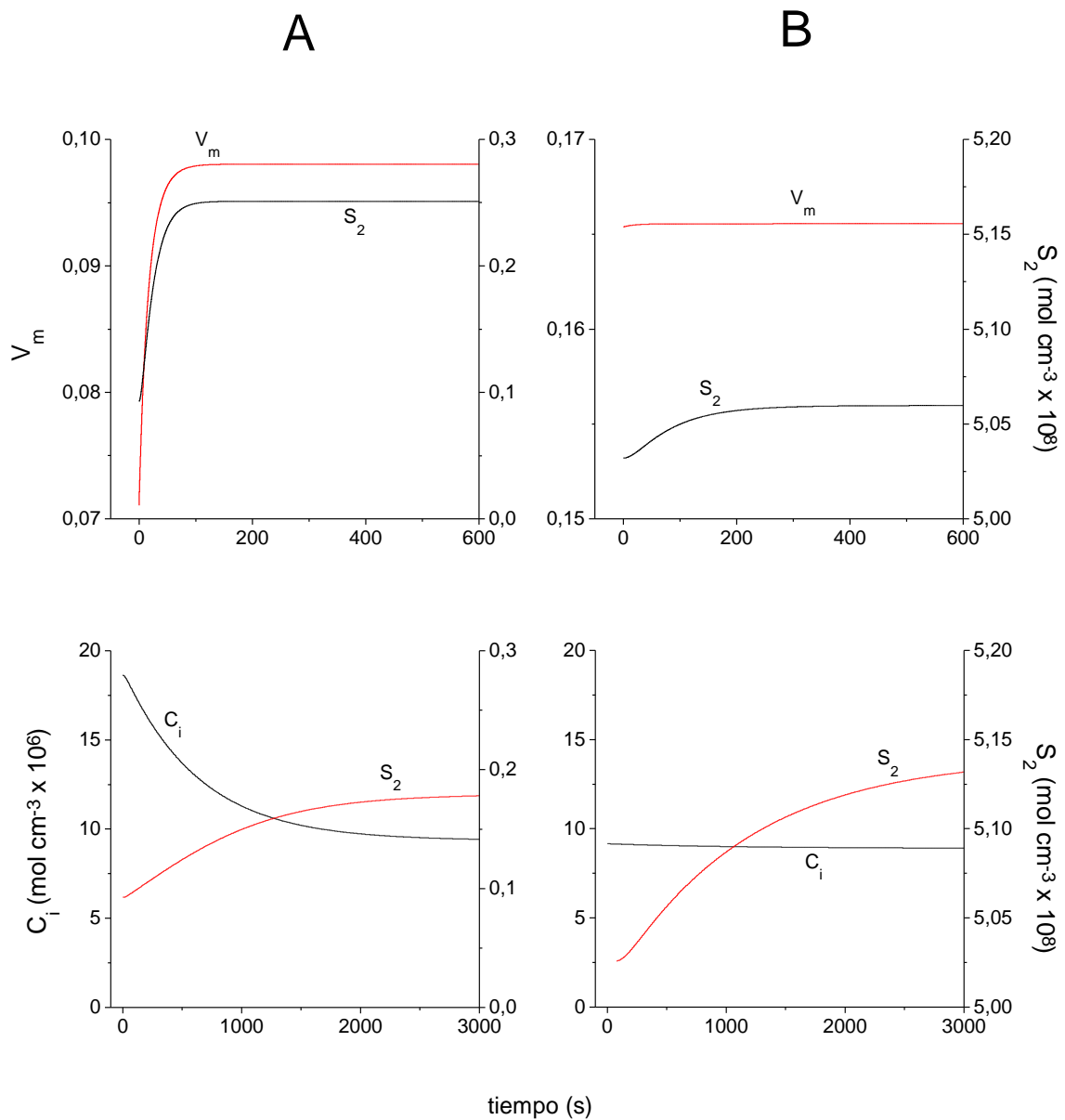


Fig. 7. Respuesta dinámica del modelo a un “pulso” de S_1 de 10^{-7} mol cm^{-3} {de $S_1(0) = 1 \times 10^{-7}$ a $S_1(\infty) = 2 \times 10^{-7}$ mol cm^{-3} [Ec. (5)] (Fig. 7-A), y de $S_1(0) = 5 \times 10^{-6}$ a $S_1(\infty) = 5.1 \times 10^{-6}$ mol cm^{-3} [Ec. (5)] (Fig. 7-B)}. V_m , C_i y S_2 aparecen graficados en función del tiempo. Estado inicial para la Fig. 7-A: estado de referencia MII (6b). Estado inicial para la Fig. 7-B: estado de referencia MI (6a). Gráficos superiores: se realizó la “corrida” del modelo manteniendo C_i constante (en su valor inicial). Gráficos inferiores: se realizó la “corrida” del modelo manteniendo V_m constante (en su valor inicial). Valores de los demás parámetros según Tabla I.

Para las simulaciones en las cuales las condiciones iniciales del sistema corresponden a las del estado de referencia MII (Fig. 7-A), los efectos causados por el “pulso” de S_1 resultan ser notorios. Durante el “clampeo” de concentración del cation (gráfico superior), el incremento en S_1 provoca un importante aumento en V_m , y por consiguiente también en S_2 . En la situación ocasionada por el “clampeo” de voltaje (gráfico inferior), se aprecia que el “pulso” de nutriente determina un significativo descenso en C_i y, a su vez, un aumento en S_2 . La cantidad adicional de energía acumulada en cada caso, bajo la forma del intermediario energético, es la siguiente [Ecs. (6)]:

$$\text{“Clampeo” de } C_i: \Delta \epsilon_{\text{elec}} = F [(V_m)_{t=600} - (V_m)_{t=0\text{ s}}] = 2600.7 \text{ J/mol.} \quad (7a)$$

$$\text{“Clampeo” de } V_m: \Delta \epsilon_{\text{conc}} = R T [\ln (C_e/C_i)_{t=3000} - \ln (C_e/C_i)_{t=0\text{ s}}] = 1751.3 \text{ J/mol.}$$

Para las simulaciones en las cuales las condiciones iniciales del sistema corresponden a las del estado de referencia MI (Fig. 7-B), los efectos provocados por el “pulso” de S_1 resultan ser cualitativamente similares a aquellos que se observan en la Fig. 7-A, aunque notoriamente menores en magnitud. Se puede apreciar que V_m aumenta durante el “clampeo” de concentración del cation y que C_i disminuye durante el “clampeo” de voltaje, pero ambos lo hacen en cantidades prácticamente despreciables. Esto último se refleja claramente en el balance energético correspondiente a cada caso:

“Clampeo” de C_i : $\Delta\varepsilon_{elec} = F [(V_m)_{t=600} - (V_m)_{t=0s}] = 16.2 \text{ J/mol.}$

(7b)

“Clampeo” de V_m : $\Delta\varepsilon_{conc} = R T [\ln (C_e/C_i)_{t=3000} - \ln (C_e/C_i)_{t=0s}] = 46.8 \text{ J/mol.}$

Al comparar los resultados de las Ecs. (7a) y (7b) podemos observar que, bajo las condiciones estacionarias establecidas por el estado de referencia MI, el sistema se halla cercano a la saturación de cualquiera de los dos componentes del intermediario energético, ya que la capacidad de almacenamiento de energía por parte de estos componentes es claramente menor en relación a la situación determinada por el estado de referencia MII. Las condiciones estacionarias establecidas por este último estado, determinan que el sistema se halle notoriamente alejado de la saturación de ambos componentes del intermediario energético, lo cual se refleja en el hecho siguiente: la generación de un “pulso” de nutriente (S_1) es capaz de producir una importante respuesta de acumulación de energía tanto en los experimentos de “clampeo” de concentración del cation como en los de “clampeo” de voltaje [Ecs. (7a)]. Sin embargo, en la condición de “clampeo” de concentración del cation se logra almacenar una mayor cantidad de energía (en la forma del componente eléctrico) que en la relativa a la de “clampeo” de voltaje (en la forma del componente de concentración), como se constata en los resultados de las Ecs. (7a). Es importante destacar, además, que las constantes de tiempo de estas dos clases de simulaciones son marcadamente diferentes. Mientras que en los experimentos de “clampeo” de concentración del cation (Figs. 7-A y 7-B, gráficos superiores), V_m alcanza rápidamente un nuevo valor estacionario, los cambios experimentados por C_i durante los experimentos de “clampeo” de voltaje (Figs. 7-A y 7-B, gráficos inferiores), tienen lugar a

un ritmo apreciablemente más lento. Esto resulta ser una consecuencia directa de la diferencia que existe entre las escalas de tiempo en que ocurren los cambios en V_m y en C_i (Jakobsson, 1980; Hernández y Cristina, 1998) (ver Apéndice II). Esta diferencia ha sido implícitamente asumida, en todos los estudios efectuados, mediante el empleo de la ecuación estacionaria Ec. (1b) como una solución para la dependencia temporal de V_m (Apéndice II), en lugar de una ecuación diferencial explícita.

4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados permiten entonces concluir que:

- a) El intermediario en el proceso de acoplamiento (el gradiente electroquímico del cation C) es capaz de almacenar la energía suministrada por el nutriente (S_1) y de emplearla para la síntesis de un determinado metabolito energético (S_2) (Fig. 2-A, Sección 3.3.1).
- b) Para los valores considerados de los parámetros (Tabla I), la principal contribución a la generación de la DP proviene de la enzima electrogénica E_1 . En consecuencia, el nivel de energía alcanzado por el intermediario energético, y por consiguiente, la concentración del metabolito energético, resultan ser extremadamente sensibles a la actividad de esta enzima (Fig. 3, Sección 3.3.2, Figs. 5 y 6, Sección 3.4.1).
- c) La concentración del metabolito energético puede variar en respuesta a modificaciones en la demanda metabólica (representada por ϕ_{\max}) o en la actividad de la enzima electrogénica que cataliza su síntesis (E_2), sin que se afecte el nivel de energía del intermediario en el proceso de acoplamiento (Figs. 2-B, 3-B y 6, Secciones 3.3.1 y 3.3.2). Esto resulta ser una consecuencia inmediata de la propiedad expresada en b).

- d) Las modificaciones provocadas en la permeabilidad iónica (P_C) promueven significativos cambios en los dos componentes del intermediario energético (V_m y C_i) (Fig. 4, Sección 3.3.3). Esta propiedad concuerda con la actividad desacoplante atribuida a los “leaks” iónicos en las membranas transductoras de energía (Nedergaard y Cannon, 1992; Brand et al., 1994).

Estas propiedades permiten concluir que el modelo planteado puede constituir una descripción elemental plausible para aquellos procesos de acoplamiento de energía en los que una de las EE resulta ser dominante.

A su vez, algunos de los resultados presentados en este trabajo de tesis constituyen argumentos a favor de la noción de que la DP resulta ser el componente cinético y termodinámico relevante en el intermediario energético. En efecto, según hemos mostrado:

- a) Los cambios en la concentración del metabolito energético fundamentalmente obedecen a las modificaciones que se producen en el potencial de membrana (Figs. 2-A, 3-A, 4 y 5, Sección 3.3). Esto se debe principalmente a que la concentración del cation no puede descender más allá de un valor mínimo, consecuencia de la imposición de la condición de electroneutralidad [Ec. (2)]; por lo tanto, todo cambio que se registre en la concentración de S_2 , una vez que C_i ha alcanzado ese valor mínimo, estará estrechamente vinculado a las modificaciones que se verifiquen en el componente eléctrico del intermediario energético (V_m) (ver Figs. 2-A, 3-A y 5).

b) Para “pulsos” de igual magnitud en la concentración de nutriente (S_1), la DP constituye una fuente de energía libre que se genera más rápidamente en relación a la representada por la diferencia de concentración del ion transportado (Fig. 7-A, Sección 3.4.2). Además, para condiciones en las que el sistema se halla alejado de la saturación de los dos componentes del intermediario energético, el potencial de membrana es capaz de almacenar una mayor cantidad de energía [Fig. 7-A y 7-B, Sección 3.4.2, Ecs. (7a) y (7b)].

5 PERSPECTIVAS

El modelo estudiado en esta tesis representa una de las situaciones más simples que se pueden plantear. Posteriores modificaciones a este modelo básico permitirían extender los estudios con el fin de analizar situaciones más realistas. Esto implicaría explorar los efectos que se originarían al incorporar otras propiedades y características relevantes de los sistemas transductores de energía que existen en las membranas de diversos organelos y microorganismos. Entre otras propiedades podrían considerarse:

- a) Incluir términos no óhmicos en las expresiones que describen la electrodifusión iónica. Esto permitiría abordar el estudio de algunos procesos de acoplamiento energético en los que el flujo desacoplado (“leak”) resulta ser no-óhmico (Garlid et al., 1989).

- b) Incluir procesos de “slippage” en los modelos enzimáticos [desarrollo de ciclos en los cuales ocasionalmente las bombas iónicas promueven la degradación de una fuente de energía libre, sin que ésta sea empleada para el transporte de iones a través de la membrana (ciclos fútiles)]. Esto se lograría mediante el uso de diagramas cinéticos, representando a las enzimas participantes en el proceso, con un mayor número de estados conformacionales que los utilizados en este trabajo de tesis, aunque como consecuencia el análisis se haría más complejo (ver Apéndice VI). El rol del “slippage” de las EE en el proceso de acoplamiento energético ha sido planteado y discutido por algunos autores (para una revisión, véase Laüger, 1991).

- c) Considerar relaciones estequiométricas diferentes de la unidad para los procesos de transporte mediados por las EE. Esto podría generar un modelo capaz de funcionar bajo condiciones de energía menores que las consideradas en esta tesis [por ejemplo, mantener la síntesis del metabolito energético (S_2), a partir de reacciones químicas ($S_1 \leftrightarrow P_1$) cuyas fuerzas termodinámicas fueran inferiores a aquellas que promueven la propia formación del metabolito energético]. Como se mencionara, tal podría ser la situación en algunos microorganismos (Dimroth, 1992; 1997).
- d) Condiciones que determinen diferentes contribuciones relativas de las EE a la DP [por ejemplo, que ambas EE (E_1 y E_2) contribuyan en igual término al potencial de membrana]. Para ello, se requeriría considerar valores mayores de ϕ_{\max} . Es interesante destacar, sin embargo, que el valor de ϕ_{\max} empleado aquí (Tabla I) es consistente con los valores experimentales encontrados para el recambio (“turnover”) de ATP en mitocondria (Reich y Sel’kov, 1981).
- e) Considerar la aplicación del modelo para el caso en el cual el gradiente electroquímico sea generado por un transporte de protones. Un tipo de análisis como el desarrollado en este trabajo de tesis, basándose en un modelo elemental poseyendo algunas de las propiedades y características básicas de los procesos de acoplamiento de energía en membranas, podría ayudar a comprender cuales son las diferencias esenciales relacionadas al empleo de iones H^+ , en lugar de otra clase de iones, para la generación del gradiente electroquímico existente a

través de las membranas transductoras de energía de la mayoría de organelos y microorganismos (Skulachev, 1992).

En conclusión, consideramos que el modelo desarrollado constituye una adecuada descripción de los aspectos cinéticos básicos de los procesos de acoplamiento energético en sistemas macromoleculares de membrana. Sus propiedades fundamentales podrían ser las que caracterizaran a ciertos procesos de acoplamiento que emplean un gradiente electroquímico de Na^+ como intermediario energético. Su principal contribución consiste en la propuesta de una plausible estrategia de modelado con la finalidad de describir tanto las propiedades estacionarias como dinámicas de los procesos elementales de acoplamiento de energía en membranas biológicas. Por su naturaleza, el modelo es potencialmente capaz de incorporar otras propiedades que le permitan describir situaciones más complejas.

APENDICE I

Flujos de C mediados por las enzimas electrogénicas

El transporte activo de C mediado por E_1 está descrito por el siguiente diagrama cinético de dos estados (Fig. A11):

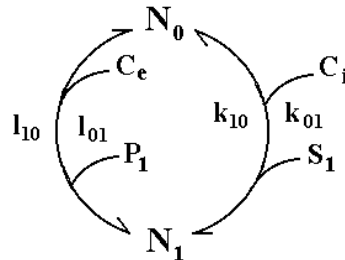


Fig. A11. Diagrama cinético correspondiente a la enzima E_1 .

En este diagrama, N_0 y N_1 representan los estados conformacionales de la enzima electrogénica, mientras que k_{01} , k_{10} , l_{01} , l_{10} , son las constantes de velocidad que gobiernan las transiciones correspondientes. El significado del resto de los términos se halla especificado en el Glosario de Símbolos. En estado estacionario, el flujo J_1 (considerado positivo en la dirección de las agujas del reloj) puede ser expresado, entre otras formas, empleando el método algorítmico desarrollado por Hill (1977), como:

$$J_1 = (N_T / \Sigma_1) (k_{01} l_{10} S_1 C_i - k_{10} l_{01} P_1 C_e), \quad (A1)$$

donde N_T representa la cantidad total de la enzima y Σ_1 la suma de los diagramas direccionales de todos los estados del modelo cinético, es decir

$$\Sigma_1 = k_{01} S_1 C_i + l_{01} P_1 C_e + k_{10} + l_{10}.$$

Para el caso en que $P_1 = 0$ y $C_i = C_e = C$, a partir de la Ec. (A1) se obtiene el flujo máximo (J_{S_1}) y la constante de Michaelis (K_{M,S_1}) para S_1 :

$$J_{S_1} = N_T l_{10} \quad \text{y} \quad K_{M,S_1} = (k_{10} + l_{10}) / k_{01} C. \quad (\text{A2a})$$

Análogamente, para P_1 :

$$J_{P_1} = N_T k_{10} \quad \text{y} \quad K_{M,P_1} = (k_{10} + l_{10}) / l_{01} C. \quad (\text{A2b})$$

Se ha asumido que las constantes de velocidad l_{01} y l_{10} dependen con la DP de acuerdo con las siguientes expresiones (Hansen et al., 1981):

$$l_{01} = l_{01}^{\circ} \exp [FV_m / (2RT)]; \quad l_{10} = l_{10}^{\circ} \exp [- FV_m / (2RT)], \quad (\text{A3})$$

donde l_{01}° y l_{10}° son independientes de V_m , y F , R y T ya han sido definidos (Sección 2.2.1).

Para valores de $V_m = 0$ y $C = 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$, y empleando los valores de los parámetros que aparecen en la Tabla I, se obtiene:

$$J_{S_1} = 48.25 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ s}^{-1}; \quad K_{M,S_1} = 7.214 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3};$$

$$J_{P_1} = 0.482 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ s}^{-1}; \quad K_{M,P_1} = 7.214 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}.$$

La condición de balance detallado (o principio de reversibilidad microscópica) impone, además, la siguiente restricción sobre las constantes de velocidad:

$$K_1 = k_{01} I_{10}^0 / (k_{10} I_{01}^0), \quad (\text{A4})$$

donde K_1 es la constante de equilibrio (disociación) de la reacción $S_1 \leftrightarrow P_1$.

Teniendo en cuenta que existe un único ciclo, el flujo activo de C mediado por E_1 (considerado positivo en la dirección saliente) es igual a J_1 .

El transporte activo de C mediado por E_2 está descrito por el siguiente diagrama cinético de dos estados (Fig. AI2):

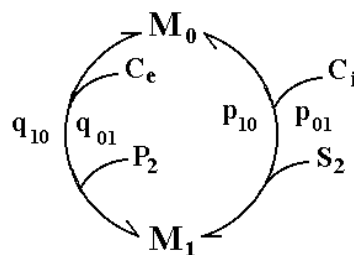


Fig. AI2. Diagrama cinético correspondiente a la enzima E_2 .

Análogamente al caso anterior, el flujo activo de C mediado por E₂ es igual a J₂:

$$J_2 = (M_T / \Sigma_2) (p_{01} q_{10} S_2 C_i - p_{10} q_{01} P_2 C_e), \quad (A5)$$

donde M_T representa la cantidad total de la enzima y Σ₂ la suma de los diagramas direccionales de todos los estados del modelo cinético, es decir

$$\Sigma_2 = p_{01} S_2 C_i + q_{01} P_2 C_e + p_{10} + q_{10}.$$

Para el caso en que P₂ = 0 y C_i = C_e = C, a partir de la Ec. (A5) se obtiene el flujo máximo (J_{S₂}) y la constante de Michaelis (K_{M,S₂}) para S₂:

$$J_{S_2} = M_T q_{10} \quad y \quad K_{M,S_2} = (p_{10} + q_{10}) / p_{01} C. \quad (A6a)$$

Análogamente, para P₂:

$$J_{P_2} = M_T p_{10} \quad y \quad K_{M,P_2} = (p_{10} + q_{10}) / q_{01} C. \quad (A6b)$$

Las constantes de velocidad q₀₁ y q₁₀ dependen de la DP de acuerdo con las siguientes expresiones (Hansen et al., 1981):

$$q_{01} = q_{10}^0 \exp [FV_m / (2RT)]; \quad q_{10} = q_{10}^0 \exp [- FV_m / (2RT)], \quad (A7)$$

donde q_{01}° y q_{10}° son independientes de V_m , y F , R y T ya han sido definidos (Sección 2.2.1).

Para valores de $V_m = 0$ y $C = 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$, y empleando los valores de los parámetros que aparecen en la Tabla I, se obtiene:

$$\begin{aligned} J_{S_2} &= 96.5 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ s}^{-1}; & K_{M,S_2} &= 7.146 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}; \\ J_{P_2} &= 4.038 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ s}^{-1}; & K_{M,P_2} &= 7.146 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}. \end{aligned}$$

La condición de balance detallado impone la siguiente restricción sobre las constantes de velocidad:

$$K_2 = p_{01} q_{10}^{\circ} / (p_{10} q_{01}^{\circ}), \quad (\text{A8})$$

donde K_2 es la constante de equilibrio (disociación) de la reacción $S_2 \leftrightarrow P_2$.

Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos J_{S_1} , K_{M,S_1} , J_{P_1} , K_{M,P_1} , J_{S_2} , K_{M,S_2} , J_{P_2} , K_{M,P_2} , empleando las correspondientes constantes cinéticas mostradas en la Tabla I, se encuentran dentro de los rangos numéricos usuales para las EE (Gradmann et al., 1982; Slayman y Sanders, 1984).

APENDICE II

Solución estacionaria para V_m

Los cambios en las variables del sistema de Ecs. (1) ocurren a escalas muy diferentes en función de los parámetros (A_C/V_C) y (F/C_m), cuyos valores numéricos son muy distintos (empleando los valores de la Tabla I, $A_C/V_C = 5 \times 10^3$ y $F/C_m = 9.65 \times 10^{10}$, respectivamente). Esto hace que dicho sistema presente un carácter fuertemente “stiff” [denominación empleada en el área del Cálculo Numérico de Sistemas de Ecuaciones (véase por ejemplo, Press et al., 1990)]. Por lo tanto, la estrategia adoptada para el estudio numérico de la dependencia temporal de V_m se basó en asumir una solución estacionaria de la condición de electroneutralidad, condición satisfecha constantemente a lo largo de cualquier transitorio experimentado por el sistema. Para las Ecs. (1), la condición de electroneutralidad está dada por:

$$J_1 + J_2 - J_C + J_A = 0. \quad (1b)$$

A partir de esta condición, se puede obtener la siguiente expresión para V_m (Hernández et al., 1989):

$$V_m = (RT/F) \ln [(\kappa + \lambda) / (\mu + \omega)], \quad (A9)$$

donde las funciones $\kappa = \kappa(V_m)$, $\lambda = \lambda(V_m)$, $\mu = \mu(V_m)$ y $\omega = \omega(V_m)$ están dadas por:

$$\kappa = (P_C C_i + P_A A_e) \varepsilon_m$$

$$\lambda = (N_T / \Sigma_1) k_{01} l_{10}^0 S_1 C_i + (M_T / \Sigma_2) p_{01} q_{10}^0 S_2 C_i$$

$$\mu = (P_C C_e + P_A A_i) \varepsilon_m$$

$$\omega = (N_T / \Sigma_1) k_{10} l_{01}^0 P_1 C_e + (M_T / \Sigma_2) p_{10} q_{01}^0 P_2 C_e,$$

con ε_m definido por las Ecs. (3), y con N_T , M_T , Σ_1 , Σ_2 y las constantes de velocidad definidos en el Apéndice I.

Es importante señalar que la Ec. (A9) es una ecuación trascendente en V_m , ya que κ , λ , μ , y ω son funciones de V_m . Por lo tanto, sus raíces solo pueden ser obtenidas mediante el empleo de procedimientos numéricos. Resulta interesante notar además, que en ausencia de transporte electrogénico (por ejemplo, $N_T = M_T = 0$), la Ec. (A9) se convierte en la ecuación explícita para el potencial de difusión de Goldman-Hodgkin-Katz (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949):

$$(V_m)_{\text{Goldman}} = (RT / F) \ln (\kappa / \mu). \quad (\text{A10})$$

Para los estudios realizados aquí, V_m fue obtenido a partir de la Ec. (A9) por medio de un proceso de iteración del tipo $(V_m)_{n+1} = f_{V_m} (C_i, A_i, S_2, P_2, u)_n$ (Hernández et al., 1989), el cual condujo a soluciones convergentes para todas las simulaciones.

Como resultado de haber adoptado la solución estacionaria para V_m , el sistema de Ecs. (1) se reduce a:

$$\begin{aligned} dC_i / dt &= dA_i / dt = (A_C / V_C) (- J_1 - J_2 + J_C) \\ dS_2 / dt &= (A_C / V_C) (- J_2 - \phi) = - dP_2 / dt \end{aligned} \quad (A11)$$

$$V_m (t) = V_m \{ J_1 + J_2 - J_C + J_A = 0 \}.$$

En consecuencia las tres variables dinámicas consideradas en el modelo resultan ser V_m , C_i y S_2 (ver también texto principal).

APENDICE III

Determinación de los valores de estado estacionario

En estado estacionario, el sistema de Ecs. (1a) debe cumplir:

$$dC_i/dt = dA_i/dt = dS_2/dt = -dP_2/dt = 0 \quad \text{y} \quad dV_m/dt = 0,$$

$$o \tag{A12}$$

$$-J_1 - J_2 + J_C = J_A = -J_2 - \phi = J_1 + J_2 - J_C + J_A = 0.$$

A partir de estas condiciones, los valores de estado estacionario de las variables pueden ser expresados por el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} C_i &= \{ (P_C \varepsilon_m C_e + \omega) / [P_C + (N_T / \Sigma_1) k_{01} l_{10}^\circ S_1 + (M_T / \Sigma_2) p_{01} q_{10}^\circ S_2] \} \exp(u) = \\ &= f_{C_i}(C_i, A_i, S_2, P_2, u) \end{aligned}$$

$$A_i = A_e \exp(-u) = (A_i)_{eq} = f_{A_i}(C_i, A_i, S_2, P_2, u)$$

$$\begin{aligned} S_2 &= [(M_T / \Sigma_2) p_{10} q_{01}^\circ P_2 C_e \exp(u/2) - \phi] / [(M_T / \Sigma_2) p_{01} q_{10}^\circ C_i \exp(-u/2)] = \\ &= f_{S_2}(C_i, A_i, S_2, P_2, u) \tag{A13} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P_2 &= [(M_T / \Sigma_2) p_{01} q_{10}^\circ S_2 C_i \exp(-u/2) + \phi] / [(M_T / \Sigma_2) p_{10} q_{01}^\circ C_e \exp(u/2)] = \\ &= f_{P_2}(C_i, A_i, S_2, P_2, u) \end{aligned}$$

$$V_m = (RT / F) \ln [(\kappa + \lambda) / (\mu + \omega)] = f_{V_m} (C_i, A_i, S_2, P_2, u),$$

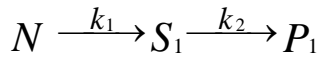
con κ , λ , μ , y ω definidos en el Apéndice II; u y ε_m definidos por las Ecs. (3), y con N_T , M_T , Σ_1 , Σ_2 y las constantes de velocidad definidos en el Apéndice I. La última ecuación (para V_m) es de hecho la Ec. (A9).

Las Ecs. (A13) son trascendentes, por lo tanto sus raíces solo pueden ser obtenidas mediante el empleo de métodos numéricos. En forma similar al procedimiento descrito en el Apéndice II, las raíces del sistema de ecuaciones (A13) se obtuvieron por medio de un procedimiento de iteración del tipo $(y)_{n+1} = f_y (C_i, A_i, S_2, P_2, u)_n$ ($y = C_i, A_i, S_2, P_2, V_m$), el cual condujo a soluciones convergentes para todas las simulaciones realizadas.

APENDICE IV

Diferencias en las modificaciones en S_1 y en ϕ

La diferencia de criterios adoptada para los cambios en S_1 y en ϕ , se debe fundamentalmente a que S_1 representa un tipo de molécula que forma parte integral de una secuencia de reacciones que se lleva a cabo a nivel celular (en el caso de una mitocondria, el par $[S_1/P_1]$ representaría al par $[(\text{NADH}+\text{H}^+)/\text{NAD}^+]$, por lo tanto cualquier modificación en su concentración estará estrechamente vinculada a modificaciones en las concentraciones de otras especies moleculares; en otras palabras, los cambios en S_1 no se verificarán en forma instantánea. Teniendo en cuenta esto, y asumiendo además la situación más elemental a los efectos de simplificar los estudios, a partir de la reacción genérica:



se obtiene el siguiente modelo dinámico:

$$dS_1/dt = k_1 (N) - k_2 (S_1), \quad (\text{A14})$$

donde N podría representar la concentración intracelular de nutrientes, mientras que k_1 y k_2 las respectivas constantes de velocidad de cada etapa. La solución de la ecuación diferencial (A14) resulta ser la Ec. (5), con $S_1 (\infty) = (S_1)_{ss} = k_1(N) / k_2$; siendo $(S_1)_{ss}$ el valor de S_1 correspondiente a la situación de estado estacionario ($dS_1/dt = 0$).

A su vez, el metabolito energético S_2 representa una clase de molécula que resulta ser imprescindible, en su función de transportador primario de energía química, para el desarrollo de diversas reacciones y procesos vinculados al mantenimiento del estado estacionario celular (si se tratara de una mitocondria, S_2 representaría al ATP). En consecuencia, y a los efectos de evaluar la incidencia de súbitas e importantes modificaciones, a nivel celular, en los requerimientos metabólicos de S_2 (representados por ϕ), se ha asumido que las posibles variaciones en la concentración de este metabolito se traduzcan a través de cambios instantáneos en su velocidad máxima de consumo ϕ_{\max} .

APENDICE V

Consideraciones termodinámicas

En sistemas que se hallan a presión y temperatura constantes los cambios espontáneos, es decir aquellos que no se deben a la acción de fuerzas externas, solo ocurren a partir de estados de alta energía libre, llegándose al equilibrio termodinámico cuando se iguala la energía libre de todos los componentes del sistema. Es así que las sustancias disueltas en compartimientos separados por una membrana permeable tienden a pasar espontáneamente a través de la membrana desde el compartimiento donde su energía libre es mayor. El movimiento cesa cuando la energía libre de la sustancia en ambos compartimientos se iguala, alcanzando así el equilibrio termodinámico. La expresión matemática que permite calcular la energía libre de sustancias disueltas en medios cuyo potencial eléctrico es distinto de cero es la del potencial electroquímico (Nicholls y Ferguson, 1992). En sistemas biológicos, donde la temperatura y la presión suelen ser constantes, las variables que afectan el potencial electroquímico de un soluto son su concentración y el potencial eléctrico de la disolución. Para este trabajo, asumimos que el potencial electroquímico se expresa en forma ideal:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C + zF\Psi, \quad (\text{A15})$$

donde μ_0 es el potencial electroquímico estándar, C estrictamente representaría a la concentración molal de soluto (aproximadamente asimilable a la concentración molar del mismo), Ψ es el potencial eléctrico de la disolución, R es la constante universal de los

gases, T es la temperatura absoluta, z es el número de cargas por ion (el signo de z dependerá del signo de las cargas) y F es la constante de Faraday. El término $(RT \ln C)$ mide el cambio de energía libre cuando se producen modificaciones en la concentración de soluto, mientras que el término $(zF\Psi)$ mide los cambios de energía libre debidos a variaciones en el potencial eléctrico del sistema.

En términos generales, la variación neta de energía libre ocasionada por el transporte de un mol del ion C debido a la existencia de una diferencia de potencial eléctrico de valor $\Delta\Psi$ ($\Delta\Psi = \Psi' - \Psi''$), desde una concentración $[C]'$ a otra $[C]''$ viene dada por la ecuación electroquímica:

$$\mu_{C'} - \mu_{C''} = \Delta\mu_C = RT \ln[C] - RT \ln[C]'' + zF\Psi' - zF\Psi''$$

o (A16)

$$\Delta\mu_C = RT \ln([C]'/[C]'') + zF\Delta\Psi.$$

Por lo tanto, los cambios de energía libre en los componentes eléctrico y de concentración, cuando el sistema experimenta variaciones que lo conducen desde un estado inicial a un estado final, estarán dados por:

$$\Delta\varepsilon_{elec} = F [(\Delta\Psi)_{final} - (\Delta\Psi)_{inicial}],$$

(A17)

$$\Delta\varepsilon_{conc} = RT \{ \ln([C]'/[C]'')_{final} - \ln([C]'/[C]'')_{inicial} \}.$$

A su vez, los procesos de acoplamiento energético que tienen lugar en las membranas de diversos organelos y microorganismos pueden ser interpretados en términos de la teoría quimiosmótica propuesta por Mitchell (Mitchell, 1961). Según esta teoría, los sistemas macromoleculares responsables de estos procesos pueden considerarse constituidos por dos grupos de proteínas. Uno es el denominado “ATP sintetasa”, que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico, acoplada energéticamente al transporte de H^+ (o de Na^+) a favor de gradiente. El otro grupo de proteínas es el responsable de la generación del gradiente electroquímico de protones (o de iones sodio). Para ello, emplea fuentes energéticas características de cada organismo. En otras palabras, la teoría quimiosmótica establece que el funcionamiento de estos dos grupos proteicos se encuentra acoplado por medio de la existencia de un “intermediario energético”, es decir, el gradiente electroquímico de protones (o de iones sodio) que se crea a través de las membranas transductoras de energía.

La expresión matemática que permite cuantificar la magnitud del gradiente electroquímico de un ion es la de la diferencia de potencial electroquímico [Ec. (A16)]. La diferencia de potencial electroquímico resulta ser el indicador más directo y cuantitativo del estado de “energización” de los sistemas transductores de energía existentes en las membranas biológicas. La magnitud de la diferencia de potencial electroquímico, es decir la magnitud de la energía almacenada bajo la forma del intermediario energético, dependerá a su vez de la magnitud del componente eléctrico y del componente de concentración, respectivamente.

APENDICE VI

Procesos de “slippage”

Los procesos de “slippage” podrían ser incorporados al modelo mediante la extensión del diagrama cinético básico de dos estados conformacionales (Figs. AI1 y AI2, Apéndice I), a uno de cuatro estados como el que se presenta en la Fig. AVI1.

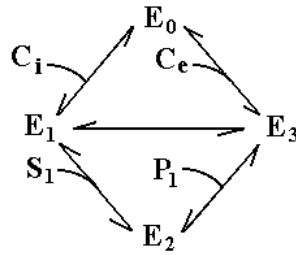


Fig. AVI1. Diagrama cinético correspondiente a la enzima “E”.

En este diagrama existen tres ciclos que se pueden representar esquemáticamente de la manera siguiente (Fig. AVI2):

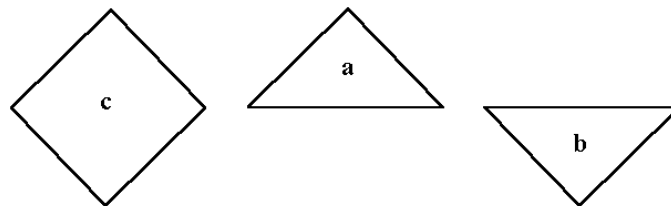


Fig. AVI2. Ciclos correspondientes al diagrama de la Fig. AVI1.

El ciclo “c” operaría espontáneamente en la dirección positiva (contraria a la de las agujas del reloj), transportando al cation C, en contra de su gradiente electroquímico, hacia el medio exterior, a expensas de la energía obtenida de S_1 . Los ciclos “a” y “b” representan ciclos fútiles; como el potencial electroquímico del cation es mayor en el medio exterior, el ciclo “a” operaría espontáneamente en dirección negativa (a favor de las agujas del reloj) moviendo a C desde el exterior hacia el interior, mientras que el ciclo “b” lo haría en dirección positiva, promoviendo la degradación del nutriente S_1 desacoplada del transporte de C hacia el medio exterior.

Por otro lado, resulta interesante señalar que la suma de los diagramas direccionales (Σ) de todos los estados del modelo cinético representado en la Fig. AVI1 (Hill, 1977), que a su vez constituye el denominador de la ecuación que describe el flujo de C mediado por la enzima “E”, consta de 32 términos (a diferencia de los 4 términos para el caso de los diagramas de dos estados de las Figs. AI1 y AI2, Apéndice I), siendo cada uno de ellos el producto de tres constantes de velocidad. En otras palabras, la consideración de modelos cinéticos con un mayor número de estados conformacionales permite incorporar otras propiedades inherentes a los procesos de acoplamiento energético en membranas, pero como consecuencia el análisis de estos modelos se vuelve cada vez más complejo.

BIBLIOGRAFIA

Borst-Pauwels, G.W.F.H. Mutual interaction of ion uptake and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1145: 15-24, (1993).

Brand, M.D.; Chien, L.F; Ainscow, E.K.; Rolfe, D.P.S. and Porter, R.K. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* 187: 132-139, (1994).

Byrne, J.H. and Schultz, S.G. (1988). *An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity*, págs.66-92. Raven Press, New York.

Caplan, S.R. and Essig, A. (1983). *Bioenergetics and Nonequilibrium Thermodynamics. The Steady-State*, págs. 348-388. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Chapman, J.B.; Johnson, E.A., and Kootsey, J.M. Electrical and biochemical properties of an enzyme model of the sodium pump. *J. Membrane Biol.* 74: 139-153, (1983).

Dimroth, P. The ATPases of *Propionigenium modestum* and *Bacillus alcalophilus*. Strategies for ATP synthesis under low energy conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1101: 236-239, (1992).

Dimroth, P. Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1318: 11-51, (1997).

Dybas, M. and Konisky, J. Energy transduction in the methanogen *Methanococcus voltae* is based on a sodium current.. *J. Bacteriol.* 174: 5575-5583, (1992).

Frumento, A.S. The electrical effects of an ionic pump. *J. Theor. Biol.* 9: 253-262, (1965).

Goldman, D.E. Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60, (1943).

Gottschalk, G. and Blaut, M. Generation of proton and sodium motive forces in methanogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 263-266, (1990).

Gradmann, D.; Tittor, J., and Goldfarb, V. Electrogenic Cl⁻ pump in *Acetabularia*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 299: 447-457, (1982).

Groen, B.H.; Berden, J.A., and van Dam, K. Differentiation between leaks and slips in oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1019: 121-127, (1990).

Hansen, U.P.; Gradmann, D.; Sanders, D., and Slayman, C.L. Interpretation of current-voltage relationships for “active” ion transport systems: I. Steady-state reaction-kinetic analysis of class-I mechanisms. *J. Membrane Biol.* 63: 165-190, (1981).

Hayashi, M.; Nakayama, Y., and Unemoto, T. Existence of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase in *Haemophilus influenzae*. FEBS Lett. 381: 174-176, (1996).

Hernández, J.A.; Fischbarg, J., and Liebovitch, L.S. Kinetic model of the effects of electrogenic enzymes on the membrane potential. J. Theor. Biol. 137: 113-125, (1989).

Hernández, J.A. and Cristina, E. Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the Na⁺ pump and of cotransport systems. Am. J. Physiol. 275: C1067-C1080, (1998).

Hill, T.L. (1977). Free Energy Transduction in Biology, págs. 1-32. Academic Press, New York.

Hille, B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes (Second Edition), págs. 15-18. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Hilpert, W.; Schink, B., and Dimroth, P. Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. EMBO J. 3: 1665-1670, (1984).

Hodgkin, A.L. and Katz, B. The effects of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. Lond. 108: 37-77, (1949).

Holzhtüter, H.-G.; Henke, W.; Dubiel W., and Gerber G. A mathematical model to study short-term regulation of mitochondrial energy transduction. Biochim. Biophys. Acta 810: 252-268, (1985).

Iriarte, R. (1990). Métodos Numéricos, págs. 164-171. Editorial Trillas.

Jacob, R.; Piwnica-Worms, D; Horres, C.R., and Lieberman, M. Theoretical effects of transmembrane electroneutral exchange on membrane potential. J. Gen. Physiol. 83: 47-56, (1984).

Jacquez, J.A. A generalization of the Goldman equation, including the effects of electrogenic pumps. Math. Biosci. 12: 185-196, (1971).

Jacquez, J.A. and Schultz, S.G. A general relation between membrane potential, ion activities, and pump fluxes for symmetric cells in a steady state. Math. Biosci. 20: 19-25, (1974).

Jakobsson, E. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. Am. J. Physiol. 238: C196-C206, (1980).

Korzeniewski, B., and Froncisz, W. An extended dynamic model of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 1060: 210-223, (1991).

Korzeniewski, B., and Froncisz, W. Theoretical studies on the control of the oxidative phosphorylation system. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 67-75, (1992).

Laüger, P. (1991). *Electrogenic Ion Pumps*, págs. 3-14, 18, 81. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Laubinger, W. and Dimroth, P. Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F₁F₀ type. *Eur. J. Biochem.* 168: 475-480, (1987).

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1993). *Principles of Biochemistry* (2nd edition), págs. 375-377. Worth Publishers, New York.

Lemieux, D.R.; Roberge, F.A., and Savard, P. A model study of the contribution of active Na-K transport to membrane repolarization in cardiac cells. *J. Theor. Biol.* 142: 1-33, (1990).

Lemieux, D.R.; Roberge, F.A., and Joly, D. Modeling the dynamic features of the electrogenic Na, K pump of cardiac cells. *J. Theor. Biol.* 154: 335-358, (1992).

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature (London)* 191: 144-148, (1961).

Moo Kwon, H. and Handler, J.S. Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 465-471, (1995).

Moreton, R.B. An investigation of electrogenic sodium pump in snail neurons using the constant field theory. *J. Exp. Biol.* 51: 181-201, (1969).

Mullins, N.J. and Noda, K. The influence of sodium-free solutions on the membrane potential of frog muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 47: 117-132, (1963).

Nicholls, D.G. (1987). *Bioenergética (Introducción a la teoría quimiosmótica)*, págs. 45-68. Editorial Reverté, S. A.

Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J. (1992). *Bioenergetics* 2, págs. 39-63. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers.

Nedergaard, J. and Cannon, B. (1992). *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), págs. 385-420. Elsevier, Amsterdam.

Press, W.; Flannery, B.; Teukolsky, S., and Vetterling, W. (1990). *Numerical Recipes*, págs. 572-577. Cambridge University Press.

Reich, J.G. and Sel'kov, E.E. (1981). *Energy Metabolism of the Cell*, pág. 117. Academic Press.

Scriven, D.R.L. Modeling repetitive firing and bursting in a small unmyelinated nerve fiber. *Biophys. J.* 35: 715-730, (1981).

Skulachev, V.P. (1992). *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), págs. 37-73. Elsevier, Amsterdam.

Slayman, C.L. and Sanders, D. (1984). *Electrogenic Transport. Fundamental Principles and Physiological Implications.* (Blaustein, M.P., and Lieberman, M., eds.), págs. 307-322. Raven Press, New York.

Sperelakis, N. (1995). *Cell Physiology. Source Book.* (Sperelakis, N., ed.), págs. 61-66. Academic Press, New York.

Stoeckenius, W. The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in a archaeobacterium. *Trends. Biochem. Sci.* 10: 483-486, (1985).

Walz, D. Biothermokinetics of processes and energy conversion. *Biochim. Biophys. Acta* 1019: 171-224, (1990).

Weinstein, A.M. Dynamics of cellular homeostasis: Recovery time for a perturbation from equilibrium. *Bull. Math. Biol.* 59: 451-481, (1997).

Westerhoff, H.V., and van Dam, K. (1992). *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), págs. 1-35. Elsevier, Amsterdam.

Yancey, P.H.; Clark, M.E.; Hand, S.C.; Bowlus, R.D., and Somero G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222, (1982).

Tabla I

Valores numéricos de los parámetros

$A_C : 2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$	$V_C : 1 \times 10^{-11} \text{ cm}^3$
$P_C : 2 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$	$P_A : 1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$
$C_e : 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$	$A_e : 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$
$N_T : 5 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$	$M_T : 1 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$
$S_1 : 5 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$	$P_1 : 2 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$
$k_{01} : 1 \times 10^6 \text{ mol cm}^{-3}$	$k_{10} : 1 \text{ s}^{-1}$
$l_{01}^0 : 1 \times 10^4 \text{ mol}^{-2} \text{ lt}^2 \text{ s}^{-1}$	$l_{10}^0 : 1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$
$p_{01} : 1 \times 10^7 \text{ mol}^{-2} \text{ lt}^2 \text{ s}^{-1}$	$p_{10} : 0.418 \text{ s}^{-1}$
$q_{01}^0 : 1 \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \text{ lt}^2 \text{ s}^{-1}$	$q_{10}^0 : 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$
$K_1 : 1 \times 10^4$	$K_2 : 2.4 \times 10^5$
$\phi_{\max} : 2 \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$K_{S_2} : 5 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$
$T_2 : 2.24 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$	$q : 8.87 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$
$R : 8.3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	$F : 96500 \text{ C mol}^{-1}$
$T : 310 \text{ K}$	$C_m : 1 \text{ } \mu\text{F cm}^{-2}$
$\theta : 20 \text{ s}$	