

Tesis de Maestría en Biofísica

Área Biología, PEDECIBA

Efectos alostéricos en procesos de transporte en membranas biológicas.
Estudios analíticos y numéricos de modelos dinámicos.

Autor: Guillermo Perdomo

Orientador: Dr. Julio A. Hernández

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

Tribunal: Dr. Gustavo Brum

Dr. Ruben Budelli

Dr. Eduardo Mizraji

Índice general

1. Introducción	2
2. Modelos de una dimensión	8
2.1. Modelo 1	9
2.2. Modelos con interacciones	10
2.2.1. Modelo 2	13
2.2.2. Modelo 3	13
2.2.3. Modelo 4	15
2.2.4. Modelo 5	18
2.2.5. Modelo 6	20
2.2.6. Modelo 7	20
2.2.7. Modelo 8	20
2.2.8. Modelo 9	25
2.3. Tiempos de relajación	26
2.4. Conclusiones	28
3. Modelos no continuos y de 2 dimensiones	30
3.1. Incorporación del potencial de membrana	31
3.2. Modelo no continuo de una dimensión (Modelo I)	32
3.3. Modelos de 2 dimensiones	34
3.3.1. Modelo II	36
3.3.2. Modelo III	40
3.4. Apéndice	49
4. Simulaciones numéricas	51
4.1. Elección de los valores numéricos	51
4.2. Dependencia de los valores estacionarios de pH_i y V_m del Modelo III con M	53
4.3. Efecto de M sobre las propiedades dinámicas de los Modelos I y III	54
4.4. Conclusiones	59
Epílogo	61
Bibliografía	63

Capítulo 1

Introducción

Transporte a través de membranas biológicas

El movimiento de moléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular, o en el caso de los organelos celulares, entre su interior y el citoplasma, es realizado por diferentes mecanismos de transporte ubicados en las membranas biológicas (Hille, 1992; Weiss, 1996). Algunas moléculas pueden atravesar la membrana lipídica como resultado de su gradiente de concentración entre los compartimientos. El ejemplo más conocido es el del agua, pero otras moléculas que son hidrofóbicas o lipofílicas también presentan esta capacidad, por ejemplo los esteroides. Se trata de un mecanismo no selectivo y depende de las características físicas de las moléculas, tales como su solubilidad en lípidos y su radio molecular. Solutos de tamaño relativamente grande o con baja solubilidad lipídica difícilmente traspone la bicapa lipídica de las membranas. Este tipo de solutos puede experimentar transporte mediado a través de membranas biológicas. Los canales y los transportadores (“carriers”) permiten que solutos específicos se desplacen entre uno y otro lado de la membrana a favor de su gradiente electroquímico. Al igual que la difusión simple de solutos a través de la bicapa lipídica, este transporte por difusión facilitada constituye un ejemplo de transporte pasivo. Diversos iones inorgánicos, como sodio, potasio, cloro, calcio y el ión hidrógeno, son transportados a través de diferentes membranas biológicas por canales y transportadores. Para el caso de muchas moléculas orgánicas de tamaño intermedio, como los azúcares y los aminoácidos, su movimiento entre compartimientos celulares está mediado por transportadores con diferentes grados de especificidad.

El transporte activo de solutos a través de membranas es una de las propiedades más importantes de los organismos vivos. Los sistemas responsables del transporte activo acoplan una fuente dadora de energía libre al transporte contra gradiente electroquímico del soluto. En el transporte activo primario dicha fuente es una reacción química, usualmente la hidrólisis del ATP, o el impacto fotónico. El ejemplo más típico de transporte activo primario es el de las bombas iónicas, como la $Na^+ - K^+$ ATPasa de la membrana plasmática de las células animales o la H^+ ATPasa de la membrana interna mitocondrial. En el transporte activo secundario el transporte contra gradiente de un soluto se logra al acoplarse al transporte a favor de gradiente de otro soluto, usualmente un ión inorgánico. Ejemplos de transporte activo secundario son el cotransportador sodio-glucosa de las células epiteliales de la mucosa intestinal y el intercambiador $Cl^- - HCO_3^-$ presente en

diversos epitelios.

Canales y bombas iónicas

Uno de los mecanismos fundamentales de transporte pasivo está representado por los canales iónicos, la mayoría de los cuales permiten el pasaje de iones inorgánicos a través de las membranas biológicas. Los canales iónicos se pueden caracterizar de acuerdo a los iones transportados, inhibidores y activadores farmacológicos, propiedades cinéticas, etc. Muchos canales se caracterizan por poseer mecanismos de compuerta que determinan que puedan encontrarse abiertos o parcial o completamente cerrados. Dichos mecanismos de compuerta pueden estar modulados por diferentes factores, uno de los cuales es el potencial de membrana. El ejemplo clásico es el de las células excitables, las que presentan canales cuya apertura y cierre se encuentra determinada por cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática. La presencia de estos canales desempeña un rol fundamental en la generación de señales en el sistema nervioso, contracción muscular y en la secreción hormonal, tal como ocurre en las células beta del páncreas (Hille, 1992; Weiss, 1996). En otros canales iónicos la regulación del grado de apertura depende de la unión de una molécula de ligando a un sitio específico de la proteína, accesible desde alguna de las caras de la membrana. Habitualmente, la molécula o ión que modula la apertura del canal no es la misma que pasa por él. Ejemplos de ello son el canal de potasio activado por calcio, el cual se abre ante un incremento de la concentración intracelular de este último, y el canal de potasio activado por ATP, el cual se cierra en respuesta a un aumento de la concentración intracelular del nucleótido (Weiss, 1996). Un caso de interés para este trabajo lo representan los canales de protones. Estos se han encontrado, entre otras localizaciones, en neuronas de caracol, en epitelio alveolar de rata y en diversas células humanas, como neutrófilos (DeCoursey, 1998) y epitelios renales (DeCoursey, 1998, 2003). Es posible distinguir cuatro variedades de canales protónicos, algunos de los canales presentan una fuerte modulación por el pH intra o extracelular (DeCoursey, 1998, 2003). En muchos casos la curva de activación es más acentuada a potenciales negativos cuando el pH extracelular se incrementa o el pH intracelular decrece, abriéndose el canal cuando el gradiente electroquímico determina una corriente saliente. Estudios en tejido epitelial alveolar de ratón muestran que la curva de activación puede ser predicha por el gradiente de pH. El mecanismo de regulación del canal por el pH no ha sido aclarado, lo más probable es que existan sitios de protonación accesibles desde ambas caras de la membrana (DeCoursey, 2003). Al respecto, es interesante destacar que otros sistemas de transporte iónico presentan modulación por protones. Así, por ejemplo, el intercambiado $Na^+ - H^+$ posee, sobre la cara intracelular, un sitio de unión alostérico de protones que activa el transporte (Weiss, 1996; DeCoursey, 2003). Asimismo, se ha reportado que en los intercambiadores $Cl^- - HCO_3^-$ y $Cl^- - OH^-$ la regulación por el pH ocurre a través de la protonación, y que diferentes canales son inhibidos o activados por protones (DeCoursey, 2003). Una de las características importantes de algunos canales de protones es que el propio ión que lo atraviesa es quién a su vez lo regula. Un mecanismo de transporte con estas características ha sido propuesto para explicar la existencia de oscilaciones eléctricas en mitocondria (Hattori y otros, 2005) En efecto, estos autores han sugerido que las fluctuaciones espontáneas del potencial de la membrana interna de la mitocondria se podrían explicar por la presencia de canales de protones regulados por pH, de forma similar a los

descritos arriba. Pero esto no sólo se limita a los canales de protones, un fenómeno similar se encuentra en algunos canales de Ca^{2+} donde entre los distintos reguladores se encuentra el propio ión Ca^{2+} (Lee y Catterall, 2005). Esta modalidad es importante porque el calcio juega un rol fundamental como segundo mensajero, esta vinculado a distintos fenómenos de la fisiología celular como es el inicio de la transcripción de genes, contracción muscular, liberación de neurotransmisores. Algunos ejemplos son en *Paramecium caudatum* donde el Ca^{2+} acelera la inactivación de los canales Ca^{2+} voltaje-dependientes, resultados similares se han encontrado en neuronas gigantes del caracol marino *Aplysia californica*.

También resulta de interés para esta tesis hacer referencia a algunas bombas de protones. Estas representan una superfamilia de proteínas, donde el transporte de iones hidrógeno está vinculado a distintos roles de la fisiología celular. Las protón-ATPasas se clasifican en tipos A, P, V y F. Las del tipo F se encuentran en mitocondrias, cloroplastos y bacterias, mientras que las V-ATPasas se encuentran en eucariotas, en las membranas del aparato de Golgi, en vacuolas y en vesículas. Las protón ATPasas tipo F pueden funcionar tanto en el sentido de sintetizar ATP a partir del gradiente electroquímico de protones como en el de hidrolizar ATP para bombear protones desde el interior del organelo celular. En condiciones fisiológicas las protón ATPasas tipo V no funcionan en el sentido de la síntesis de ATP, sino que lo hidrolizan para generar un flujo de hidrogeniones, el cual es utilizado en numerosos procesos de transporte activo secundario y para mantener un bajo pH interno. Las ATPasas tipo A se encuentran sólo en Archaea, y si bien su estructura primaria es similar a las del tipo V, sus funciones son semejantes a las del tipo F (Weiss, 1996; Hilario y Gogarten, 1998).

Fluctuaciones en el potencial de membrana en células no excitables y en organelos

Los cambios experimentados por la diferencia de potencial eléctrico de diversas membranas biológicas juegan un rol importante en el cumplimiento de diferentes funciones. Un ejemplo clásico está constituido por las células excitables. Así, la transmisión de información en las células nerviosas y la contracción en los tejidos musculares esquelético, cardíaco y liso, depende de la capacidad de éstos de generar potenciales de acción, cambios transitorios del potencial de membrana plasmática como respuesta a estímulos de diverso origen. A lo largo de los últimos años se han descrito otros tipos celulares que presentan cambios temporales, a veces verdaderas oscilaciones sostenidas, en el potencial de membrana. En algunos casos son tipos particulares de células excitables, como son las células beta del páncreas que liberan insulina (Gilon y Henquin, 1992; Bergsten, 2002; Numemaker y otros, 2006). En otros casos se trata de células o de organelos subcelulares que, en principio, no parecen presentar canales voltaje-dependientes, pero en las que igualmente se han observado fluctuaciones en el potencial de membrana. Entre otros, se han descrito estas fluctuaciones eléctricas en algas (Bauer y otros, 1999), mitocondrias (Vergun y otros, 2003; Vergun y Reynolds, 2004; Cortassa y otros, 2004; Hattori y otros, 2005), macrófagos (Hanley y otros, 2004), células HeLa (Tilly y otros, 1990) y células que expresan el oncogén Ha-ras (Lang y otros, 1991). Estos casos suelen presentar diferencias con las células excitables “clásicas”. En estas últimas los cambios en el potencial presentan regularidad en su amplitud y frecuencia a lo largo del proceso, y la duración de una oscila-

ción particular es del orden de los milisegundos. Las oscilaciones observadas en células no excitables, sin embargo, no poseen dicha regularidad y las escalas de tiempo se encuentran en el rango de los segundos (Bauer y otros, 1999; Hanley y otros, 2004; Hattori y otros, 2005). Asimismo, los mecanismos involucrados son más complejos y el detalle funcional de los mismos no es todavía claro. En algunos casos se asocia el cambio en el potencial de membrana a la fluctuación de la concentración de calcio en el citoplasma, en otros a la variación del pH intra y extracelular o a la presencia de ATP en el medio extracelular.

Los comportamientos oscilatorios han sido descritos en diversas áreas de la biología, como la biofísica, la bioquímica y la ecología. Uno de los ejemplos más estudiados es el de las oscilaciones de la vía glicolítica, en las que las concentraciones de ciertos intermediarios varían en períodos de varios minutos (Goldbeter y Berridge, 1996; Edelstein-Keshet, 1988; Murray, 2002a,b; Montero y Morán, 1992). Otro ejemplo muy estudiado es el del mohó del lodo *Dictyostelium discoideum*, que puede exhibir oscilaciones en la síntesis de AMP cíclico, caracterizadas también por períodos del orden de minutos. En ecología se describen diversas circunstancias en las que ocurren oscilaciones de poblaciones debidas a fenómenos de interacción entre especies o a impactos de procesos epidémicos (Edelstein-Keshet, 1988; Murray, 2002a,b; Montero y Morán, 1992). Las oscilaciones que ocurren en los procesos biológicos suelen involucrar mecanismos más complejos que los de los modelos físicos más sencillos. Suele ser frecuente la observación de situaciones más extremas que las de una oscilación sostenida o amortiguada clásica, pudiéndose llegar incluso a la presencia de caos determinístico. El desarrollo de modelos para el análisis de estos fenómenos constituye ya una rama clásica del estudio de sistemas complejos en biología (Delcroy y Goldbeter, 1982; Takeuchi y Adachi, 1983; Montero y Morán, 1992; Haberichter y otros, 2000).

Modelos integrados de procesos de transporte a través de membranas

Diferentes propiedades celulares, tales como la concentración interna de distintos iones, el volumen celular o el potencial de membrana, constituyen un importante objeto de estudio de la fisiología celular. La adaptación, supervivencia y evolución celular depende de la capacidad de las células de mantener estas variables dentro de rangos compatibles con las funciones vitales (Weiss, 1996; Hernández, 2003). La dinámica de estas variables puede ser descrita utilizando modelos matemáticos que integran diferentes procesos de transporte a través de membranas. Este tipo de metodología ha sido clásicamente empleado en biofísica para la interpretación de diversas propiedades celulares, tales como la regulación del volumen (Weinstein, 1997; Hernández, 2007) y la generación del potencial de reposo de la membrana plasmática (Jakobsson, 1980; Hernández y Cristina, 1998). Se han realizado algunos trabajos teóricos sobre oscilaciones del potencial de membrana en células no excitables y en mitocondria (Cortassa y otros, 2004) que proponen modelos explícitos de procesos de transporte a través de membranas combinados con mecanismos bioquímicos. En estos modelos se integran diferentes procesos de transporte pasivo y activo donde las variables son el potencial de membrana y las concentraciones de algunos iones, y en los que se consideran diferentes formas de interacción entre los flujos, los ligandos transportados y las variables mencionadas. Habitualmente, la inclusión de una única especie de ligando intracelular (iónico o no) y unas pocas variables celulares resulta suficiente para que el modelo ya exhiba comportamientos complejos y su análisis resulte complicado.

La razón de la complejidad de este tipo de sistemas se pone de manifiesto por el hecho de que los mismos consisten usualmente en sistemas de ecuaciones diferenciales no lineales. Las herramientas de que se dispone para abordarlos son analíticas, si el número de ecuaciones es menor o igual a dos (estudios de estabilidad), y numéricas. La literatura sobre el estudio de sistemas no lineales en general, y aplicados a la biología en particular, es abundante y en general implica realizar estudios sobre las propiedades de estabilidad de los puntos estacionarios frente a pequeñas perturbaciones de los mismos (FitzHugh, 1961; Chay y Rinzel, 1985; Edelstein-Keshet, 1988; Montero y Morán, 1992; Strogatz, 1994; Murray, 2002a,b).

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es contribuir a comprender el papel que juegan los procesos de transporte en el comportamiento de algunas variables celulares, como el potencial de membrana y las concentraciones iónicas. El objetivo particular es estudiar modelos integrados de transporte en membranas biológicas en los que el ligando transportado tenga efectos alostéricos sobre el propio proceso de transporte. El propósito es comprender las propiedades básicas de estos tipos de modelos y sugerir algunos roles fisiológicos posibles. Para ello, se tratan modelos matemáticos explícitos consistentes en sistemas de ecuaciones diferenciales que describen la velocidad de cambio de las variables consideradas. Dichos sistemas son estudiados desde un punto de vista analítico y numérico. En algunos casos se desarrollarán, asimismo, los modelos mecanísticos correspondientes, esto es, las descripciones plausibles de los aspectos mecánicos del modelo de transporte considerado. Es de destacar que los modelos trabajados aquí presentan un mínimo de factores integrados, siempre se busca que presenten el menor número posible de variables y parámetros. Lo que se pretende con esto es destacar los aspectos más relevantes de los procesos mecanísticos y bioquímicos involucrados. Otro camino, aquí no tratado, pero más presente en las tendencias actuales es hacia la modelización de sistemas con un número creciente de ecuaciones y componentes, donde su solución radica en la potencia de cálculo de las nuevas computadoras. A veces en algunos de estos modelos lo que se gana en capacidad de representación se pierde en discriminar los factores determinantes. Una desventaja del enfoque utilizado en esta tesis es que los modelos aquí presentados no capturan la totalidad de la complejidad ni de la riqueza de los mecanismos involucrados.

Metodología

Se estudian dos tipos de modelos de transporte, los cuales contienen una y dos ecuaciones diferenciales. Quedan excluidos de los estudios de esta tesis sistemas más complejos, de tres o más ecuaciones. Al incluir un número mayor de ecuaciones aumenta el número de comportamientos que pueden ser descritos. En general, los sistemas de ecuaciones diferenciales a utilizar en este estudio no son originales como tales sino que son adaptaciones de otros, empleados para describir situaciones en diferentes ámbitos de la biología. En esencia, los modelos considerarán el transporte pasivo y activo de una especie a través de una membrana. Los sistemas se estudian primero para el caso de una especie no iónica, y

después se incorpora el efecto del potencial de membrana para el caso de que el ligando transportado tenga carga eléctrica.

En el capítulo uno se estudiarán modelos de una sola variable, cuya cinética dependerá del ligando transportado a través de un efecto alostérico. La concentración intracelular del ligando constituirá la variable dependiente. Se estudiarán diferentes situaciones, en las que el ligando posea efectos de activación o de inhibición del proceso de transporte. No se incluirán en este capítulo los efectos del potencial de membrana.

En el capítulo dos se considerarán modelos de dos variables dependientes: la concentración interna del ligando y la concentración del mismo en un estado intermedio durante su pasaje pasivo a través de la membrana. Asimismo, se considerará el rol del potencial de membrana. Estudios previos realizados en el marco de este trabajo muestran que este modelo mínimo de dos ecuaciones diferenciales puede mostrar una gran riqueza de comportamientos. Entre otros, puede transformarse en un modelo formalmente idéntico a un modelo clásico empleado para describir oscilaciones en vías metabólicas (Higgins, 1964). Es interesante destacar que el “Modelo Mínimo de Higgins” (ibid) presenta una mayor riqueza de conductas dinámicas que otros modelos de dos ecuaciones, tales como el clásico modelo de Lotka-Volterra (Higgins, 1964; Queeney y otros, 1996) o el oscilador de Schnackenberg (1979). Como se mencionara, no se han explorado aquí modelos más complejos, por ejemplo, de tres ecuaciones diferenciales, para describir situaciones plausibles de transporte de un ligando a través de una membrana biológica. Estos tipos de modelos podrían exhibir conductas dinámicas aún más ricas que las de los modelos antes citados, existiendo incluso la posibilidad de poder encontrar hasta dinámicas de caos determinístico. Ejemplos de estos modelos de tres ecuaciones, que abundan en la literatura, son los Delcroy y Goldbeter (1982), Takeuchi y Adachi (1982), Haberichter (2000) entre otros.

Desde el punto de vista metodológico, para todos los modelos se realizan análisis de estabilidad. Para ello se emplean las técnicas usuales en estos casos, las que implican hallar los valores estacionarios del sistema, la realización de aproximaciones lineales en torno a los mismos, la obtención del sistema variacional a partir del conjunto de ecuaciones diferenciales originales y finalmente el estudio de los valores propios del modelo lineal obtenido. Para todos los modelos se realizan estudios numéricos. Para las simulaciones temporales se emplea el método de integración de Runge-Kutta de 4° orden y ocasionalmente el método corrector-predictor de Hamming. Los lenguajes de programación utilizados fueron Matlab 6.1.0.450 o superiores y C++, y se empleó un computador PC con procesador Pentium IV o superior.

Capítulo 2

Modelos de una dimensión

Como se comentó en la Introducción, en este capítulo se van a analizar modelos dinámicos descritos por una única ecuación diferencial, siendo estos sistemas autónomos y la variable dependiente la concentración interna de ligando (x). Se estudiarán diferentes casos de activación e inhibición del ligando transportado. Sólo se considerará aquí el caso de ligandos no iónicos. El esquema mostrado en la Fig. 2.1 ilustra los dos mecanismos de transporte a través de la membrana involucrados en el proceso. Asumiremos que el ingreso y la salida del ligando de la célula ocurre a través de dos vías, un paso difusional (b) y un paso activo (a). La regulación alostérica podrá ocurrir a través de una o ambas vías, dependiendo del modelo, y será debida exclusivamente a la especie molecular transportada. No se considerará explícitamente ningún otro factor, como podría ser un metabolito energético u otro ligando.

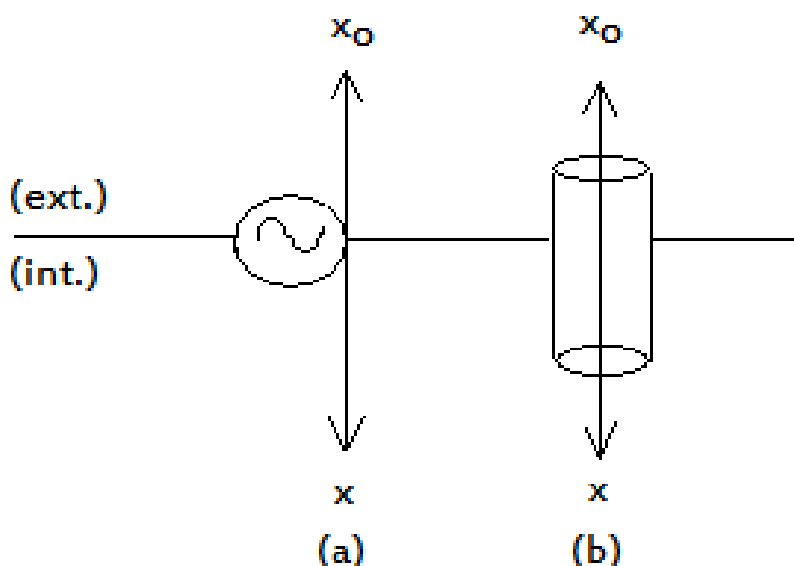


Fig. 2.1: Sistemas de Transporte.

El esquema cinético común a todos los modelos se muestra en la Fig. 2.2.

Modelo 1

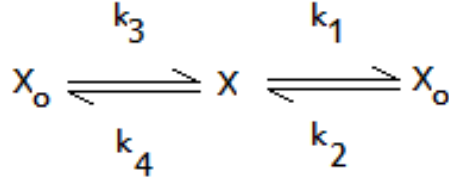


Fig. 2.2: Modelo Básico.

En el esquema de la Fig. 2.2 x_o , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , son parámetros positivos que representan la concentración externa del ligando, las constantes relacionadas con el paso difusional (k_1 , k_2) y las constantes relacionadas con el paso activo (k_3 , k_4) respectivamente. A lo anterior hay que agregar, en los casos particulares a analizar en este capítulo, las correspondientes constantes de activación e inhibición que presentan las diferentes variantes del esquema general.

2.1. Modelo 1

En este modelo no se considera efecto alósterico alguno por parte del ligando. Entonces, el esquema es el propio de la Fig. 2.2, siendo la ecuación correspondiente:

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - (k_1 + k_4)x. \quad (2.1)$$

Resulta fácil encontrar una solución de la Ec.(2.1), no obstante, antes de hallar una solución explícita se obtendrá el modelo adimensional correspondiente, como ilustración del procedimiento que se empleará en los restantes sistemas a estudiar. La adimensionalización es un procedimiento habitual en el estudio de sistemas físicos (Segel, 1984; Strogatz, 1994).

Modelo adimensional

Las constantes cinéticas poseen dimensiones de inversa de unidades de tiempo, mientras que la concentración de $[n/[L]^3]$, simbolizando n la magnitud “cantidad de sustancia”. Entonces, si se multiplica a ambos lados de la Ec.(2.1) por $1/x$ y luego se divide por $(k_1 + k_4)$ se obtiene:

$$dy/d\tau = \alpha - y, \quad (2.2)$$

siendo $y = x/x_o$, $\alpha = (k_2 + k_3)/(k_1 + k_4)$ y $\tau = (k_1 + k_4)t$. La solución de la ecuación (2.2) es:

$$y = \alpha + cte * e^{-\tau} \quad (2.3)$$

donde $cte = x^0/x_o^0$ y x^0 , x_o^0 las concentraciones iniciales intra y extracelulares de soluto, respectivamente. El comportamiento de la Ec.(2.3) es mostrado en la Fig. 2.3.

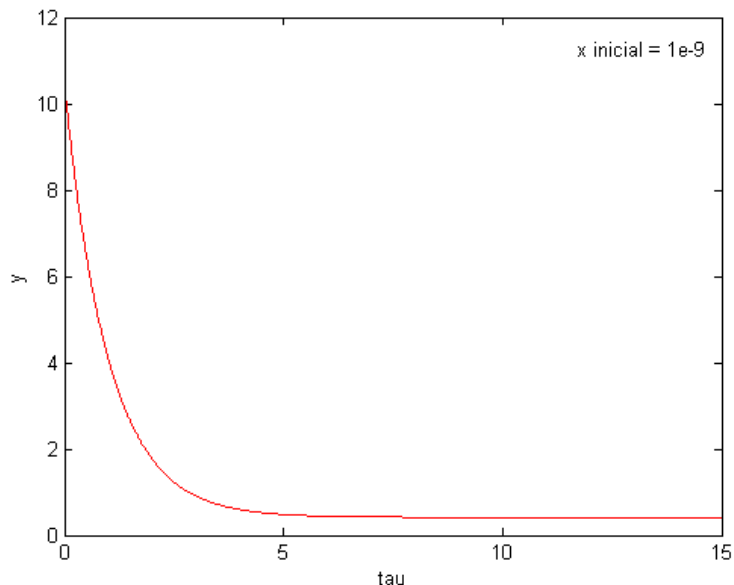


Fig. 2.3: Curso temporal de la ecuación (2.3) ($\alpha = 0,417$, $cte = 10$).

Como se observa en la Fig. 2.3 el comportamiento de la Ec.((2.3)) esta limitado a un decaimiento exponencial. ¿Es posible con un modelo de una única ecuación diferencial disponer de comportamientos más complejos que el mostrado? Para responder a esta pregunta se analizarán a continuación modelos similares al anterior, pero agregando interacciones alostéricas en los distintos pasos. Estas interacciones serán descritas por medio de constantes simples de activación y de inhibición, no detallándose aquí la naturaleza molecular de estas modulaciones (por ejemplo, si las mismas implican cambios conformacionales de algún tipo).

2.2. Modelos con interacciones

Los esquemas de la Fig. 2.4 muestran los posibles modelos a considerar. En principio, existe un número mayor de esquemas cinéticos que incluirían interacciones alostéricas del ligando (por ejemplo, si existen más de dos sitios de interacción alostérica), los que podrian o no tener plausibilidad biológica. Entonces, ¿por qué se consideran solamente los mostrados en la Fig. 2.4? Los ocho modelos presentados allí se pueden dividir en dos grupos. El primero incluye a modelos en los que las interacciones alostéricas afectan únicamente a una de las constantes del paso difusional o del paso activo. Por ejemplo, los modelos 4 y 5 muestran dos modulaciones diferentes que afectan a k_4 (paso activo), desde el punto de vista biológico esto es distinto de afectar a k_1 que es un paso difusional, pero la estructura matemática de los dos sistemas son semejantes y por tanto las conductas que se van a observar en la solución de las respectivas ecuaciones diferenciales son similares. La misma consideración de simetría se puede realizar para las constantes k_2 y k_3 , tomando como eje de simetría la concentración interna y siempre teniendo presente que son pasos

físicamente diferentes.

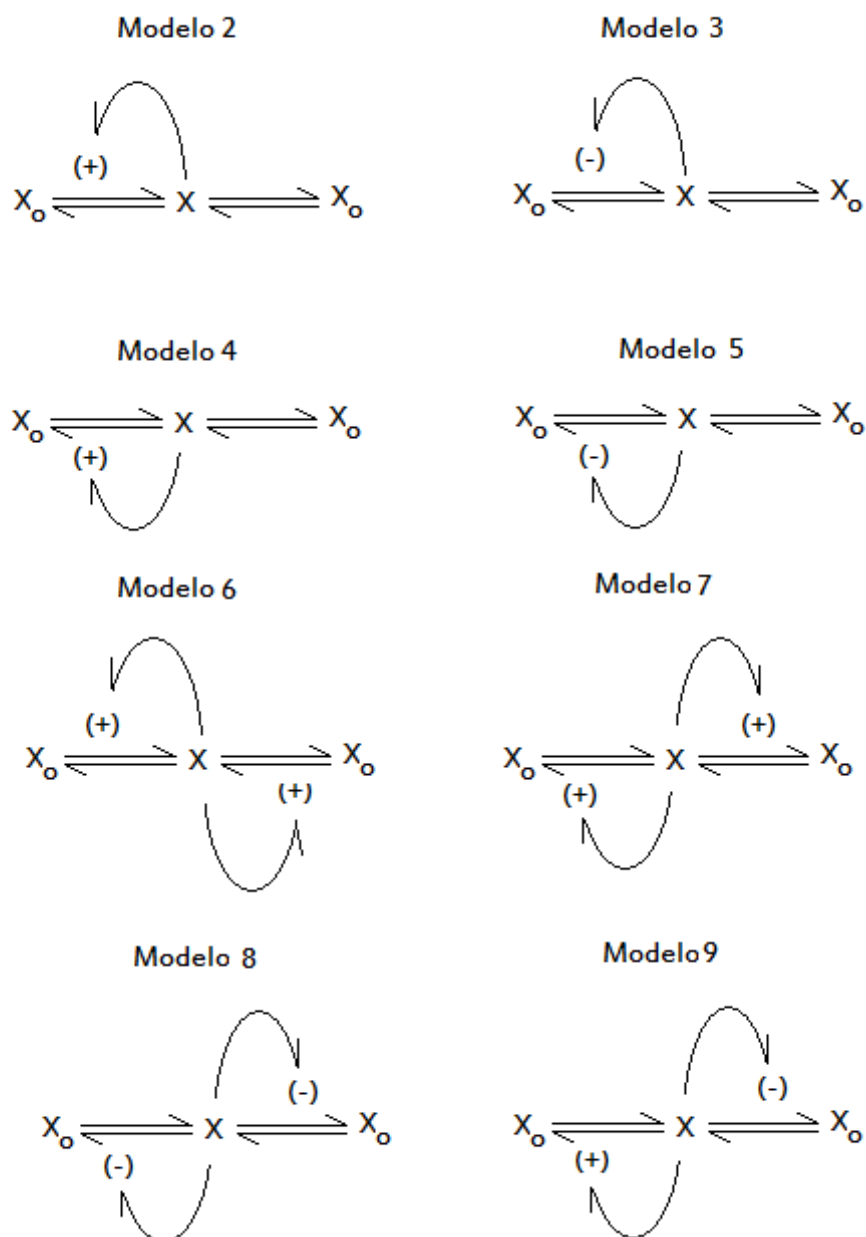


Fig. 2.4: Modelos con interacciones alostéricas de ligando. Los esquemas muestran posibles efectos alostéricos positivos (+) y negativos (-) del ligando sobre los diferentes pasos.

El segundo grupo está constituido por los modelos 6 a 9, que presentan dos interacciones simultáneas. Al igual que en el grupo anterior de modelos, se pueden hacer consideraciones de simetría para reducir el número de sistemas a estudiar. Por ejemplo, el simétrico correspondiente al esquema del modelo 9 se obtendría al intercambiar el tipo de interacción (esto es, positiva o negativa) sobre las constantes moduladas, pero desde el punto de vista de su comportamiento dinámico no existirán diferencias entre uno u otro. Para el caso del modelo 6 las constantes afectadas son k_2 y k_3 . Veremos aquí que este tipo de modulación

conduce a obtener un modelo adimensional similar al del modelo 2. No obstante, a pesar del hallazgo de dinámicas básicas similares en esquemas distintos, siempre debe tenerse presente que se trata de procesos físicamente diferentes. Como se mencionara, para realizar el estudio dinámico de los sistemas se les transformará de modo de obtener modelos adimensionales y con un menor número de variables. En la Tabla 2.1 se muestran los correspondientes cambio de variable y parámetros adimensionales de los modelos 2 a 9. Como puede constatar, las dimensiones de k_1 , k_2 , k_3 y k_4 y de x y x_o son las mismas que para el Modelo 1, mientras que para las constantes de activación e inhibición son $[L]^3[n]^{-1}$

Modelo	Variable	A	C	D	I	τ
2	$y = \frac{x}{x_0}$	$A = k_A x_0$	$\frac{k_2+k_3}{k_1+k_4-k_3A}$	—	—	$(k_1 + k_4 - k_3A)t$
3	$y = \frac{x}{x_0}$	—	$\frac{k_2}{k_1+k_4}$	$\frac{k_3}{k_1+k_4}$	$k_I x_0$	$(k_1 + k_4)t$
4	$y = \frac{x}{x_0}$	$A = k_A x_0$	$\frac{k_2+k_3}{k_4A}$	$\frac{k_1+k_4}{k_4A}$	—	k_4At
5	$y = \frac{x}{x_0}$	—	$\frac{k_2+k_3}{k_1}$	$\frac{k_4}{k_1}$	$k_I x_0$	k_1t
6	$y = \frac{x}{x_0}$	$A_2 = k_{A2}x_0; A_3 = k_{A3}x_0$	$\frac{k_2+k_3}{k_1+k_4-k_2A_2-k_3A_3}$	—	—	$(k_1 + k_4 - k_2A_2 - k_3A_3)t$
7	$y = \frac{x}{x_0}$	$A_1 = k_{A1}x_0; A_4 = k_{A4}x_0$	$\frac{k_2+k_3}{k_4A_4+k_1A_1}$	$\frac{k_1+k_4}{k_1A_1+k_4A_4}$	—	$(k_1A_1 + k_4A_4)t$
8	$y = \frac{x}{x_0}$	—	$\frac{k_2+k_3}{k_4}$	$\frac{k_1}{k_4}$	$I_1 = k_{I1}x_0; I_4 = k_{I4}x_0$	k_4t
9	$y = \frac{x}{x_0}$	$A_4 = k_{A4}x_0$	$\frac{k_2+k_3}{k_1}$	$\frac{k_4}{k_1}$	$I_1 = k_{I1}x_0$	k_1t

Tabla 2.1: Variables y parámetros adimensionales.

La Tabla 2.2 muestra los valores numéricos de referencia de los parámetros de los distintos modelos empleados para los estudios numéricos. Algunos de estos valores fueron extraídos de algún trabajo previo (Hernández, 2003), y valores semejantes a éstos (en rango y magnitud) se asignaron a los parámetros restantes.

Parámetro	Unidades
x_o	$10^{-10} molcm^{-3}$
k_1	$10s^{-1}$
k_2	$10s^{-1}$
k_3	$2,5s^{-1}$
k_4	$20s^{-1}$
k_A	$10^{10} mol^{-1} cm^3$
k_{A1}	$10^{10} mol^{-1} cm^3$
k_{A2}	$5 * 10^9 mol^{-1} cm^3$
k_{A3}	$10^{10} mol^{-1} cm^3$
k_{A4}	$5 * 10^9 mol^{-1} cm^3$
k_I	$10^{10} mol^{-1} cm^3$
k_{I1}	$5 * 10^9 mol^{-1} cm^3$
k_{I4}	$10^{10} mol^{-1} cm^3$

Tabla 2.2: Valores numéricos de los parámetros

2.2.1. Modelo 2

La ecuación correspondiente al Modelo 2 (fig. 2.4) es

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - (k_1 + k_4 - k_3A)x, \quad (2.4)$$

que sin dimensiones resulta tener la siguiente forma:

$$dy/d\tau = C - y. \quad (2.5)$$

La Ec.(2.5) es similar a la Ec.(2.2), por lo tanto su solución es del mismo tipo. No obstante, se puede realizar un estudio de estabilidad de los puntos estacionarios, donde en este caso hay un único estado:

$$\hat{y} = C. \quad (2.6)$$

La derivada de $f(y)$ evaluada en \hat{y} brinda un criterio para decidir el tipo de estabilidad, de forma tal que si:

$$f'(\hat{y}) \begin{cases} < 0 & \text{entonces } \hat{y} \text{ es estable} \\ > 0 & \text{entonces } \hat{y} \text{ es inestable,} \end{cases} \quad (2.7)$$

donde es $f(y) = C - y$. En el Modelo 2 la derivada de $f(y)$ es igual a -1 entonces el estado estacionario es estable (independientemente del signo de C el cual podría ser negativo, aunque no tendría significado biológico). Al tratarse de un sistema de primer orden (una única ecuación), el único comportamiento posible en la aproximación a un estado de equilibrio estable es monótono y no existen otros tipos de conductas como pueden ser oscilaciones. Lo anterior es válido siempre que la ecuación diferencial no sea de la forma $\dot{\theta} = f(\theta)$, donde f ahora describe la variación de un vector sobre un círculo (Strogatz, 1994). El Modelo 2 no muestra, en consecuencia, otras características de interés que las ya mencionadas, y las variaciones que se puedan producir en las constantes no van a cambiar cualitativamente la evolución del sistema.

2.2.2. Modelo 3

La ecuación para el sistema 3 (fig.2.4) es

$$\dot{x} = k_2x_o + k_3x_o/(1 + k_Ix) - (k_1 + k_4)x, \quad (2.8)$$

donde k_I es una constante de inhibición. Realizando las convenientes sustituciones se obtiene la nueva ecuación

$$dy/d\tau = C + D/(1 + Iy) - y, \quad (2.9)$$

donde sus componentes son adimensionales (cf. Tabla 2.1). Para hallar los puntos de equilibrio de la Ec.(2.9) existen dos métodos, uno analítico y otro gráfico. Para el primero se buscan las raíces que anulan (2.9), obteniéndose la siguiente expresión resultante para los estados estacionarios:

$$\hat{y} = \frac{(IC - 1) \pm \sqrt{(IC - 1)^2 + 4I(C + D)}}{2I}, \quad (2.10)$$

donde el término contenido en la raíz es mayor que 0. Por esta razón se obtienen dos raíces, una negativa y otra positiva, pero sólo la última tiene significado biológico. Por este camino es poca la información que se puede extraer del modelo, más allá que a priori se sabe que C , D e I son constantes positivas (Tabla 2.1). La alternativa es una solución gráfica, que consiste en igualar la Ec.(2.9) a 0 y luego despejar, obteniéndose la expresión:

$$C + D/(1 + Iy) = y. \quad (2.11)$$

Se grafican los dos términos (a la derecha y a la izquierda de la igualdad) y los puntos de intersección entre ambos son los puntos fijos del sistema. Las curvas correspondientes a las funciones se muestran en la Fig. 2.5, correspondiendo el color negro a $f_1(y) = y$ y el rojo a $f_2(y) = C + D/(1 + Iy)$ donde los valores de C , D e I son los correspondientes a la Tabla 2.2.

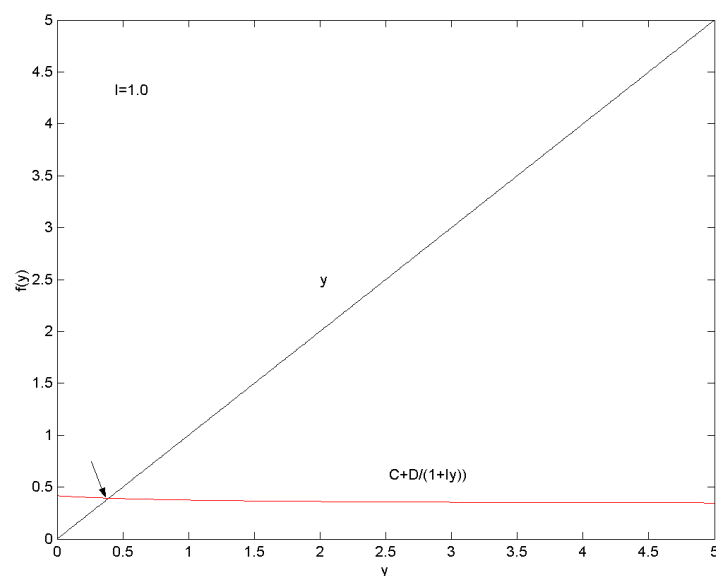


Fig. 2.5: Representación gráfica de la Ec.(2.11).

Para valores positivos de y hay un único punto fijo, el que se obtiene realizando la proyección sobre el eje de las abscisas del punto de corte de las dos curvas (Fig. 2.5, flecha). Tomando como referencia este punto, a la izquierda del mismo la función $C + D/(1 + Iy)$ es mayor que y y la Ec.(2.9) tiende a valores positivos crecientes, mientras que a la derecha del punto la función tiende a valores decrecientes. Por lo tanto, concluimos que el punto fijo es estable.

También es posible estudiar como se comporta este punto estacionario frente a cambios de los parámetros, es decir, si cambia su estabilidad o si el punto fijo llega a desaparecer. Para ello se deriva respecto a y a ambos lados de la igualdad (2.11):

$$\frac{d}{dy} \left(C + \frac{D}{1 + Iy} \right) = \frac{d}{dy}(y) \quad (2.12)$$

y se busca un valor crítico del o de los parámetros que afecten las propiedades de los puntos estacionarios. Para el caso considerado aquí, estos valores críticos coinciden cuando el punto de corte de los gráficos es tangente a los mismos. En el Modelo 3 hay tres parámetros, de los que sólo se consideran cambios en D e I , no así en C . Como puede verse en la expresión (2.11), el término de la derecha es independiente de los parámetros. A partir de la Ec.(2.12) se llega a

$$-\frac{DI}{(1+Iy)^2} = 1. \quad (2.13)$$

Operando y sustituyendo en la Ec.(2.11) se tiene que $I = \frac{1}{C-2y}$ y $D = \frac{(C-y)^2}{C-2y}$. Para este sistema no es esperable encontrar bifurcaciones, porque para distintos valores de f_2 el corte con f_1 siempre ocurre en un único punto. La estabilidad de este punto nunca se ve afectada para un rango de valores positivos de C , D e I .

2.2.3. Modelo 4

Para el sistema 4 la modulación es positiva y ocurre sobre el paso mediado por la constante k_4 . La ecuación correspondiente es:

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - (k_1 + k_4)x - k_A k_4 x^2, \quad (2.14)$$

donde k_A es la constante de activación. Si se eliminan las dimensiones de la Ec.(2.14) el Modelo 4 toma la forma

$$dy/d\tau = C - Dy - y^2, \quad (2.15)$$

siendo C y D las constantes positivas definidas en la Tabla (2.1).

El punto estacionario de interés del sistema ((2.15)) es:

$$\hat{y} = \frac{D - \sqrt{D^2 + 4C}}{-2}, \quad (2.16)$$

ya que $D < \sqrt{D^2 + 4C}$.

Igualando la Ec.(2.15) a 0 se obtiene $C = Dy + y^2$. Empleando el mismo procedimiento que para el Modelo 3, graficamos las dos funciones correspondientes en la Fig. 2.6.

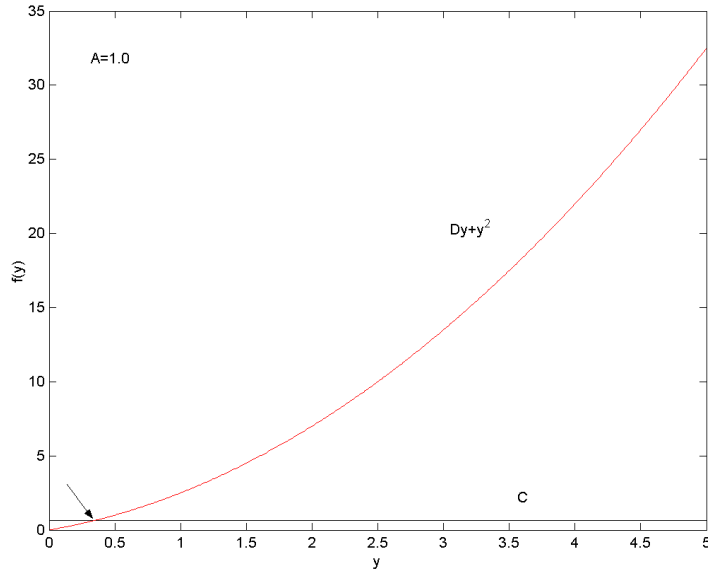


Fig. 2.6: Representación gráfica de las funciones correspondientes al Modelo 4

En la Fig. 2.6 se representa en rojo la función $f_1(y) = Dy + y^2$ y en negro $f_2(y) = C$, para valores de $C=0.625$ y $D=1.5$. El punto de corte entre ambas funciones es el correspondiente punto estacionario de la Ec.(2.15) proyectado sobre el eje y . Para un rango positivo de valores de y hay un único punto fijo el que, utilizando similares argumentos a los del Modelo 3, concluimos que se trata de un punto estable.

Para estudiar la existencia de bifurcaciones en el Modelo 4 se iguala y deriva las funciones $f_1(y)$ y $f_2(y)$:

$$\frac{d}{dy}(C) = \frac{d}{dy}(Dy + y^2) \implies 0 = D + 2y. \quad (2.17)$$

Despejando, obtenemos $D = -2y$ y el valor del parámetro $C = -y^2$. Es interesante observar lo que sucede con la evolución de los puntos fijos del sistema. Para estos valores de C sólo hay dos puntos fijos de diferente signo. Para valores menores de C , incluso si se elimina la restricción de tomar valores exclusivamente positivos, se observa que los puntos fijos tienden a colapsar en un único punto (punto crítico) y finalmente a desaparecer. Esto se observa en la Fig. 2.7 para valores decrecientes de C . Esta conducta corresponde a la existencia de un punto de bifurcación del tipo de Punto Silla. Para lograr modificar únicamente C y no los otros parámetros del modelo, se debe aumentar o disminuir la constante k_3 con respecto al valor de referencia de la Tabla 2.2. ¿Cómo es la estabilidad de este punto crítico, el que ocurre cuando $C_c = -D^2/4$? Realizando el mismo tipo de razonamiento que empleamos para concluir el tipo de estabilidad de los puntos fijos en los casos anteriores, podemos observar en la Fig. 2.7 que si se aproxima al punto estacionario desde la derecha este es atractivo, mientras que si se lo hace desde la izquierda es repulsivo. Además, las propiedades dinámicas del punto crítico no cambian con los diferentes valores de C . Si se grafica $y(C)$ (Fig. 2.8) se puede apreciar el comportamiento y estabilidad de los puntos fijos del Modelo 4 para un un valor fijo de D ($D = 1,5$). En la Fig. 2.8,

la línea negra continua representa valores estables del punto estacionario para distintos valores de C , mientras que la línea roja discontinua representa valores inestables. Como puede apreciarse, ambas curvas convergen para el valor crítico de C antes mencionado. Como dijéramos más arriba, este tipo de bifurcación recibe el nombre de bifurcación de Punto Silla (Strogatz, 1994).

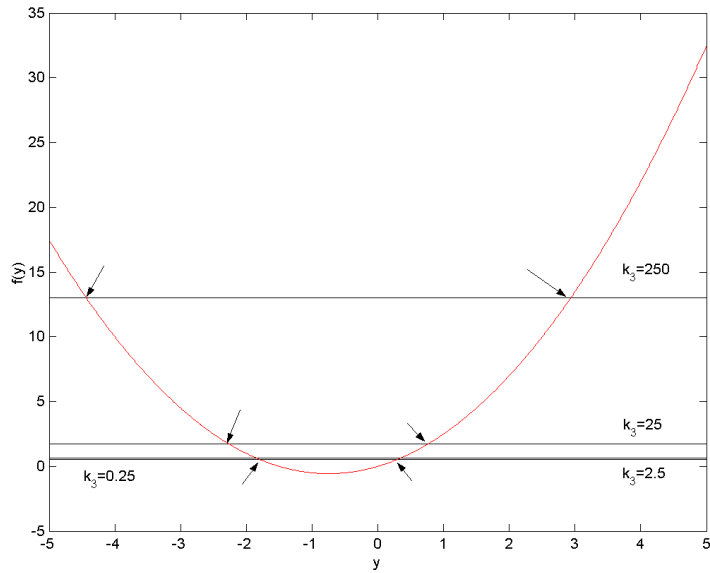


Fig. 2.7: Representación gráfica de la Ec.(2.17).

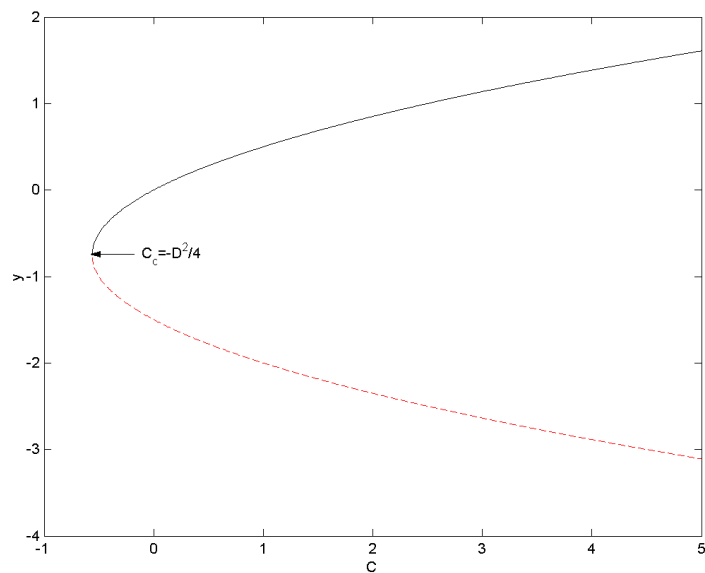


Fig. 2.8: Diagrama de estabilidad del Modelo 4

También es posible obtener la dependencia entre los parámetros C_c y D realizando las llamadas curvas de bifurcación (Fig. 2.9). Puede observarse en esta figura que para un C mayor que el valor crítico existen dos estados estacionarios, mientras que para valores menores no existe ninguno.

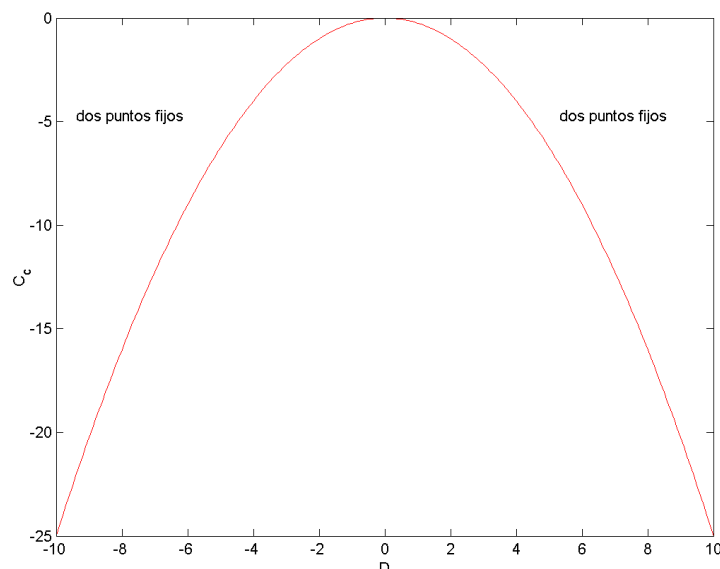


Fig. 2.9: Dependencia del valor crítico con los parámetros.

Se debe remarcar que la bifurcación mencionada sólo ocurre para valores negativos de C e y , y por consiguiente no tiene significado biológico. Por otro lado, la forma de variar C disminuyendo a k_3 , hace que esta constante tenga un peso cada vez menor en la determinación de C , lo cual implica que no es posible lograr hacer tender C a 0 modificando exclusivamente dicha constante. También es posible modificar C variando la constante k_A (Tabla 2.1), en ese caso se logra afectar a todos los parámetros de la Ec.(2.15). Sin embargo, las conclusiones extraídas mediante este procedimiento no son diferentes de las anteriores.

2.2.4. Modelo 5

En el modelo 5 (Fig. 2.4) la interacción en el paso mediado por k_4 es negativa, por lo tanto su correspondiente ecuación es:

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - \frac{k_4}{(1 + k_I x)}x - k_1 x. \quad (2.18)$$

La ecuación sin dimensiones resulta ser

$$dy/d\tau = C - \frac{D}{(1 + Iy)}y - y, \quad (2.19)$$

donde I es el producto de la constante de inhibición k_I por x_o . El estado estacionario de la Ec. (2.19) para el rango de interés es

$$\hat{y} = \frac{(IC - D - 1) + \sqrt{(IC - D - 1)^2 + 4IC}}{2I}. \quad (2.20)$$

Utilizando el método gráfico empleado para los modelos previos, obtenemos el gráfico mostrado en la Fig. 2.10 a partir de la igualdad $C = \frac{D}{(1+Iy)}y + y$,

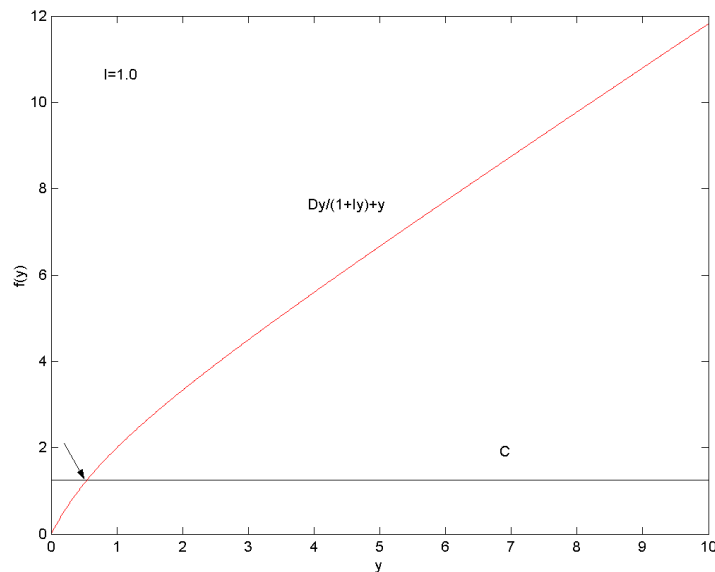


Fig. 2.10: Representación gráfica del Modelo 5 en estado estacionario.

para los valores $C=1.25$ y $D=2.0$ e $I=1.0$. Como puede observarse en la Fig. 2.10, nuevamente para valores positivos de las constantes y variables solamente hay un único punto fijo que es estable. Por más que se haga variar C dentro del rango positivo el punto estacionario no desaparece y tampoco cambia su estabilidad.

Si se desea encontrar bifurcaciones del sistema 5 se procede a derivar la igualdad anterior,

$$0 = \frac{D}{(1 + Iy)^2} + 1. \quad (2.21)$$

Despejando D en la Ec.(2.21) se obtiene que

$$D = -(1 + Iy)^2. \quad (2.22)$$

Sustituyendo en la igualdad mostrada arriba, se tiene que $C = -Iy^2$. En ambos casos, los valores de C y D tienen que ser negativos para verificar las respectivas igualdades. Por lo tanto, en caso de que existan bifurcaciones las mismas no se encontrarán en el rango positivo de los parámetros.

2.2.5. Modelo 6

Este modelo (fig. 2.4) presenta dos interacciones positivas que afectan simultáneamente el aumento de la concentración interna de la especie(x). Para el esquema 6 la ecuación correspondiente es:

$$dx/dt = [k_2(1 + k_{A_2}x) + k_3(1 + k_{A_3}x)]x_o - (k_1 + k_4)x, \quad (2.23)$$

donde k_{A_2} y k_{A_3} son las constantes de activación para los pasos mediados por las constantes k_2 y k_3 , respectivamente. Procediendo de igual forma que para los modelos anteriores, a partir de la Ec.(2.23) la ecuación adimensional resultante es

$$dy/d\tau = C - y, \quad (2.24)$$

la que es formalmente similar a la Ec.(2.5), aunque los C no representan la misma combinación de constantes cinéticas. El Modelo 6 tiene, por consiguiente un comportamiento semejante a los modelos 1 y 2.

2.2.6. Modelo 7

Si ahora se consideran interacciones positivas similares al modelo anterior (Fig. 2.4), pero sobre las otras dos vías, se obtiene:

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - (k_1 + k_4)x - (k_1k_{A_1} + k_4k_{A_4})x^2, \quad (2.25)$$

siendo k_{A_1} y k_{A_4} las correspondientes constantes de activación. Eliminando las dimensiones de la Ec.(2.25) se llega a

$$dy/d\tau = C - Dy - y^2. \quad (2.26)$$

Esta ecuación es similar a la del Modelo 4. Por consiguiente, el Modelo 7 posee un comportamiento análogo al del Modelo 4.

2.2.7. Modelo 8

Para el Modelo 8 (fig 2.4) las interacciones negativas conducen a la siguiente ecuación

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - k_1 \frac{x}{(1 + k_{I_1}x)} - k_4 \frac{x}{(1 + k_{I_4}x)}, \quad (2.27)$$

donde k_{I_1} y k_{I_4} son las correspondientes constantes de inhibición. El sistema 8 sin dimensiones resulta ser:

$$dy/d\tau = C - \left(\frac{D}{1 + I_1y} + \frac{1}{1 + I_4y} \right) y, \quad (2.28)$$

y la expresión correspondiente para el estado estacionario dentro del rango de concentraciones es

$$\hat{y} = \frac{-(C(I_1 + I_4) - (D + 1)) - \sqrt{(C(I_1 + I_4) - (D + 1))^2 - 4(CI_1I_4 - (DI_4 + I_1))C}}{2(CI_1I_4 - (DI_4 + I_1))}. \quad (2.29)$$

Realizando la búsqueda de los puntos fijos del modelo por métodos gráficos, se descompone la ecuación Ec.(2.28) en el siguiente par de funciones: $f_1 = C$ y $f_2 = \left(\frac{D}{1+I_1 y} + \frac{1}{1+I_4 y} \right) y$. Para $C = 0,625$ y $D = 0,5$ el gráfico correspondiente se muestra en la Fig. 2.11.

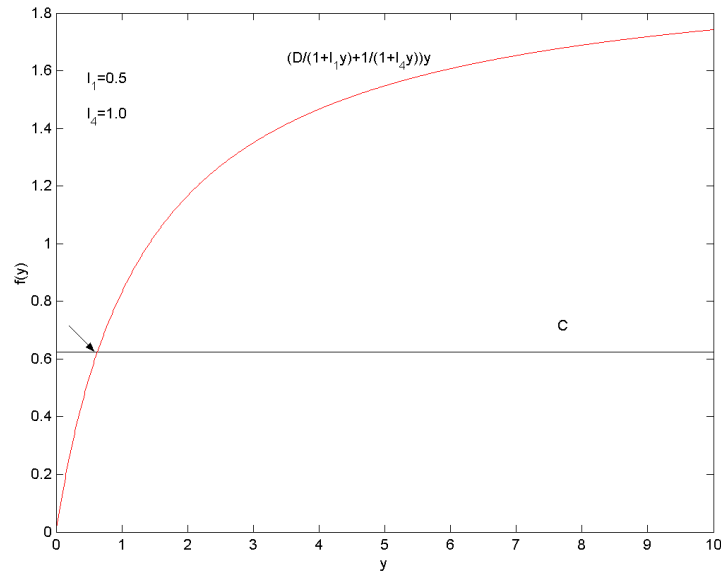


Fig. 2.11: Representación gráfica del Modelo 8 en estado estacionario.

Como se observa en la figura, nuevamente se encuentra un único punto fijo estable. ¿Qué sucede con este estado si se afecta alguna de las constantes de inhibición? En las Figs. 2.12 y 2.13 se observan los comportamientos de las curvas para distintos valores de I_1 y de I_4 .

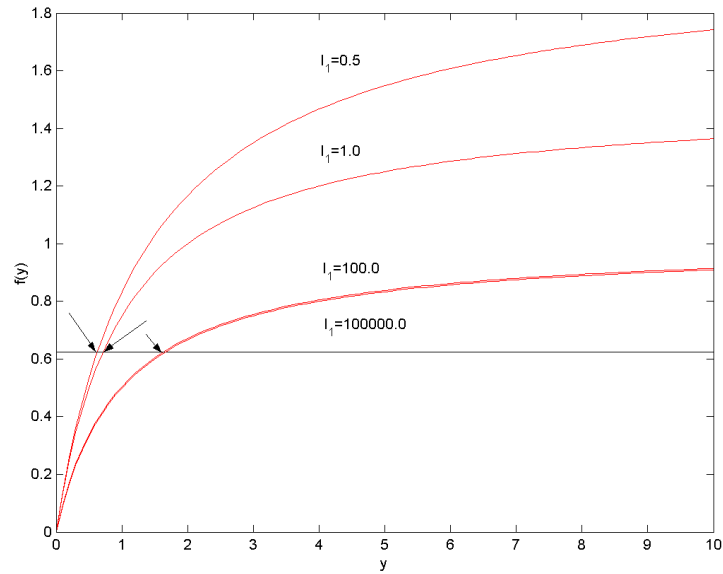


Fig. 2.12: Análogo a la Fig. 2.11, pero para diferentes valores de I_1 .

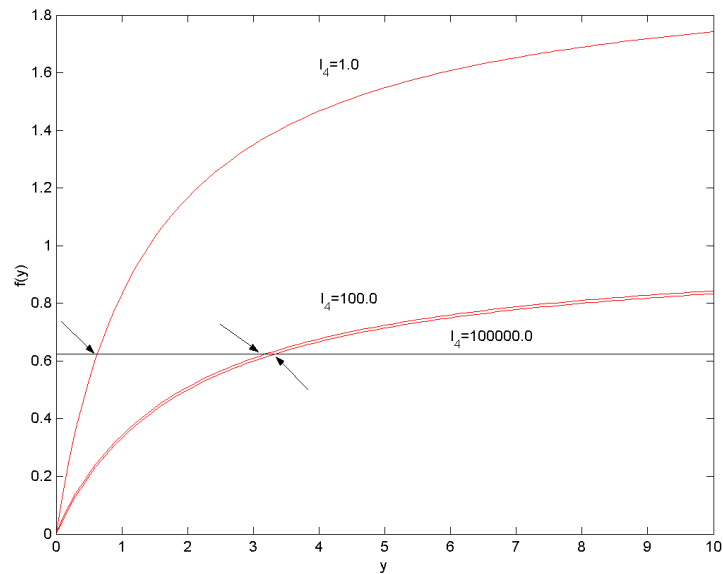


Fig. 2.13: Análogo a la Fig. 2.11, pero para diferentes valores de I_4 .

En las Figs. 2.12 y 2.13 algunos de los valores numéricos considerados para I_1 e I_4 se encuentran fuera del rango biológicamente plausible, pero se incluyen para observar el comportamiento “límite” del sistema. Se puede ver que, incluso para valores elevados de las constantes de inhibición, el punto estacionario no desaparece ni cambia su estabilidad. Sin embargo, para valores crecientes de C se observa que el punto fijo desaparece, tal como se muestra en el gráfico Fig. 2.14,

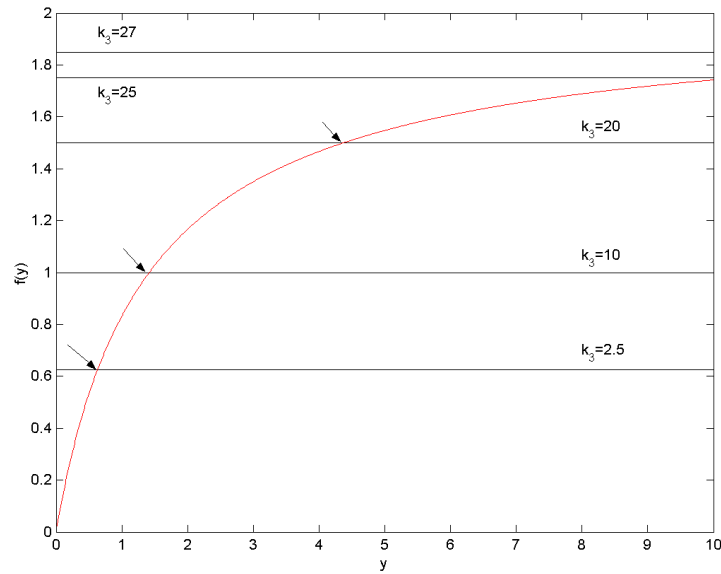


Fig. 2.14: Análogo a la Fig. 2.13, pero para diferentes valores de k_3 .

lo cual implica que nos encontramos en presencia de una bifurcación. El aumento de C se logra incrementando k_3 , lo que biológicamente implica aumentar el ingreso del ligando a la célula por el paso activo. Debe observarse también que el incremento de k_3 sólo afecta a C . Sin embargo, esto sí sucede si se incrementa D , dado que un cambio en k_1 implica necesariamente un cambio en k_2 .

Para comprender la dinámica de este sistema y qué tipo de bifurcación es la observada, y de igual forma que se realizara para el Modelo 4, se extendió el gráfico de la Fig 2.14 a valores negativos de y . Aunque ya se sabe que la región correspondiente a estos valores no se va a considerar, incluirlos permite visualizar todos los estados estacionarios del sistema y cómo se comportan para distintos valores de C .

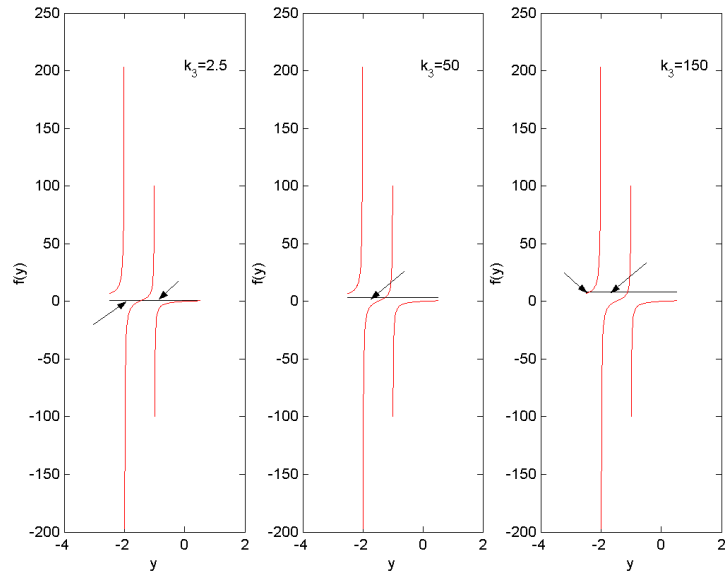


Fig. 2.15: Análogo a Fig.2.14, pero incluyendo valores negativos de y .

En la Fig. 2.15 se puede apreciar que el Modelo 8 presenta un punto estacionario negativo, que si bien cambia su valor, siempre existe. Un segundo punto estacionario primero aparece para valores positivos, desaparece y luego vuelve a surgir para valores negativos de y . Sin embargo, ninguno de los puntos cambia sus propiedades de estabilidad, las que siempre son estables. La Fig. 2.16 muestra el diagrama de bifurcación del punto de la Fig. 2.15 que toma valores positivos, mientras que la Fig. 2.17 el correspondiente al punto negativo.

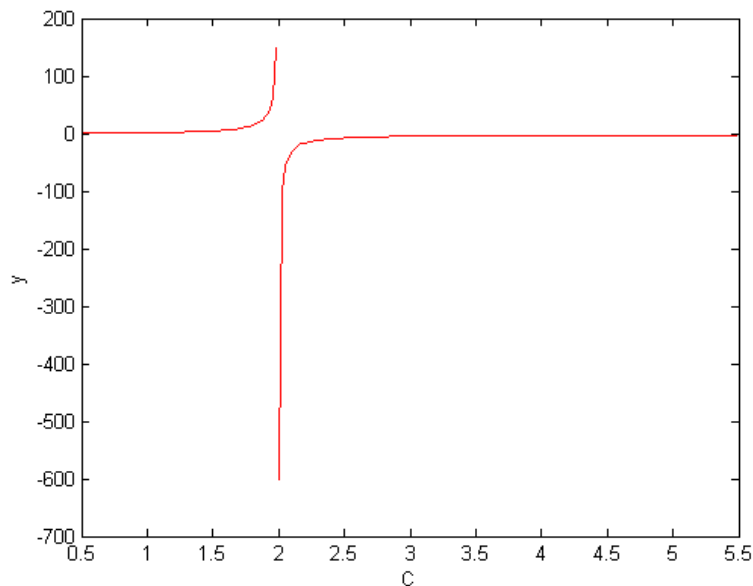


Fig. 2.16: Diagrama de bifurcación del punto fijo positivo de la Fig.2.15.

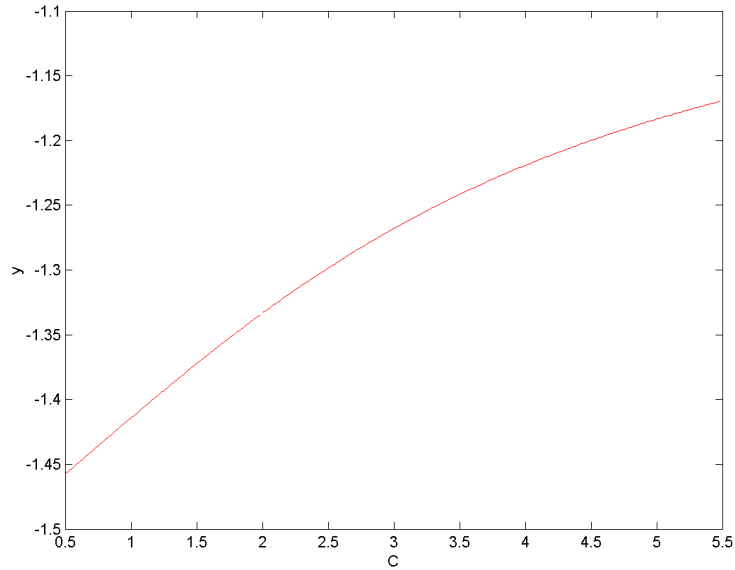


Fig. 2.17: Diagrama de bifurcación del punto fijo negativo de la Fig. 2.15.

Los diagramas de bifurcación mostrados en las Figs. 2.16 y 2.17 no coinciden con los descritos en la literatura para sistemas de una dimensión (Strogatz, 1994), por lo tanto las bifurcaciones encontradas para el Modelo 8 no pueden clasificarse como Punto Silla, Transcrítica o Pitchfork. La característica más destacable de las mismas es que el punto de equilibrio no cambia las propiedades de estabilidad para los diferentes valores de los parámetros. Desde el punto de vista biológico resulta razonable pensar que la constante k_3 no puede incrementarse indefinidamente. En resumen, una de las propiedades destacables del Modelo 8 es que presenta bifurcaciones, pero las mismas no tienen otra consecuencia más que la desaparición del punto fijo para valores crecientes de k_3 en el rango físicamente plausible de concentración del ligando transportado.

2.2.8. Modelo 9

Finalmente se considera, nuevamente, una doble interacción, pero donde una es positiva y la otra es negativa. La ecuación correspondiente es:

$$dx/dt = (k_2 + k_3)x_o - k_4(1 + k_{A4}x)x - k_1 \frac{x}{(1 + k_{I1}x)}, \quad (2.30)$$

que sin dimensiones resulta ser

$$dy/d\tau = C - D(1 + A_4y)y - \frac{y}{1 + I_1y}. \quad (2.31)$$

Para este modelo encontrar los estados estacionarios implica resolver una ecuación de tercer grado, por eso el estado estacionario de interés (para el rango positivo de y) es obtenido por métodos numéricos (ver Tabla (2.3)). Si se grafica $f_1(y) = C$ y $f_2(y) = C - D(1 + A_1y)y + \frac{y}{1+I_1y}$

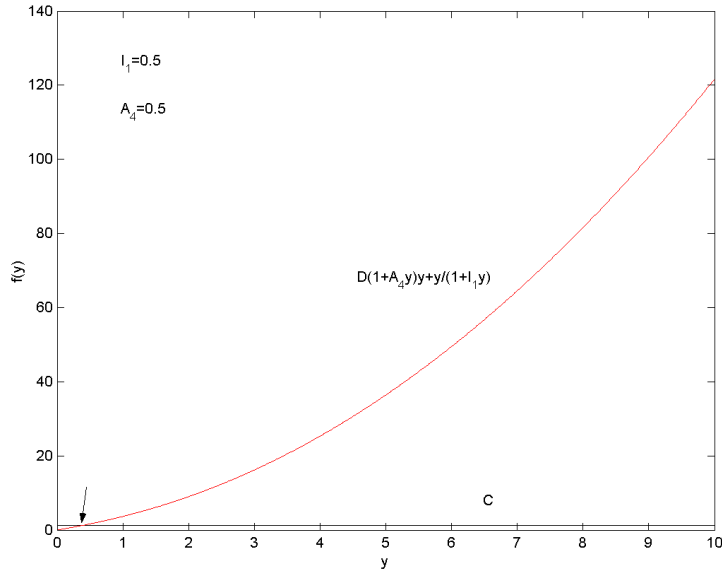


Fig. 2.18: Representación gráfica del Modelo 9 en estado estacionario.

nuevamente se observa que hay un único punto fijo para valores positivos de y , el cual es estable (Fig. 2.18). Como se desprende de la inspección de esta figura, el Modelo 9 no presenta bifurcaciones en el rango de interés de y .

2.3. Tiempos de relajación

La Tabla (2.3) muestra los correspondientes estados estacionarios para los Modelos 3 al 9. Se nota que para el modelo 9 el valor del estado estacionario se obtuvo mediante métodos numéricos utilizando la función fzero de MATLAB. Del análisis realizado previamente

Modelo	Estados Estacionarios
3	$\hat{y} = \frac{(I \cdot C - 1) + \sqrt{(IC - 1)^2 + 4I(C + D)}}{2I}$
4	$\hat{y} = \frac{C - \sqrt{C^2 + 4D}}{-2}$
5	$\hat{y} = \frac{(IC - D - 1) + \sqrt{(IC - D - 1)^2 + 4IC}}{2I}$
6	$\hat{y} = C$
7	$\hat{y} = \frac{C - \sqrt{C^2 + 4D}}{-2}$
8	$\hat{y} = \frac{-(C(I_1 + I_4) - (D + 1)) - \sqrt{(C(I_1 + I_4) - (D + 1))^2 - 4(CI_1 I_4 - (DI_4 + I_1)C)}}{2(CI_1 I_4 - (DI_4 + I_1))}$
9	$3,87568 * 10^{-1}$

Tabla 2.3: Estados estacionarios de los Modelos 3 a 9

concluimos que los sistemas que muestra la Tabla 2.3 son asintóticamente estables para el rango plausible de valores de x . No obstante, es interesante conocer como se comportan

los distintos modelos frente a perturbaciones del estado estacionario. En Fig. 2.19 se muestra la evolución dinámica de los modelos 3 a 9 frente a dos perturbaciones del estado estacionario. Para comparar entre los distintos modelos, en el eje de ordenadas los valores de y están normalizados respecto al correspondiente valor estacionario de cada modelo. En un caso se parte de un valor diez por ciento mayor que el valor del punto fijo, en el otro diez por ciento menor.

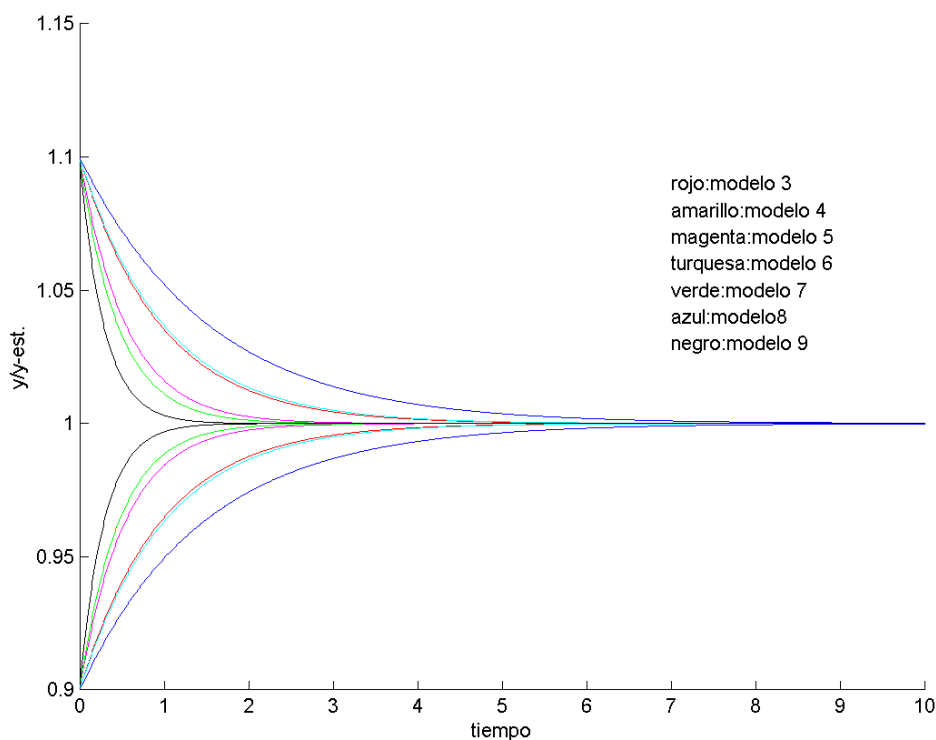


Fig. 2.19: Evolución temporal de los modelos 3 a 9 en respuesta a perturbaciones de su estado estacionario

En primer lugar hay que observar que en todos los casos los comportamientos de los sistemas son consistentes con lo concluido en las secciones anteriores, donde comprobamos que todos sus puntos de equilibrio son asintóticamente estables. El Modelo 9 es el que más rápidamente vuelve al valor estacionario, mientras que el Modelo 8 es el que presenta el tiempo de relajación mayor. Se pueden agrupar los diferentes modelos de acuerdo a los tiempos de relajación. El primer grupo está constituido por los modelos que poseen los tiempos menores, el Modelo 9 y el 7. Ambos modelos presentan dos interacciones sobre los mismos pasos, pero mientras que en el Modelo 7 ambas son positivas en el 9 una es negativa y otra positiva. El grupo siguiente está compuesto por modelos con tiempos intermedios de relajación, los Modelos 4 y 5, los que poseen una interacción sobre k_4 . El grupo siguiente posee tiempos más lentos y está constituido por los Modelos 3 y 6, los que también tienen una única interacción pero sobre k_3 . Finalmente, el Modelo 8 se caracteriza por poseer el tiempo más lento, presentando dos modulaciones negativas en los pasos mediados por k_3 y k_4 . Salvo para este último caso, podría concluirse que, para

la determinación de los tiempos de relajación son más importantes las posiciones donde ocurren las interacciones regulatorias que el tipo de las mismas. En todo caso, los Modelos 8 y 9 parecen representar los comportamientos extremos para un máximo de dos interacciones de diferente tipo para los sistemas propuestos, donde las modulaciones ocurren en los pasos mediados por k_1 y k_4 .

Los estudios realizados en esta sección y en las anteriores permiten concluir que todos los modelos propuestos son asintóticamente estables dentro del rango plausible de concentraciones y que, exceptuando el Modelo 8, no muestran la aparición de bifurcaciones dentro de dichos rangos. Con respecto a los tiempos de relajación, éstos se ubican entre dos límites, el menor representado por el Modelo 9 y el mayor por el Modelo 8. Hemos destacado aquí que ambos modelos presentan interacciones regulatorias sobre los mismos pasos. Esto puede interpretarse observando la estructura de los modelos propuestos (Fig. 2.4). Cuando se afecta a las constantes k_1 y k_4 los términos correspondientes incluyen x , lo que hace más complejas a las ecuaciones. En suma, exceptuando el Modelo 8, los modelos estudiados aquí no presentan propiedades dinámicas complejas. De todas formas, como se mencionara el hallazgo de bifurcaciones para el caso del Modelo 8 no posee mayor efecto sobre las propiedades dinámicas generales de dicho sistema. Conductas dinámicas más ricas podrían obtenerse sustituyendo las constantes de inhibición y activación empleadas aquí por expresiones que consideren interacciones alostéricas explícitas y características estructurales detalladas de los procesos de transporte considerados.

2.4. Conclusiones

Según se mencionara en los modelos estudiados la presencia de mecanismos regulatorios del ligando transportado puede afectar los tiempos de relajación frente a perturbaciones de distinto tipo. Estas perturbaciones se pueden identificar con cambios en condiciones asociadas a determinados estados estacionarios. Una especulación posible, es que los distintos tiempos de respuesta podrían estar involucrados en fenómenos de señalización celular que operen a través de sistemas transporte. En estos mecanismos, en general, la evidencia tiende a mostrar que están involucrados procesos de retroalimentación (positiva o negativa) y o de switch. En diferentes áreas de la Biología se han propuestos modelos que describen comportamientos donde se introduce los mecanismos antes mencionados. Dos de los modelos que se pueden citar son los propuestos por Heinrich (1996) y Lewis (1979), ambos tienen en común ser descritos por una única ecuación diferencial. El modelo de Heinrich y Schuster (1996) describe un sistema metabólico con vías ramificadas, donde una vía u otra se activan alternativamente y son reguladas por un feedback positivo. Este sistema desde el punto de vista dinámico presenta múltiples estados estacionarios, donde al cambiar los valores de los parámetros el número y la conducta de estos estados se modifican. El modelo morfogenético de Lewis (Lewis y otros, 1977) también es un ejemplo de switch bioquímico, en esta caso la expresión de un gen es activado por la presencia de una determinada sustancia, y donde también presenta un feedback positivo (citado). Otro modelo de interés es el propuesto por Ludwig (1978), para el estudio de las relaciones entre bosques y poblaciones de insectos. Al igual que los anteriores está compuesto por una única ecuación diferencial, pero que no presenta mecanismos de retroalimentación o de

switch. Sin embargo, es capaz de generar comportamientos dinámicos complejos (Ludwig y otros, 1978).

No resulta inverosímil plantear modelos similares a los antes mencionados, aplicados a sistemas de transporte como los propuestos en este capítulo. En donde el flujo pasivo y activo pueden ser regulado por múltiples caminos en forma simultánea o alternativa, considerando además los tiempos de respuesta en alcanzar el o los estados estacionarios. No obstante, estos modelos deberían considerar aspectos analizados aquí con respecto a los Modelos 3 al 9. Pero necesariamente deben presentar en sus ecuaciones términos que reflejen relaciones más complejas entre los componentes del sistema que los modelos vistos aquí.

Capítulo 3

Modelos no continuos y de 2 dimensiones

Como se comentó en el capítulo anterior, los modelos continuos de una dimensión presentan un número limitado de comportamientos, a esto se suma que las ecuaciones presentadas buscan tener un mínimo de constantes y de detalles mecanísticos. En este capítulo se tratan sistemas que son conformados por una o dos ecuaciones diferenciales. En el primer caso que se va a abordar, al contrario de los modelos ya vistos, para el sistema de una dimensión uno de los parámetros opera en forma discreta, semejante a los modelos de Hodgkin y Huxley (1952) con variaciones discretas en la conductancia. En el caso de los sistemas con dos ecuaciones diferenciales a tratar aquí, éstos son continuos, como en el caso de los del primer capítulo. En este capítulo y el siguiente se desarrollan estudios contenidos en un trabajo recientemente publicado por nosotros (Perdomo y Hernández, 2009) el cual se adjunta. Aquí desarrollamos algunos aspectos analíticos y en el próximo capítulo simulaciones numéricas de los modelos considerados. Éstos se proponen con el objetivo de describir oscilaciones eléctricas en membranas no excitables. En particular, estos modelos se aplican para describir algunos aspectos esenciales del transporte de protones en mitocondria. Todos los modelos consideran, por un lado, el bombeo de protones por intermediarios de la cadena respiratoria y por el otro el flujo entrante pasivo del ión. Sobre la base de alguna evidencia experimental obtenida por diversos autores (Hattori y otros, 2005; Vergun y otros, 2003; Vergun y Reynolds, 2004; Cortassa y otros, 2004), todos los modelos asumen que la conductancia protónica de la membrana interna mitocondrial es modulable por el pH de la matriz. De esta forma, veremos que el comportamiento oscilatorio no ocurre por la presencia de canales voltaje dependientes, sino por el efecto directo de la modulación en la cinética del canal debida al protón transportado. En los tres modelos analizados en el referido trabajo y discutidos aquí, se considera entonces que el transporte del ión es regulable por él mismo, es decir que el ión que atraviesa la membrana a su vez modula su conductancia. Esto ha sido observado en diversos canales de protones, algunos de los cuales, pese a ser voltaje dependientes, también admiten modulación por los propios protones (DeCoursey, 2003). Tal tipo de regulación por el ligando transportado también ha sido observado en diversos canales de calcio (Lee y Catterall, 2005). De interés para nuestro trabajo es enfatizar que, a partir de su evidencia experimental, Hattori y otros (2005) propusieron que el flujo de protones a través de la membrana interna mitocondrial es regulado por el pH de la matriz.

La Fig. 3.1 muestra esquemáticamente los aspectos esenciales de los procesos de transporte considerados para elaborar los tres modelos (Modelo I, II y III). Al igual que en el capítulo 2, la concentración extracelular (x_0) es un parámetro en los tres modelos. El Modelo I está conformado por una única ecuación, ya que el ingreso del catión al interior ocurre en un único paso. En los Modelos II y III esto ocurre en dos etapas. La primera de estas etapas la constituye el movimiento del ión desde el exterior hacia un compartimento intermedio a nivel de la membrana. Este compartimento podría corresponder a un vestíbulo del canal protónico considerado (Adley y Stanfield, 1996). En este caso, la concentración en el vestíbulo (x) es una de las dos variables dependientes en los Modelos II y III. Para estos modelos, la segunda etapa del transporte pasivo del ión hacia el interior está constituida por el flujo desde el vestíbulo hacia el interior celular (Fig. 3.1B), siendo la concentración del ión en éste último compartimento (y) la otra variable dependiente.

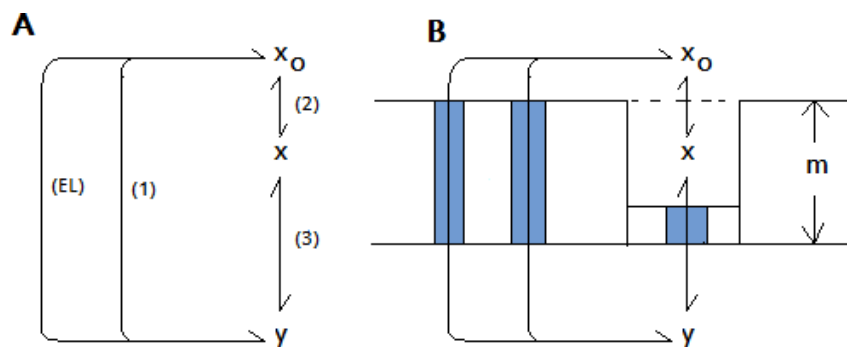


Fig. 3.1: Procesos de transporte del ión considerados en los modelos I II y III.

El transporte del ión se completa por el bombeo del mismo desde el compartimento interno al exterior. Ello ocurre a través de dos procesos de transporte activo (Fig. 3.1). El proceso mediado por el sistema 1 es electroneutro y asumimos que, en condiciones fisiológicas, ocurre en forma irreversible. El otro proceso de transporte activo del protón (EL) es electrogénico y ocurre reversiblemente.

3.1. Incorporación del potencial de membrana

El potencial de membrana (V_m) es la otra variable dependiente de interés, aunque no se encuentra integrada en las ecuaciones en ninguno de los tres modelos. Su comportamiento es obtenido a partir de los resultados de la integración numérica de los respectivos modelos. Asumimos aquí que los sistemas de transporte 1, 2 y 3 (Fig. 3.1) son independientes del potencial de membrana y que sólo el proceso EL es electrogénico. El flujo del ión mediado por EL es

$$J_{ion} = \mu x_0 - \eta y, \quad (3.1)$$

donde los parámetros cinéticos son afectados por la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, definiendo V_m como la diferencia entre el potencial eléctrico en el exterior (V_o) menos el potencial en el interior (V_i). Asumimos que las expresiones para μ y η son:

$$\mu = \mu_0 \exp(FV_m/2RT), \quad (3.2)$$

$$\eta = \eta_0 \exp(-FV_m/2RT), \quad (3.3)$$

donde μ_o y η_o son independientes de V_m , y F es la constante de Faraday, R la constante universal de los gases y T la temperatura en grados Kelvin (310 K). El potencial de membrana es calculado después de cada paso de integración de los tres modelos empleando la ecuación (Hernández y otros, 1989)

$$V_m = (RT/F) \ln(\eta_0 y / \mu_0 x_o) \quad (3.4)$$

En general, la variación de y respecto al tiempo se puede expresar como:

$$\frac{dy}{dt} = f + \phi(\mu x_o - \eta x_o). \quad (3.5)$$

En la Ec.(3.5) f depende de cuál sea el modelo, siendo ϕ un parámetro. La condición de electroneutralidad implica que se puede considerar que el término $\mu x_o - \eta x_o$ es nulo. Con respecto a la Ec.(3.3), consideramos aquí que η_0 es función de la concentración de un metabolito energético M , para el caso de la mitocondria podría tratarse del malato o el succinato (Hattori y otros, 2005). Asumimos que esta dependencia respecto al metabolito es lineal y sigue la siguiente expresión:

$$\eta_0 = \eta_0 + n_1 M, \quad (3.6)$$

donde n_0 y n_1 son parámetros.

3.2. Modelo no continuo de una dimensión (Modelo I)

El Modelo I no es continuo como los mostrados en el capítulo anterior, ya que uno de sus parámetros puede tomar dos valores de acuerdo a la concentración de protones en el interior celular. Como ya se comentó, el modelo es construido en base al descubrimiento de oscilaciones en el potencial de membrana de mitocondria y al mecanismo propuesto por Hattori y colaboradores (2005, de aquí en adelante llamado HWU). Estos autores proponen que la entrada de protones a la matriz se debe a la apertura de canales como consecuencia del aumento del pH en la matriz mitocondrial, el que a su vez ocurre por el transporte activo de hidrogeniones en presencia del metabolito energético (esto es, M).

La dinámica del Modelo I esta descrita por la siguiente ecuación

$$dy/dt = \alpha - \delta y, \quad (3.7)$$

donde α y δ son parámetros que representan la entrada y salida del protón, respectivamente, e y la concentración interna de protones. Esta no es una ecuación diferencial común, ya que estos parámetros a su vez muestran dependencia de una concentración umbral y_u y de la concentración del metabolito energético (M). Este vínculo entre la concentración interna del ión, M , α y δ se incorpora para dar cuenta de los resultados experimentales de HWU. Para ello, introducimos las siguientes relaciones:

$$\alpha = (\alpha_0 + \alpha_1)x_o, \quad (3.8)$$

$$\delta = \delta_0 + \delta_1 M \quad (3.9)$$

Asumimos que si $y < y_u$ entonces $\alpha_1 = \alpha_1^0$, en cambio si $y \geq y_u$ entonces $\alpha_1 = 0$. Todos los miembros a la derecha de la igualdad de las Eqs.(3.8) y (3.9) son parámetros. La conductancia del canal protónico (α) depende entonces de dos componentes, uno independiente de la concentración interna de protones (α_0) y otro que sí es dependiente de la misma y deja de ser nulo cuando dicha concentración cae por debajo de cierto valor umbral (y_u). En forma análoga, la tasa de bombeo (δ) tiene dos componentes, de los cuales uno (δ_1) depende de la concentración de M . La dinámica del modelo es la siguiente. La evolución temporal de y está dada por la Ec.(3.7). Si $M \neq 0$, y tiende a disminuir y a alcanzar el valor umbral (y_u). Cuando está por debajo de este valor, α_1^0 se hace positivo y aumenta la conductancia del canal. Ésta, a su vez, aumenta la concentración de protones en el interior, volviendo a repetirse el ciclo.

Realizando lo siguientes cambios de variables

$$\begin{aligned} m &= \frac{y}{x_o} \\ \kappa &= \frac{\alpha}{\delta x_o}, \end{aligned} \quad (3.10)$$

se obtiene una variante adimensional de la Ec.(3.7)

$$\frac{dm}{d\tau} = \kappa - m. \quad (3.11)$$

En la Fig. 3.2 se observa el comportamiento dinámico del Modelo I para los valores numéricos mostrados en la Tabla (4.1). Muchos de los valores numéricos empleados en éste y en los siguientes cálculos se encuentran basados en evidencia experimental, otros se utilizaron sobre la base de obtener resultados plausibles. Para una discusión de estos aspectos, consultar Perdomo y Hernández (2009).

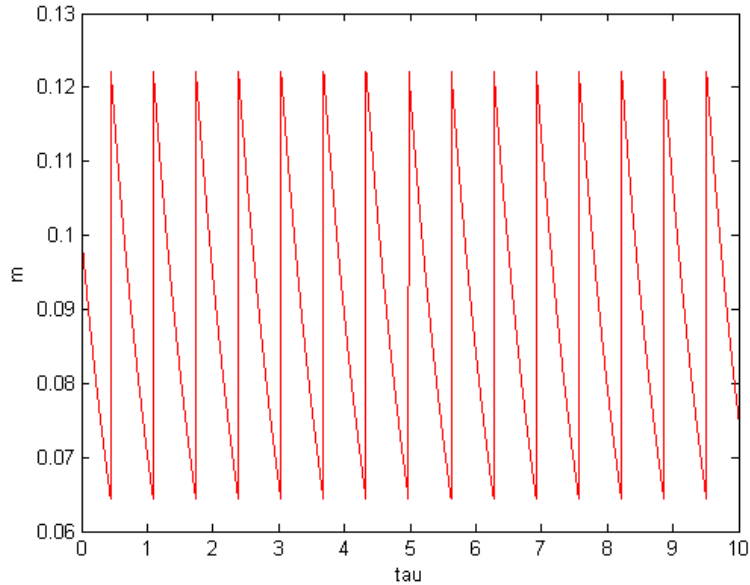


Fig. 3.2: Curso temporal de m (Ec.3.11)

Puede observarse en la Fig. 3.2 que el Modelo I es capaz de generar oscilaciones sostenidas mediante el mecanismo antes comentado.

3.3. Modelos de 2 dimensiones

En esta sección se tratan los aspectos analíticos de dos modelos mínimos de dos ecuaciones diferenciales no lineales cada uno (Modelos II y III), los que se evaluaron para representar oscilaciones en el potencial de membrana de células no excitables (Perdomo y Hernández, 2009). El Modelo II es una versión continua de la propuesta mecánica de HWU, expresada en un formato de sistema de dos ecuaciones diferenciales. El Modelo II es una versión continua del Modelo I pero, al contrario que en éste, en este caso los parámetros son constantes. El Modelo III resulta ser formalmente similar al clásico Modelo Mínimo de Higgins (Higgins, 1964), desarrollado para describir oscilaciones en sistemas bioquímicos. Al igual que en la sección anterior, se estudian los aspectos dinámicos de ambos modelos. En ambos casos, el potencial de membrana también se simula por fuera de los sistemas de ecuaciones diferenciales utilizando la expresión (3.4). Los fundamentos cinéticos de los términos empleados en los Modelos II y III se obtienen del análisis de los diagramas mostrados en las Figs. 3.2, 3.3 y 3.4 (ver Apéndice), los que representan modelos mínimos de los procesos de transporte activo y pasivo del protón.

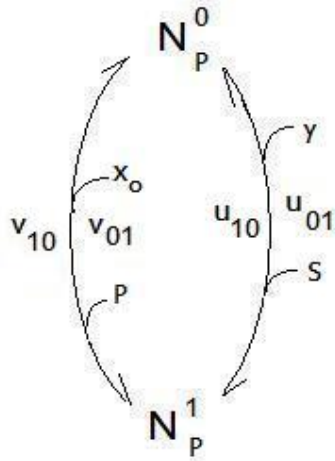


Fig. 3.3: Esquema cinético del transporte activo no electrogénico del ión.

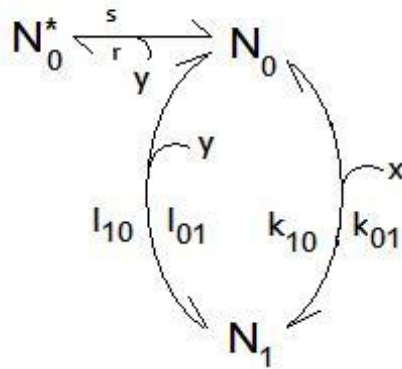


Fig. 3.4: Esquema cinético de un canal iónico inactivado por el ión transportado.

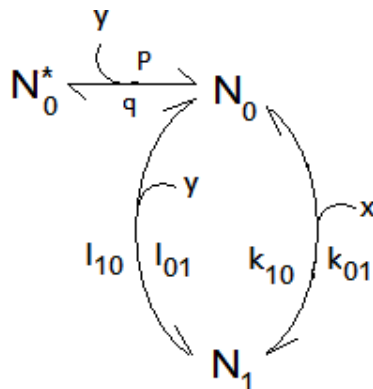


Fig. 3.5: Esquema cinético de un canal iónico activado por el ión transportado.

Al igual que en el capítulo 2 se trabaja aquí con los modelos adimensionales. En la Tabla 3.1 se muestran las unidades de los parámetros y variables del sistema.

Parámetros y variables	Unidades
x_o	$mol.cm^{-3}$
x	$mol.cm^{-3}$
y	$mol.cm^{-3}$
α	$mol.cm^{-3}s^{-1}$
β	$mol.cm^{-3}s^{-1}$
δ	s^{-1}
γ	$mol^{-1}cm^3$
d	$mol^{-1}cm^3s^{-1}$
M	$mol.cm^{-3}$

Tabla 3.1

3.3.1. Modelo II

En el Modelo II se asume que el sistema de transporte 1 presenta cinética de saturación (Fig. 3.3). Asimismo, se asume que el ión (y) afecta en forma negativa al sistema de transporte 3 (Fig. 3.4). Los efectos sobre el paso difusional en este caso ocurren de forma continua, lo que constituye una diferencia esencial con el Modelo I. En aquel un descenso en la concentración de protones (o sea, un aumento de la alcalinización) determina que el canal se abra, de forma de que opera como un canal tipo “todo o nada”. Esto no es lo que ocurre para el caso del Modelo II, en el cual el efecto se introduce mediante la inactivación del canal por y . El Modelo II está expresado por el siguiente sistema de ecuaciones

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \alpha - [\beta x / (1 + \varphi y)] \\ \frac{dy}{dt} &= [\beta x / (1 + \varphi y)] - [\delta y / (1 + \gamma y)],\end{aligned}\tag{3.12}$$

donde α , β , δ y φ son parámetros cinéticos. En las dos ecuaciones se observa como y afecta a ambos mecanismos de transporte con diferentes constantes cinéticas. Es posible eliminar las dimensiones del sistema anterior definiendo

$$\begin{aligned}r &= \delta / (\alpha \gamma), \\ k &= (\beta \delta / \alpha \gamma) / (\delta - \alpha \gamma + \alpha \varphi),\end{aligned}\tag{3.13}$$

y realizando los siguientes cambios de variable:

$$\begin{aligned}m &= x \gamma, \\ n &= y \gamma, \\ \tau &= \alpha \gamma t.\end{aligned}\tag{3.14}$$

De esta forma, las Ecs.(3.12) se transforman en

$$\begin{aligned}\frac{dm}{d\tau} &= 1 - \frac{km}{(1+n)} \\ \frac{dn}{d\tau} &= \frac{km}{(1+n)} - \frac{rn}{(1+n)}.\end{aligned}\quad (3.15)$$

Este sistema presenta un único estado estacionario

$$\begin{aligned}\hat{m} &= \frac{r}{k(r-1)} \\ \hat{n} &= \frac{1}{r-1}\end{aligned}\quad (3.16)$$

donde las concentraciones sólo pueden tomar valores positivos. Esta restricción implica que deben ser $k > 0$ y $r > 1$. El jacobiano correspondiente al sistema (3.15) es

$$\begin{pmatrix} \frac{-k}{(1+n)} & \frac{km}{(1+n)^2} \\ \frac{k}{(1+n)} & \frac{-(km+r)}{(1+n)^2} \end{pmatrix}_{\left(\frac{r}{k(r-1)}, \frac{1}{r-1}\right)} \quad (3.17)$$

que evaluado en el punto fijo resulta

$$\begin{pmatrix} \frac{-k(r-1)}{r} & \frac{r-1}{r} \\ \frac{k(r-1)}{r} & -(r-1) \end{pmatrix}. \quad (3.18)$$

La traza y el determinante de esta matriz son, respectivamente,

$$tr = \frac{-(r-1)}{r}(k+1), \quad (3.19)$$

$$\Delta = \frac{(r-1)^3}{r^2}k. \quad (3.20)$$

A partir de las dos últimas expresiones se hallan los valores propios del sistema. La ecuación característica correspondiente es:

$$\lambda^2 - tr\lambda + \Delta = 0. \quad (3.21)$$

Aplicando la restricción mencionada arriba se concluye que la traza siempre es negativa. Por lo tanto, la parte real de los valores propios es negativa, pues éstos se obtienen a partir de la siguiente ecuación

$$\lambda_{1,2} = \frac{\left(\frac{-(r-1)}{r}(k+1)\right) \pm \sqrt{\left(\frac{-(r-1)}{r}(k+1)\right)^2 - 4\frac{(r-1)^3}{r^2}k}}{2}. \quad (3.22)$$

En virtud de lo anterior, el Modelo II es incapaz de generar oscilaciones. Frente a cualquier perturbación del estado estacionario la conducta del sistema es la de volver asintóticamente al mismo, como lo muestran los gráficos de las Figs. 3.6 y 3.7 para diferentes valores

de los parámetros. En estos gráficos los círculos azules representan los valores iniciales y los cuadrados azules los valores finales de la simulación.

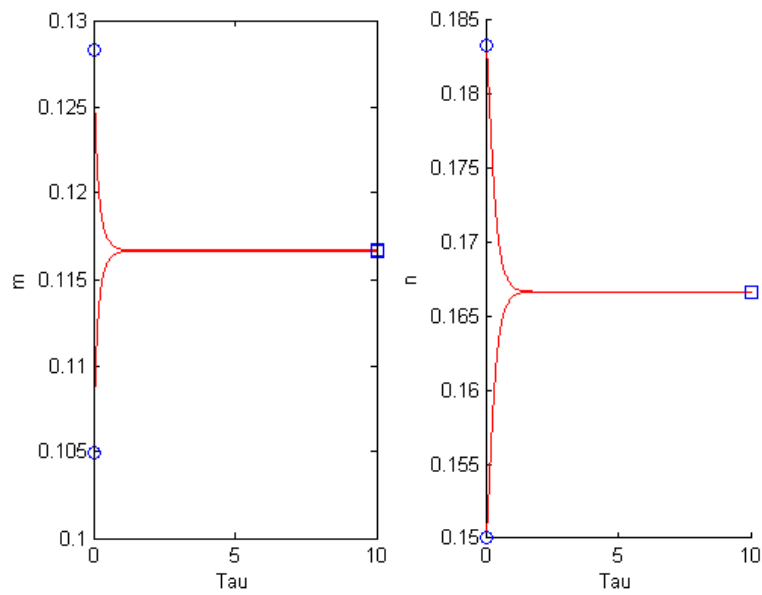


Fig. 3.6: Curso temporal del Modelo II. Los gráficos se obtuvieron por integración numérica de la Ec.(3.15) ($k=10$, $r=7$).

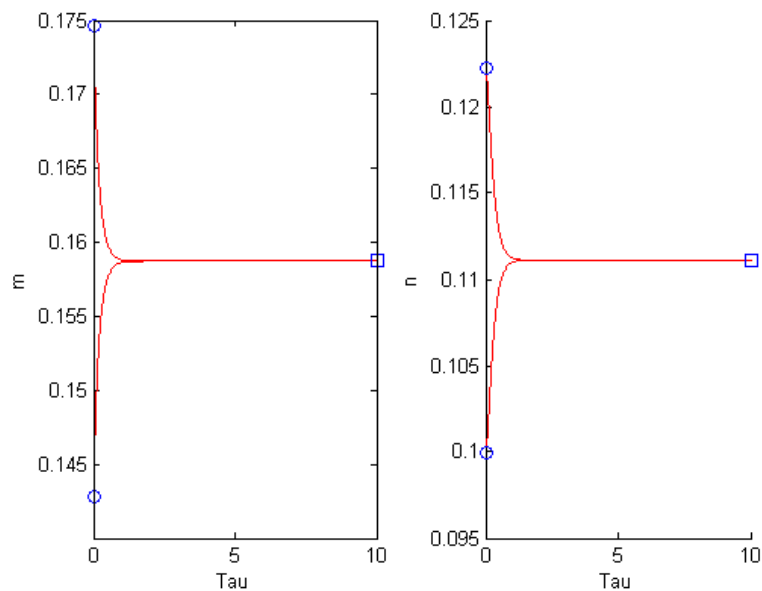


Fig. 3.7: Curso temporal del Modelo II. Los gráficos se obtuvieron por integración numérica de la Ec.(3.15) ($k=7$, $r=10$).

En todos los casos, los gráficos de las Figs. 3.6 y 3.7 se obtuvieron perturbando al sistema desde valores superiores e inferiores al estado estacionario, siendo los valores iniciales de las

simulaciones de 10 por ciento por encima y por debajo del valor estacionario. Como puede observarse, los comportamientos en todos los casos son similares. La Fig. 3.8 muestra el diagrama de fases correspondiente.

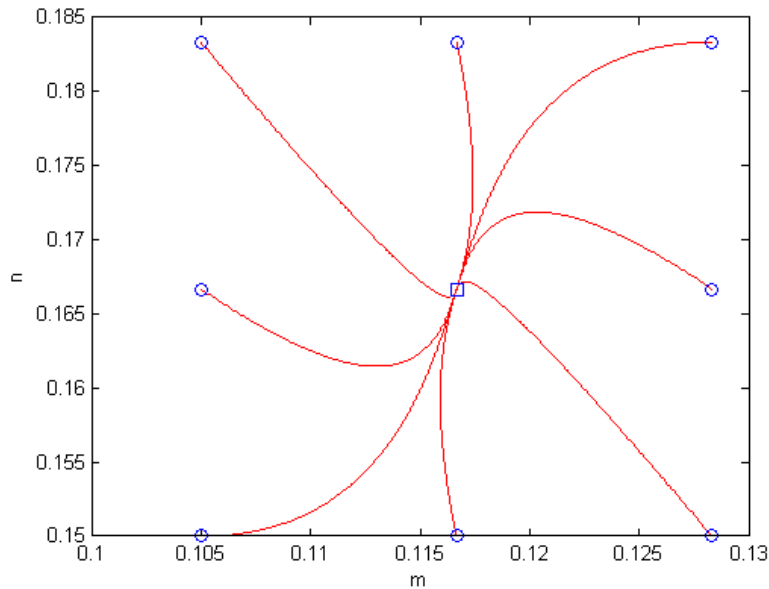


Fig. 3.8: Diagrama de fases del sistema (3.15).

La inspección de la Fig. 3.8 permite comprobar que el estado estacionario es un nodo estable para los valores empleados de los parámetros. El sistema tampoco presenta, para el rango positivo de las variables, ningún tipo de bifurcación (de Hopf, Punto Silla, Transcrítica o Pitckford). Para que ocurra una bifurcación de Hopf es necesario que la parte real de los valores propios cambie de signo para algún valor de los parámetros. Teniendo en cuenta las restricciones de éstos ($k > 0$ y $r > 1$) y las expresiones (3.19) y (3.20), ésto nunca ocurre. Para que ocurra alguno de los otros tipos de bifurcaciones debería cumplirse que $\Delta = 0$ o, por lo menos, que uno de los valores propios fuera nulo (Strogatz, 1994; Murray, 2002a). Esto tampoco ocurre para el sistema (3.15). Como complemento de lo anterior se presenta el gráfico correspondiente a las isoclinas iguales a 0 (Fig.3.9). Es posible observar que para el rango de concentraciones positivas el estado estacionario (punto de corte de las isoclinas) siempre existe y que en ningún momento cambia su estabilidad.

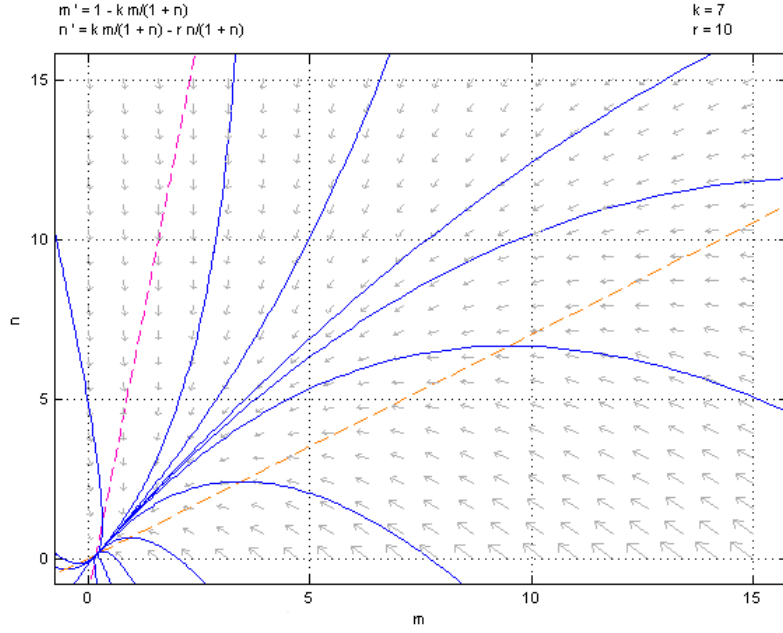


Fig. 3.9: Diagrama de isoclinas iguales a 0 del sistema (3.15)(Magenta: Ec.(3.15) para m , Amarillo: Ec(3.15) para n). Cálculos realizado con el script libre pplane7 para Matlab.

3.3.2. Modelo III

En el Modelo III, al igual que para el II, se considera un mecanismo de transporte pasivo en dos etapas, como muestra la Fig.(3.1). En forma análoga al Modelo II, el modelo matemático correspondiente presenta dos variables dependientes: x , concentración en el comportamiento intramembrana, e y , concentración interna del ión. Asimismo, el sistema de transporte 1 en este caso también exhibe saturación cinética, pero a diferencia del Modelo II, y ahora modula al sistema 3 por un feedback positivo (fig.3.5). La presencia de la especie x es un aspecto esencial de modelo y es lo que permite adaptar el Modelo Mínimo de Higgins (Higgins, 1964), formalmente similar Al Modelo III a una situación de la biofísica de membranas. Las ecuaciones correspondientes son:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= \alpha - \beta xy & (3.23) \\ \frac{dy}{dt} &= \beta xy - [\delta y / (1 + \gamma y)]. \end{aligned}$$

El estado estacionario de este sistema de ecuaciones es:

$$\begin{aligned} \hat{x} &= (\delta - \alpha \gamma) / \beta & (3.24) \\ \hat{y} &= \alpha / (\delta - \alpha \gamma). \end{aligned}$$

Los parámetros de la Ec.(3.24) dependen de la concentración externa de protones (x_o) y de la concentración del metabolito energético M, estas relaciones son expresadas mediante

las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
\alpha &= x_o & (3.25) \\
\beta &= b_0/x_o^2 + b_1M/x_o^2 \\
\gamma &= c_0/x_o + c_1M/x_o \\
\delta &= d_0/x_o + d_1M/x_o,
\end{aligned}$$

donde κ , b_0 , b_1 , c_0, c_1 , d_0 y d_1 son parámetros. El efecto de M sobre δ es similar al Modelo I (Ec.(3.9)), mientras que δ y γ dependen de x_o , lo cual es consistente con la Ec.(A3). A su vez, la dependencia de β con x_o recrea el efecto de la alcalinización sobre la conductancia del protón. Para las simulaciones numéricas (Cap. 4) se considerará que c_1 es despreciable y, por lo tanto, que M no influye en γ . Además, asumimos que β sí es dependiente de M , con lo que se logra un mejor ajuste a los resultados experimentales. Antes de proceder a eliminar las dimensiones de las ecuaciones (3.23) se definen las siguientes formas adimensionales:

$$\begin{aligned}
r &= \frac{\delta}{\alpha\gamma}, & (3.26) \\
k &= \frac{\beta}{\alpha\gamma^2},
\end{aligned}$$

que son constantes positivas. Con los siguientes cambios de variable

$$\begin{aligned}
m &= x\gamma, & (3.27) \\
n &= y\gamma, \\
\tau &= \alpha\gamma t,
\end{aligned}$$

donde t es el tiempo, las ecuaciones del sistema (3.23) se transforman en

$$\begin{aligned}
\frac{dm}{d\tau} &= 1 - kmn & (3.28) \\
\frac{dn}{d\tau} &= kmn - r \frac{n}{1+n}.
\end{aligned}$$

A continuación se procede a encontrar los estados estacionarios del sistema anterior. Igualando las ecuaciones a 0 y despejando, se obtiene

$$\begin{aligned}
\hat{m} &= \frac{r-1}{k} & (3.29) \\
\hat{n} &= \frac{1}{r-1},
\end{aligned}$$

lo que muestra que, al igual que el Modelo II, el Modelo III también posee un único punto fijo. Para analizar la estabilidad del estado estacionario se halla el jacobiano correspondiente, para el cual la expresión general es

$$\begin{pmatrix} -kn & -km \\ kn & km - \frac{r}{(1+n)^2} \end{pmatrix}_{\left(\frac{r-1}{k}, \frac{1}{r-1}\right)} \quad (3.30)$$

Evaluada en el punto fijo dicha expresión resulta ser

$$\begin{pmatrix} \frac{-k}{(r-1)} & 1-r \\ \frac{k}{(r-1)} & \frac{r-1}{r} \end{pmatrix} \quad (3.31)$$

La traza de esta matriz es igual a

$$tr = \frac{-kr + (r-1)^2}{r(r-1)}, \quad (3.32)$$

y su determinante es

$$\Delta = \frac{k}{r}(r-1). \quad (3.33)$$

La solución de la ecuación característica (3.21) para el Modelo III es:

$$\lambda_{1,2} = \frac{\left(\frac{-kr+(r-1)^2}{r(r-1)}\right) \pm \sqrt{\left(\frac{-kr+(r-1)^2}{r(r-1)}\right)^2 - 4\frac{k}{r}(r-1)}}{2}. \quad (3.34)$$

A las ecuaciones (3.32) y (3.33) se les aplica las mismas restricciones que para el Modelo II, esto es $r > 1$ y $k > 0$. Esto lleva a que Δ siempre sea positivo. No ocurre así con la traza, la cual puede ser negativa si se cumple que $|rk| > |(r-1)^2|$. De manera que el punto estacionario, dependiendo de si la traza es positiva o negativa, puede ser estable o inestable. Es decir, el valor que toma la traza determina la estabilidad del Modelo III, el cambio de estabilidad ocurre para un valor crítico de la misma y es un punto de bifurcación.

Para hallar ese valor crítico se iguala a 0 la traza (Ec.(3.32)):

$$\frac{-kr + (r-1)^2}{r(r-1)} = 0, \quad (3.35)$$

Despejando k se llega a que

$$k_c = \frac{(r-1)^2}{r}. \quad (3.36)$$

Para el caso que $r \gg 1$, se cumple

$$k_c \simeq r. \quad (3.37)$$

Lo que muestran las expresiones anteriores es que si $k > r$ el estado estacionario es estable, si $k < r$ es inestable. Esto puede ser observado en los siguientes gráficos para valores arbitrarios de k y r . En la Fig. 3.10 se observa el comportamiento de m y n en función del tiempo, mientras que en la Fig. 3.11 el de n en función de m .

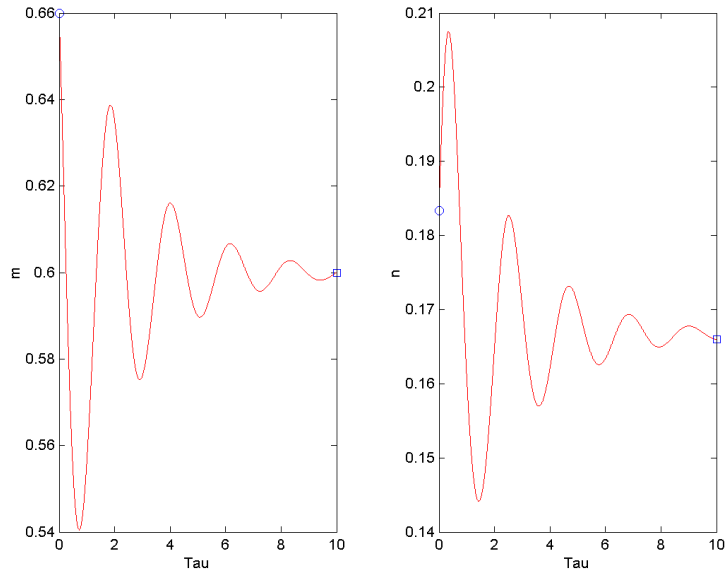


Fig. 3.10: Variación temporal de m y n para $k=10$ y $r=7$ Ec.(3.28).

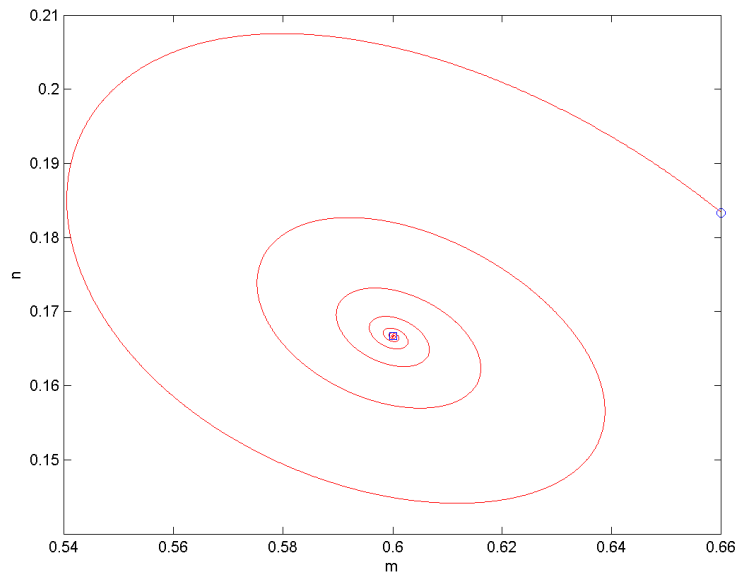


Fig. 3.11: Diagrama de fases de Ec.(3.28) para $k=10$ y $r=7$.

En todos los casos, para las simulaciones los valores iniciales correspondieron a una perturbación de diez por ciento con respecto a los estados estacionarios. Los círculos en los gráficos representan el valor inicial en la simulación, mientras que los cuadrados los últimos valores de las misma. Como se desprende de la Fig. 3.11, el punto fijo es un foco estable para $k > r$. Cuando se intercambian los valores de k y r , los resultados obtenidos son los mostrados en las Figs. 3.12 y 3.13.

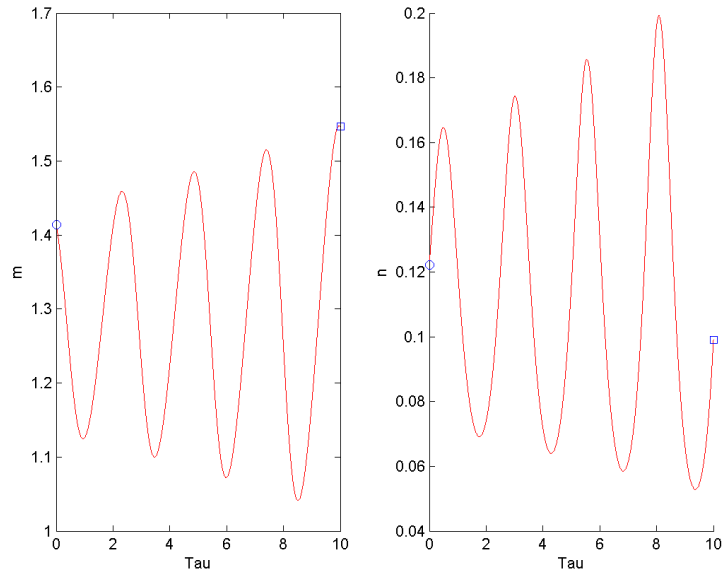


Fig. 3.12: Variación temporal de m y n para $k=7$ y $r=10$ Ec.(3.28).

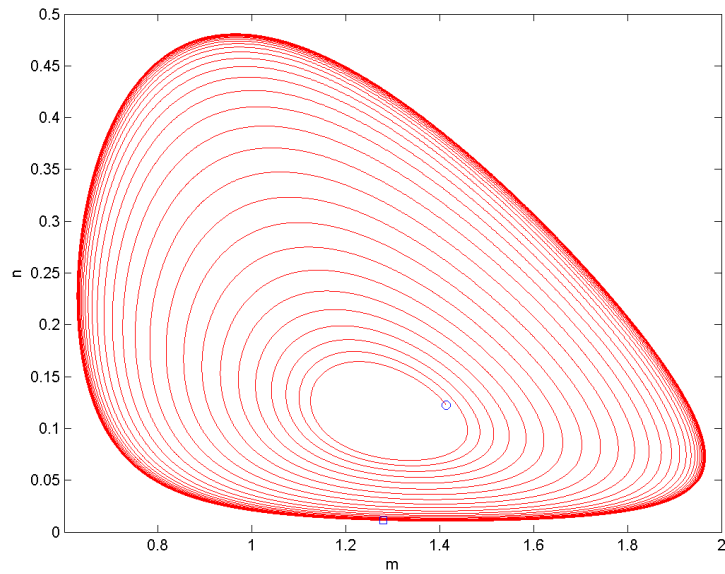


Fig. 3.13: Diagrama de fases de Ec.(3.28) para $k=7$ y $r=10$.

Los resultados mostrados en las Fig. 3.12 y 3.13 coinciden con el estudio analítico previo, permitiendo concluir que el punto estacionario es un foco inestable, donde las oscilaciones se hacen cada vez mayores. En la Fig. 3.13 se pone de manifiesto la presencia de un ciclo límite. Una observación con respecto a las figuras es que en los diagramas de fase el intervalo de tiempo fue de 100 unidades, mientras que los gráficos en función del tiempo

el intervalo fue sólo de 10.

Queda explorar la conducta del sistema cuando la relación entre k y r está dada por la Ec.(3.36). Para los estudios correspondientes (Figs. 3.14 y 3.15), el valor de r utilizado en la integración numérica fue de 10.

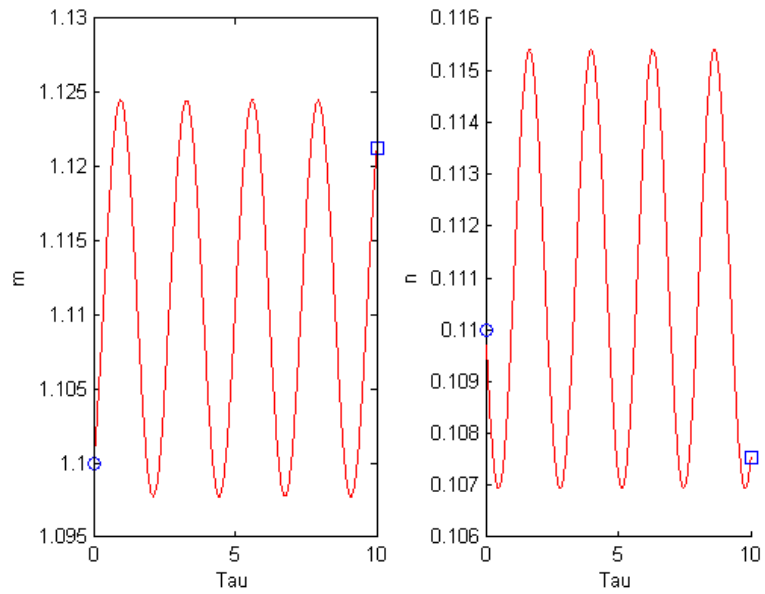


Fig. 3.14: Variación temporal de m y n para $r=10$ (Ec.(3.35)).

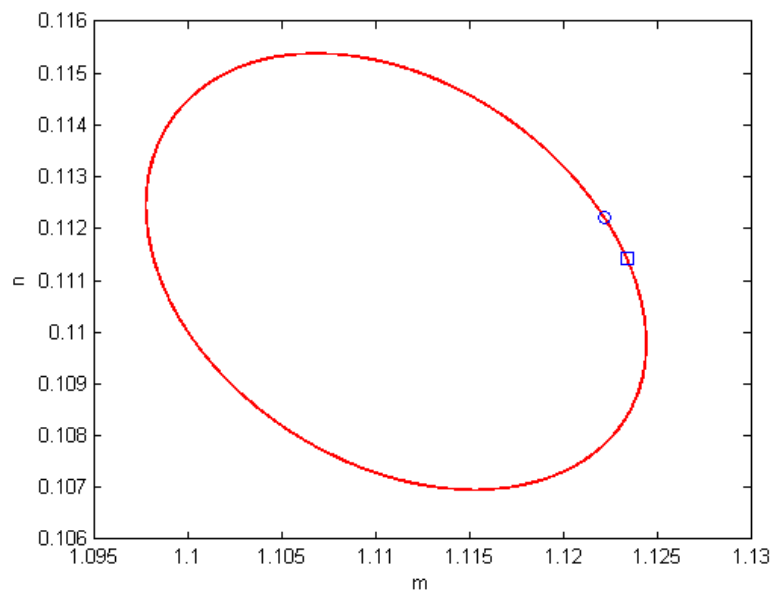


Fig. 3.15: Diagrama de fases de la Ec.(3.35) para $r=10$.

Como concluyéramos del análisis y como muestran las Figs. (3.14) y (3.15), cuando $k = k_c$ se producen oscilaciones sostenidas de las concentraciones, donde se obtiene una elipse para el correspondiente diagrama de fase. Esto coincide con el estudio analítico, que permite concluir que en este caso el punto fijo constituye un centro, ya que la traza vale 0 y las raíces de la ecuación característica son imaginarias puras. Una observación importante que debemos hacer, es que las perturbaciones para este caso con respecto al estado estacionario fueron ínfimas. Esto es debido a que los centros son infinitesimalmente estables o, lo que es lo mismo, neutralmente estables (Rubinow, 1975; Montero y Morán, 1992; Strogatz, 1994). El período correspondiente a las oscilaciones sostenidas es igual a

$$T = \pi/k^{1/2}. \quad (3.38)$$

Resta responder qué tipo de bifurcación es la que presenta el Modelo III, y si realmente existe un ciclo límite, como parece indicar la Fig. (3.13). En caso afirmativo, qué clase de ciclo límite es (inestable o estable). Si se perturba al sistema en mayor proporción (100 por ciento), es decir, para valores iniciales más alejados del estado estacionario inestable, se obtiene el gráfico mostrado en la Fig. (3.16)

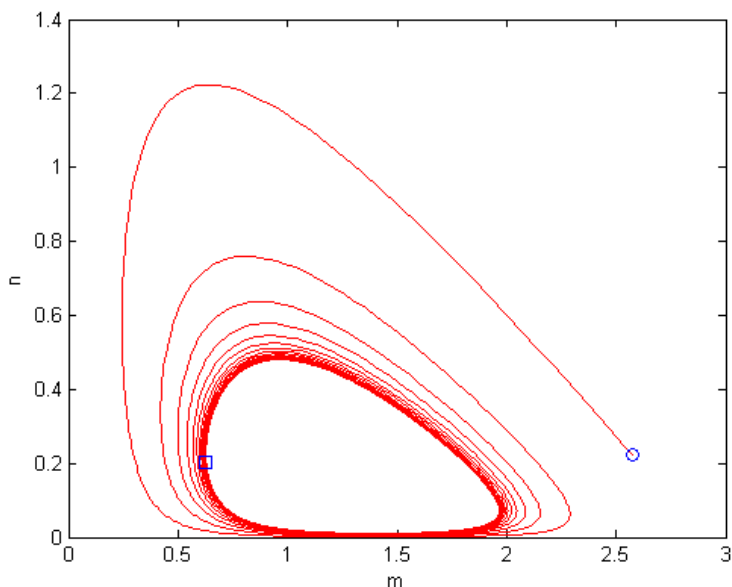


Fig. 3.16: Plano de fase para el estado estacionario. $r=10$, $k=7$.

Los resultados mostrados en esta figura parecen corroborar la existencia de un ciclo límite estable. Para confirmar que efectivamente se trata de un ciclo límite existen diferentes métodos, aquí se opta por aplicar métodos numéricos (el scrip de uso libre para Matlab pplane7). Primero se encuentran las isoclinas, que se obtienen igualando \dot{m} o \dot{n} a 0, las cuales indican el sentido dinámico horizontal o vertical de las variables (“flujo”).

$$n = \frac{1}{km} \quad (3.39)$$

$$n = \frac{r}{km} - 1. \quad (3.40)$$

El campo de flujos se muestra en Fig. (3.17).

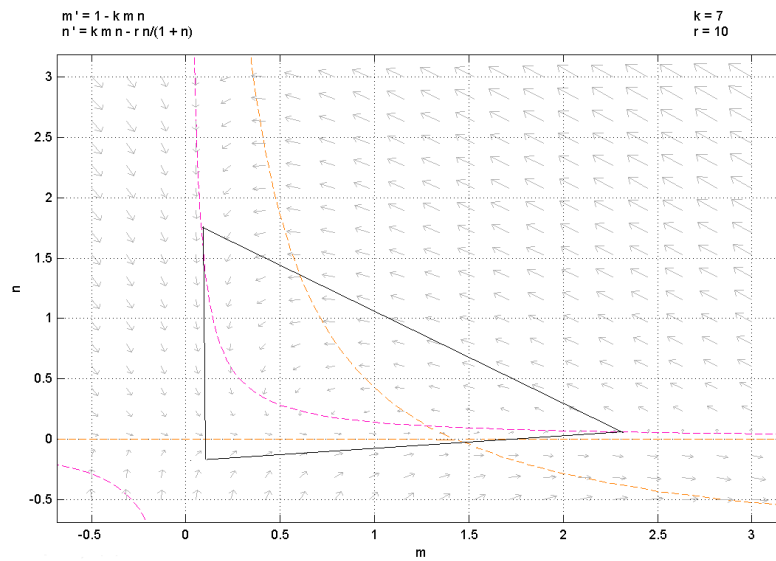


Fig. 3.17: Diagrama de isoclinas iguales a 0. (Magenta: Eq.3.39, amarillo Eq.3.40. En negro región entorno al punto fijo. Cálculos realizados con el scrip libre pplane7 para Matlab.)

En la Fig. (3.17) la curva de color magenta corresponde a la Ec.(3.39) y la de color naranja a la (3.40). El punto de corte entre ambas curvas es el punto fijo. Se puede observar que el flujo cambia alrededor de éste, de manera que se puede encontrar una región donde los flujos son entrantes a la misma. Ésto se puede ver más claramente dentro del recuadro de la figura Si se aplica el teorema de Poincaré-Bendixon, la región recuadrada presenta en su interior un punto fijo, pero éste es repulsor. Nos encontramos entonces en las condiciones del teorema mencionado, que nos permite por lo tanto concluir que existe un ciclo límite, el cual es estable. Si la aproximación es desde fuera del mismo se converge a él y lo mismo sucede si se parte del punto fijo o muy próximo de éste, cómo se grafica en la Fig. 3.18.

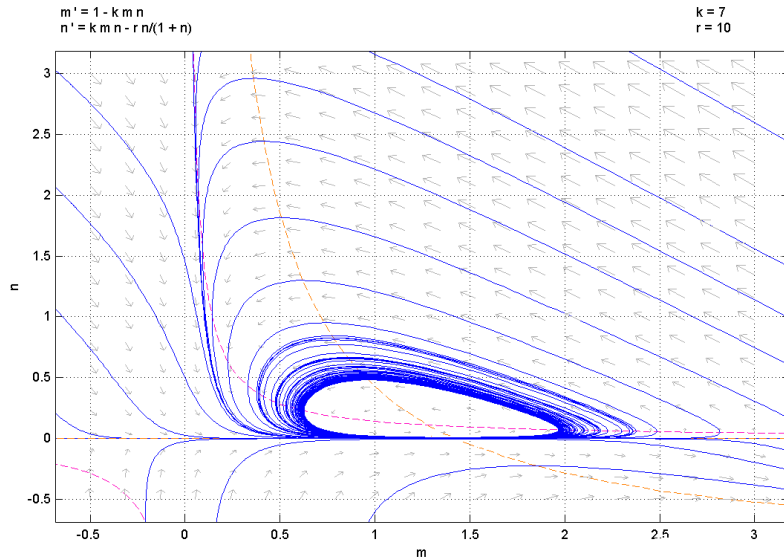


Fig. 3.18: Plano de fase y ciclo límite.

De lo anterior concluimos entonces que el tipo de bifurcación que se presenta cuando r es mayor que k_c , dado que el sistema pasa de un foco estable a uno inestable con la presencia de un ciclo límite estable, es una bifurcación de Hopf supracrítica. Su diagrama de estabilidad, obtenido a partir de la Ec.(3.36), se muestra en la Fig. (3.19).

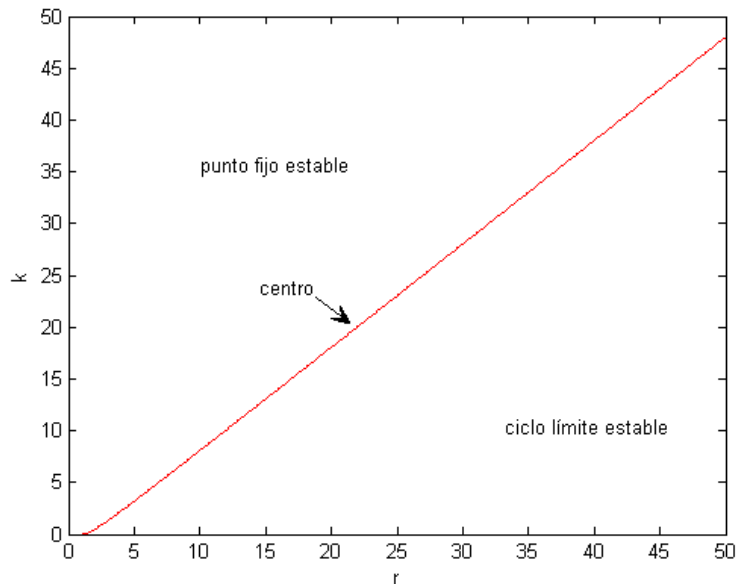


Fig. 3.19: Diagrama de estabilidad.

Debe destacarse que los valores de r y k utilizados para los estudios mostrados en esta sección no tienen necesariamente significado biológico, los mismos fueron utilizados con

el objetivo de ilustrar la dinámica de los modelos. En el siguiente capítulo se muestran estudios numéricos empleando valores biológicamente plausibles.

Según se desprende de los estudios realizados aquí, de los tres modelos únicamente el I y el III son capaces de generar oscilaciones sostenidas. Además, el Modelo III posee una mayor riqueza ya que tiene la capacidad de generar diferentes comportamientos dinámicos. Ambos modelos se empelan en el capítulo siguiente para realizar estudios numéricos.

3.4. Apéndice

Modelos cinéticos de los procesos de transporte

Suponemos aquí que, para el caso del sistema 1 (Fig.3.1), el transporte activo de y está acoplado a la reacción $S \leftrightarrow P$. Para dar cuenta de esto, para el caso de los Modelos II y III se propone un diagrama cinético simple de dos estados de la enzima (Fig.3.3). En este diagrama, N_P^0 y N_P^1 son estados intermedios de la enzima. Los mismos símbolos representan la densidad de cada uno de los correspondientes estados. La suma de ambas densidades es constante y se simboliza como N_P . El resto de los símbolos representan: μ_{01} , ν_{10} , μ_{10} , ν_{01} , constantes cinéticas; S , P , x_o e y , concentraciones de sustrato, producto, catión extracelular e intracelular, respectivamente. El flujo neto de transporte J_P en la dirección $y \rightarrow x_o$ es

$$J_P = (N_P/\Sigma_P)(\mu_{01}\nu_{10}Sy - \mu_{10}\nu_{01}Px_o), \quad (\text{A.1})$$

con $\Sigma_P = \mu_{10} + \nu_{10} + \mu_{01}Sy + \nu_{01}Px_o$. Como consideramos que el sistema 1 opera irreversiblemente, la expresión para el flujo se reduce a

$$J_P = (N_P/\Sigma_P)(\mu_{01}\nu_{10}Sy). \quad (\text{A.2})$$

Esta última ecuación se puede identificar con el término $[\delta y/(1 + \gamma y)]$ de los modelos II y III, siendo

$$\begin{aligned} \delta &= (N_P\mu_{01}\nu_{10}S)/(\mu_{10} + \nu_{10} + \nu_{01}Px_o) \\ \gamma &= (\nu_{01}S)/(\mu_{10} + \nu_{10} + \nu_{01}Px_o). \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

En los Modelos II y III el paso activo presenta entonces saturación, esto no ocurre para el caso del Modelo I. En algunas situaciones de estudio el sustrato S puede ser el metabolito M. Una contrapartida realística de estos sistemas es el ya mencionado de bombeo de hidrogeniones a través de la membrana interna mitocondrial, correspondiente a los sitios de bombeo de la cadena respiratoria (Nichols y Budd, 2000).

Los sistemas 2 y 3 son comunes a los modelos II y III y corresponden a la entrada del catión al espacio intracelular, como se comentó este pasaje ocurre en dos etapas (Fig.3.1). El sistema 2 representa la primera de esas etapas, el pasaje del exterior al espacio intramembrana, mientras que el sistema 3 corresponde a la difusión desde este último al interior celular. Tanto en el Modelo II como en el III asumimos que ocurre modulación del sistema 3 por el ión transportado, pero en formas diferentes. Para el caso del Modelo II, el aumento de y inactiva el canal (sistema 3). Un esquema cinético que

da cuenta de esta propiedad se muestra en la Fig.3.4. En este caso el canal presenta dos formas intermedias, donde y promueve la transición de la forma activa (N_0) a la forma inactiva (N_0^*). El flujo neto en la dirección $x \longrightarrow y$ es

$$J_P = (Ns/\Sigma)(k_{01}l_{10}x - k_{10}l_{01}y). \quad (\text{A.4})$$

En la Ec.(A.4) k_{01} , l_{10} , k_{10} y l_{01} son constantes cinéticas verdaderas; x e y , concentraciones de las especies involucradas, y N la densidad total del canal. Σ es la suma de todos los diagramas direccionales del modelo y es igual a:

$$\Sigma = s(l_{10} + k_{10} + k_{01}x) + y[sl_{01} + r(k_{10} + l_{10})]. \quad (\text{A.5})$$

Bajo la condición de irreversibilidad, la ecuación para el flujo se puede aproximar a

$$J_P = (Ns/\Sigma)(k_{01}l_{10}x). \quad (\text{A.6})$$

Si despreciamos $sk_{01}x$, $\Sigma = s(l_{10} + k_{10}) + y[sl_{01} + r(k_{10} + l_{10})]$. La Ec.(A.6) es análoga al término $\beta x/(1 + \varphi y)$ de la Ec.(3.12), donde β y φ están dadas por

$$\begin{aligned} \beta &= (Nsk_{01}l_{10})/s(l_{10} + k_{10}) \\ \varphi &= [sl_{01} + r(k_{10} + l_{10})]/s(l_{10} + k_{10}). \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Para el caso del Modelo III, el efecto de y sobre el sistema 3 es positivo. Un esquema cinético que da cuenta de esta situación se muestra en la Fig.3.5. Como se muestra en la misma, el canal (sistema 3, Fig. 3.1) preexiste en dos estados conformacionales, igual que en el caso del Modelo II, y sólo uno es capaz de transportar el ión (N_0). La transición del estado inactivo al activo se logra por la presencia de y , que es la propia especie transportada. El flujo neto en la dirección $x \longrightarrow y$ es

$$J = (Np/\Sigma)(k_{01}l_{10}xy - k_{10}l_{01}y^2), \quad (\text{A.8})$$

donde los términos poseen un significado equivalente a los de la Ec.(A.4), con $\Sigma = (p + q)(l_{10} + k_{10}) + py(l_{01}y + k_{01}x)$. Operando bajo condiciones de irreversibilidad, la Ec.(A.8) puede aproximarse a

$$J \cong [(Npk_{01}l_{10}/q)/(l_{10}k_{10})]xy \quad (\text{A.9})$$

y resulta análoga al término βxy del Modelo III (Ec.(3.23)). Aquí, $\beta = (Npk_{01}l_{10}/q)/(l_{10}k_{10})$.

Capítulo 4

Simulaciones numéricas

En este capítulo se realizan estudios numéricos de los Modelos I y III analizados en el capítulo anterior, empleando valores de los parámetros plausibles desde el punto de vista de su significado biológico. No se incluyen aquí estudios numéricos del Modelo II ya que, como se demostrara en el capítulo 3, no es capaz de dar cuenta de conductas oscilatorias. Los resultados mostrados aquí han sido publicados en el artículo anteriormente mencionado (Perdomo y Hernández, 2009), cuya copia se adjunta. Fundamentalmente, las simulaciones numéricas mostradas en este capítulo pretenden reproducir algunos resultados experimentales obtenidos por Hattori y colaboradores (2005, HWU). Dentro de la bibliografía explorada, este artículo constituye uno de los que presenta evidencia experimental más exhaustiva de oscilaciones del potencial de membrana en un tejido no excitable. Por otro lado, estos autores han explorado (entre otras) la posibilidad de que ciertos metabolitos (por ej., malato y succinato) pueden participar en la producción de este tipo de oscilaciones. Las simulaciones aquí presentadas tuvieron como objetivo reproducir el efecto de estos metabolitos. Existen otros modelos teóricos para representar oscilaciones en el potencial eléctrico de las mitocondrias donde se incluye la participación de otros procesos, tales como la dinámica de reservorios de calcio (Vergun y Reynolds, 2004) o la producción de especies reactivas de oxígeno (Cortassa y otros, 2004). En los modelos aquí estudiados tampoco se realiza una representación detallada y completa de todos los factores y procesos que intervienen en la fisiología de las mitocondrias o de los microorganismos, como pueden ser mecanismos de acoplamiento energético (acción de f_{o1} atpasas), producción de especies reactivas de oxígeno o liberación de calcio almacenado, los que sí son considerados por modelos que poseen una estructura más detallada (Hernández y Cristina, 1998; Cortassa y otros, 2003; Beard, 2005; Bertram y otros, 2006). De esta manera, en los modelos estudiados aquí sólo se han tenido en cuenta aquellos componentes mínimos capaces de generar conductas eléctricas oscilatorias.

4.1. Elección de los valores numéricos

Para la elección de los valores numéricos de los parámetros empleados para simular los Modelos I y III (Cap. 3) se tuvieron en cuenta algunas restricciones, producto de la evidencia experimental disponible (Hattori y otros, 2005). La primera de ella fue tener en cuenta que el pH de la matriz mitocondrial y de muchos microorganismos se encuentra entre 7 y 9, correspondiendo a un valor de concentración de protones entre 10^{-10} y 10^{-12}

$mol\ cm^{-3}$. La segunda restricción surge del hecho que la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana interna mitocondrial se encuentra usualmente entre 0,10 y 0,20 V (Tedeschi, 1974; Miller y Koshland, 1977; Brand y Felder, 1984; Chen, 1984; Nichols y Budd, 2000). Además hay que considerar que en los diferentes trabajos experimentales se reportan algunos resultados similares, por ejemplo, en relación con el hallazgo de valores del período de las oscilaciones eléctricas (Cortassa y otros, 2004; Vergun y otros, 2003; Hattori y otros, 2005). Esto se introduce en los modelos simulados aquí como una nueva restricción, imponiendo que el período para oscilaciones sostenidas sea de aproximadamente 60s para concentraciones de referencia del metabolito M (5 mM). Finalmente, consideramos que el pH exterior es de 7 en condiciones fisiológicas, con lo que el valor del parámetro $x_o = 10^{-10}mol\ cm^{-3}$. Para el caso del Modelo III se impone además una unidad de tiempo S para el modelo no adimensional (Ec.(3.23)) de 1 s. Esto determina que el modelo adimensional (Ec.(3.28)) posea una unidad de tiempo h igual a $\alpha\gamma$ (Ec.(4.1)). Teniendo presente esto, las restricciones del párrafo anterior y las Ecs.(3.24), (3.26) y (3.27), se obtienen las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned}\gamma/(\delta - \alpha\gamma) &= 10^{-11}mol\ cm^{-3} \\ \alpha\gamma S &= h, \\ S &= 1s.\end{aligned}\tag{4.1}$$

Combinando las ecuaciones (3.26), (3.27), (3.29) y (4.1), obtenemos para el Modelo III las siguientes expresiones

$$\begin{aligned}\alpha &= 10^{-11}h(r - 1)mol\ cm^{-3}\ s^{-1} \\ \beta &= 10^{11}hk/(r - 1)mol^{-1}\ cm^3\ s^{-1}, \\ \gamma &= 10^{11}/(r - 1)mol^{-1}\ cm^3, \\ \delta &= hr\ s^{-1}\end{aligned}\tag{4.2}$$

A partir de las mismas, se obtienen los valores numéricos de los parámetros que se muestran en la Tabla (4.1).

Modelo I	
α_0	$10^{-5} s^{-1}$
α_1^0	$0,7 s^{-1}$
δ_0	$10^{-4} s^{-1}$
δ_1	$2,4 \times 10^{-3} mol^{-1} cm^3 s^{-1}$
y_{th}	$6,44 \times 10^{-12} mol cm^{-3}$
Modelo III	
κ	$0,1 s^{-1}$
b_0	$10^{-12} mol cm^{-3}$
b_1	$2 \times 10^{-6} s^{-1}$
c_0	0,1
d_0	$10^{-11} mol cm^{-3} s^{-1}$
d_1	$2 \times 10^{-5} s^{-1}$
Otras variables	
μ_0	$1 cm s^{-1}$
n_0	$10^2 cm s^{-1}$
n_1	$10^9 mol^{-1} cm^4 s^{-1}$
x_0	$10^{-10} mol cm^3$ ($pH_o = 7,0$)
M	$5 \times 10^{-6} mol cm^{-3}$ ($= 5 mM$)

Tabla 4.1: Valores numéricos de los parámetros.

4.2. Dependencia de los valores estacionarios de pH_i y V_m del Modelo III con M

La Fig.4.1 muestra la dependencia de los valores estacionarios de pH_i y V_m con M, para un rango fisiológico de concentraciones del metabolito. Puede observarse que pH_i y V_m aumentan con M, lo cual coincide con la evidencia experimental y con modelos explícitos de acoplamiento energético en mitocondrias y microorganismos (Hernández y Cristina, 1998). El incremento en M afecta positivamente a δ (Ec.(3.25)), lo cual determina un decremento de \hat{y} . Como consecuencia, el pH interno aumenta. Los efectos sobre el potencial de membrana se deben a dos factores. Por un lado la disminución de la concentración interna de hidrogeniones causa la disminución de V_m (Ec.(3.4)). A su vez, ocurre un incremento de η_0 debido al incremento de M (Ec.(3.3) y (3.6)). La dependencia de V_m con M será función de cual de estos factores predomine. En nuestro caso, en definitiva, V_m aumenta con M, lo cual es característico de un sistema de acoplamiento energético (ibid).

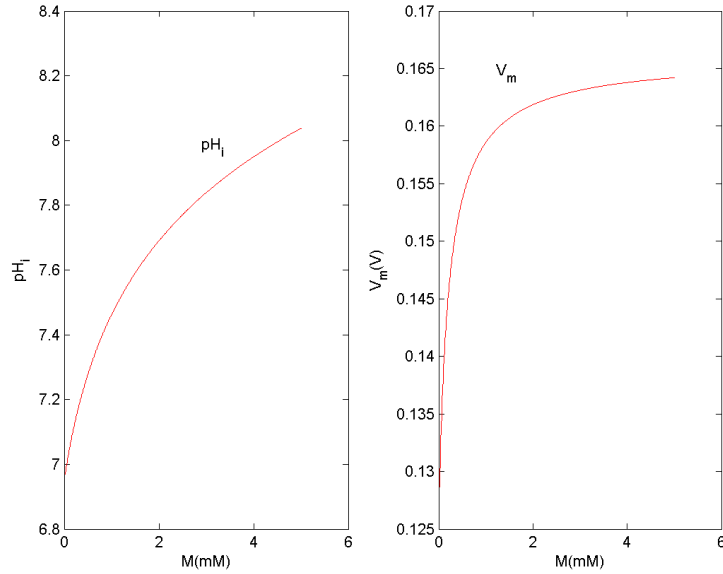


Fig. 4.1: Dependencia del pH_i y V_m estacionarios con M , para el Modelo III

4.3. Efecto de M sobre las propiedades dinámicas de los Modelos I y III

Para estudiar el efecto de M sobre las propiedades dinámicas de ambos modelos se realizaron simulaciones numéricas de la Ec.(3.7) (Modelo I) y de las Ecs.(3.23) (Modelo III), utilizando los valores de la Tabla 4.1 y el método de integración de Runge-Kutta de cuarto orden. En el Modelo I los valores iniciales de la simulación son el valor estacionario de y :

$$\hat{y} = \alpha_0 x_o / \delta_0, \quad (4.3)$$

y el valor estacionario del potencial eléctrico, que se obtiene de evaluar la Ec.(3.4) en \hat{y} :

$$\hat{V}_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{\eta_0 \hat{y}}{\mu_0 x_o}. \quad (4.4)$$

El valor estacionario de la concentración interna de protones es de $10^{-11} \text{molcm}^{-3}$, el cual corresponde a un pH intracelular igual a 8 y a un valor de potencial de 0,116 V. La concentración de referencia del metabolito M es la mostrada en la Tabla 4.1. En la Fig.4.2 se pueden observar los resultados de la integración numérica del Modelo I.

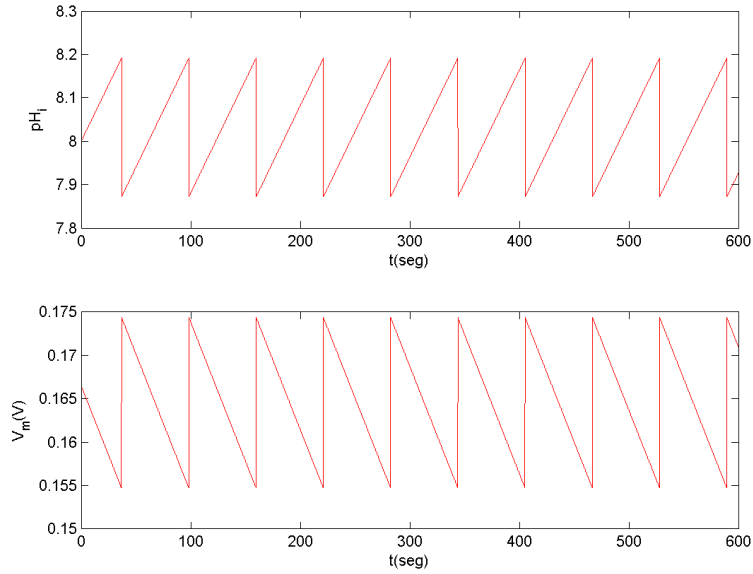


Fig. 4.2: Simulación dinámica del Modelo I.

Como puede verse, para los valores numéricos empleados el Modelo I exhibe oscilaciones sostenidas, caracterizadas por un período de aproximadamente 60 segundos.

Para las simulaciones correspondientes al Modelo III, los valores iniciales utilizados fueron: $x = \hat{x}$, $y = \hat{y}(1 - \Delta y)$ y $V_m = \hat{V}_m$, indicando $\hat{\cdot}$ el correspondiente estado estacionario. Únicamente para la variable y se partió de un valor diferente al del equilibrio. Para ello se consideró que la perturbación Δy fue proporcional a M según un factor de 10^5 . La elección de este valor fue arbitraria y se basó en la obtención de buenas aproximaciones numéricas a las curvas experimentales. Se debe recordar (Cap. 3) que las oscilaciones sostenidas suceden para el Modelo III en dos casos, el primero ocurre cuando la solución de la ecuación característica está dada por raíces imaginarias puras y la traza es igual a 0, lo que requería que $k \simeq r$ cuando $r \gg 1$ (Sección 3.3.2). Un segundo caso ocurre cuando la solución del sistema se encuentra en la región del ciclo límite (Sección 3.3.2). Las simulaciones mostradas más abajo coinciden con la primera de estas situaciones. Cuando $k = r = 110$, las oscilaciones presentan una frecuencia igual a 1 min^{-1} , similar a las descritas por HWU. En la Fig.4.3 se muestra la simulación dinámica del Modelo III, empleando los valores numéricos de la Tabla 4.1. El potencial membrana inicial fue de 164 mV y la concentración de equilibrio de y igual a $9,17 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-3}$, que equivale a un valor de pH interno de 8.05.

Como puede verse en la Fig. 4.3, análogamente al Modelo I, se obtienen oscilaciones sostenidas con frecuencias similares. Estos resultados son consistentes con la evidencia experimental de HWU.

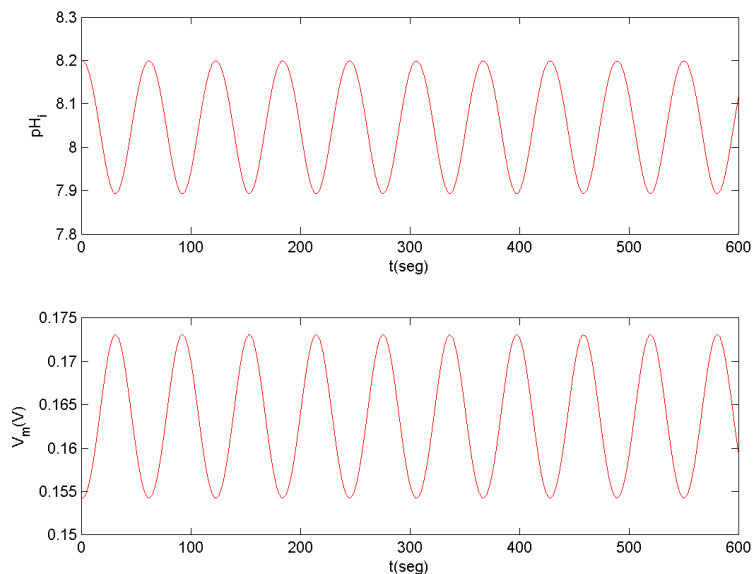


Fig. 4.3: Simulación dinámica del Modelo III.

Dos factores investigados por HWU que inciden en la frecuencia de las oscilaciones, son la concentración de distintos metabolitos (succinato, malato) y el pH externo. El incremento de ambos tiene como consecuencia aumentar el número de oscilaciones por minuto, estos factores son incluidos en las siguientes simulaciones en los dos modelos. En la Fig. 4.4 se observa la dependencia de la frecuencia de las oscilaciones con la concentración de metabolito para ambos modelos. Si bien los resultados numéricos son consistentes con la evidencia experimental (HWU), los modelos presentan conductas diferentes. Mientras que para el Modelo I se encuentra una dependencia lineal de la frecuencia respecto de la concentración de M , no ocurre así para el Modelo III. De esta forma, el Modelo I no reproduce en el rango de concentración explorado las curvas obtenidas por HWU como sí lo hace el Modelo III, que resulta ser entonces una mejor aproximación. Esto se debe a que, en el caso del segundo modelo, M afecta a tres de las cuatro constantes (Ec.(3.25)), mientras que en el Modelo I M sólo afecta a δ , parámetro vinculado al bombeo de protones al exterior. La propia complejidad del Modelo III permite reflejar que el efecto de M ocurre en más de una de las etapas. Para el caso del Modelo III los valores puntuales fueron obtenidas a partir de la integración numérica y la curva empleando directamente la Ec.(3.38) Para el Modelo I, los valores puntuales (que ajustan a una recta) fueron obtenidos de la integración numérica.

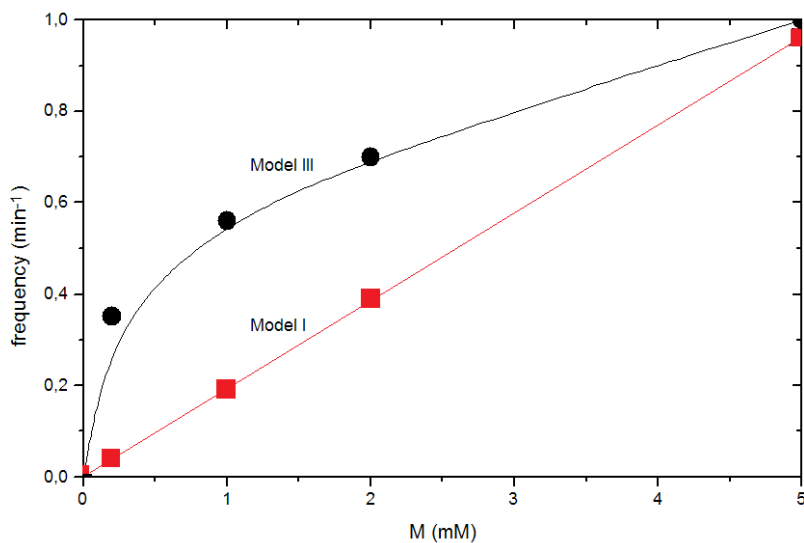


Fig. 4.4: Dependencia de la frecuencia de oscilación con M.

En la Fig. 4.5 se muestra el efecto del pH externo sobre la frecuencia de las oscilaciones. Como puede verse, ambos modelos determinan un incremento de la frecuencia con la disminución de la concentración de hidrogeniones, logrando, en términos generales, buenas aproximaciones a la evidencia experimental (HWU). No obstante, es el Modelo III el que nuevamente tiene un mejor ajuste a los resultados experimentales, debido probablemente a considerar un número mayor de efectos (ver más arriba). Nuevamente, la curva para el Modelo III se obtuvo empleando la Ec.(3.38).

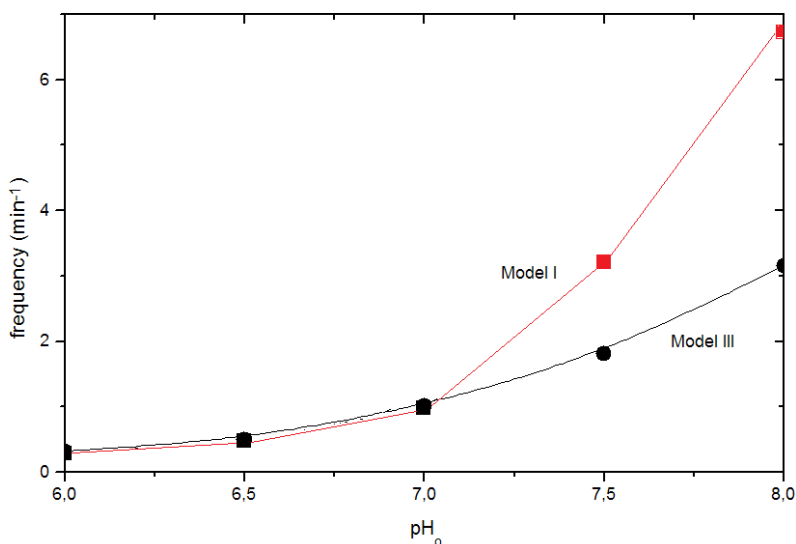


Fig. 4.5: Dependencia de la frecuencia de oscilación con pH₀

Los modelos desarrollados permiten el estudio del efecto de la modificación de otros

parámetros sobre sus propiedades dinámicas. Como no existe todavía evidencia experimental para contrastar los resultados que se muestran a continuación, los estudios siguientes pueden tener valor especulativo y predictivo. Entre los parámetros a estudiar bajo estas condiciones se encuentran la conductancia del paso pasivo y la tasa del transporte activo para la concentración de referencia del metabolito (Tabla 4.1). Los efectos sobre la conductancia para el Modelo I se introducen a través de cambios en los valores de α_0 y α_0^1 (Ec.3.8). Un aumento en estas constantes determina una disminución del pH interno (es decir, un aumento de la concentración interna de protones) y de la frecuencia de las oscilaciones. La disminución de α_0 y α_0^1 determina un decremento en la concentración interna de H^+ , lo que a su vez produce un aumento de la frecuencia (Fig. 4.6.A). De esta forma, este fenómeno resulta similar al visto anteriormente para el pH externo (Fig.4.5), donde los valores elevados de éste determinan un aumento de la frecuencia.

Para el caso del Modelo I, la modulación del transporte activo se realiza a través de las constantes δ_0 y δ_0^1 (Ec.(3.8)). El incremento simultáneo de estos factores produce un incremento del pH intracelular y de la frecuencia (Fig. 4.6.B). Es fácil corroborar, con ayuda de la Ec.(3.7), que valores bajos de la tasa de bombeo determinan que se acumule protones en el compartimento interno. Para el caso del Modelo I, la disminución de la frecuencia oscilatoria por inhibición del transporte activo puede interpretarse de forma semejante a la observada para valores bajos de M (Fig.4.4).

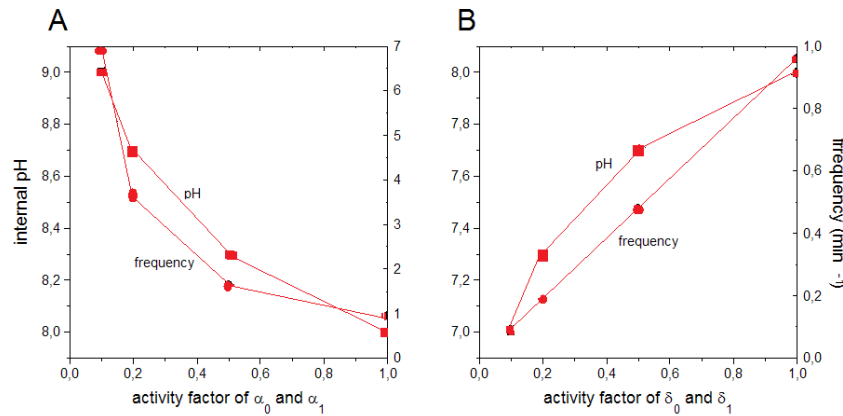


Fig. 4.6: Efecto de la inhibición de la conductancia y del transporte activo sobre el Modelo I.

Para el Modelo III, la conductancia se afecta modificando simultáneamente κ , b_0 y b_1 , mientras que se debe modificar d_0 y d_1 para afectar el paso activo (Ec.(3.25)). En ambos casos, los resultados son análogos a los obtenidos para el Modelo I. El aumento del pH interno debido a inhibición de la conductancia (Fig.4.7) y el decremento del mismo por inhibición del transporte activo (Fig.4.8) se pueden interpretar con ayuda de las Eqs.(3.24) y (3.25).

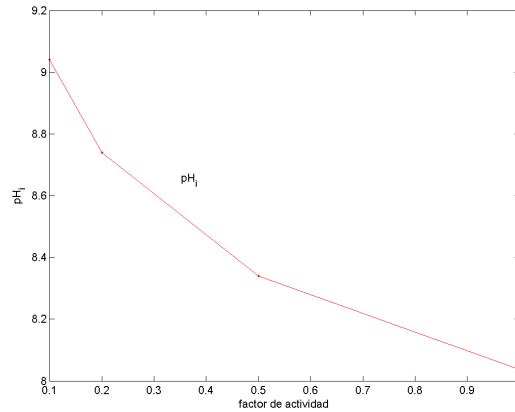


Fig. 4.7: Efecto de la inhibición de la conductancia sobre el Modelo III.

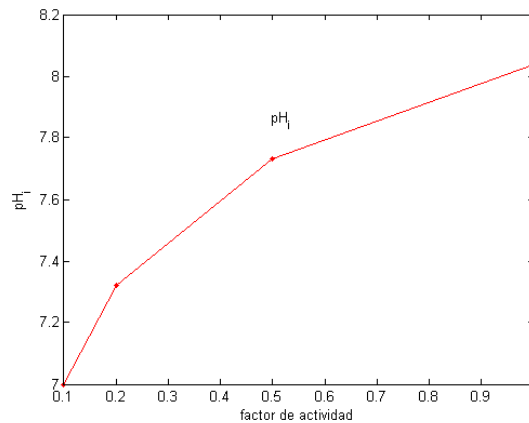


Fig. 4.8: Efecto de la inhibición del transporte activo sobre el Modelo III.

Para el caso del Modelo III, la inhibición de la conductancia y del transporte activo protónico afecta las propiedades de estabilidad. Cuando decrece la conductancia, el cociente k/r decrece y el Modelo III tiende a la inestabilidad. Lo contrario ocurre cuando se inhibe el transporte activo. En este caso, el cociente k/r aumenta y el sistema tiende a ser dinámicamente estable y no a generar oscilaciones sostenidas (ver Fig. 3.19).

4.4. Conclusiones

De los estudios numéricos mostrados en este capítulo puede concluirse que los Modelos I y III son capaces de generar oscilaciones sostenidas, similares en frecuencia y amplitud a las encontradas por HWU en mitocondrias aisladas. A su vez, estos modelos cumplen con el requisito mencionado en la introducción de esta tesis de presentar un mínimo de

elementos para la generación de las oscilaciones. Así, sólo se incluyen en dichos modelos mecanismos sencillos de transporte activo y pasivo. Con respecto a los modelos, el III, al ser más complejo, permite incluir un número mayor de efectos y lograr así un mejor ajuste a las curvas experimentales. Por otro lado, ambos modelos ignoran otros factores que pueden estar incidiendo en la generación de oscilaciones y la modulación de distintos mecanismos de transporte, como son la producción de especies de reactivas de oxígeno, depósitos de calcio mitocondrial, entre otros. La inclusión en los modelos básicos aquí presentados de estos otros fenómenos ciertamente permitiría obtener conductas más capaces de reproducir toda la evidencia experimental existente acerca de los fenómenos oscilatorios de la membrana interna mitocondrial.

Epílogo

A lo largo de este trabajo se han analizado distintos modelos capaces de representar fenómenos de modulación alostérica de procesos integrados de transporte en membranas, en los que el modulador fue el propio ligando transportado. Dichos modelos han consistido en sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, los que se desarrollaron con el objetivo de que incluyeran el mínimo número de componentes y fueran capaces de representar el mayor número de conductas posibles. Lo de “mínimo” debe entenderse con un doble significado. Por un lado, como se comentó en la Introducción, desde el punto de vista biológico las estructuras involucradas se limitan a un mecanismo de transporte pasivo y uno activo. Ambas vías pueden ser modulables por el propio ligando, lo que condiciona la forma de las expresiones matemáticas. Según el segundo significado con que se ha usado la palabra mínimo, los sistemas son de una o dos ecuaciones y presentan un número limitado de parámetros. Para los modelos continuos de una dimensión (una variable dependiente), donde el vector dirección se desplaza en una recta, se conocía de antemano que son incapaces de converger o diverger al punto fijo de otra forma que no sea monótonamente o permanecer constante. En estos casos, las soluciones periódicas no existen y no se obtienen oscilaciones sostenidas o amortiguadas (Strogatz, 1994). Los ocho sistemas de este tipo estudiados aquí son, por consiguiente, asintóticamente estables (Cap.2). Con respecto a la aparición de bifurcaciones, sólo uno de los modelos presentó este tipo de comportamiento en el rango válido de concentraciones. La misma resultó ser una bifurcación “funcional” que no entra en ninguna de las categorías descritas en la literatura (Strogatz, 1994; Murray, 2002a). Los otros modelos sencillos que mostraron bifurcaciones, lo hicieron para valores sin significado físico y fueron de tipo Silla, sin encontrarse bifurcaciones Transcríticas o de Pitchfork. La explicación del hallazgo de estas dinámicas sencillas seguramente reside en el hecho de que los tipos de interacciones planteadas resultaron ser demasiado elementales. Más allá de las limitaciones antes comentadas de los modelos de una ecuación diferencial, existe abundante bibliografía que muestra que se pueden obtener conductas más ricas con estos tipos de sistemas de ecuaciones cuando se les aplica a diversos sistemas metabólicos o ecológicos (Ludwig y otros, 1978; Strogatz, 1994; Heinrich y Schuster, 1996; Murray, 2002a). Una forma de obtener oscilaciones sostenidas en modelos de una dimensión fue la de discretizar algún parámetro. Así, para el caso del Modelo I (Cap.3), se asumió que un componente de la conductancia del ión transportado se activa en respuesta a la alcalinización de la matriz. Esta propiedad puede dar cuenta de algunos resultados experimentales, tales como el hallazgo de oscilaciones eléctricas sostenidas. Bajo las condiciones de referencia, las oscilaciones generadas por el Modelo I son similares a las producidas por el más complejo Modelo III (Cap.3)

Para el caso de los sistemas de dos ecuaciones, sólo uno de los explorados aquí fue capaz de generar oscilaciones sostenidas, el Modelo III. Este modelo representa una versión

biofísica del clásico Modelo Mínimo de Higgins, diseñado para interpretar oscilaciones en sistemas bioquímicos. Dicho modelo presenta una riqueza de comportamientos dinámicos superior a otros de las mismas características, tales como el de Lotka-Volterra o el de Schnakenberger (Schnackenberg, 1979; Strogatz, 1994; Queeney y otros, 1996; Murray, 2002a). En nuestro caso, el Modelo III fue capaz de reproducir distintos resultados experimentales, pero además en un rango diferente de variables al utilizado aquí puede generar otros comportamientos oscilatorios vinculados al ciclo límite, con lo cual presenta una potencialidad mayor para representar otros procesos. Aunque el estudio de estos modelos tuvo principalmente el objetivo de reproducir los cambios en el potencial de membrana de mitocondria, los mismos se podrían aplicar a otras situaciones biológicas, tales como las oscilaciones del potencial asociadas con oscilaciones de calcio en mitocondria u otros sistemas. Esta posibilidad está apoyada por el hecho de que se han descrito canales de calcio modulados por el propio ión.

Dentro de los aspectos que han quedado pendiente estudiar en el marco de los temas de esta tesis, la inclusión de componentes estocásticos en los modelos les podría conferir un mejor ajuste a los resultados experimentales. Otro punto importante sería incluir una tercera ecuación diferencial, ya sea haciendo explícito el potencial de membrana en esta nueva expresión o mediante la inclusión de algún aspecto estructural o alostérico explícito. La bibliografía de modelos con este número es extensa y permite presentar un número mayor de comportamientos, por ejemplo la descripción de caos determinístico. Si bien no se han descrito hasta ahora conductas caóticas en el potencial de membrana, sí lo han sido en otros ámbitos biológicos, por ejemplo en la dinámica de poblaciones, la actividad cardíaca, los sistemas enzimáticos, etc. (Montero y Morán, 1992; Murray, 2002a). Una pregunta de gran relevancia en el desarrollo de modelos teóricos en Biología es cuán detallado debe ser un modelo y cuántas ecuaciones debe incluir. La relación entre la estructura biológica y la complejidad matemática de los modelos es directa. En esta tesis sólo se han estudiado modelos simples, fáciles de comprender e implementar, y que incluyeron los factores más importantes de la dinámica de los fenómenos fisiológicos considerados. Ello se realizó a costa del detalle mecanístico pero, a su vez, permitió utilizar todo el arsenal del tratamiento analítico. Sin embargo, la tendencia actual va en otro sentido, los modelos tienden a incluir más el detalle de todos los procesos y esto se refleja en el aumento del número y complejidad de las ecuaciones, las que pueden investigarse gracias al constante incremento en la capacidad de cálculo computacional.

Bibliografía

- ADLEY, D.J. y STANFIELD, P.R. (1996). *Ion channels: Molecules in action*. Cambridge University Press, 1ª edición.
- BAUER, C.; SIMONIS, W. y SCHONKNECHT, G. (1999). «Different Xanthenes Cause Membrane Potential Oscillations in a Unicellular Green Alga Pointing to Ryanodine/cADPR Receptor Ca²⁺». *Plant Cell Physiology*, **40**(4), pp. 435–456.
- BEARD, D.A. (2005). «A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxydative phosphporilation.» *PLoS Computational Biology*, **1**(4), p. e36.
- BERGSTEN, P. (2002). «Role of Oscillations in Membrane Potential, Cytoplasmic Ca²⁺, and Metabolism for Plasma Insulin Oscillations». *Diabetes*, **51**, p. S17151.
- BERTRAM, R.; PEDERSEN, M.G.; LUCIANI, D.S. y SHERMAN, A. (2006). «A simplified model for mitochondrial ATP production». *Journal Theoretical Biology*, **243**, pp. 575–586.
- BRAND, M.D. y FELDER, S.M. (1984). «Membrane potential of mitochondria in intact lymphocytes during early mitogenic stimulation.» *Biochemical Journal*, **217**, pp. 453–459.
- CHAY, T. REE y RINZEL, J. (1985). «Bursting, Beating, and Chaos in an Excitable Membrane Model». *Biophysical Journal*, **47**, pp. 357–366.
- CHEN, L.B. (1984). «Mitochondrial membrane potential in living cells». *Annual Review of Cell Biology*, **4**, pp. 155–181.
- CORTASSA, S.; AON, M.; WINSLOW, R. y O’ROURKE, B. (2004). «A Mitochondrial Oscillator Dependent On Reactive Oxygen Species». *Biophysical Journal*, **87**, pp. 2060–2070.
- CORTASSA, S.; AON, M.A.; MARBAN, E.; WINSLOW, RL y O’ROURKE, B. (2003). «An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics». *Biophysical Journal*, **84**, pp. 2734–2755.
- DECOURSEY, T. (1998). «Four Varieties of Voltage-Gated Proton Channels». *Frontiers in Bioscience*, **3**, pp. d477–482.
- DECOURSEY, T. (2003). «Voltage Gated Proton Channels and Other Ptroton Transfer Pathways». *Physiological Review*, **83**, pp. 475–579.

- DELCROY, O. y GOLDBETER, A. (1982). «Birhythmicity, chaos, and other patterns of temporal self-Organization in multiply regulated biochemical system». *Proceedings of the National Academy Science USA*, **79**, pp. 6917–6921.
- EDELSTEIN-KESHET, LEAH (1988). *Mathematical Models In Biology*. McGraw-Hill Companies, 1ª edición.
- FITZHUGH, R. (1961). «Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane». *Biophysical Journal*, **1**, pp. 445–466.
- GILON, P. y HENQUIN, J.C. (1992). «Influence of Membrane Potential Changes on Cytoplasmic Ca²⁺ Concentration in an Electrically Excitable Cell, the Insulin-secreting Pancreatic B-cell». *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, pp. 20713–20720.
- GOLDBETER, A. y BERRIDGE, M. J. (1996). *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms: The Molecular Bases of Periodic and Chaotic Behaviour*. Cambridge University Press.
- HABERICHTER, T.; MARHL, M. y HEINRICH, R. (2000). «Birhythmicity, trirhythmicity and chaos in bursting calcium oscillations». *Biophysical Chemistry*, **90**, pp. 17–30.
- HANLEY, P.; MUSSET, B.; RENIGUNTA, V.; LIMBERG, S.; DALPKE, A.; SUS, R.; HEEG, K.; PREISIG-MÜLLER, R. y DAUT, J. (2004). «Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages». *Proceedings of the National Academy Science USA*, **101**, n°25, pp. 9476–9484.
- HATTORI, T.; K.WATANABE; UECHI, Y.; YOSHIOKA, H. y OHTA, Y. (2005). «Repetitive Transient Depolarizations of the Inner Mitochondrial Membrane Induced by Proton Pumping». *Biophysical Journal*, **88**, pp. 2340–2349.
- HEINRICH, R. y SCHUSTER, S. (1996). *The Regulation of Cellular Systems*. Springer, 1ª edición.
- HERNÁNDEZ, J.A. (2003). «Stability Properties of Elementary Dynamics Models of Membrane Transport». *Bulletin of Mathematical Biology*, **65**, pp. 175–197.
- HERNÁNDEZ, J.A. (2007). «A general model for the dynamics of the cell volume». *Bulletin of Mathematical Biology*, **69**, pp. 1631–1648.
- HERNÁNDEZ, J.A. y CRISTINA, E. (1998). «Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the Na⁺ pump and of cotransport systems». *Am. J. Physiol.*, **275**, pp. C1067–C1080.
- HERNÁNDEZ, J.A.; FISCHBARG, J. y LIEBOVITCH, L.S. (1989). «Kinetic model of the effects of electrogenic enzymes on the membrane potential». *Journal Theoretical Biology*, **65**, pp. 113–125.
- HIGGINS, J. (1964). «A Chemical Mechanism for Oscillations of Glycolytic Intermediates in Yeast Cells», **51**, pp. 989–994.

- HILARIO, E. y GOGARTEN, J.P. (1998). «The Prokaryote-to-Eukaryote Transition Reflected in the Evolution of the V/F/A-ATPase Catalytic and Proteolipid Subunits». *Journal of Molecular Evolution*, **46**, pp. 703–715.
- HILLE, BERTIL (1992). *Channels Ionics of Excitable Membranes*. Sinauer.
- JAKOBSSON, E. (1980). «Interactions of cell volume, membrane potential and membrane transport parameters». *American Journal of Physiology*, **238**, pp. C196–C206.
- LANG, F.; FRIEDRICH, F.; KAHN, E.; WÖLL, E.; HAMMERER, M.; WALDDEGGER, S.; MALY, K. y H.GRUNICKE (1991). «Bradykinin-induced Oscillations of Cell Membrane Potential in Cells Expressing the Ha-ras Oncogene». *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, pp. 4398–4942.
- LEE, A. y CATTERALL, W. (2005). *Voltage Gated Calcium Channels*. Klumber Academic and Plenum Publishers.
- LEWIS, J.; SLACK, J.M.W. y WOLPERT, L. (1977). «Thresholds in development». *Journal Theoretical Biology*, **65**, pp. 579–590.
- LUDWIG, D.; JONES, D.D. y HOLLING, C.S (1978). «Qualitative Analysis of Insect outbreak systems:The Spuce Budworm and Forest». *Journal of Animal Ecology*, **47**, pp. 315–332.
- MILLER, J.B. y KOSHLAND, D.E. (1977). «sensory electrophysiology of bacteria: relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in Bacillus subtilis». *Proceedings of the National Academy Science USA*, **74**, pp. 4752–4756.
- MONTERO, F. y MORÁN, F. (1992). *Biofísica. Procesos de autoorganización en Biología*. EUDEMA, Madrid, 1ª edición.
- MURRAY, J.D. (2002a). *Mathematical Biology*. volumen 1. Springer, New York, 3ª edición.
- MURRAY, J.D. (2002b). *Mathematical Biology*. volumen 2. Springer, New York, 3ª edición.
- NICHOLS, D.G. y BUDD, S.L. (2000). «Mitochondria and neuronal survival». *Physiological Review*, **80**, pp. 315–360.
- NUMEMAKER, C.; BERTRAM, R.; SHERMAN, A.; TSANEVA-ATANASOVA, K.; DANIEL, C. y SATIN, L. (2006). «Glucose Modulates [Ca²⁺]_i Oscillations in Pancreatic Islets via Ionic and Glycolytic Mechanism». *Biophysical Journal*, **91**, pp. 2082–2096.
- PERDOMO, G. y HERNÁNDEZ, J.H. (2009). «Minimal models of electric potential oscillations in non-excitable membranes». *European Biophysics Journal*. doi: 10.1007/s00249-009-0537-7.
- QUEENEY, K.; MARIN, E.; CAMPBELL, C. y PEACOCK-LÓPEZ, E. (1996). «Chemical Oscillations in Enzyme Kinetics». *The Chemical Educator*, **1**.
- RUBINOW, S.I. (1975). *Introduction to Mathematical Biology*. Dover Publications 2002.

- SCHNACKENBERGER, J. (1979). «Simple chemical reaction systems with limit cycle behavior». *Journal Theoretical Biology*, **81**, pp. 389–400.
- SEGEL, LEE A. (1984). *Modeling Dynamics Phenomena in Molecular and Cellular Biology*. Cambridge University Press.
- STROGATZ, S.H. (1994). *Nonlinear Dynamics and Chaos*. Westview Press 2000.
- TAKEUCHI, Y. y ADACHI, N. (1983). «Existence and Bifurcation of Stable Equilibrium in two-prey, one-predator communities». *Bulletin of Mathematical Biology*, **45**, pp. 877–900.
- TEDESCHI, H. (1974). «Mitochondrial membrane potential:evidence from studies with a fluorescent probe.» *Proceedings of the National Academy Science USA*, **71**, pp. 583–585.
- TILLY, B.; ERTOOLEN, L.T; LAMBRECHTS, A.; REMORIE, R.; DE LAAT, W. y MOOLENAAR, W. (1990). «Histamine-H1-receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis, Ca²⁺ signalling and membrane-potential oscillations in human HeLa carcinoma cells». *Biochemical Journal*, **266**, pp. 235–243.
- VERGUN, O. y REYNOLDS, I. (2004). «Fluctuations in Mitochondrial Membrane in Single Isolated Brain Mitochondria: Modulation by Adenine Nucleotides and Ca²⁺». *Biophysical Journal*, **87**, pp. 3585–3593.
- VERGUN, O.; VOTYAKOVA, T. y REYNOLDS, I. (2003). «Spontaneous Changes in Mitochondrial Membrane Potential in Single Isolated Brain Mitochondria». *Biophysical Journal*, **85**, pp. 3358 – 3366.
- WEINSTEIN, A.M. (1997). «Dynamics of cellular homeostasis: recovery time for a perturbation from equilibrium». *Bulletin of Mathematical Biology*, **59**, pp. 451–481.
- WEISS, F.T. (1996). *Cellular Biophysics*. volumen 1. MIT press.