



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN
EN SISTEMAS TORTUOSOS:
UNA APROXIMACIÓN FRACTAL**

**Tesis que presenta
Marco Antonio Cantor Arellano
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Química**

Asesor: Dr. Armando Domínguez Ortíz

Jurado Calificador:

Presidente:	Dr. FERNANDO ROJAS GONZÁLEZ	UAM-I
Secretario:	Dr. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA	UAM-I
Vocal:	Dr. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS	UPIBI-IPN

México, D.F., abril 2011

Agradecimientos

Doy muchísimas gracias a mi Dios, creador de todo lo que existe, por haberme prestado vida y permitirme acabar la maestría. Gracias Dios por haberme puesto gente buena y amable a mi alrededor, que por tu voluntad, me han apoyado durante este proceso de aprendizaje. Gracias por permitirme descubrir una pequeñísima parte de tu ciencia.

A mis padres y hermanos, por haberme alentado en todo momento en que los he necesitado. Que me han amado y me seguirán amando sin importar los grados académicos que logre obtener.

A mi esposa, hijos y suegra; que siempre han estado a mi lado y han sido el combustible para que siga adelante. Gracias por apoyarme en todo de manera incondicional.

Agradezco al Dr. Armando Domínguez Ortiz y al Dr. Salomón Cordero Sánchez, por todo el apoyo moral y académico que me han brindado.

A un verdadero amigo, que es como mi hermano, Pantaleón Romero Cruz, que siempre encuentro en él un buen consejo y apoyo cuando lo necesito.

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Por permitirme ser parte de una comunidad talentosa y exitosa.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Particulares.....	5
CAPÍTULO 1	6
ANTECEDENTES	6
1.1 Membranas celulares.....	6
1.2 Modelo de cinética enzimática por Michaelis-Menten.....	9
1.3 Sistema dinámico	12
1.3.1 Fractales	13
1.3.2 Cinética química fractal.....	18
1.4 Método estocástico.....	21
1.4.1 Sistemas estocásticos.....	21
1.4.2 Método de Monte Carlo	21
1.4.3 Medio de reacción representado por una red numérica.....	23
1.4.3.1 Traslape y longitud de correlación	24
1.5 Movimiento Browniano.....	28
CAPÍTULO 2	30
METODOLOGÍA Y RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTOCÁSTICO.....	30
2.1 Arquitectura de las redes numéricas	30
2.2 Bloqueo de sitios.....	32
2.3 Establecimiento de condiciones periódicas.....	34
2.4 Visualización de redes.....	37
2.5 Estimación de la d_w en los medios de reacción.....	45
2.6 Estimación de la d_f en los medios de reacción.....	52
2.7 Estimación de la d_s en redes bidimensionales.	54
2.8 Reacciones enzimáticas en medios tortuosos	56
2.8.1 Metodología.....	56
2.8.2 Resultados	59
2.9 Discusión de resultados.....	65
CAPÍTULO 3	66
METODOLOGÍA Y RESULTADOS DEL MODELO DETERMINISTA.....	66
Resumen	66
3.1 Método	66
3.1.1 Condiciones iniciales.....	67
3.2 Resultados.....	69
3.2.1 Estudio de la sensibilidad del sistema frente a los valores de h ...	69
3.2.2 Cinética enzimática fractal, sensibilidad a K_m	72
3.3 Discusión de resultados.....	77
CONCLUSIÓN	78
PERSPECTIVAS	79
REFERENCIAS	80
LISTA DE SÍMBOLOS.....	83

RESUMEN

Se estudia numéricamente la cinética química de una reacción enzimática simple, ocurriendo en el seno de un medio tortuoso y mal agitado. La investigación se desarrolla sobre dos ejes: (i) se resuelve mediante un método Runge-Kutta (orden 2) el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias derivado del mecanismo de Michaelis-Menten (MM), allí se considera una cinética química tipo fractal para la reacción bimolecular; y (ii) se concibe y desarrolla un algoritmo, tipo método de Monte Carlo, para modelar la cinética de MM en medios tortuosos y con mal mezclado. Los resultados obtenidos en ambos estudios muestran que un mezclado ineficiente inhibe el establecimiento de condiciones estacionarias para las especies intermediarias. Este trabajo busca establecer las características propias de reacciones enzimáticas controladas por la difusión de los reactivos en medios tortuosos.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por organismos vivos. Muchas de las reacciones que se llevan a cabo en una célula son catalizadas por enzimas. En todos los organismos vivos existe una gran variedad de enzimas, las cuales son importantes para la vida, ya que sin ellas la vida como la conocemos no sería posible. Por ello es relevante conocer el comportamiento cinético de estas biomoléculas bajo condiciones *in vivo*.

Para diversas áreas es de gran importancia entender el comportamiento cinético de las enzimas; e.g. el área de la biofarmacocinética, donde es importante modelar curvas que describan, comparen y predigan el comportamiento del fármaco (el fármaco se considera como el sustrato) en un organismo. Un modelo comúnmente usado para describir la trayectoria y el comportamiento del fármaco es el de Michaelis-Menten, MM (Marsh y Jack, 2006), un modelo simplísimo que involucra una enzima y un solo sustrato, con él se han establecido interpretaciones sencillas en diversos campos. Es pues un buen punto de partida, así que de allí partiremos para iniciar nuestro estudio sobre cinética enzimática en medios tortuosos y mal agitados.

La cinética enzimática de MM, es utilizada extensamente para el estudio de la catálisis enzimática dentro del campo de la química y de la biología, por ser un modelo sencillo que reproduce los principales rasgos de cinéticas enzimáticas observadas *in vitro* (Wagner, 1993). Sin embargo se conocen diferencias significativas entre el comportamiento de reacciones enzimáticas ocurridas *in vitro* e *in vivo* (Marsh y Jack 2006). Podemos citar dos causas para ello: (i) las reacciones que ocurren en espacios intracelulares son constreñidas por la significativa tortuosidad del medio y, (ii) la falta de un mecanismo de agitación

eficiente. Del estudio de los sistemas dispersos se sabe, que los efectos combinados de dichas causas generan cinéticas distintas a las que aparecen en los libros clásicos de cinética química.

En este trabajo abordamos el estudio de la cinética enzimática de MM desarrollándose en un medio tortuoso y mal mezclado. Mediante el uso de conceptos provenientes del estudio de los sistemas dispersos, como por ejemplo: sistema dinámico, percolación y cinética química fractal. Tales conceptos ya han mostrado su utilidad en el estudio de ciertas reacciones bimoleculares, controladas por la difusión de los reactivos, que tienen lugar en el seno de un sistema disperso y con mala agitación (Kopelman, 1988).

La cinética de MM presenta características no lineales en donde el efecto particular de cada una de las variables es muy difícil de discernir en forma experimental. Para el estudio de sistemas no lineales la simulación numérica es una herramienta interesante, ya que ella permite un manejo singular de las variables, así como el análisis de sus efectos individuales o combinados. En este trabajo se realizan simulaciones *in silico* del sistema de MM evolucionando en el seno de un medio tortuoso y sin agitación. Se busca comprender las consecuencias de la microestructura del medio de reacción sobre la cinética de la reacción. Este trabajo se articula en dos ejes:

1. *Autómata celular*. Se utilizan métodos de Monte Carlo para: (i) construir las redes numéricas en segunda dimensión espacial (2d) con baja conectividad que representan el medio de reacción, y (ii) simular los mecanismos de transporte (reacción controlada por difusión). Los resultados de este estudio se presentan en el capítulo 2
2. *Sistema dinámico*. El balance de materia sobre las ecuaciones que componen el modelo de MM, esto produce un sistema dinámico que usualmente se resuelve estableciendo la condición del estado estacionario para el complejo. Tal condición ciertamente válida en el

contexto *in vitro* (sistema homogéneo), pero dudosa en el contexto *in vivo* (sistema tortuoso y mal agitado). En el capítulo 3 Se presentan los resultados de un estudio numérico (Runge-Kutta de 2° orden) de la evolución del sistema MM. Hay que subrayar que tal solución se obtiene libre de la hipótesis del estado estacionario e introduciendo los efectos de la tortuosidad del medio de reacción mediante una aproximación tipo cinética química fractal.

Los resultados de ambos métodos –determinista y estocástico– presentan una gran similitud en cuanto al comportamiento cinético del complejo enzima–sustrato. Observándose así que la cinética química fractal es una herramienta operativa para el estudio de sistemas enzimáticos, particularmente debemos subrayar que el establecimiento de un estado estacionario para el complejo no es obvio bajo condiciones *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✚ Estudiar *in silico* el comportamiento del sistema de Michaelis–Menten evolucionando en el seno de un sistema tortuoso y con agitación ineficiente.

Objetivos Particulares

- ✚ Estudiar la evolución del sistema de MM empleando un autómata celular semejante al desarrollado por Berry (2002), pero evolucionando en redes correlacionadas.
- ✚ Analizar numéricamente la evolución del sistema dinámico derivado del mecanismo de MM bajo la aproximación de cinética química fractal.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Resumen

Los fractales forman parte de nuestro entorno cotidiano. Por ejemplo, los cuerpos de diversos seres vivos exhiben autosimilitud en su estructura constitutiva. Esta frecuencia de estructuras fractales ha despertado el interés sobre las estructuras mismas y sobre los procesos fisicoquímicos que allí ocurren.

1.1 Membranas celulares

Las membranas celulares le sirven a la célula como una capa aislante y protectora del ambiente; evitando (solo por mencionar algunas funciones) la pérdida de materiales, cambios bruscos de temperatura y la entrada de cualquier sustancia. Las membranas no aíslan en su totalidad el interior celular con su exterior, sino que es necesario que exista entradas y salidas de sustancias para que la célula sobreviva y lleve a cabo todas las reacciones químicas necesarias (con ello sus funciones) coexistiendo en el medio que la rodea.

El modelo más aceptado de una membrana celular es el llamado, modelo de mosaico fluido por contener una composición mixta de fosfolípidos, de glucolípidos, de esteroides y proteínas. Los lípidos forman una capa aceitosa que sirve de barrera contra las sustancias hidrosolubles. Varias proteínas están embebidas en la bicapa o unidas rígidamente a una de sus superficies. Dichas

proteínas realizan la mayor parte de las funciones de la membrana (Starr y Taggart, 2008).

Muchas clases de solutos atraviesan las membranas difundiéndose por un canal o túnel en el interior de una proteína transportadora. Cuando un soluto o un ión, pasan por el canal y se enlaza débilmente a la proteína, la forma de esta cambia. El canal se cierra detrás del soluto y se abre frente a él, para dejarlo libre al otro lado de la membrana, en este momento la proteína regresa a su forma original. Este tipo de transporte membranar se puede llevar a cabo de forma pasiva o activa, conocidas como transporte pasivo y transporte activo respectivamente (Starr y Taggart, 2008).

El transporte pasivo se manifiesta cuando existe: un gradiente de concentración, un gradiente eléctrico o ambos. En la superficie de las membranas celulares existen canales abiertos (considerados como transportadores pasivos); estos se abren o se cierran conforme las condiciones vayan cambiando. Si no ocurre otra cosa, el transporte pasivo proseguirá hasta que se iguale la concentración en ambos lados.

El transporte activo consiste en trasladar solutos a través de la membrana en contra del gradiente de concentración, esto requiere energía por lo tanto las células vivas nunca dejan de consumir energía para bombear solutos hacia dentro y hacia fuera. Sólo determinados solutos pueden unirse a grupos funcionales que recubren el canal interior de un transportador activo, que es activado por un grupo fosfato procedente de una molécula de ATP (Adenosin Trifosfato). La transferencia del grupo fosfato modifica la forma del transportador de modo que libera el soluto en el otro lado de la membrana (Starr y Taggart, 2008).

Otra de las características importantes de los sistemas de transporte es la velocidad con la que funcionan, esto va relacionado con la cantidad o concentración de un sustrato y la velocidad con la que es transportada; además, de la interacción que existe entre la sustancia (sustrato) y la proteína transportadora, a medida que aumenta la concentración la velocidad del transporte

es mayor, pero esto tiene un límite, y este es establecido por las proteínas transportadoras, puesto que su concentración no cambia en la membrana a la cual pertenecen, y esto determinará la velocidad máxima del transporte.

Las membranas celulares presentan en su superficie gran cantidad y variedad de proteínas; algunas integrales y otras ancladas (periféricas) en la superficie; además de algunos carbohidratos que de igual manera se encuentran anclados en la superficie. Cuando un sustrato llega a la superficie de una membrana, lo primero que tiene que pasar es encontrar de forma aleatoria la proteína (enzima) indicada para la formación del complejo, puesto que no todas las proteínas son las indicadas, y solo son obstáculos (junto con los carbohidratos) para el sustrato – *c.f.* Figura 1.1–. Las membranas celulares pueden presentar de un 25 hasta un 75% de proteínas, esto va a depender del grado de especialización y actividad de cada membrana (Peña, 2009). Las redes que se construyeron y utilizaron en este trabajo, presentan cierta cantidad de obstáculos, en representación de aquellas proteínas y carbohidratos que solo obstaculizan el libre tránsito del sustrato.

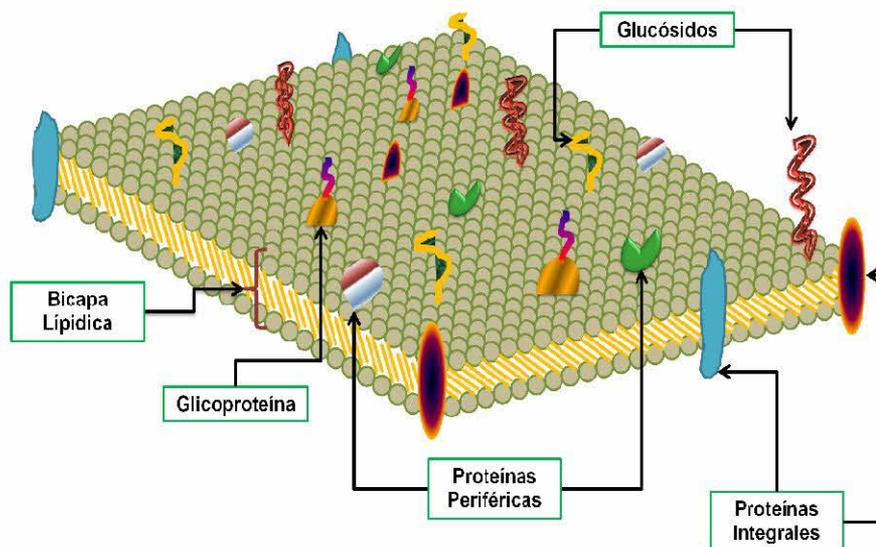
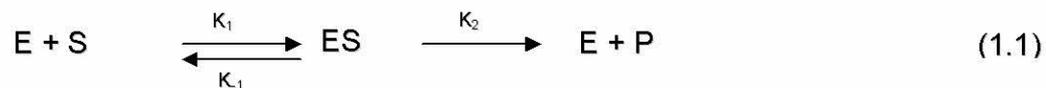


Figura 1.1- Membrana celular basado en el modelo del mosaico, se presenta solo algunas de sus macromoléculas como las proteínas integrales y periféricas.

1.2 Modelo de cinética enzimática por Michaelis-Menten

El modelo de catálisis enzimática propuesto por MM (Michaelis y Menten 1913) se representa en la ecuación 1.1.



En donde: E, S, ES y P, representan a la enzima, sustrato, complejo enzima-sustrato y al producto respectivamente; k_1 , k_2 y k_{-1} son las constantes de velocidad de la reacción en la dirección señalada en la ecuación (1.1). De allí se deriva el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales (sistema 1.1):

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] - k_1[E][S] \quad (1.2)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.3)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \quad (1.4)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (1.5)$$

Sistema 1.1

El tratamiento tradicional de este sistema se basa en las siguientes consideraciones:

1. La concentración del sustrato, [S], es mucho mayor que la concentración de la enzima, [E], de tal suerte que la cantidad de sustrato unido a la enzima es en todo momento muy pequeña con respecto a la [S].
2. Se asume el rápido establecimiento de condiciones estacionarias para la concentración del complejo enzima-sustrato, [ES], *i.e.* la velocidad de formación de [ES] iguala a la de su descomposición.
3. Sistema bien mezclado.

Bajo tales consideraciones se establece la ecuación cinética de MM (ella describe como varia la velocidad de la reacción con respecto a la concentración del sustrato, ecuación 1.6).

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.6)$$

En donde V es la velocidad de la reacción, V_{\max} es la velocidad máxima, [S] es la concentración de sustrato y K_m es la constante de MM, la cual se encuentra definida como:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (1.7)$$

Es pertinente señalar que las consideraciones antes mencionadas ($[S] \gg [E]$ y $d[ES]/dt = 0$) son únicamente adecuadas bajo condiciones *in vitro*. La validez de tales hipótesis resulta cuestionable cuando una reacción ocurre *in vivo* (Kosmidis *et al.*, 2004). Diversos estudios señalan que el medio celular se halla estructurado de manera heterogénea (Scalettar, *et al.*, 1991; Minton, 1993 y 1998; Luby-Phelps, *et al.*, 1987; Frauenfelder, *et al.*, 1999). Muchas reacciones en membranas celulares ocurren en sistemas no diluidos, además dado el tamaño de las moléculas participantes y las dimensiones propias del medio, se trata de reacciones estrictamente bidimensionales y carentes de agitación. Este último aspecto es sumamente importante para determinar la velocidad de reacciones controladas por difusión. La velocidad de reacción es altamente dependiente de la dimensión Euclídea (d) del medio de reacción. En dimensiones mayores que dos ($d > 2$), las moléculas se alejan de su posición inicial –difusión no compacta–. Mientras que en dimensiones menores que dos ($d < 2$); las moléculas se mantienen cerca de la posición inicial –difusión compacta– (De Gennes, 1982). Ello tiene consecuencias sobre la probabilidad de encuentro entre los reactivos. Existen estudios que concluyen que la dimensión espacial de ciertas membranas biológicas, en donde ocurre la reacción enzimática es menor que 2 (Kopelman, 1988). Luego, las reacciones enzimáticas en medios intracelulares presentan características cinéticas atípicas, e.g. comportamiento errático por separación de reactivos, ordenes de reacción particularmente grandes y las constantes de velocidad son remplazadas por parámetros cinéticos dependientes del tiempo (Kopelman, 1988).

En los organismos vivos, las enzimas se hallan en el seno de una fase líquida, lo cual es necesario para su locomoción. Durante su recorrido a través del medio, controlado por difusión debido a la falta de mezclado, entran en contacto con el sustrato para dar inicio a la reacción enzimática. Dentro de un organismo, el transporte se torna difícil debido a la constreñida estructura espacial del medio de reacción, de tal suerte que las hipótesis de homogeneidad y buen mezclado son inadecuadas. En tal escenario consideramos pertinente desarrollar un estudio, *in*

silico, relativo a los efectos de la baja dimensionalidad del medio de reacción ($d < 2$) sobre la evolución de la cinética química del mecanismo de MM. Para iniciar nuestro estudio se escogió MM por ser un sistema dinámico muy simple.

1.3 Sistema dinámico

Se llaman dinámicos aquellos sistemas que sufren variaciones de sus valores, cantidades o propiedades, con el tiempo. Dichos sistemas pueden ser: físicos, químicos, biológicos, sociales, etc. Nos ocuparemos de los que su variación con el tiempo puede expresarse por sistemas de ecuaciones diferenciales, e.g. sistema 1.1.

Los sistemas dinámicos fueron concebidos por primera vez por Henri Poincaré. Actualmente estos sistemas constituyen una de las áreas más estudiadas e importantes de la investigación matemática (Simmons y Krantz, 2007). Muchos sistemas dinámicos, cualquiera que sea su naturaleza, son extremadamente sensibles a los valores de sus condiciones iniciales. Esto pone un límite a la posibilidad de predecir el estado futuro del sistema. En el capítulo 3 el modelo MM se plantea como un sistema dinámico, el cual se resuelve para obtener la evolución temporal de las especies involucradas.

1.3.1 Fractales

En términos sencillos, un fractal es una estructura que está compuesta por pequeñas partes, las cuales son parecidas a la figura original, que se repiten en diferentes escalas (invariante ante dilatación, autosimilitud), desde grandes hasta pequeñas (Mandelbrot, 1977).

El concepto 'fractal' se ha aplicado para describir organismos y estructuras complejas (Warnecke, 1993). Puede representar a una organización compleja a nivel macro o la unidad elemental a nivel micro.

En primera aproximación existen dos tipos de fractales, los deterministas y los aleatorios. Los primeros son aquellos que se construyen de manera iterativa siguiendo una regla bien determinada. Un ejemplo clásico es el de la alfombra de Sierpinski, la cual se construye siguiendo de forma recursiva los siguientes pasos (Figura 1.2):

1. Comenzamos con un cuadrado.
2. El cuadrado se corta en 9 cuadrados congruentes e imaginarios, y eliminamos el cuadrado central (cuadro de color ■).
3. El paso anterior se aplica recursivamente a cada uno de los 8 cuadrados restantes.

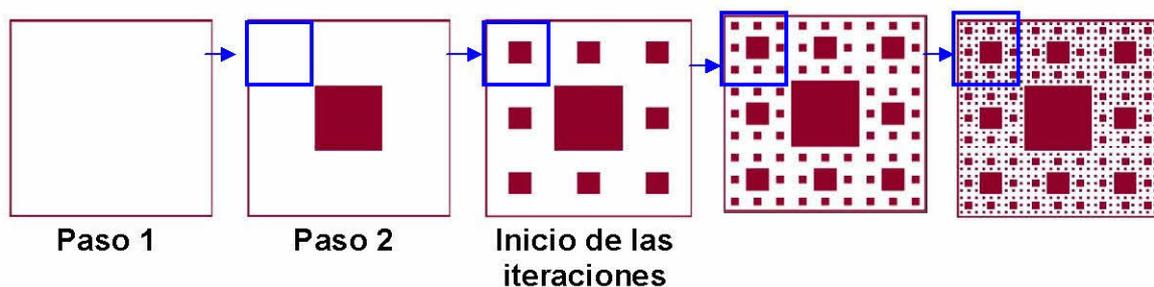


Figura 1.2 Carpeta de Sierpinski construida de forma iterativa y determinista.

Ahora, para ejemplificar la construcción de un fractal aleatorio, construiremos la misma carpeta pero con un factor aleatorio, para ello procedemos de la siguiente manera:

1. Comenzamos con un cuadrado.
2. El cuadrado se corta en 9 cuadrados de igual tamaño, y eliminamos uno de los cuadrados de forma aleatoria (cuadro de color ■).
3. El paso anterior se repite recursivamente a cada uno de los 8 cuadrados restantes.



Figura 1.3.- Alfombra de Sierpinski, construida de forma aleatoria e iterativa.

Una vez construidas ambas carpetas –la aleatoria y la determinista– podemos observar que entre ellas existe una gran diferencia, la apariencia visual ocasionada por la forma de elegir la eliminación de una de sus áreas. En este trabajo se construyeron y utilizaron estructuras fractales aleatorias para modelar el medio de reacción, notablemente cúmulos infinitos en el contexto de la percolación clásica.

Una característica importante de los fractales es que tienen una dimensión Euclídea no entera. La recta tiene dimensión uno ($d=1$), o una figura plana (por

ejemplo un cuadrado) tiene dimensión dos ($d=2$). En el caso de los fractales, la dimensión no es un entero, sino que puede tomar un valor $d=1.7$

Existe varios métodos para la estimación de la dimensión fractal (d_f) en un plano, sólo mencionamos el que se empleara en este trabajo, uno de ellos es conocido como “counting box” o “método de cajas”, empleado para calcular la d_f en objetos que no se subdividen en copias exactas de sí mismo (i.e Figura 1.3), de manera que la d_f , por el método de counting box, se define como:

$$d_f = \lim_{\delta \rightarrow 0} \frac{\ln N_\delta}{\ln \frac{1}{\delta}} \quad (1.8)$$

Donde:

d_f Dimensión fractal.

δ Longitud de la caja.

N_δ Número de cajas.

En el capítulo 2 se presenta un estudio mediante métodos de Monte Carlo. Se presenta la construcción, caracterización y el uso de redes para representar el medio de reacción. El medio de reacción se caracteriza mediante la estimación de su dimensión fractal d_f y de su dimensión espectral d_s .

Los fractales son comunes en la naturaleza, un ejemplo biológico en donde se presenta una autosimilitud desde un nivel macro a uno micro, se puede apreciar en la Figura 1.3 la cual muestra la imagen de un árbol. Allí la Figura “a” presenta cierta similitud con la Figura “b” que es una rama del mismo y a su vez esta rama tiene cierta similitud con una de sus ramitas presentada en la Figura “c”.

En la misma Figura podemos observar que existe cierta similitud entre el árbol y la ramita, (Figuras “a” y “c”, respectivamente). Por lo tanto, se trata de un sistema autosimilar.

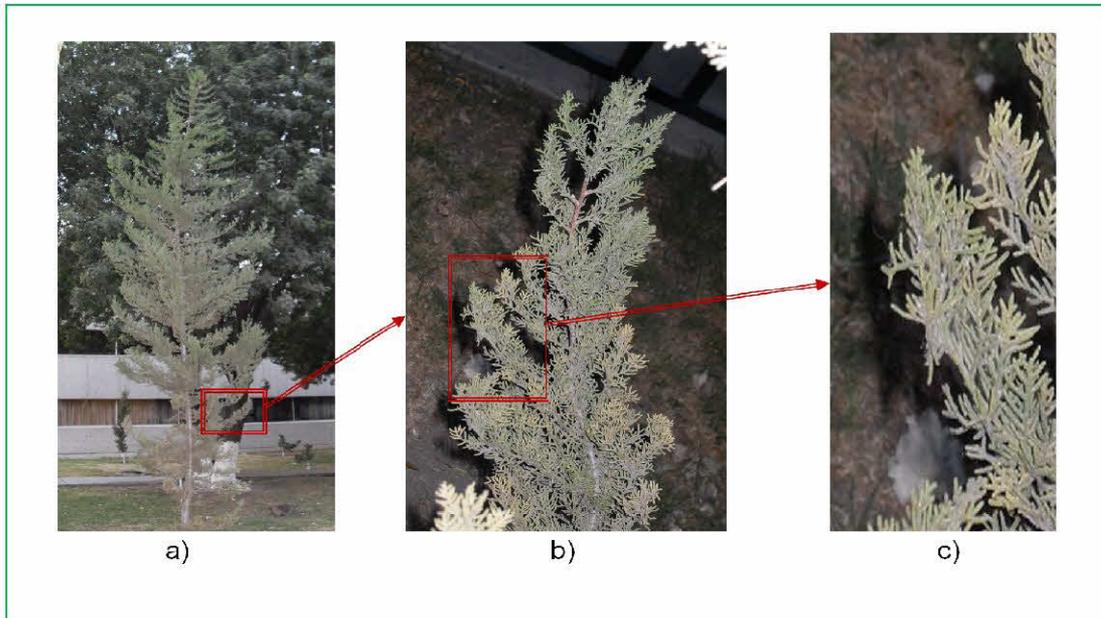


Figura 1.3- Autosimilitud en un árbol. La estructura del árbol, a distintas escalas de observación se muestra invariante.

En la naturaleza existen diferentes ejemplos de fractales como por ejemplo: un árbol (Figura 1.3), una coliflor (Figura 1.4), el brócoli, entre otros. En dichos ejemplos, la totalidad de la planta tiene una gran similitud con sus propias partes ya sea de mediano o menor tamaño. La autosimilitud de un fractal natural tiene un límite puesto que se llega a un tamaño en donde la similitud se pierde, por ejemplo la forma del árbol presentado en la Figura 1.3 en nada se parece a la forma de las células que lo conforman.

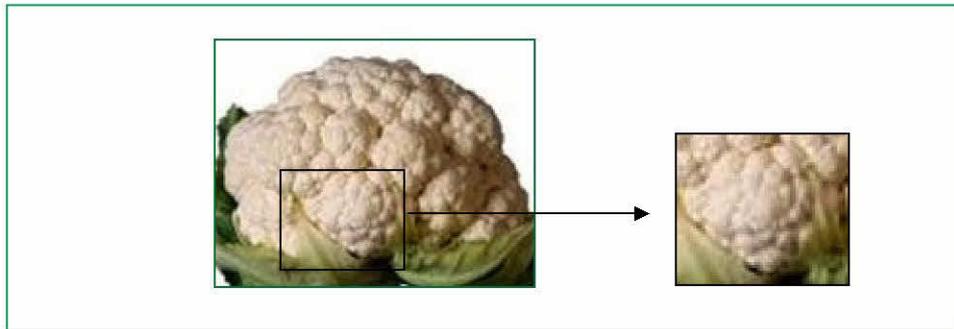


Figura 1.4.- Estructura fractal de una coliflor. Observar que la estructura es invariante ante dilatación.

Eliezer Braun, comenta en su libro *Fractales y cosas raras*, la importancia que tienen los fractales y el caos dentro de la ciencia durante el último cuarto de siglo, refiriendo que los fractales y el caos se encuentran dentro de los campos de ciencias como el de la física, las matemáticas, la biología, la medicina, la economía, la lingüística y otras muchas ramas del saber humano (Braun, 2003). Los fractales son tan abundantes que cada vez son más los investigadores que los involucran en algún campo de interés, buscando con ello tener una representación más adecuada del sistema y luego la obtención de resultados más convincentes (Berry, 2002, Gálvez, 2005, Kopelman, 1988, Marsh, *et al.*, 2006, Meraz, *et al.*, 2004). En el caso de la cinética química, la introducción de la herramienta fractal a dado lugar a lo que se conoce como la cinética química fractal, que a continuación se describe.

1.3.2 Cinética química fractal

La ecuación convencional para describir la velocidad de reacción de un sistema enzimático (ecuación 1.6) no resulta adecuada para describir el comportamiento cinético presentado por sistemas enzimáticos evolucionando en el seno de un medio tortuoso y mal agitado (e.g. membranas biológicas).

Cuando una reacción química se desarrolla en un ambiente carente de mezclado y en el seno de un sistema tortuoso, en el cual la difusión de los reactivos se torna difícil, la constante cinética se ve reemplazada por un coeficiente que depende del tiempo. Para el caso de reacciones bimoleculares, Kopelman (1988) propone que esta variación sigue una ley de potencia de la forma:

$$k_1 = k_0 t^{-h} \quad (1.9)$$

Donde:

t Representa el tiempo de reacción.

h Es una constante, cuyos valores se encuentran entre cero y uno.

Hugues Berry (2002), mediante métodos de Montecarlo, estudia el sistema representado por la ecuación 1.1 (MM). Él hace que dicha reacción se desarrolle en redes $2d$ sin correlación espacial. La fractalidad del sistema es introducida por el bloqueo aleatorio de los elementos de la red, *i.e.* a mayor presencia de obstáculos, el medio de reacción se vuelve más tortuoso y el transporte difusivo de los reactivos es más difícil. Sus resultados indican una fuerte influencia de la fractalidad sobre la cinética de MM. Este trabajo es una extensión del trabajo de

Berry, aquí abordamos el estudio del sistema MM evolucionando en el seno de un medio de reacción que presenta correlaciones espaciales. Las estructuras aleatorias son raras en la naturaleza, la gran mayoría de las estructuras presentan correlaciones espaciales lo cual redundaría en el valor de la dimensión espectral del sistema que a continuación definimos.

1.3.3 Dimensión espectral

Para introducir la variación del coeficiente cinético, consideramos la ecuación 1.9 propuesta por Kopelman (1988) en donde h se define como:

$$h = 1 - \frac{d_s}{2} \quad (1.10)$$

Donde:

d_s Es la dimensión espectral o fracton

La d_s es involucrada por Kopelman (1988) en las reacciones bimoleculares que se llevan a cabo en medios tortuosos y con pobre agitación. Alexander y Orbach (1982) han conjeturado que la dimensión espectral es de $4/3$ en medios tortuosos, en todas las dimensiones mayores a uno. Ha habido numerosas tentativas de probar o refutar este notable resultado, no obstante esta conjetura ha demostrado ser una buena aproximación para la difusión de una partícula con movimiento al azar en medios tortuosos (Ben-Avraham y Havlin, 2004).

La dimensión espectral se define de la siguiente manera (Meraz, *et al.*, 2004).

$$d_s = \frac{2d_f}{d_w} \quad (1.11)$$

Donde:

d_f Es la dimensión fractal del medio de reacción

d_w Es la dimensión fractal de la trayectoria que toma una partícula que se mueve por difusión en el seno del medio de reacción

Como se puede ver no solo se toma en cuenta la dimensión fractal del sistema, sino también la dimensión fractal del camino aleatorio que toma la partícula durante su difusión en un medio heterogéneo. Luego el valor que caracteriza la difusión de una partícula al interior del sistema bajo estudio es la dimensión espectral.

Para estudiar la cinética química de reacciones enzimáticas ocurriendo *in vivo*, la hipótesis tradicionalmente aceptada del estado estacionario para la concentración del complejo merece ser revisada. En este trabajo nos avocaremos a ello. El mecanismo de MM será simulado evolucionando en el seno de un medio tortuoso y carente de mezclado. Este sistema se estudiará numéricamente bajo una aproximación de tipo cinética química fractal para la etapa bimolecular (*c.f.* Capítulo 3). Además se contempla el desarrollo de un autómata celular semejante al desarrollado por Berry (2002) utilizando redes aleatorias, pero nosotros utilizamos redes con distintas correlaciones espaciales entre los elementos

constituyentes de la red (*c.f.* Capítulo 2). Se usarán algoritmos de Monte Carlo, para modelar el transporte de las especies en las redes $2d$ correlacionadas con conectividad igual a cuatro (Cordero, 2002) Algunas de las interrogantes que motivan este trabajo son ¿Qué efecto tiene la correlación espacial del medio de reacción sobre el desarrollo de la difusión? y ¿Se mantiene, en redes correlacionadas, la conjetura de Alexander y Orbach (1982)?

1.4 Método estocástico

1.4.1 Sistemas estocásticos

El término estocástico se refiere a lo relativo al azar. Un sistema estocástico (también es conocido como no determinista) se emplea para aquellos procesos que involucran el azar. Para el estudio de dichos sistemas, lo único que se necesita es definir las características iniciales y dejar que todo lo que ocurra dentro, sea producto de un conjunto de probabilidades.

1.4.2 Método de Monte Carlo

El método de Monte Carlo es un método no determinista o estadístico numérico, usado para aproximar expresiones matemáticas complejas y costosas de evaluar con exactitud; se atribuye a Stan Ulam (Aspray, 1993). Él advirtió que resulta mucho más simple tener una idea del resultado general del solitario haciendo pruebas múltiples con las cartas y contando las proporciones de los

resultados, que computar todas las posibilidades de combinación formalmente. Se le ocurrió que esta misma observación debía aplicarse a su trabajo de Los Álamos sobre difusión de neutrones, para la cual resulta prácticamente imposible solucionar las ecuaciones íntegro-diferenciales que gobiernan la dispersión, la absorción y la fisión. "La idea consistía en probar con experimentos mentales las miles de posibilidades, y en cada etapa, determinar por casualidad, por un número aleatorio distribuido según las probabilidades, qué sucedería y totalizar todas las posibilidades y tener una idea de la conducta del proceso físico" (Aspray, 1993).

El método de Monte Carlo proporciona soluciones aproximadas a una gran variedad de problemas matemáticos, posibilitando la realización de experimentos con muestreos de números pseudoaleatorios en una computadora. El método es aplicable a cualquier tipo de problema, ya sea estocástico o determinista. A diferencia de los métodos numéricos que se basan en evaluaciones en N puntos en un espacio M -dimensional para producir una solución aproximada, el método de Monte Carlo (MC) tiene un error absoluto de la estimación que decrece cuando N es muy grande.

Un estudio que se debe citar, donde se ha utilizado MC en un sistema biológico y precisamente en el estudio de una cinética tipo fractal en un plano, es el realizado por Berry (2002), quien observa que la cinética de MM es de tipo fractal cuando esta ocurre en medios de reacción tortuosos representados por redes con un bloqueo parcial de sus sitios (similares a membranas biológicas según Berry), los sitios bloqueados se escogen de manera aleatoria.

1.4.3 Medio de reacción representado por una red numérica

Los medios porosos se encuentran constituidos por dos fases: La fase porosa (hueca o vacía) y la sólida. La fase porosa, Cordero (1998) la considera como un sistema que puede descomponerse en sitios y enlaces, donde se considera la existencia de entidades huecas relativamente pequeñas (enlaces) que comunican a los poros más grandes (sitios), ver Figura 1.5. Esta descomposición es la base del modelo dual (para una presentación exhaustiva de este modelo consultar Cordero (1998)).

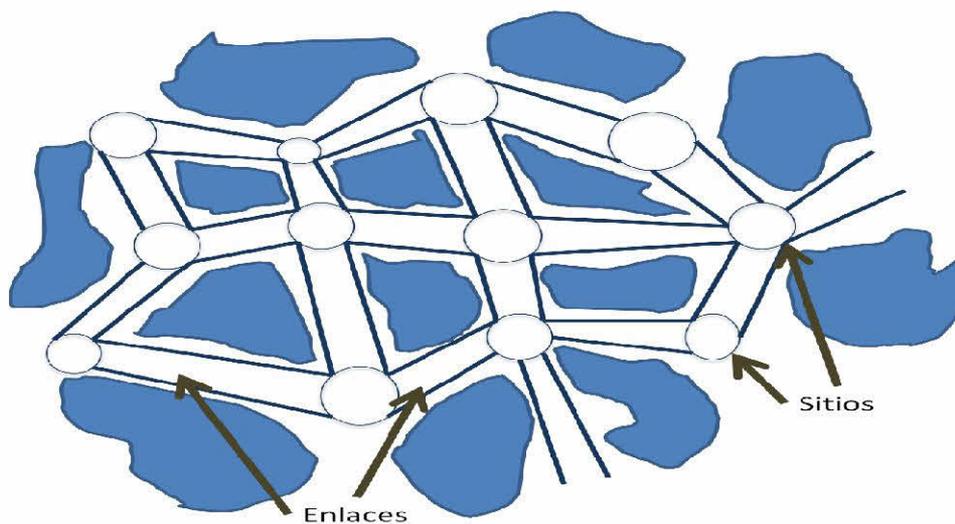


Figura 1.5 Representación esquemática de un medio poroso, donde se distinguen los sitios de los enlaces.

En la descripción dual del espacio poroso se establecen ambas, una función de distribución de tamaño de sitios y una distribución de tamaños para los

enlaces. Estas distribuciones de tamaños, pueden o no estar traslapadas, como se ilustra en la Figura 1.6.

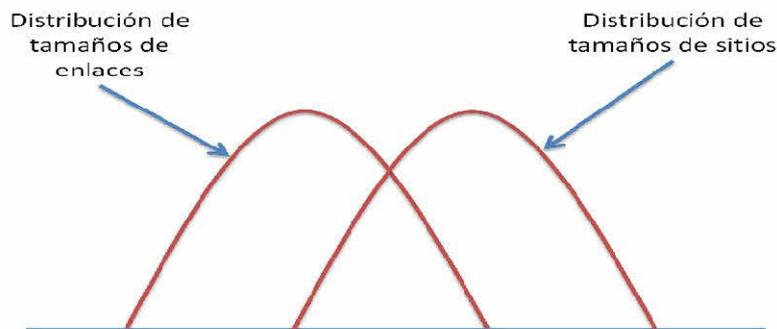


Figura 1.6 Posición relativa de las distribuciones de tamaños de enlaces y de sitios.

1.4.3.1 Traslape y longitud de correlación

Cuando existe una intersección entre las curvas que representan a las distribuciones de tamaños de sitios y enlaces, entonces se dice que hay, entre ellas, un traslape (Ω) mayor que cero. Los valores del traslape se encuentran entre 0 y 1. En la Figura 1.7 se pueden apreciar distintos valores de Ω .

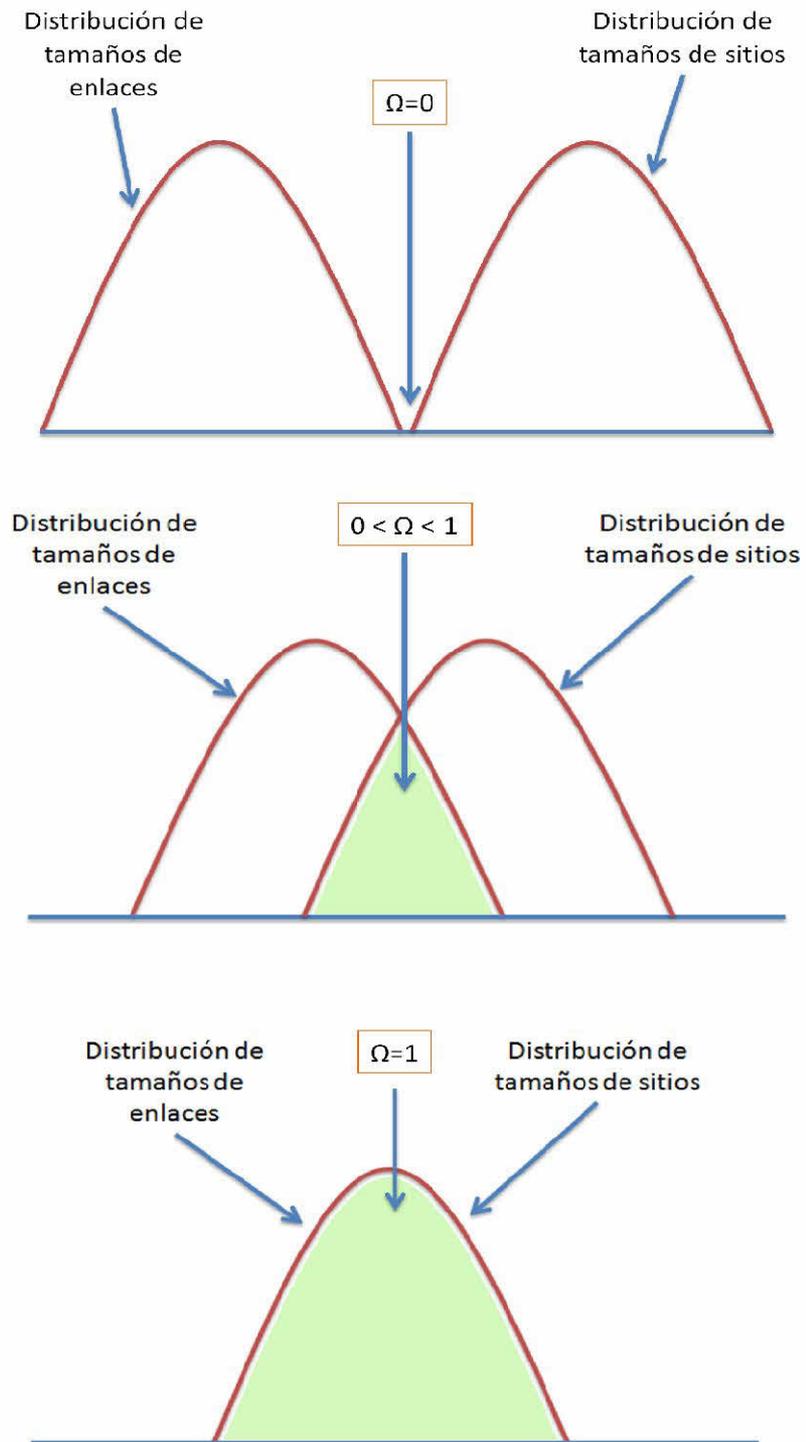


Figura 1.7 Las distribuciones de sitios y enlaces pueden presentar un cierto traslape (Ω).

La longitud de correlación, l_o es una función de Ω , y su valor se estima de manera aproximada mediante la relación empírica siguiente (Rojas, *et al.*, 1993).

$$l_o = \frac{\Omega}{1 - \Omega} \quad (1.12)$$

La longitud de correlación representa, en unidades de red, la longitud característica del sistema, *i.e.* el radio promedio de las zonas formadas por elementos de tamaños parecidos (*i.e.* hasta donde influye el tamaño de un elemento sobre el tamaño de los elementos que le rodean y viceversa). En este trabajo, las redes con diversas longitudes de correlación son generadas mediante el algoritmo presentado en Cordero (1998). Cualquier red aquí presentada puede simular algún tipo de membrana celular.

En nuestro trabajo solo se considera el tamaño de los sitios. Éstos se designan como zonas permeables (celdas) o zonas impermeables (obstáculos), en función de su tamaño.

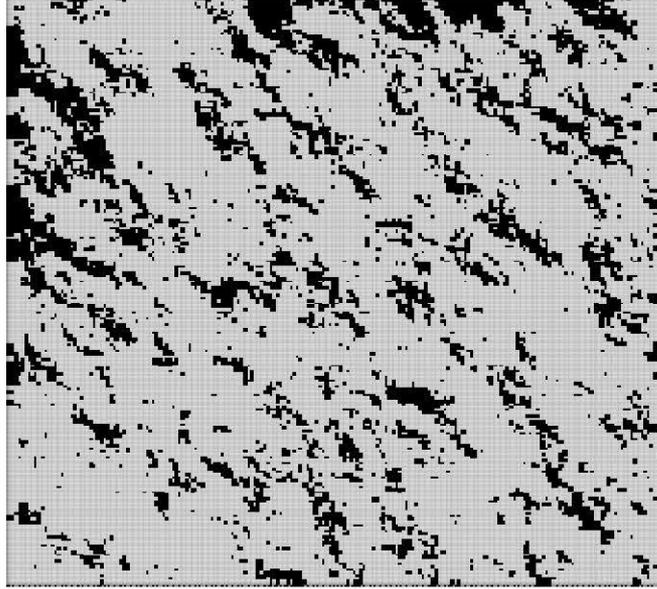


Figura 1.8.- Ejemplo de un medio de reacción de tamaño 200 x 200 (sitios). El área de color negro representa los obstáculos en la red, y el área de color gris claro es el espacio vacío que puede ser ocupado por un fluido.

La Figura 1.8 es un ejemplo de una red cuadrada de un tamaño de 200x200 sitios, dicha red simula un medio donde un fluido puede transitar por todo el espacio vacío disponible. En dicha red se cuenta con la presencia de obstáculos que deben ser contorneados por el fluido. Los obstáculos son considerados inertes e insolubles.

1.5 Movimiento Browniano

La idea de modelar la difusión como un movimiento al azar se desarrolló en 1827, por el botánico británico Robert Brown. Él observó con un microscopio a las partículas de polen (con un diámetro aproximado de $5 \mu\text{m}$) que se encontraban suspendidas en un medio acuoso. También se dio cuenta que las partículas mostraban un movimiento constante cuya dirección cambiaba de forma aleatoria, dicho movimiento es conocido como “movimiento browniano”. El movimiento de las partículas está dirigido por las colisiones con las partículas del líquido (Engel y Reid, 2006).

El desplazamiento aleatorio de partículas ha sido descrito por la ecuación 1.13, dicho desplazamiento se encuentra en función del tiempo y la dimensión fractal de la trayectoria del caminante (Ben-Avraham y Havlin, 2004).

$$\langle r^2(t) \rangle \propto t^{2/d_w} \quad (1.13)$$

Donde:

r Distancia recorrida por el caminante aleatorio.

t tiempo

d_w dimensión fractal de la trayectoria descrita por el caminante

En la Figura 1.9 se ilustran las trayectorias seguidas por una partícula con movimiento browniano sobre un plano; el punto de partida corresponde a la coordenada (0,0). Sí en el plano valor de 'x' o de 'y' aumenta o disminuye una unidad se considera como un movimiento. Después de 1000 movimientos aleatorios la coordenada final es (-9,-8). Esto es de gran utilidad para la estimación de la d_w de las diferentes redes construidas. La d_w es necesaria para la estimación de la d_s la cual caracteriza nuestras redes.

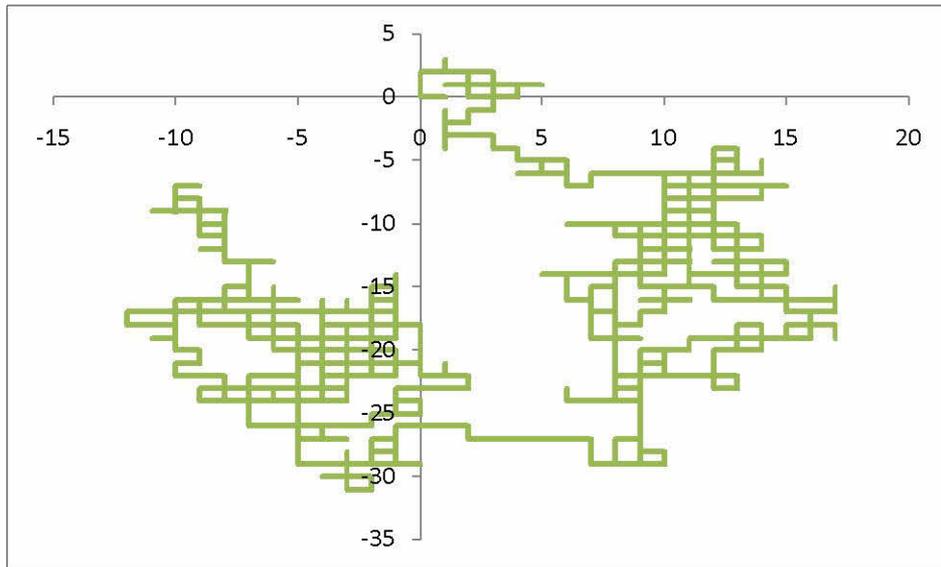


Figura 1.9.- Trayectoria recorrida por un caminante aleatorio después de 1000 pasos. La trayectoria descrita puede ser caracterizada mediante una dimensión fractal que se identifica como d_w .

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA Y RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTOCÁSTICO

Resumen

En este capítulo presentamos la metodología utilizada y los resultados obtenidos a partir de simulaciones numéricas de la cinética enzimática de Michaelis-Menten (MM) en medios tortuosos. Los medios de reacción utilizados son caracterizados mediante la estimación de su dimensión espectral (d_s). Los resultados obtenidos señalan que el establecimiento de un estado estacionario para el complejo enzima-sustrato es poco probable en el contexto de un medio de reacción tortuoso y mal agitado, señalando así la no aplicación de la hipótesis del rápido establecimiento de un estado estacionario para el complejo; hipótesis tradicionalmente aceptada para el estudio de este sistema.

2.1 Arquitectura de las redes numéricas

En primer lugar, se construyeron redes numéricas conformadas por sitios y enlaces, con conectividad de 4 (c.f. Figura 1.5). Para construir una red cuadrada el procedimiento fue el siguiente (Cordero, 1998).

1. Se genera aleatoriamente el tamaño de un sitio, que se encuentre dentro de la distribución normal, asignada para sitios, *c.f.* Figura 1.7.
2. El sitio generado deberá ser seguido por un enlace y por ello, se genera aleatoriamente el tamaño de un enlace, dentro de su distribución normal, cuyo tamaño deberá ser menor o igual al sitio que le antecede.
3. Se repiten los pasos 1 y 2 hasta completar una fila con la dimensión de 200 sitios y 200 enlaces.
4. Se repite de manera similar el paso anterior, sólo que ahora se completa una columna. Como resultado se obtiene la primera columna y la primera fila unidos por el tamaño de un sitio (vértice de la red).
5. Los tamaños de los elementos restantes de la red se determinan haciendo crecer la red partiendo de su vértice; es decir, primero se determinan los sitios y enlaces de una red del tamaño de 1x1, después esta misma red se extiende al tamaño 2x2, y así sucesivamente hasta llegar al tamaño deseado (200x200).

Como se acaba de indicar en el algoritmo anterior, las redes que se construyen se conforman por sitios y enlaces, ambos son representados por números, razón por la cual se les conoce como redes numéricas. Una característica muy importante es que cada sitio debe de ser conectado con otro sitio por medio de un enlace y éste debe de tener un valor numérico menor o igual al valor numérico de los sitios que conecta.

Las redes construidas presentan distintas correlaciones espaciales entre sus elementos constitutivos. Sus tamaños son de 200x200 sitios, el radio promedio de enlaces es de 200 y el radio promedio de sitios es de 202, 204, 206, 208 y 230 (en distintas redes) con una desviación estándar (para sitios y enlaces) de 10 unidades. Haciendo variar el traslape de las distribuciones de sitios y

enlaces, se genera un banco de redes numéricas, *c.f.* Tabla 2.1, con longitudes de correlación de 11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r. (unidades de red).

Una vez construidas las redes numéricas, todos los enlaces fueron eliminados ya que su única función, para este trabajo, fue el de generar redes numéricamente correlacionadas. De esta manera sólo trabajamos con redes numéricas conformadas por sitios y éstas son consideradas como matrices cuyas entradas son representadas por los sitios.

2.2 Bloqueo de sitios

En cada red numérica construida se eligió y se bloqueó un porcentaje de sitios (10, 20, 30 o 40 % sobre el número total de sitios en la red), empezando por los más pequeños. Estos diferentes niveles de bloqueo se escogieron para contar con una variedad de redes con diferentes características, *c.f.* Tabla 2.1. Una vez seleccionados los sitios (los más pequeños), se les bloquea y se les renombra como sitios bloqueados o simplemente obstáculos, y al resto de los sitios se les renombra como celdas. De esta manera se obtienen redes binarizadas formadas por espacios impermeables (sitios bloqueados) y permeables (celdas).

El porcentaje máximo de obstáculos fue de 40%, este porcentaje se encuentra dentro del límite de obstáculos necesarios para la existencia de un “cúmulo infinito de percolación” (el porcentaje límite es de 40.73%, Sahimi, (1994)).

Longitud de Correlación (u.r.)	% obstáculos (sitios bloqueados)	Número de redes generadas para cada caso
11.55	10, 20, 30 y 40	20
5.31	10, 20, 30 y 40	20
3.24	10, 20, 30 y 40	20
2.22	10, 20, 30 y 40	20
0.15	10, 20, 30 y 40	20
0	0	20

Tabla 2.1 Redes generadas, porcentaje de sitios bloqueados y la longitud de correlación estimada.

La Tabla 2.1 presenta las redes construidas, la cantidad de sitios bloqueados y la distribución espacial de los mismos, caracterizada por la longitud de correlación. En total se utilizaron 420 redes. Todas las redes se construyeron en código C++. Por cada valor de longitud de correlación (excepto para la longitud de correlación igual a cero, *i.e.* una red aleatoria) se generaron 80 redes, de las cuales cada 20 contenían un: 10, 20, 30 y 40% de obstáculos respectivamente.

2.3 Establecimiento de condiciones periódicas

El establecimiento de esta condición es requerido para homogenizar la probabilidad de reacción en todas las zonas del medio de reacción. Para ello cada celda contenida en el medio debe de tener una conectividad de 4; *i.e.*, cada celda tendrá permitido interactuar con las cuatro de las celdas que la rodean y estas son conocidas como “primeros vecinos”, las cuales se encuentran: arriba abajo y en ambos lados (derecho e izquierdo), esto lo podemos visualizar en la Figura 2.1 que representa a las partículas sustrato (S) y enzima (E), contenidas en una red cuadrada.

	1	2	3	4	5	
1	■	E	■	E	S	
2	S		E	S	■	
3		S	S	■	E	
4	■	E	S	S		
5	S		E		S	

Figura 2.1, Red cuadrada de 5x5. Observar los primeros vecinos (celdas con fondo ■) de una de las partículas de sustrato (S), cuya coordenadas corresponde (3,3). Las celdas consideradas como bloqueadas se representan con fondo con la tonalidad de “■”.

Para cumplir con una conectividad 4 para todas las celdas, se establecen reglas de contorno para todas aquellas celdas que se encuentren en las orillas del medio de reacción.

La mayoría de las celdas localizadas en las orillas cuentan solamente con 3 primeros vecinos, por lo tanto fue necesario asignarles un vecino de contorno (primer vecino de un extremo de la matriz). De esta manera lograr que su conectividad sea 4. Para las celdas que se encuentran en las orillas en la parte izquierda se les asigna como uno de los primeros vecinos a la celda de la orilla de la parte derecha, localizada en la misma fila y viceversa. Para las celdas localizadas en la parte superior de la red, se les asigna como vecino la última celda de la misma columna y viceversa (*c.f.* Figura 2.2).

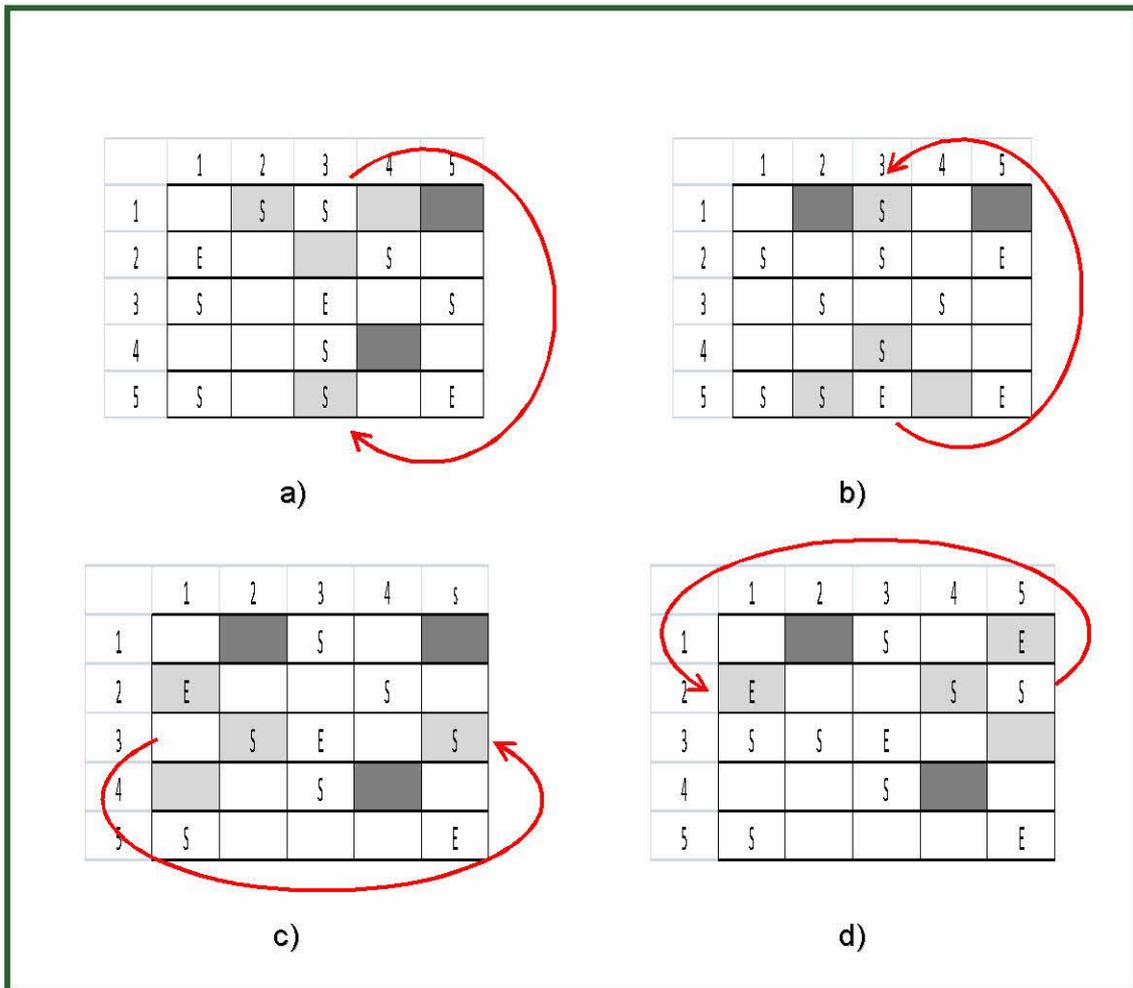


Figura 2.2, Esquema de las condiciones periódicas en un medio de reacción con conectividad 4. Son considerados como primeros vecinos los elementos ubicados en los extremos de toda columna o renglón en la matriz representando el medio de reacción, las entradas de color gris oscuro son celdas obstaculizadas siendo considerado como primero vecino puesto que son elementos de la matriz. Además se muestran algunas partículas de reacción dentro: el sustrato y la enzima.

Una vez señaladas las condiciones de contorno, se menciona el caso de las celdas ubicadas en las esquinas, las cuales solo cuentan con dos primeros vecinos, por lo tanto se les asigna dos vecinos de contorno, como se ilustra en la Figura 2.3.

	1	2	3	4	5
1	S		S		S
2					S
3	S		S	E	
4		S			E
5	E			S	S

Figura 2.3, Asignación de primeros vecinos para los elementos ubicados en las esquinas. Red cuadrada de 5x5, donde se muestran los primeros vecinos (celdas con fondo ■) de la celda (5,5), los cuales dos son de contorno y dos primeros vecinos.

De esta manera se establece un sistema de conectividad uniforme, donde las partículas que se encuentren en la periferia de la matriz tengan las mismas probabilidades de reaccionar que las que se encuentren al interior.

2.4 Visualización de redes

En la Figura 2.4, se muestra una red construida en la cual no se ha establecido ningún obstáculo (*i.e.* todas las entradas de la matriz son accesibles a los reactivos). Este tipo de red es adecuado para simular una reacción con buen

mezclado (e.g. reacciones *in vitro*). El sistema presenta una dimensión euclídea $d=2$ (no se toma en cuenta el volumen ocupado por las partículas reactivas).

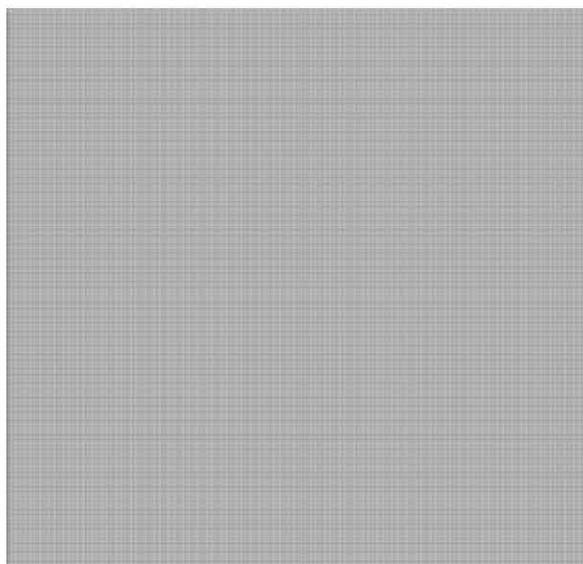


Figura 2.4. Red de 200x200 celdas. Toda la red es permeable al paso de los reactivos.

Para la obtención de medios de reacción caracterizados por dimensiones fractales menores que 2, es necesario realizar la siembra de los obstáculos (*i.e.* asignar las posiciones en la red de las celdas que son inaccesibles para los reactivos), los cuales permanecerán fijos e inertes durante toda la reacción. En la Figura 2.5 se ilustran 5 redes con diferentes longitudes de correlación (11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r.) con el 10% de las celdas ocupadas por obstáculos. A observar que la principal diferencia entre ellas radica en la distribución espacial de los obstáculos, dicha distribución se encuentra en función de la longitud de correlación. Mientras menor sea la longitud de correlación, la dispersión de los obstáculos será mayor (*c.f.* Figuras 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8).

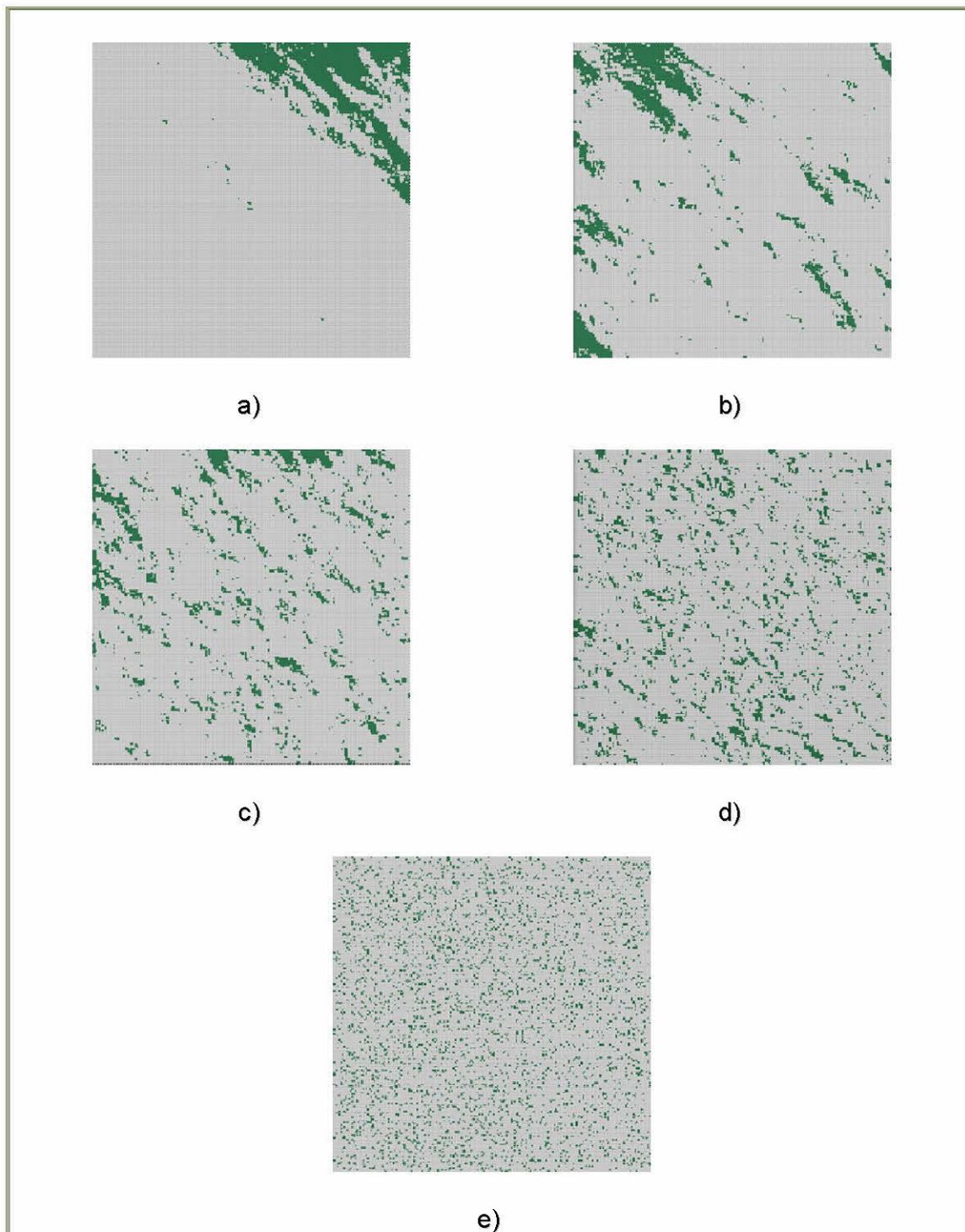


Figura 2.5. Conjunto de redes con 10% de celdas bloqueadas (■) y el resto representan espacios permeables (□) por donde podría percolar un fluido. Los obstáculos fueron sembrados en redes con longitudes de correlación de: 11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r.; representados en las imágenes: a, b, c, d y e, respectivamente.

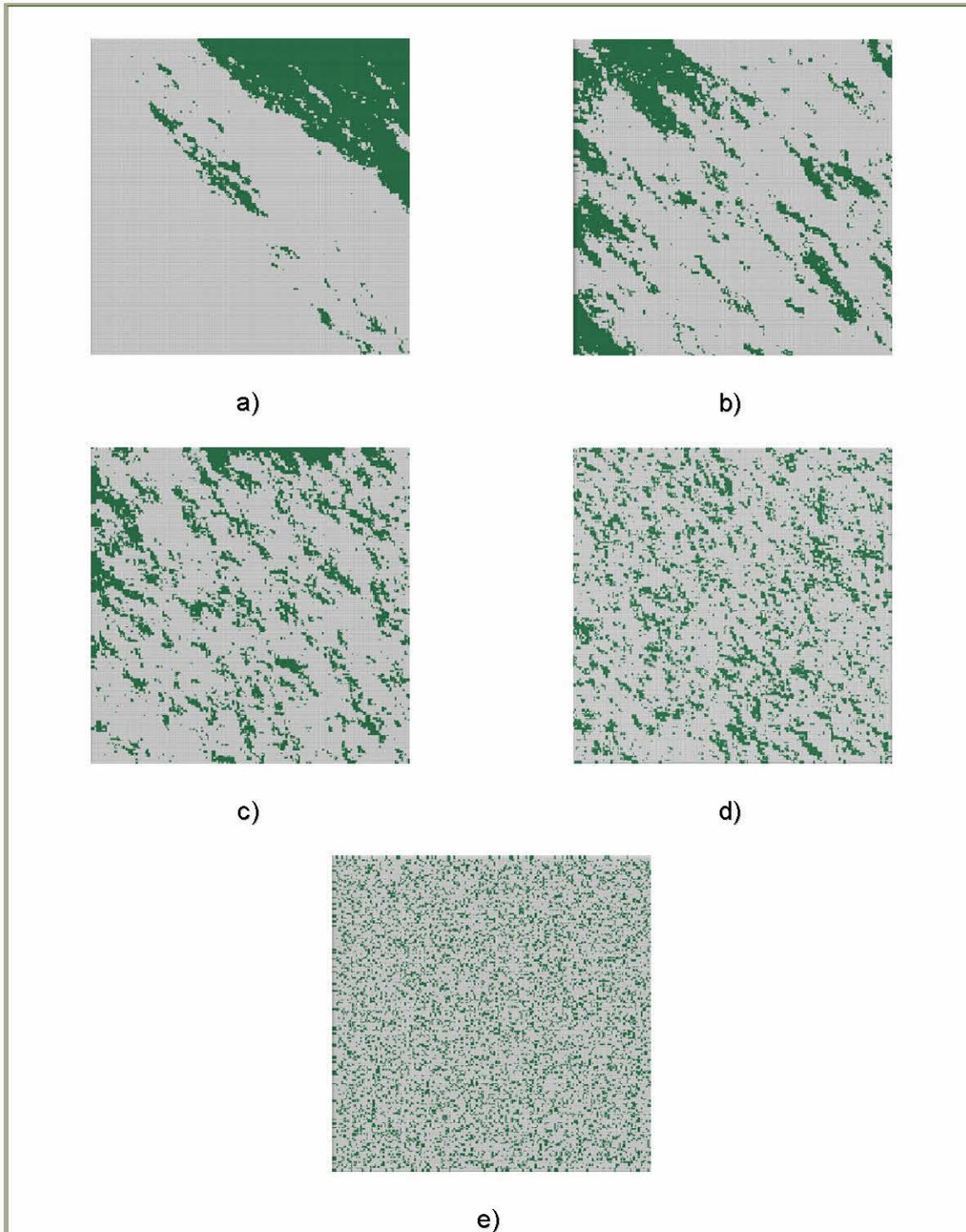


Figura 2.6. Conjunto de redes con un 20% de celdas ocupadas por obstáculos (■) y el resto representan espacios vacíos (□) por donde puede percolar un fluido. Los obstáculos fueron sembrados en redes con longitudes de correlación de: 11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r.; representados en las imágenes: a, b, c, d y e, respectivamente.

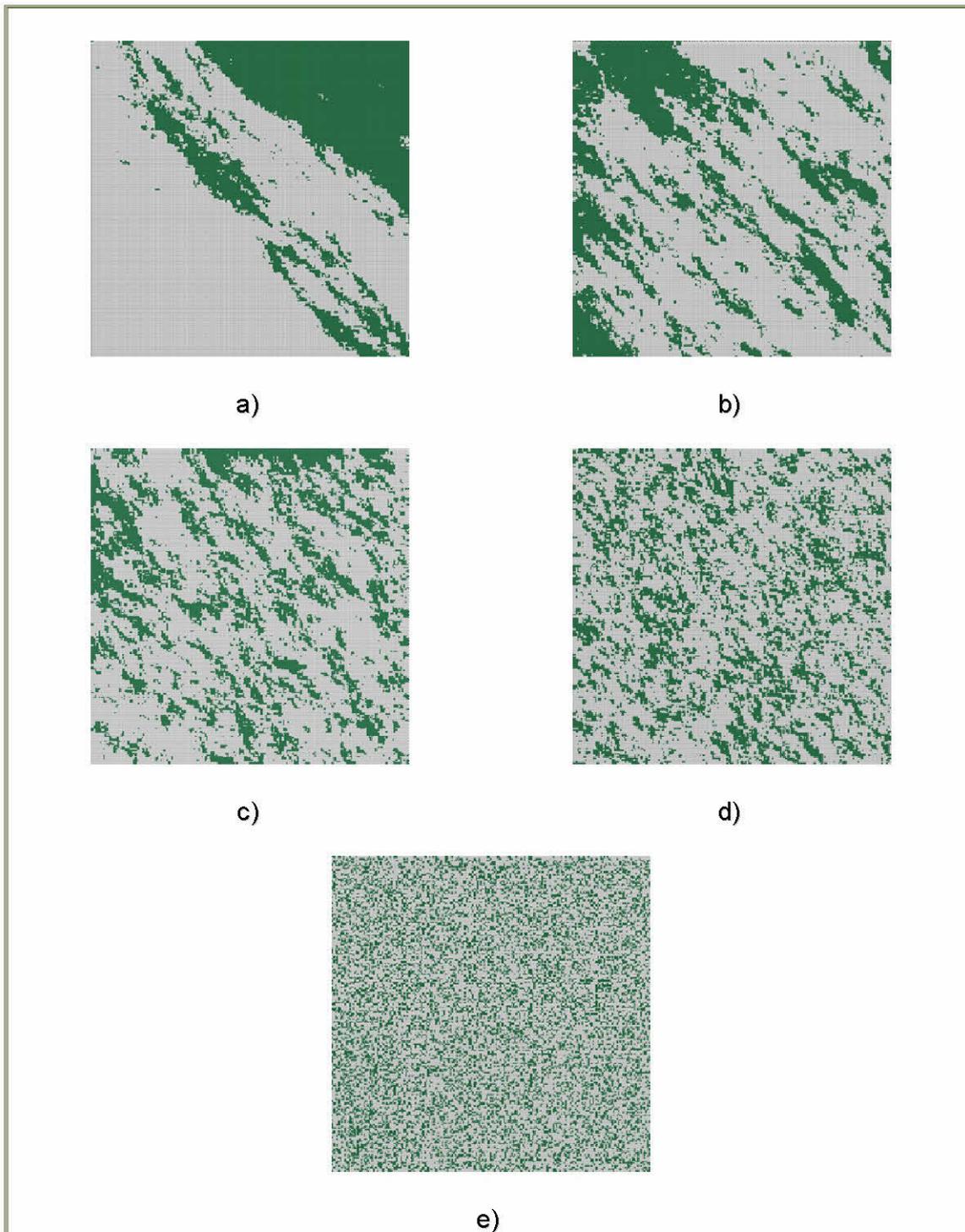


Figura 2.7. Conjunto de redes con un 30% de celdas ocupadas por obstáculos (■) y el resto representan espacios vacíos (□) por donde puede percolar un fluido. Los obstáculos han sido sembrados en los sitios de redes con longitudes de correlación de: 11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15; u.r., representados en las imágenes: a, b, c, d y e, respectivamente.

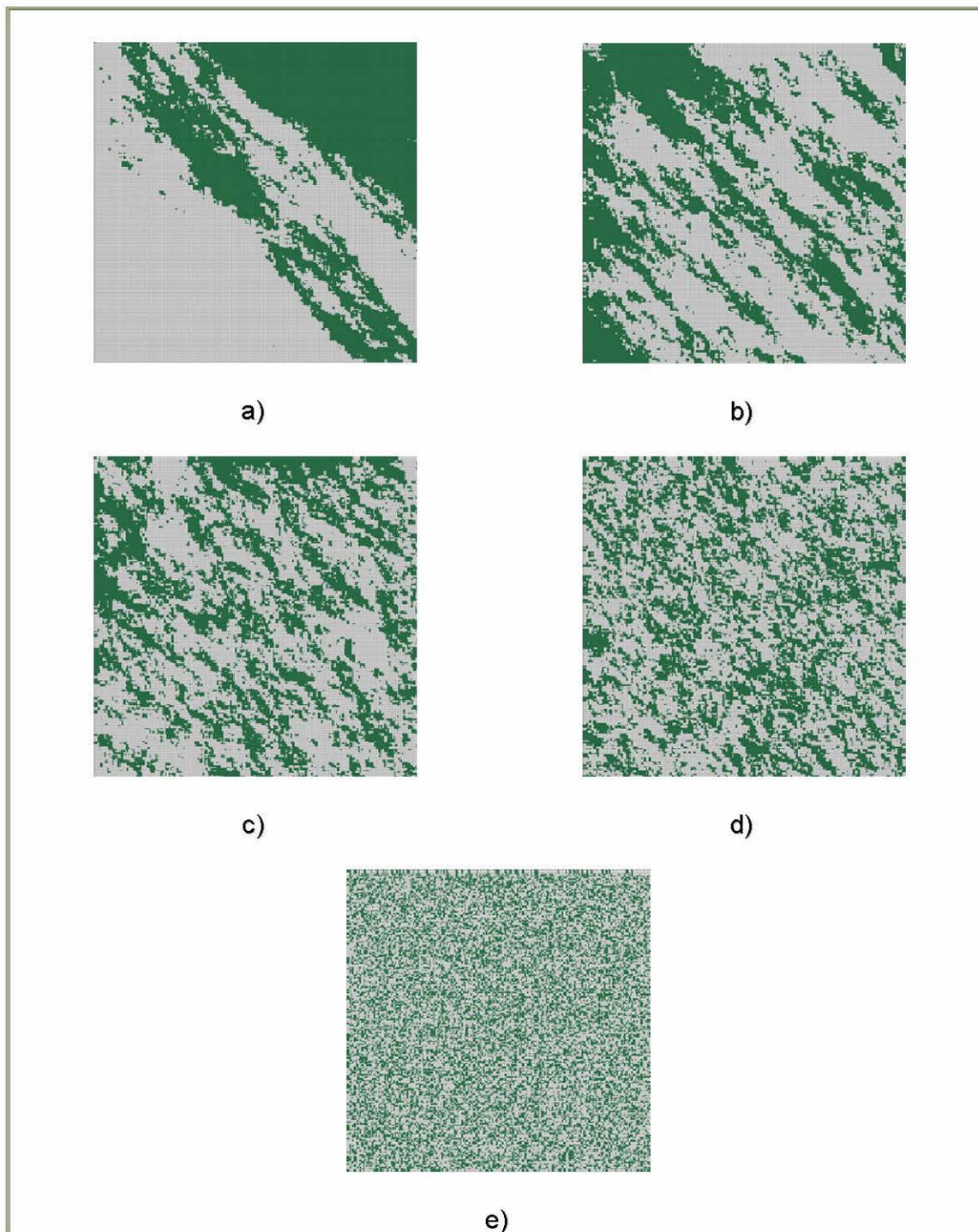


Figura 2.8. Conjunto de redes con un 40% de celdas ocupadas por obstáculos (■) y el resto representan espacios vacíos (□) por donde puede percolar un fluido. Los obstáculos han sido sembrados en redes con longitudes de correlación de: 11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r.; representados en las imágenes: a, b, c, d y e, respectivamente.

En cada una de las Figuras 2.5-2.8, se aprecian diferencias en las imágenes contenidas, a pesar de contener la misma cantidad de obstáculos. La principal diferencia radica en la distribución espacial de los obstáculos; para un valor de bloqueo dado, los obstáculos aparecen más o menos dispersos en función de la longitud de correlación de la red numérica, a mayor longitud de correlación las zonas bloqueadas se tornan más compactas. En efecto, se observa que las redes con una longitud de correlación de 11.55, 5.31 y 3.24 u.r., presentan una repartición de obstáculos densa y anisotrópica (redes anisotrópicas, obliga a un fluido a tomar una dirección preferencial (Cordero, 1998)). En un futuro, este trabajo se extenderá con el uso de redes que no presenten esta última característica.

Para un valor de longitud de correlación y un porcentaje de bloqueo dado, el comportamiento del medio de reacción (red binarizada) se promedia sobre 20 realizaciones. En efecto, sí se contruyen 20 redes con la misma longitud de correlación y con el mismo porcentaje de sitios bloqueados, estas únicamente presentan el mismo comportamiento desde una perspectiva estadística. Obsérvese por ejemplo el comportamiento ilustrado en la Figura 2.9. Todas las redes allí contenidas, tienen la misma longitud de correlación 5.31 y un 30% de las celdas bloqueadas, pero la distribución espacial de los obstáculos es localmente diferente. Estadísticamente son similares, *i.e.* presentan la misma dimensión espectral, $d_s = 1.68$.

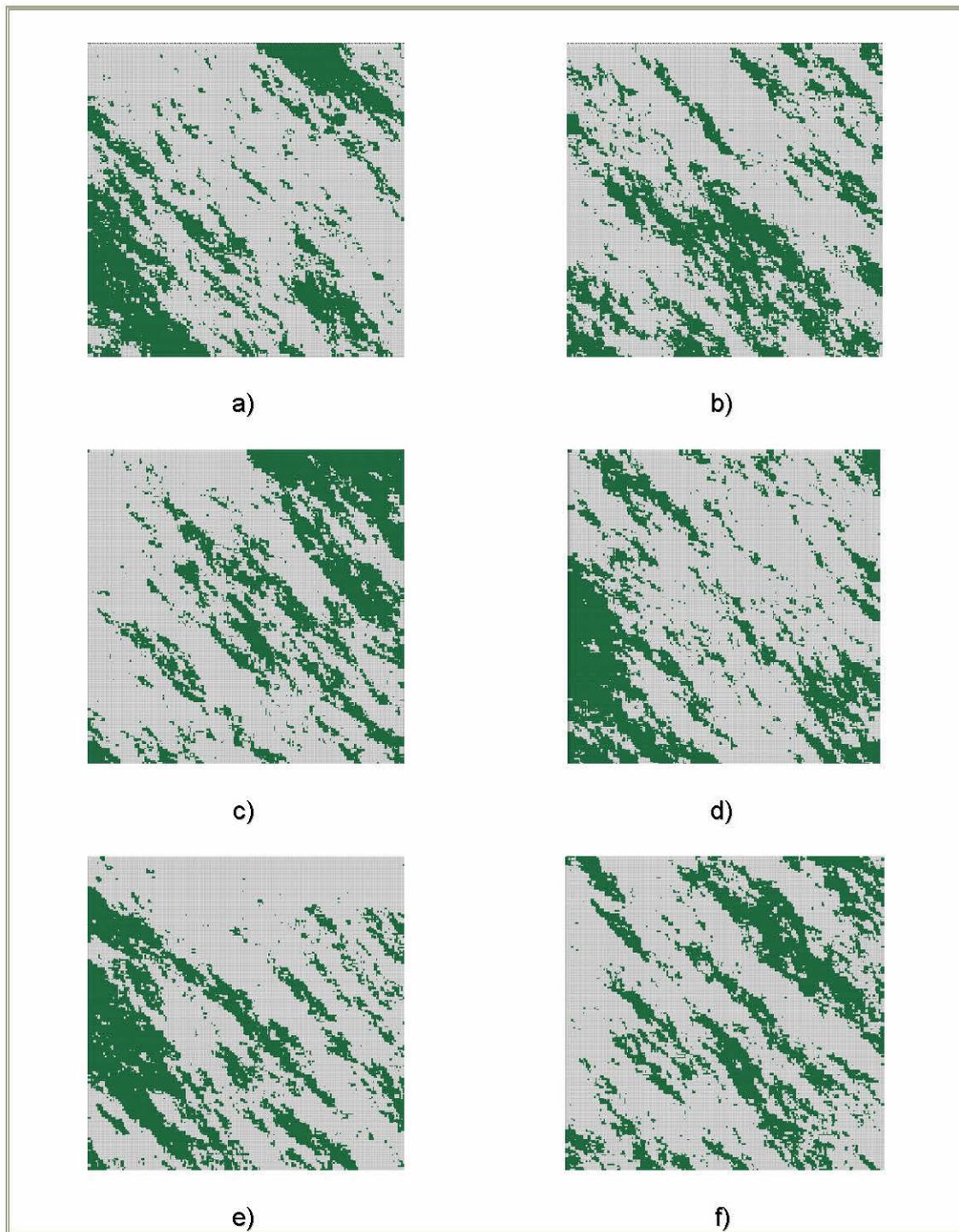


Figura 2.9. Redes binarizadas (a, b, c, d, e y f) con un 30% de celdas bloqueadas (■) y el resto representan espacios permeables a los reactivos (□). Obsérvese que la distribución espacial de los obstáculos es localmente distinta entre cada imagen aun cuando todas tiene una longitud de correlación de: 5.31 u.r. Estadísticamente estas redes son similares como lo indica su dimensión espectral $d_s = 1.68$

Una vez construidas las redes numéricas, y efectuado el proceso de binarización (*i.e.* el establecimiento de las áreas permeables e impermeables), procedemos a caracterizar el medio de reacción mediante la estimación de: la dimensión fractal del caminante aleatorio (d_w), dimensión fractal (d_f) y la dimensión espectral (d_s). Estos valores son esenciales para el estudio fractal de la difusión en un medio tortuoso (López *et al.*, 2007), enfoque que se ha mostrado adecuado para estudiar la cinética química de sistemas mal agitados.

2.5 Estimación de la d_w en los medios de reacción

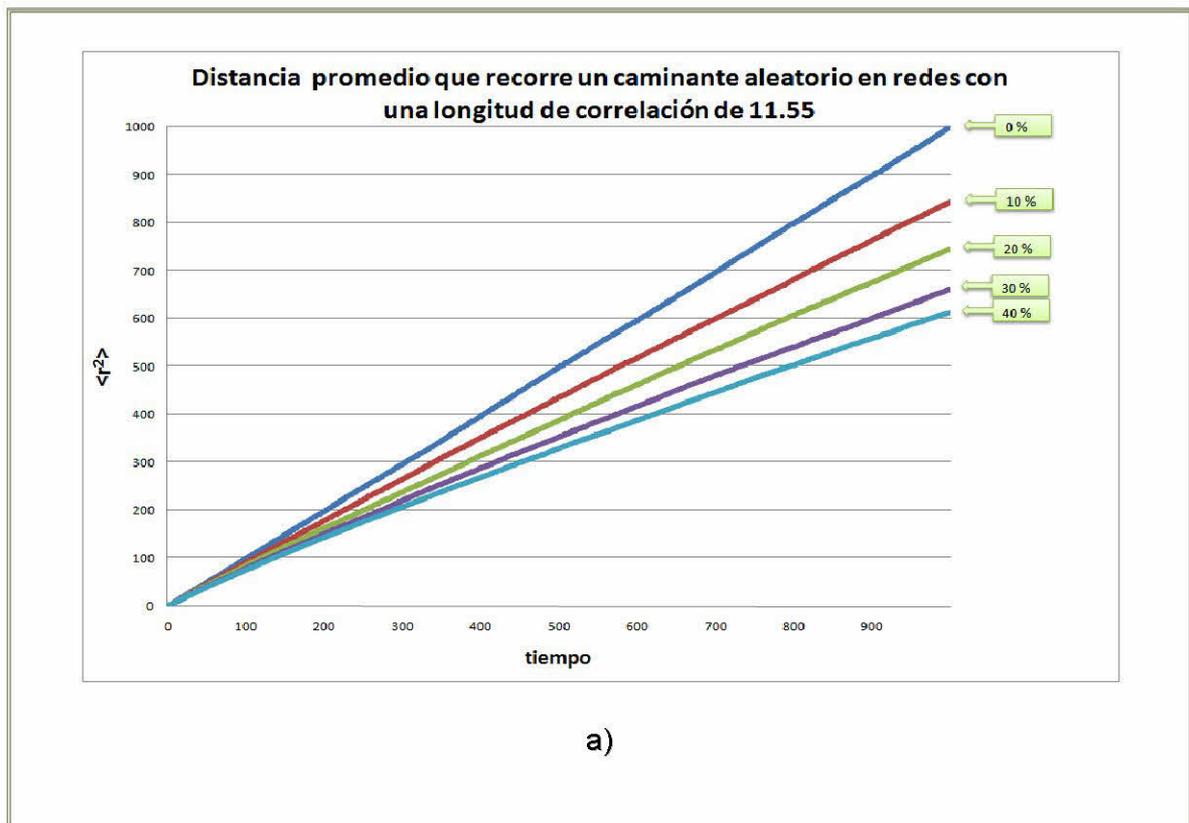
Para estimar d_w , desarrollamos dos etapas: En primer lugar se construyó un código en C++, cuyo algoritmo es el siguiente.

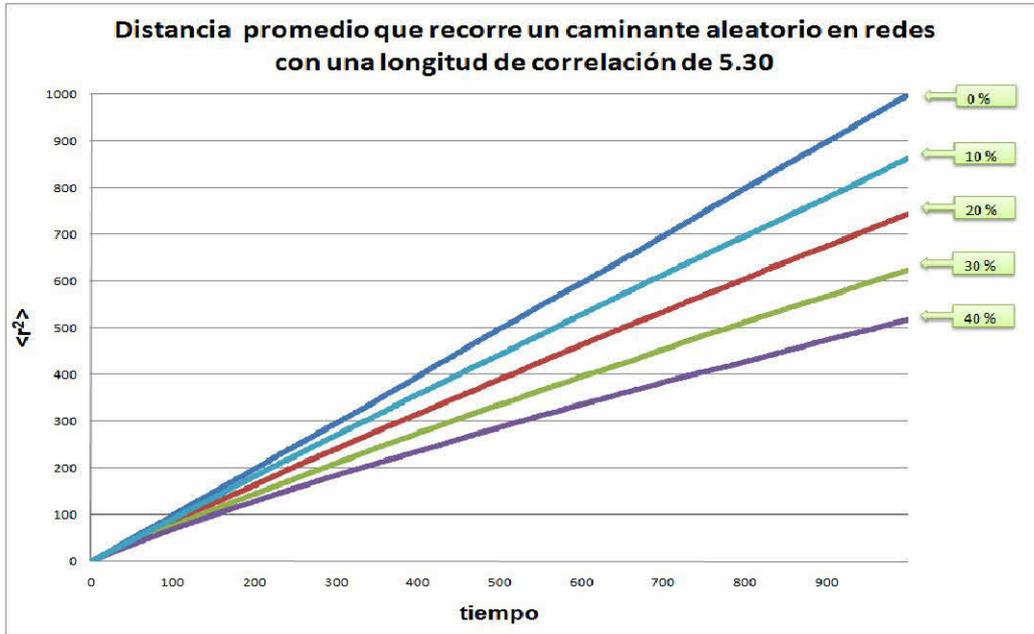
1. Se construye una red bidimensional numérica, 200x200 sitios, con la longitud de correlación deseada (*c.f.* Tabla 2.1)
2. Se elige el porcentaje de sitios – se toman los sitios de menor tamaño en la red – que se quieren obstaculizar, y se les renombra como obstáculos y a los sitios sobrantes como celdas vacías (en este paso las redes numéricas se tornan en binarizadas).
3. De forma aleatoria, se siembra en una celda vacía de la red binarizada una partícula denominado como el caminante aleatorio.
4. Una vez sembrado el caminante, la red se considera como un plano cartesiano y las coordenadas iniciales del caminante son asignadas como ($x=0$, $y=0$). Este estado también se considera como el inicio temporal, $t=0$.

5. Se elige a uno de los cuatro primeros vecinos de manera aleatoria. Sí el vecino elegido es una celda vacía, entonces el caminante avanza para ocupar la posición escogida. Si la celda escogida se encuentra bloqueada, el caminante permanece en su lugar, y se repite el procedimiento.
6. En cualquiera de los dos casos mencionados en el paso anterior los datos se actualizan: el tiempo se incrementa en una unidad, si el caminante avanza hacia la derecha el valor de $x = x+1$, si avanza a la izquierda $x = x-1$, si avanza hacia abajo $y=y-1$, si avanza hacia arriba $y=y+1$. Finalmente si el caminante no avanza las coordenadas correspondientes a 'x' y 'y' no cambian.
7. Una vez actualizadas las coordenadas, se utiliza el teorema de Pitágoras para calcular la distancia recorrida (distancia a vuelo de pájaro) elevada al cuadrado (r^2).
8. Se repite los pasos 5, 6 y 7 hasta $t=1000$, almacenando los datos de r^2 y los valores de 't'.
9. Los pasos del 4 al 8 se repiten 40,000 veces. Acto seguido, se obtiene el promedio de las distancias elevadas al cuadrado ($\langle r^2 \rangle$) para cada valor de 't'. Las $\langle r^2 \rangle$ para cada tiempo son datos almacenados para su posterior uso.
10. Se repiten los pasos del 2 al 9, veinte veces con los mismos valores establecidos en el paso 1.
11. Una vez terminado el paso anterior se calcula el promedio de los 20 valores de $\langle r^2 \rangle$ obtenidos y almacenados, para cada valor de 't'.
12. Se gráfica cada $\langle r^2 \rangle$ obtenido en el paso anterior con su respectivo tiempo.

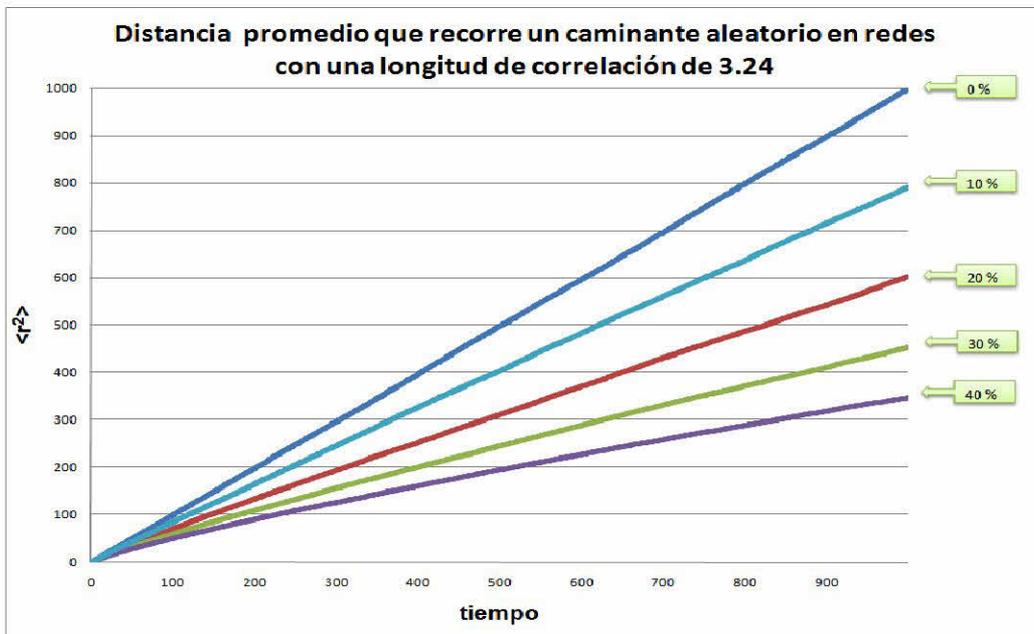
13. Se repiten los pasos del 1 al 12 con una diferente longitud de correlación y cantidad de obstáculos.

Los resultados de esta primera parte se muestran en la Figura 2.10, cuyas rectas corresponden a diferentes longitudes de correlación y distintos porcentajes de sitios bloqueados. Cada recta muestra la distancia (en función del tiempo) que recorre una partícula difundiéndose en un plano con una cierta distribución de obstáculos. Observar que la distancia recorrida por la partícula disminuye cuando aumenta el número de obstáculos en la red.

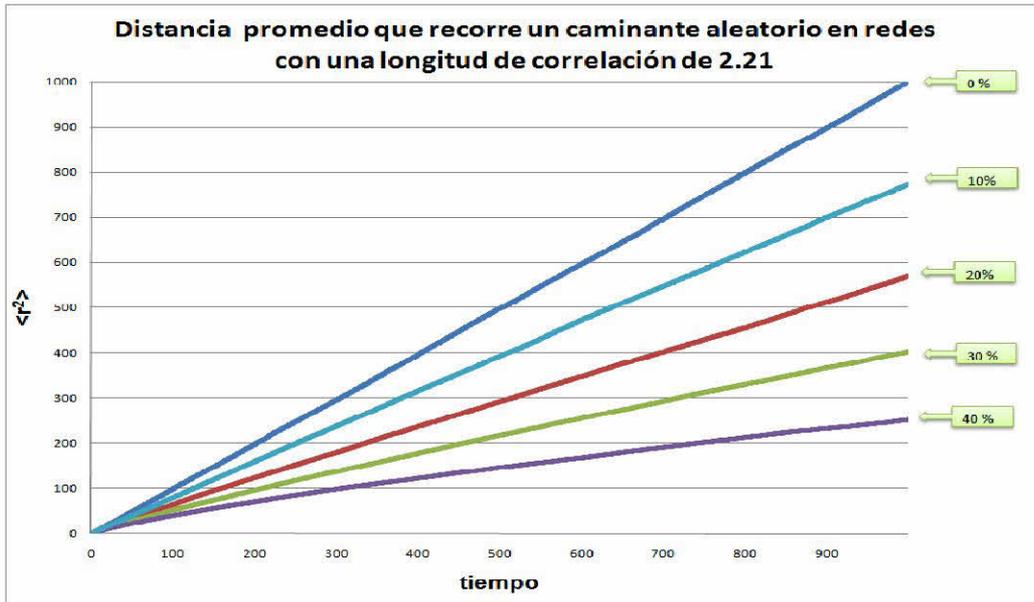




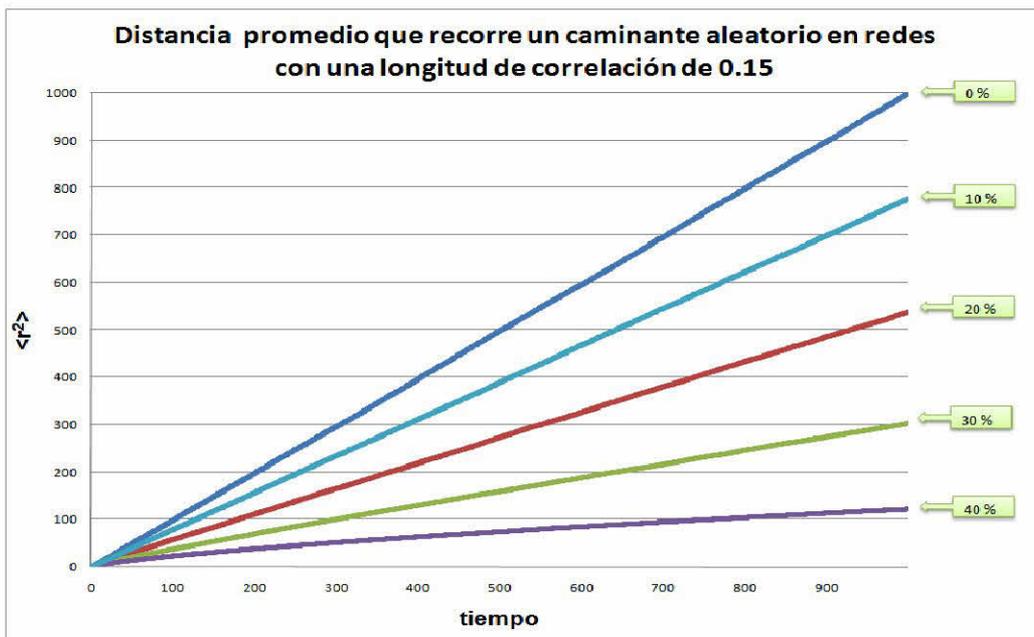
b)



c)



d)



e)

Figura 2.10. Distancia cuadrática promedio recorrida ($\langle r^2 \rangle$) vs tiempo (número de pasos) para un caminante aleatorio en redes con diferentes grados de bloqueo (% de sitios impermeables al paso de los reactivos). Las redes utilizadas poseen longitudes de correlación de: 11.55, 5.31, 3.24, 2.22, y 0.15 u.r.; Figuras a, b, c, d y e, respectivamente.

En la segunda parte, y última, se consideraron: los resultados reportados en la Figura 2.10, la ecuación 2.2 y la ecuación 2.3.

Pero antes, fue necesario encontrar la ecuación, 1.13, planteada por Ben-Avraham y Havlin (2004), que señala el promedio de la trayectoria cuadrática de un caminante aleatorio en función del tiempo. Partiendo de tal ecuación se obtiene la siguiente.

$$\langle r^2(t) \rangle = At^{2/d_w} \quad (2.1)$$

Donde A es una constante de proporcionalidad. Aplicando logaritmo natural se obtiene

$$\ln \langle r^2(t) \rangle = \ln(A) + \frac{2}{d_w} \ln(t) \quad (2.2)$$

Luego la relación entre d_w y la pendiente m de la recta descrita por la ecuación (2.2), es dada por la relación:

$$d_w = \frac{2}{m} \quad (2.3)$$

Los valores así obtenidos para d_w son reportados en la Figura 2.11. Hay que recordar que las redes sin obstáculos corresponden a $d_w = d_f = d = 2$. Ello corresponde el punto de inicio de todas las curvas mostradas en la Figura 2.11

(caso de bloqueo nulo). Notemos además que cuando la difusión de una partícula se dificulta por el aumento del número de obstáculos, la $d_w > 2$, y en todos los casos el valor de d_w se hace más grande a medida que aumenta el número de obstáculos. Siendo tal tendencia, más marcada en la medida que la longitud de correlación de la red decrece.

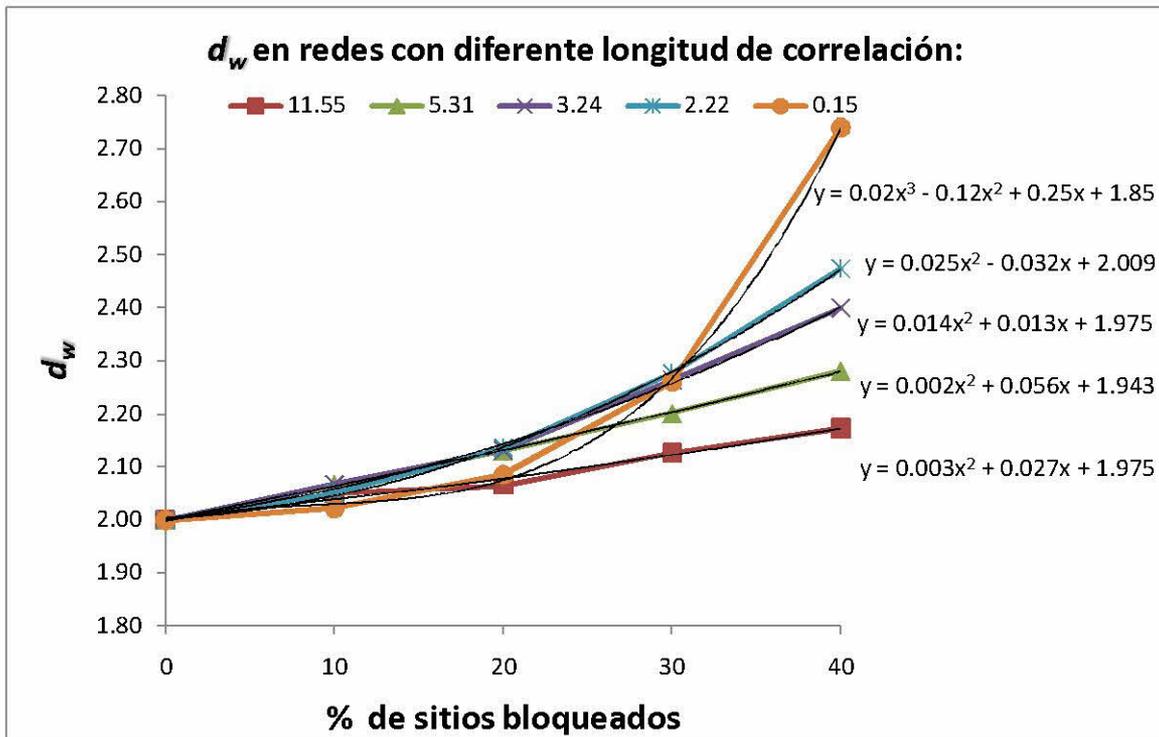


Figura 2.11 Evolución de la d_w con respecto al porcentaje de sitios bloqueados en redes con distintas longitudes de correlación (u.r). Promedio sobre 20 realizaciones. La desviación estándar de estas cantidades se estimó en 0.04.

2.6 Estimación de la d_f en los medios de reacción.

Otra dimensión importante para caracterizar el medio de reacción es su d_f ; ella es una medida de la “densidad del sistema” y nos es indispensable para el posterior cálculo de la d_s . Para estimar la d_f se echó mano de un software libre de nombre “Image J” (c.f. <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Este programa estima la dimensión fractal de una imagen binaria mediante el método de “conteo de cajas”. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. Se impone la longitud de correlación y el porcentaje sitios bloqueados que debe de tener la red (c.f. Tabla 2.1)
2. Se procede a construir la red cuadrada de tamaño 200x200 y se bloquean los sitios.
3. La red construida es dibujada en el software libre llamado “RasMol versión 2.6”.
4. Una vez dibujada la red, esta es trasportada al software “ImageJ”, cuya caja de herramientas calcula el valor de d_f .
5. Se realiza 20 veces los pasos del 2 al 4, registrando los valores de la d_f , para finalmente calcular el promedio de dicha dimensión en 20 redes con la misma longitud de correlación y el mismo porcentaje de obstáculos pero estos últimos diferentemente distribuidos.
6. Los pasos 1-5 se realiza para cada una de las redes registradas en la Tabla 2.1

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.12, donde la d_f se encuentra en función del porcentaje de sitios bloqueados. Nótese la disminución del valor de la dimensión fractal del espacio de reacción (*i.e.* los sitios permeables a los reactivos) a medida que crece el porcentaje de sitios bloqueados en la red. Obsérvese además que, para el mismo porcentaje de sitios bloqueados, en las redes menos correlacionadas la d_f es significativamente menor que en las redes con una mayor correlación debido a la aglomeración de los obstáculos, lo que posibilita la existencia de zonas libres de estorbos donde los reactivos pueden evolucionar. Del estudio anterior podemos concluir que los efectos combinados de la longitud de correlación que caracteriza a la red numérica y del porcentaje de celdas bloqueadas se pueden caracterizar mediante la dimensión fractal del medio de reacción. La d_f es una medida de la “densidad” del medio de reacción. Sin embargo, para el estudio de la evolución del sistema MM en tales medios nos falta considerar la movilidad de las partículas que representan a los reactivos, ya que ello determinará la probabilidad de los encuentros entre los reactivos. En la teoría de la difusión en el seno de espacios fractales, tal movilidad es caracterizada por d_w , cantidad que también ya ha sido calculada para nuestros distintos escenarios de reacción. La misma teoría señala que el resultado de los efectos combinados de d_f y d_w se puede resumir en una única cantidad, llamada la dimensión espectral d_s . Así d_s resulta la variable natural para el estudio del sistema MM en medios tortuosos. En la sección siguiente explicaremos cómo estimamos su valor en nuestros distintos escenarios de reacción.

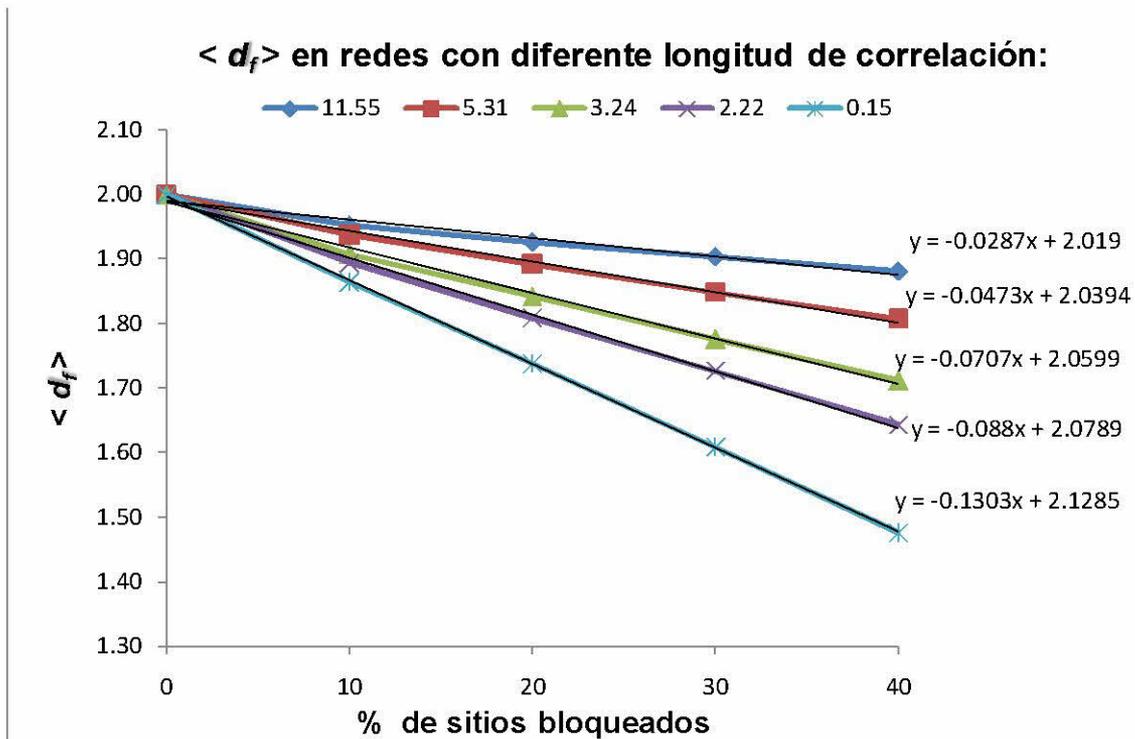


Figura 2.12 Evolución de la d_f con respecto al porcentaje de sitios bloqueados en redes con diferente longitud de correlación (11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 en u.r.).

2.7 Estimación de la d_s en redes bidimensionales.

Una vez determinadas ambas dimensiones, la dimensión fractal del medio de reacción y la dimensión fractal del caminante, se calcula el valor de d_s mediante la ecuación 1.11. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.13

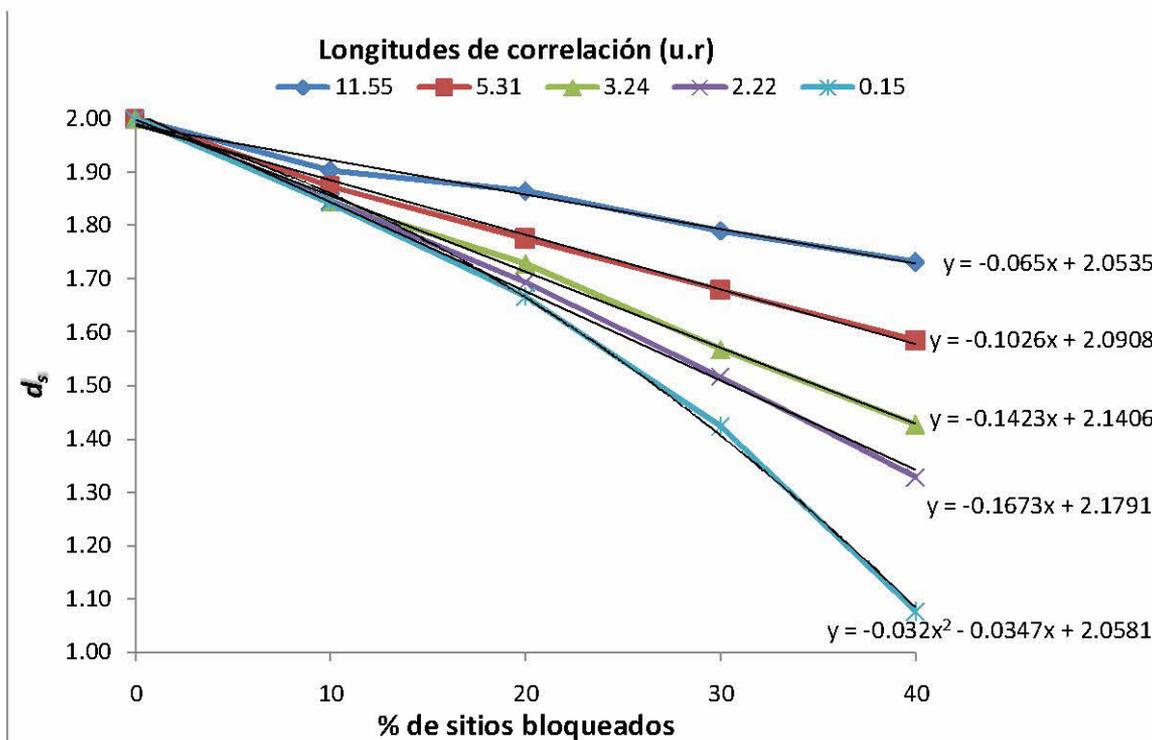


Figura 2.13 Evolución de la d_s con respecto al porcentaje de sitios bloqueados en redes con diferente longitud de correlación (11.55, 5.31, 3.24, 2.22 y 0.15 u.r.), con su respectiva ecuación de la curva ajustada.

La dimensión espectral es una medida de la conexidad del medio. Ella disminuye al aumentarse el número de obstáculos, lo que nos indica que la difusión de las partículas se torna más complicada a medida que aumenta la tortuosidad del medio. Este efecto es más pronunciado en redes con longitud de correlación cercana a cero (*c.f.* Figura 2.13) dado que los obstáculos se reparten homogéneamente. Cuando la longitud de correlación de la red aumenta, el efecto que acabamos de señalar se hace menos marcado, pues la existencia de zonas libres de obstáculos en donde los reactivos continúan evolucionando, separadas de zonas bloqueadas, sigue siendo bastante probable.

Aquí es pertinente mencionar sobre $d_s \neq \frac{4}{3}$. En efecto, los valores obtenidos para d_s difieren de $\frac{4}{3}$, valor correspondiente a la conjetura de Alexander y Orbach

(c.f. página 79 del libro de Ben-Avraham y Havlin, 2004). Alexander y Orbach – y mucho otros autores – sólo consideraron “clusters” incipientes en redes carentes de correlación espacial, así que la variación que estamos observando muy probablemente sea el efecto de dos causas: (i) no se está trabajando sobre estructuras que pudiéramos llamar “clusters” incipientes (el tamaño justo, ni más ni menos, para pasar de un lado al otro de la red únicamente moviéndose al través del “cluster”), y (ii) la correlación de la red; observar en la Figura 2.13 que la curva para el sistema de muy baja correlación (0.15 u.r.) se acerca al valor de la conjetura cuando la fracción de sitios bloqueados se aproxima al umbral de percolación (0.4073, para nuestro caso, (Sahimi, 1994)). Ciertamente, más trabajo será necesario para disipar estas dudas, pero lo que se tiene no es despreciable, mediante la teoría MDSE (modelo dual de sitios y enlaces (Cordero, 2002, y referencias allí contenidas)) se cuenta con un protocolo de construcción de medios de reacción (redes binarizadas y con bloqueo parcial) en donde se puede hacer variar la d_s ; justo lo que necesita para estudiar reacciones controladas por difusión en medios tortuosos, tema que abordaremos a continuación.

2.8 Reacciones enzimáticas en medios tortuosos

2.8.1 Metodología

Una vez construidos y caracterizados los medios de reacción, procedemos a simular en ellos las reacciones enzimáticas.

Tengamos siempre presente que los obstáculos - sitios bloqueados - son fijos e inertes durante toda la reacción. En nuestro estudio consideramos la presencia de las siguientes partículas: (i) los reactivos, son las partículas

denominadas enzima (e) y sustrato (s); (ii) complejo, (c), partícula que representa el producto de la unión de una enzima y un sustrato. El producto final no aparece en nuestro modelo, ya que la idea es modelar el transporte del sustrato transmembranal (los sustratos desaparecen de la superficie de la membrana y aparecen en la parte interna de la misma, dejando atrás el medio de reacción, lo anterior siendo catalizado por una enzima). De las partículas mencionadas, sólo el sustrato se considera móvil (mediante un proceso difusivo), tanto las partículas de enzima como las de complejo permanecerán fijas en el interior de los medios de reacción con la finalidad de simular enzimas ancladas a la membrana celular.

El sembrado de las partículas se lleva a cabo de la forma siguiente: Se elige aleatoriamente una celda vacía, allí se “siembra” virtualmente la partícula, ya sea un sustrato o una enzima. En cada una de las 420 redes construidas (*c.f.* Tabla 2.1) se “siembran” 10 enzimas y 10,000 sustratos, manteniendo así una relación de enzima-sustrato 1:1000. Estos números son habituales en problemas de cinética enzimática. En efecto, en la superficie de las membranas celulares la cantidad de enzimas con respecto al sustrato es todavía menor (Peña, 2009). De hecho también se realizaron simulaciones con una relación de 1:100, pero los resultados no se incluyeron en este manuscrito pues no se consideraron suficientemente representativos. Cualitativamente su comportamiento es similar al descrito páginas más adelante.

Una vez sembrado el medio de reacción con las partículas representando enzimas y sustratos, se simula el proceso de la reacción enzimática (*c.f.* ecuación 1.1). Para ello se propuso el siguiente algoritmo (semejante al utilizado por Berry (2002)). Donde los números que se eligen de forma aleatoria se encuentran dentro de una distribución uniforme y las constantes cinéticas de reacción representan la probabilidad de que el encuentro sea efectivo (*i.e.* que se efectúe la reacción). Los valores asignados para dichas constantes son: $k_1=1$, $k_{-1}= 0.02$ y $k_2=0.04$.

1. Si una celda se encuentra ocupada por un sustrato "S", se elige aleatoriamente uno de sus cuatro vecinos; el vecino elegido puede presentar uno de los siguientes casos:

Caso I.- Se encuentra vacío, en este caso la partícula "S" lo ocupa de forma inmediata, dejando vacía la celda de origen.

Caso II.- Se encuentra ocupado por una enzima, entonces se lleva a cabo la reacción entre la enzima y el sustrato para formar el complejo (enzima-sustrato), el cual ocupará la celda en donde se encontraba originalmente la enzima, la celda anteriormente ocupada por el sustrato queda vacía.

Caso III.- Cuando el vecino elegido, se encuentre alguna partícula ya sea: un obstáculo, un complejo u otro sustrato; en estos casos no se efectuará cambio alguno.

2. Si en una celda se encuentra una partícula de complejo "ES", puede presentarse alguno de los siguientes casos:

Caso I.- Se elige aleatoriamente un número entre 0 y 1, si este número es menor que k_{-1} , y sí alguna celda cercana se encuentra vacía, entonces la partícula de complejo se disocia en una partícula enzima "E" y una partícula sustrato "S", en donde la partícula enzima toma el lugar ocupado por el complejo, y para el sustrato se elige de forma aleatoria una celda vacía entre las vecinas y libres de toda ocupación.

Caso II.- Se elige aleatoriamente un número entre 0 y 1, sí este número es mayor que k_{-1} y menor a $k_{-1} + k_2$, entonces la partícula complejo se disocia en enzima "E" y producto "P", en donde la partícula enzima ocupa el lugar inicial del complejo, y el producto desaparece del sistema.

Caso III.- Se elige aleatoriamente un número entre 0 y 1, si este número es mayor que $k_{-1} + k_2$, en este caso no se registra cambio alguno.

Al completar el procedimiento, el tiempo es incrementado en $1/\alpha$, donde α es el número actual de partículas en el medio de reacción. El programa se deja correr hasta que el tiempo alcance las 145,000 unidades. El compilador que se utilizó, fue Borland C++ versión 5, instalado en una: Acer con un Procesador Intel® Celeron® processor 560, una memoria (RAM) 1.0 GB y SO, Windows Vista.

2.8.2 Resultados

En la Figura 2.14 se muestran los resultados obtenidos de los medios de reacción con un 20% de sitios bloqueados. Viendo de abajo hacia arriba, la primera curva corresponde a un medio de reacción libre de obstáculos, lo cual corresponde a una cinética química típica de libro de texto, que nos sirve como referencia para identificar que tanto es afectada la reacción por la fractalidad del medio de reacción. Continuando con la misma curva, se observa que el sustrato desaparece muy rápidamente, ello debido a la alta probabilidad de encuentro entre las partículas reactivas. La cinética de la reacción empieza a depender significativamente de la distribución espacial de los obstáculos. Observar que entre más dispersos se encuentren los obstáculos (menor el valor numérico de d_s), la reacción se torna más lenta. Este comportamiento se hace aún más evidente cuando el porcentaje de sitios bloqueados aumenta a 30% o a 40% (c.f. Figuras 2.15 y 2.16), ya que el medio se torna más y más tortuoso y la difusión de los reactivos se torna más y más difícil.

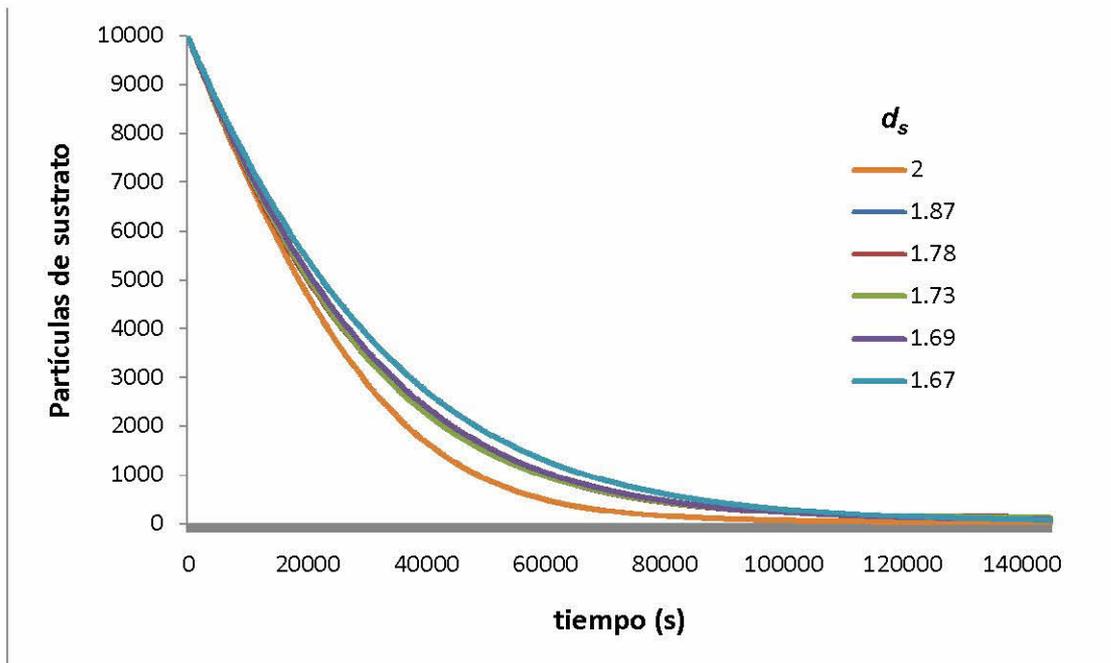


Figura 2.14 Variación de las partículas de sustrato en redes bidimensionales con 20% de sitios bloqueados. Redes con distintos valores de d_s .

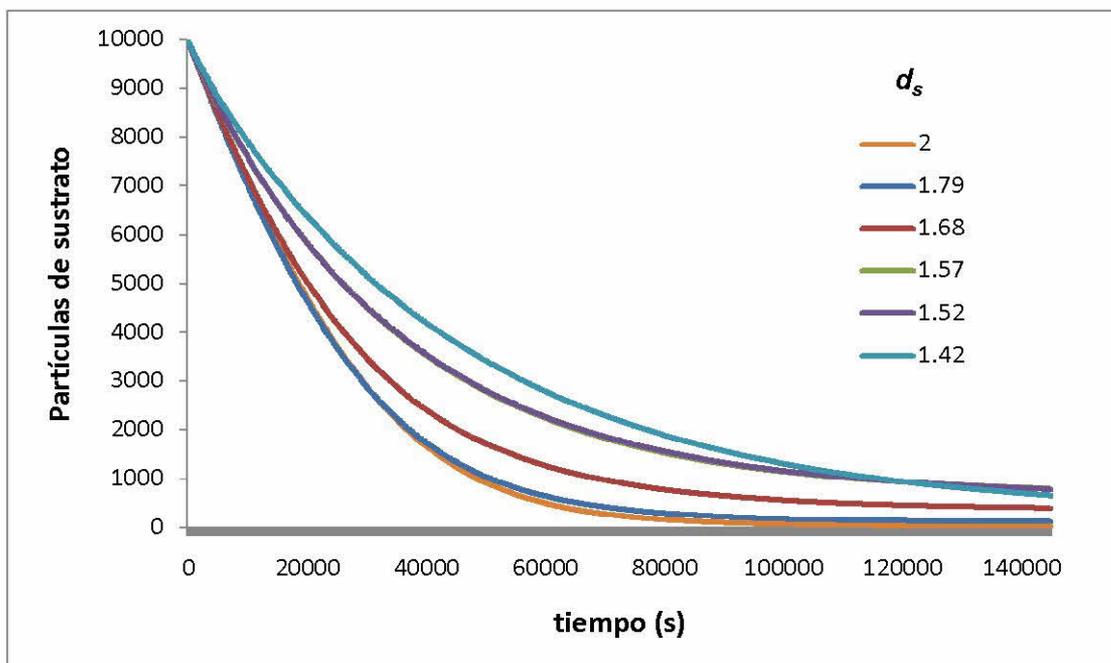


Figura 2.15 Variación del sustrato en redes bidimensionales ocupadas con 30% de sitios bloqueados y distribuidos de forma diferente (i.e. diferentes valores de d_s).

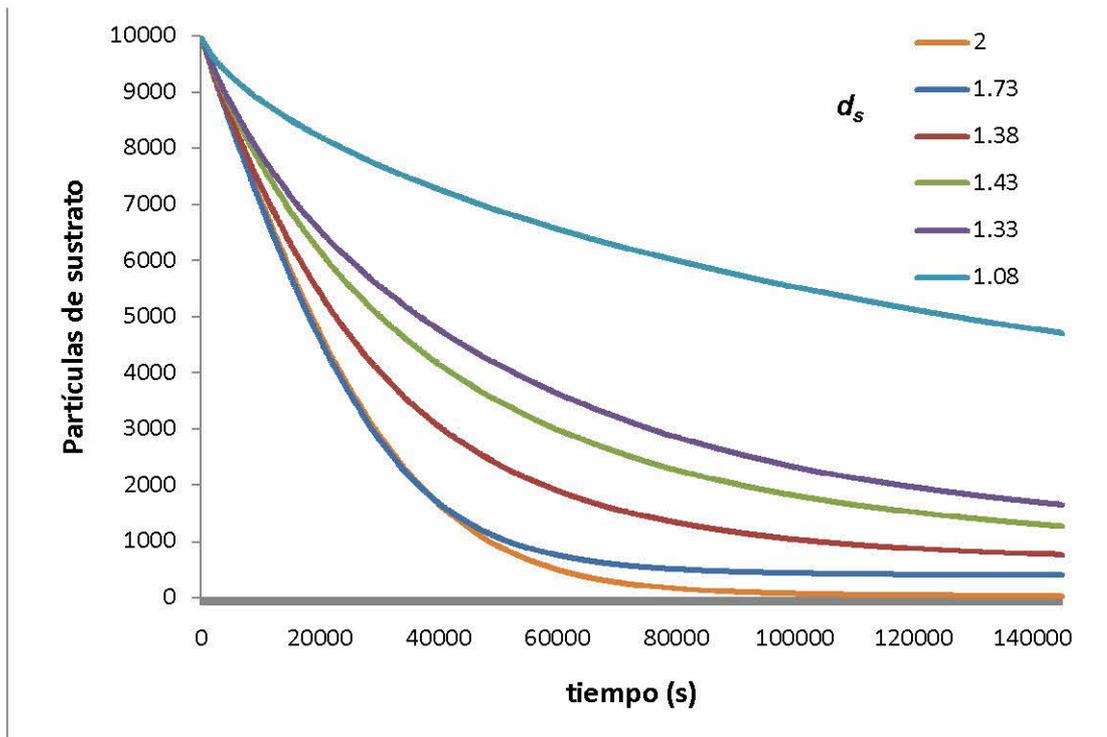


Figura 2.16 Variación del sustrato en redes bidimensionales con 40% de sitios bloqueados y distintos valores de d_s .

Los resultados anteriores muestran la relevancia de la dimensión espectral, d_s , del medio de reacción sobre la cinética de la reacción enzimática MM. Un diferente valor de d_s podría corresponder a diferentes tipos de membranas, por ejemplo una célula del hígado (hepatocito) o una de la sangre (eritrocito) se distinguen por tener distinta cantidad de biomoléculas en su superficie (peña, 2009), lo que a priori se traduciría en valores distintos de d_s .

Ahora procedemos a la presentación de resultados relativos al consumo del sustrato y su dependencia con las partículas de enzima y de complejo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.17, la cual presenta una reacción enzimática en un medio cuya $d_s=2$. Dicho medio nos sirvió como punto de referencia para las reacciones ocurriendo en medios fractales.

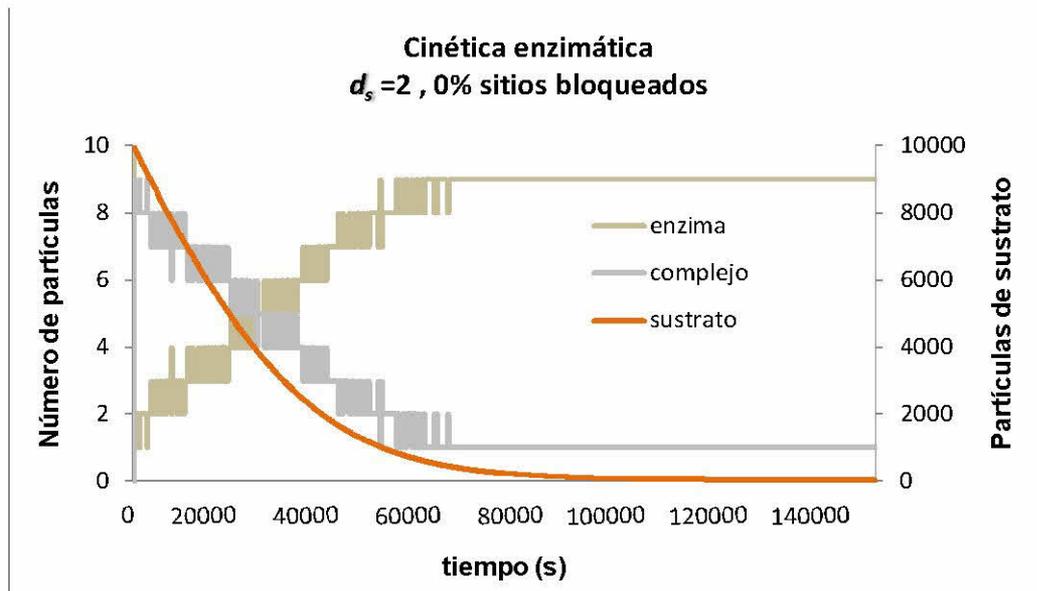


Figura 2.17 Cinética enzimática en un medio no fractal

Para un medio homogéneo, *i.e.* con nula presencia de obstáculos para los reactivos, sólo se presenta un único conjunto de resultados, pues aquí el valor de d_s no juega. Observar que si bien – debido al minúsculo número de partículas – no se aprecia el establecimiento de un estado estacionario para el complejo, si se aprecia que la concentración de enzima libre es minoritaria más allá del consumo de la mitad del sustrato original; como se verá esta característica se pierde en la medida que el medio se torna tortuoso.

A continuación presentamos las cinéticas con un 20 y un 40% de obstáculos, que a nuestra consideración son las más representativas del establecimiento de una cinética de tipo fractal.

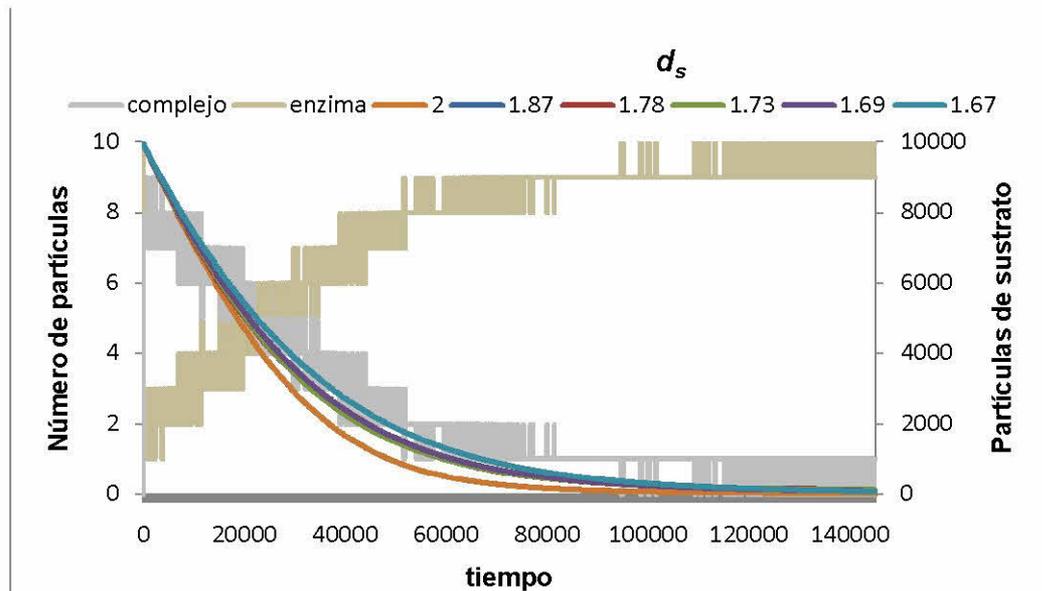


Figura 2.18 Cinética enzimática en medios: tipo fractal y caracterizados por distintos valores de d_s (2, 1.87, 1.78, 1.73, 1.69 y 1.67). Los medios de reacción presentan un 20% de obstáculos, excepto para la curva con $d_s=2$ cuya presencia de obstáculos es nula.

Para el caso de 20% de sitios bloqueados, se aprecia en la Figura 2.18, la diferencia cinética del sustrato que existe entre un medio fractal ($d_s < 2$) y uno no fractal ($d_s=2$). De esta manera se observa que entre más tortuoso sea el medio de reacción, el consumo del sustrato se prolonga. Es importante señalar la enzima libre que existe durante la mayor parte de la reacción, y puede tornarse mayor a la concentración del complejo.

Finalmente para el caso de 40% de sitios bloqueados (c.f. Figura 2.19) es aún más notoria la dificultad que presenta el sustrato para reaccionar. Tal comportamiento es muy distinto al considerado como “clásico” ($d_s=2$). Ello debido a la falta de mezclado y a la tortuosidad del medio. En un futuro, se pretende verificar estos resultados con mayor capacidad de cómputo a fin de incrementar el número de partículas en el sistema y así precisar las tendencias.

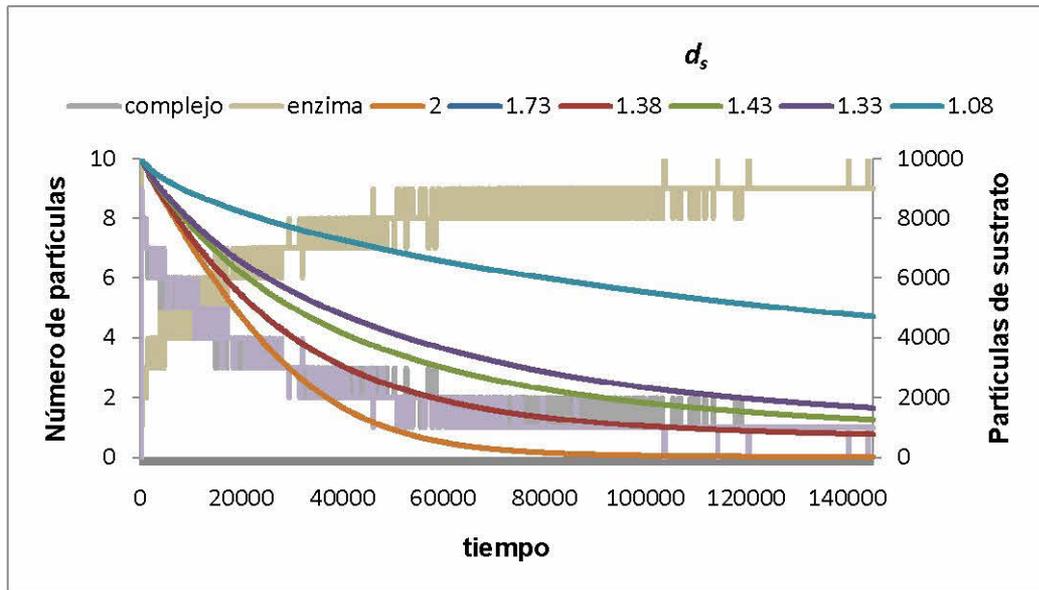


Figura 2.19 Cinética enzimática en un medio tipo fractal, con un 40% de obstáculos en el medio, excepto la curva con $d_s=2$ cuya presencia de obstáculos es nula.

Hasta el momento se ha apreciado la dependencia del consumo del sustrato con la d_s , ya que entre menor sea esta última menor será el consumo del sustrato, ocasionando que la reacción sea mas lenta. Dicho comportamiento caracteriza a las cinéticas enzimáticas de tipo fractal.

Las curvas de las cinéticas de las partículas del complejo, *idem* para enzima, con diferentes valores de d_s (2, 1.73, 1.43, 1.38, 1.33 y 1.08) contenidas en las Figuras: 2.18 y 2.19 no se diferencian entre ellas. Esto debido a que no se pudo encontrar una forma de suavizar cada curva. Para lograr lo anterior se tendría que aumentar la cantidad de partículas en el sistema (objetivo de un futuro trabajo).

2.9 Discusión de resultados

Kopelman (1988) señala que las reacciones que ocurren en medios tortuosos pueden presentar una cinética de tipo fractal. Es por ello que, mediante un autómata celular, hemos explorado el comportamiento del sistema MM en diversos escenarios de reacción.

Los resultados de este capítulo muestran que cuando una reacción química se lleva a cabo en el seno de un medio tortuoso y mal agitado, la cinética química de la reacción se ve afectada tanto por la cantidad de obstáculos, como por su distribución espacial. La cuantificación de ambos factores parece ser bien condensada en una única dimensión llamada la dimensión espectral, d_s . Los medios de reacción aquí construidos y caracterizados, utilizando para ello la teoría MDSE (que permite una variación sistemática de la correlación espacial entre los elementos constitutivos de la red numérica), muestran un comportamiento distinto al predicho por la conjetura de Alexander y Orbach, $d_s \approx \frac{4}{3}$ (observaciones semejantes fueron reportadas por R. Villalobos (2005) sobre sistemas correlacionados y más pequeños). Parecería que la conjetura es estrictamente válida en sistemas carentes de correlación espacial. Para terminar, podemos decir que el estudio de la cinética química de reacciones ocurriendo en escenarios *in vivo*, es necesario considerar las características de la tortuosidad del medio, *i.e.* no solo es necesario considerar la cantidad de partículas reactivas, sino también su distribución espacial. En el caso de MM, ello puede modificar “ilógicamente” la cinética química de la reacción, por ejemplo, la cantidad de enzima libre puede aumentar aunque exista una gran cantidad de sustrato ávido de reaccionar y la hipótesis tradicional en los libros de texto, de un rápido establecimiento de un estado estacionario para la concentración del complejo, no resulta sostenible en medios de reacción homogéneos ni mucho menos en medios tortuosos y mal agitados.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA Y RESULTADOS DEL MODELO DETERMINISTA

Resumen

Un sistema de ecuaciones diferenciales representando a MM evolucionando en un medio tortuoso – la naturaleza fractal de la cinética se introduce mediante la aproximación de Kopelman (1988) – se resuelve numéricamente con el método de Runge Kutta. Los resultados obtenidos que en tales condiciones indican: (i) el establecimiento de un estado estacionario para el complejo enzima-sustrato es improbable, y (ii) una cinética lenta para el desarrollo de reacciones enzimáticas en sistemas tortuosos sin importar el valor de la K_m .

3.1 Método

En el estudio del comportamiento enzimático bajo la aproximación de cinética química fractal para la reacción bimolecular, se resuelve de manera numérica el sistema 3.1, mediante el método de Runge-Kutta, utilizando el software Mat-Lab versión 7, con la función ODE23tb.

Al sustituir la ecuación 1.9 en el sistema 1.1, el resultado es el sistema 3.1 de esta forma se obtiene un sistema de ecuaciones tipo fractal según Kopelman (1988).

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] - k_0 t^{-h} [E][S] \quad (3.1)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_0 t^{-h} [E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3.2)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_0 t^{-h} [E][S] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (3.4)$$

Sistema 3.1

3.1.1 Condiciones iniciales

Los valores iniciales que son los mismos para todas las simulaciones aquí realizadas son:

$$[E] = 0.1 \text{ mM}$$

$$[S] = 100 \text{ mM}$$

$$[ES] = 0 \text{ mM}$$

$$k_1 = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Donde:

[E] = Concentración de enzima.

[S] = Concentración de sustrato.

[ES] = Concentración de complejo.

k_1 = Constante de reacción.

Las condiciones iniciales que varían se presentan en la Tabla 3.1

k_1 (s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	K_m (mM)
5/3	10/3	5
50/3	100/3	50
100/3	200/3	100

Tabla 3.1.- Valores de K_m y las constantes de reacción (k_1 y k_2) para el estudio *in silico* de la cinética enzimática de MM.

En la tabla anterior se observa que el valor escogido para k_2 es el doble del de k_1 . Esta relación se determinó con base en la propuesta de Berry (2002), que fue tomada en cuenta en el capítulo 2. Los valores de K_m se tomaron de los reportados por Lehninger (1993). Los valores escogidos representan un amplio espacio de comportamiento.

Para cada valor de K_m se realizaron varias simulaciones, con distintos valores de ' h ' cuyos valores son: 0, 0.13, 0.21, 0.29, 0.34 y 0.46 que corresponden

a los valores de d_s : 2, 1.73, 1.58, 1.48, 1.33 y 1.08 respectivamente. Observar que estos últimos valores de dimensión espectral son cercanos a los observados en las simulaciones reportadas en el capítulo anterior.

3.2 Resultados

3.2.1 Estudio de la sensibilidad del sistema frente a los valores de h

A continuación presentamos las cinéticas obtenidas cuando $K_m = 5$ mM, y h toma diferentes valores (0, 0.34 y 0.46). Solo cuando $h=0$ se simula una cinética enzimática no fractal el cual nos sirve como referencia para comparar los demás comportamientos. Recordar que $h=0$ es un sistema bien conexo, y $h>0$ representa un sistema tortuoso.

En la Figura 3.1 se aprecia en conjunto, los comportamientos cinéticos obtenidos para sustrato y complejo, con diferentes valores de h .

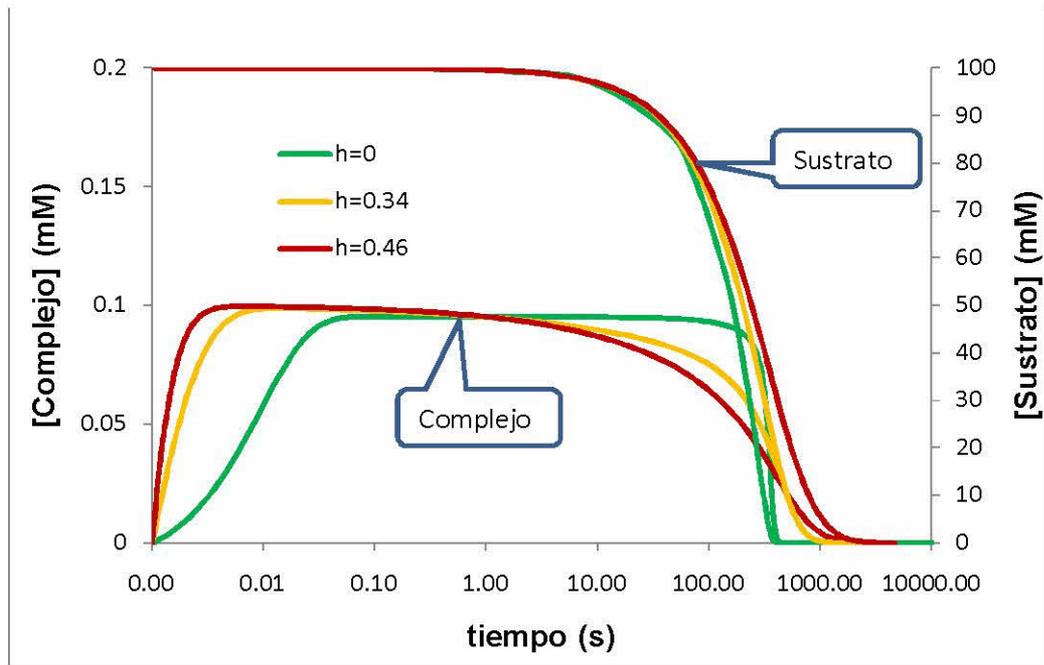


Figura 3.1 Cinéticas del sustrato y complejo con diferentes valores de h (0, 0.34 y 0.46) y $K_m = 5$ mM.

En la Figura 3.1 se aprecia como el complejo, solo al inicio, alcanza el estado estacionario pero sólo durante un intervalo de tiempo muy corto. Donde además; el consumo del sustrato (en el mismo intervalo de tiempo) no es significativo. Continuando con la misma Figura, se observa que la concentración del complejo es variable aun cuando la concentración del sustrato es relativamente alta, inclusive cuando $h=0$. Las cinéticas se ven prolongadas cuando h aumenta de valor numérico, en base a esto decimos que entre más tortuoso sea un medio de reacción, las reacciones se prolongan por más tiempo.

A continuación presentamos la Figura 3.2, donde se aprecia la cinética de la enzima libre y cuando forma parte del complejo. Al principio se nota el súbito consumo casi total (para valores de $h \neq 0$, medios fractales) de la enzima libre y como consecuencia la formación súbita del complejo. Casi de inmediato la concentración de la enzima libre empieza a aumentar y la del complejo a disminuir, ya sea en un medio no fractal o en medios fractales. Cuando el valor de

h crece la cinética se prolonga, esto por tortuosidad del medio en donde se lleva a cabo la reacción.

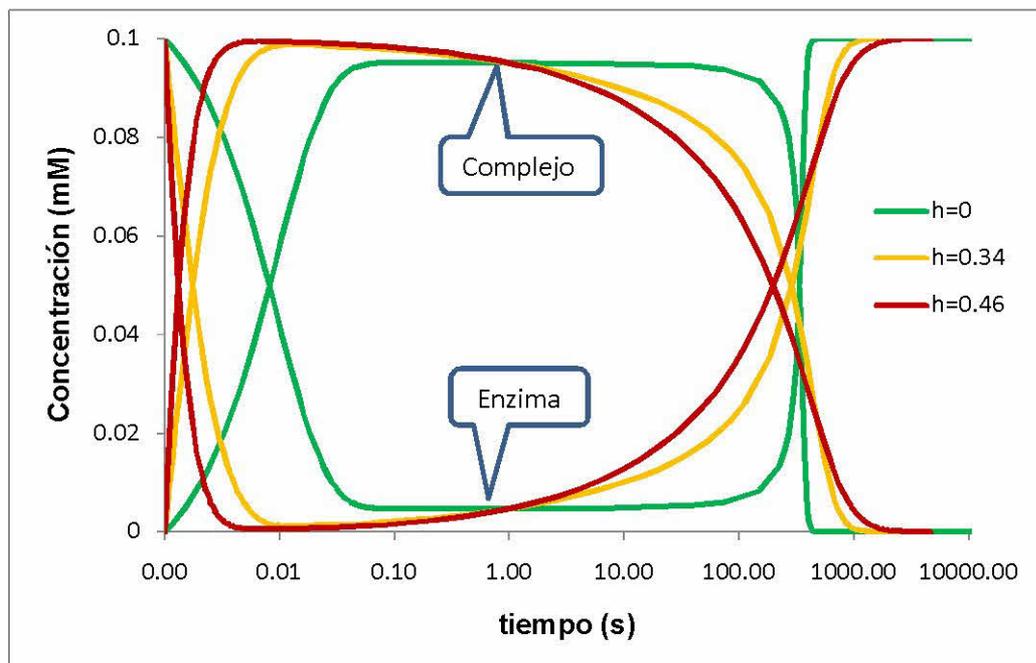


Figura 3.2 Cinéticas de la enzima (enzima libre) y la del complejo (enzima-sustrato) con: diferentes valores de h (0, 0.34 y 0.46) y $K_m = 5$ mM.

3.2.2 Cinética enzimática fractal, sensibilidad a K_m

En las Figuras 3.3 y 3.4 se muestran las cinéticas para distintos valores de K_m (50 y 100 mM), y con los mismos valores de h utilizados en la simulación anterior.

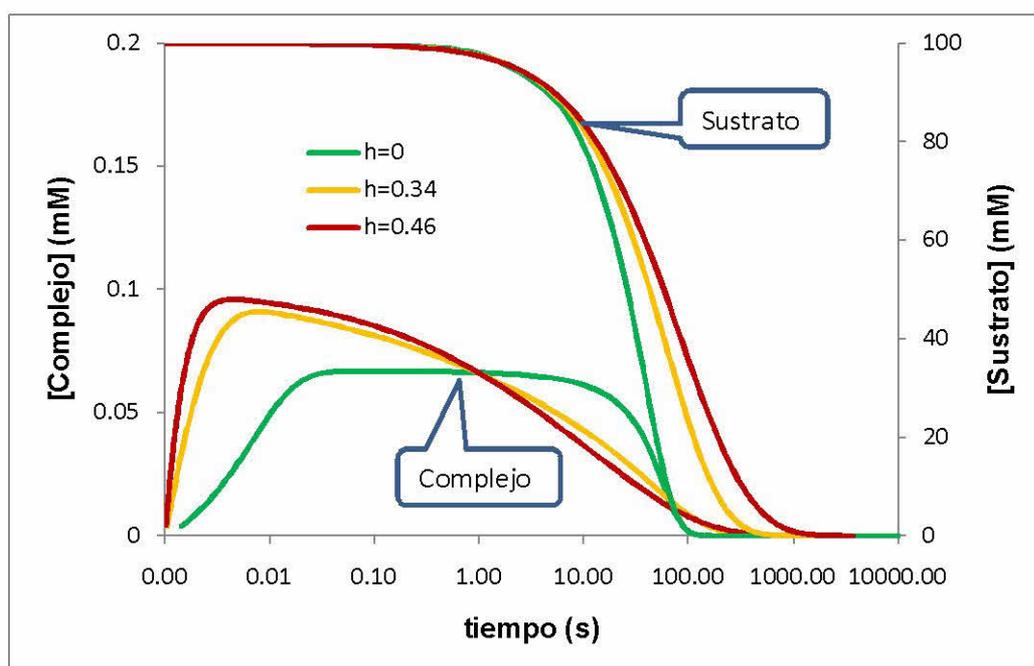


Figura 3.3 Cinética del sustrato y del complejo, como resultado de reacciones enzimáticas tipo MM en medios fractales realizadas *in silico*. El valor de K_m para todas las cinéticas aquí presentadas es de 50 mM y los valores de h corresponden a: 0, 0.34 y 0.46.

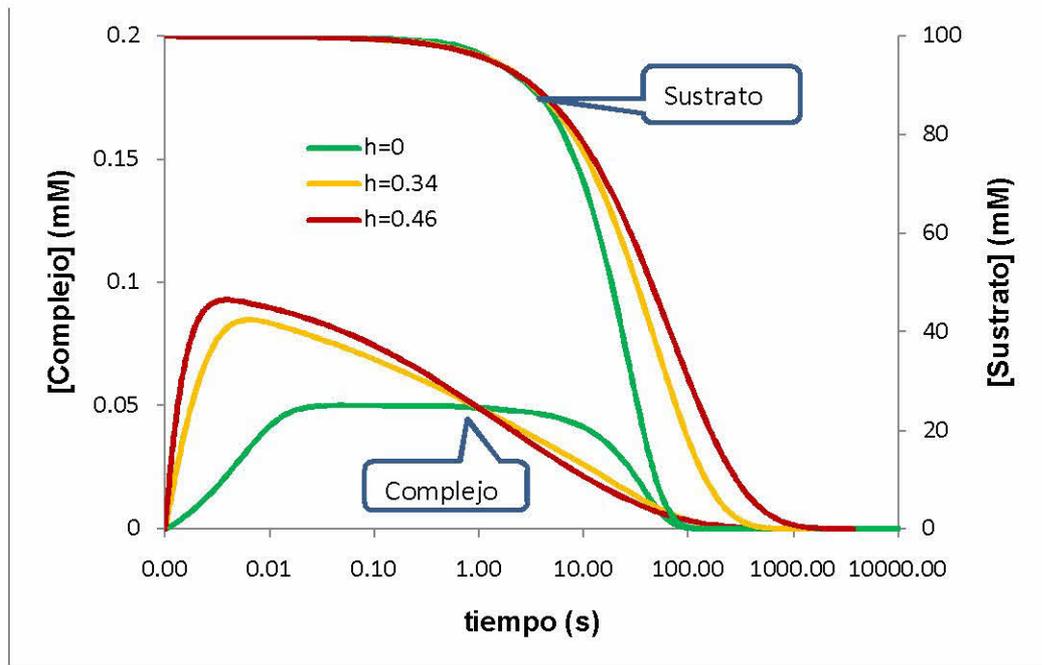


Figura 3.4 Cinética del sustrato y del complejo, El valor de K_m para todas las cinéticas aquí presentadas es de 100 mM y los valores de h son: 0, 0.34 y 0.46, estos corresponden a cada curva (ya sea para el complejo o para el sustrato).

Comparando las dos Figuras anteriores a simple vista, se puede ver que el consumo del sustrato (para un valor determinado de h) es relativamente igual. Para una comparación más precisa, presentamos la Figura 3.5 la cual contiene la cinética de reacción del sustrato con diferente valor de K_m y cada dos curvas con el mismo valor de h . lo anterior permite apreciar que entre mayor valor de K_m la cinética es más rápida, (está afirmación es válida cuando $k_2 > k_{-1}$, c.f. condiciones iniciales).

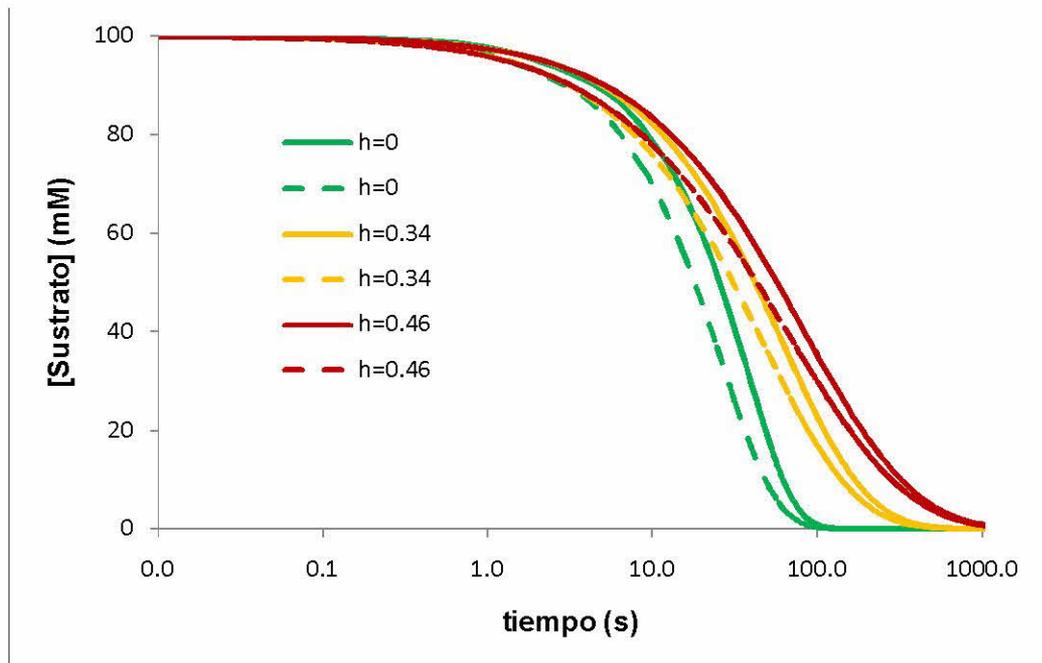


Figura 3.5 Cinética del sustrato, con diferentes valores de h (0, 0.34 y 0.46) y sólo dos valores de K_m (las curvas punteadas corresponde a 100 mM y las curvas con líneas continuas corresponden a 50 mM).

Los comportamientos cinéticos que acabamos de presentar permiten señalar las siguientes tendencias:

- ✚ Difícilmente se justifica el establecimiento un estado estacionario por parte del complejo.
- ✚ Entre mayor es el valor de h (*i.e.* entre más tortuosos el sistema, independiente del valor de K_m), mayor tiempo le lleva al sustrato en consumirse, y por ende la existencia del complejo se ve prolongado.
- ✚ Independientemente del valor de h , la concentración del complejo es variable durante casi o toda la reacción.
- ✚ La concentración máxima alcanzada por el complejo es directamente proporcional al valor de h .
- ✚ Entre mayor sea el valor de K_m y el mismo valor de h , las reacciones son más rápidas.

Para terminar hacemos las comparaciones de las cinéticas de la enzima libre y la que se encuentra formando parte de complejo; cuando K_m es igual a 50 y 100 mM (c.f. Figura 3.6 y 3.7). En ambas Figuras se hace notar la ausencia de un estado estacionario en sistemas heterogéneos y en los sistemas homogéneos sólo se establece por un corto tiempo. Esto debido a la tortuosidad del medio de reacción, ya que esto hace más difícil la acumulación del complejo.

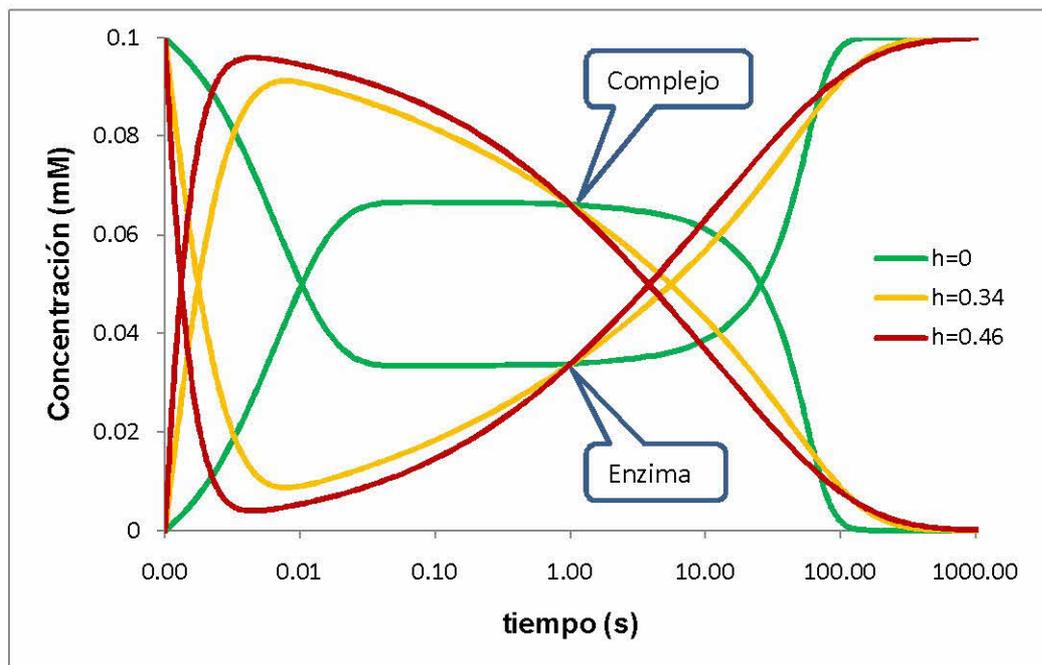


Figura 3.6 Cinética de la enzima y del complejo, El valor de K_m para todas las cinéticas aquí presentadas es de 50 mM, con diferentes valores de h (0, 0.34 y 0.46).

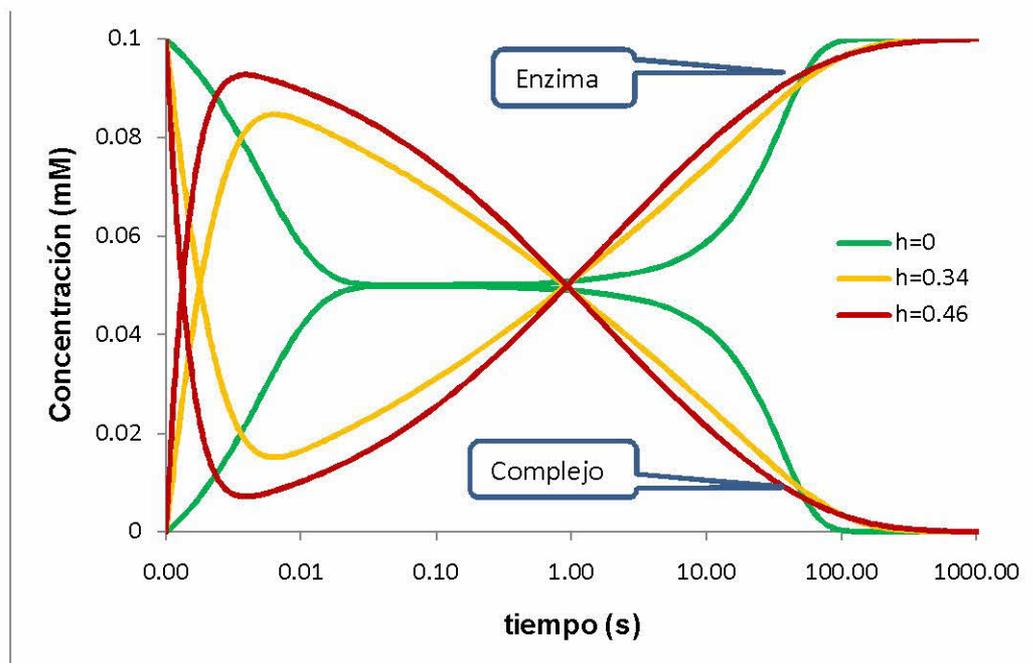


Figura 3.7 Cinética de la enzima libre y en de complejo (enzima-sustrato) en un medio homogéneo ($h=0$) y en medios fractales (h igual a: 0.34 y 0.46), El valor de $K_m= 100\text{mM}$ para todas las curvas aquí presentadas.

Cuando el valor de K_m es mayor, la reacción se lleva a cabo en menor tiempo. Puesto que el valor de k_2 , en nuestro caso particular, es directamente proporcional al valor de K_m , tomando en cuenta, que entre mayor es el valor de k_2 , el tiempo de consumo del sustrato es favorecido (*c.f.* ec. 1.1).

Entre más tortuoso es el medio, la reacción se retarda aún más. Parece ser que esto no se cumple al inicio de la reacción, ya que los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la formación del complejo es directamente proporcional al valor de h . Lo anterior es debido a que la ecuación 1.9 propuesta de Kopelman (1988) por lo menos no es válida para tiempos menores a un segundo (para nuestro caso).

Por último, señalamos que el complejo establece un estado estacionario en un intervalo pequeño de tiempo (comparándolo con el tiempo total de la reacción). Por lo anterior decimos; que casi o todo el tiempo que se lleva a cabo la reacción, la concentración del complejo es variable, sin importar el valor de K_m y de h .

3.3 Discusión de resultados

En ninguno de los casos presentados donde $h \neq 0$ se observa el establecimiento de un valor estacionario para la concentración del complejo. Esto se debe a que a través del valor de h se está considerando un medio de reacción tortuoso y con mala agitación, lo cual dificulta el transporte de las partículas, haciendo cada vez más difícil el encuentro entre los reactivos, esto hace que la velocidad con la que se forma el complejo decaiga y el consumo total del sustrato se ve afectado de tal forma que se requiere de un mayor tiempo para su conversión total. Es por lo anterior que notamos que entre mayor es el valor de h , mayor es el tiempo requerido para el consumo total del sustrato.

De igual manera se observó la presencia de enzima libre durante las reacciones independientemente del valor de h . Lo cual implica la existencia de enzima libre aún en reacciones con buen mezclado. Posiblemente esto se debe a la recuperación o regeneración de las enzimas después de haber formado parte del complejo.

El valor de la K_m no es suficiente para indicar si una reacción enzimática evolucionara de forma rápida o no, ya que es necesario tomar en cuenta las características del medio. No basta decir que el medio es tortuoso, si no que tan tortuoso es el medio, esto último es determinado por el valor de la d_s .

Como ya se sabe, las reacciones *in vivo* muy difícilmente se encuentran en un sistema homogéneo implicando una muy buena agitación. Por ello es importante tomar en cuenta la tortuosidad del medio de la reacción para una buena modelación de los comportamientos cinéticos.

CONCLUSIÓN

Las reacciones enzimáticas ocurren en medios en el seno de medios tortuosos y mal agitados, es por ello que su estudio debe de incluir las dificultades de transporte inherentes a los sistemas vivos, por ejemplo al través de un modelo de cinética fractal. De esta manera se comprenderán mejor los comportamientos cinéticos de sistemas enzimáticos y las reacciones serán mejor aproximadas.

El complejo enzima-sustrato no presenta un estado estacionario durante reacciones enzimáticas sobre todo en aquellas que evolucionan en medios tortuosos. Los medios de reacción pueden presentar diferentes niveles de tortuosidad que pueden complicar y a la vez retardar el consumo del sustrato.

Las reacciones aquí simuladas por el método determinista y por el método estocástico, coinciden en la dificultad de un estado estacionario para el complejo en reacciones enzimáticas. Esta dificultad siendo mayor en la medida que el medio es más tortuoso. De igual manera coinciden en la presencia de enzima libre durante las reacciones independientemente de la concentración de sustrato.

No solo los valores de K_m determinan si una reacción enzimática será rápida o lenta. Si no que es necesario tomar en cuenta el nivel de tortuosidad del medio en el que se desarrolla, el cual se puede determinar mediante el valor de d_s .

PERSPECTIVAS

- ✚ Este trabajo se puede ampliar y a la vez mejorar si pone más atención en los medios tortuosos en los que se desarrollan las reacciones en general, ya sea realizando simulaciones por el método determinista o estocástico, o ambos.
- ✚ Se tendría un gran beneficio si se realizan simulaciones de reacciones enzimáticas cuyas condiciones iniciales sean muy semejantes a las de un experimento *in vivo* con el fin de comparar, mejorar y aumentar la confiabilidad de las reacciones simuladas *in silico*.
- ✚ Realizar simulaciones estocásticas con un mayor número de partículas, y un mayor poder de cómputo.

REFERENCIAS

- Alexander, S. and Orbach R., 1982. Density of states on fractals: fractons. J. Phys. Lett. 43:L-625YL-631.
- Aspray William, 1993. John Von Neumann y los orígenes de la computación moderna, Primera edición, Editorial Gedisa.
- Ben-Avraham, D., and Havlin S., 2004. Diffusion and Reactions in Fractals and Disordered Systems, Cambridge Univ. Press, New York, Segunda edición, p. 79.
- Berry, H., 2002. Monte Carlo simulations of enzyme reactions in two dimensions: fractal kinetics and spatial segregation. Biophys. J. 3:1891– 1901.
- Braun E., 2003. Caos, fractales y cosas raras, La ciencia para todos. N° 150 Fondo de Cultura Económica, México. Tercera edición.
- Cordero Sánchez Salomón, 1998. Tesis de maestría “Simulación de Redes Porosas Por Métodos de Monte Carlo”, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cordero Sánchez Salomón, 2002. Tesis doctoral “Modelado de sólidos mesoporosos y de fenómenos de sorción de nitrógeno”, Universidad Autónoma Metropolitana.
- De Gennes PG., 1982. J Chem Phys; 76:3316.
- Engel Thomas y Reid Philip, 2006. Química física, Primera edición, Editorial Pearson, p. 871.
- Frauenfelder, H., P. Wolynes, and R. Austin. 1999. Biological physics. Rev. Mod. Phys. 71:S419–S430.

- Gálvez Ernesto T., 2005. Tesis doctoral "Análisis Fractal Del Mercado De Valores De México (1978-2004)", Instituto Politécnico Nacional.
- Kopelman R., 1988. Fractal reaction kinetics. *Science* Vol. 241, 1620-1626.
- Kosmidis K., V. Karalis, Panos Argyrakis, 2004. Michaelis-Menten Kinetics under Spatially Constrained Conditions: Application to Mibefradil Pharmacokinetics: *Biophysical Volume* 87: 1498–1506.
- Lehninger L. Albert, 1993. *Principios de Bioquímica*, Segunda edición, Editorial Ediciones Omega, 216.
- López R.H., Vidales A.M., Domínguez Ortiz A., Zgrablich G., 2007. How does a patchy network affect the structure of invading percolation patterns?. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 300 (2007) 122-128.
- Luby-Phelps, K., P. Castle, D. Taylor, and F. Lanni, 1987. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4910–4913.
- Mandelbrot B. 1977, *The Fractal Geometry of Nature*, W.H. Freeman, N. York.
- Marsh Rebecca E. y Jack A., 2006. Fractal Michaelis-Menten Kinetics Under Steady State Conditions: Application to Mibefradil; *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No 12.
- Meraz Rosa-Laura, Vidales Ana-María, Dominguez Armando, 2004. A fractal-like kinetics equation to calculate landfill methane production Elsevier Ltd. *Fuel* 83: 73–80.
- Michaelis, L., and L. M. Menten. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49:333–369.

- Minton, A. P., 1993. Macromolecular crowding and molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 6:211–214.
- Minton, A. P., 1998. Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol.* 295:127–149.
- Peña Antonio, 2009. *Las membranas de las Células*, Editorial Fondo de cultura Económica, tercera edición.
- Rojas F., Mayagoitia V, Kornhauser, Dominguez A., Riccardo J. L., and Zgrablich G., 1993. "Simulation of heterogeneous catalytic surfaces", *Journal of Molecular Catal.* 85:57.
- Sahimi, M., 1994. *Applications of Percolation Theory*. Taylor & Francis Ltd, London.
- Scalettar, B., Abney J., y Hackenbrock C., 1991. Dynamics, structure, and functions are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8057–8061.
- Simmons G. F. y Krantz S. G., 2007. *Ecuaciones Diferenciales (teoría, técnica y práctica)*, Ed. Mc Graw Hill, primera edición en español; p. 462.
- Starr Cecie y Taggart Ralph, 2008. *Biología. La unidad y la diversidad de la vida*. Undécima edición, Editorial Progreso p. 76-83.
- Villalobos García Rafael, 2005. Tesis doctoral "Estudio de la liberación de fármacos desde sistemas matriciales inertes por medio de métodos de Monte Carlo. Efecto de la proporción y de la distribución espacial de los componentes", Universidad Autónoma Metropolitana.
- Wagner, J. G., 1993. *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist*.
- Warnecke Hans-Jurgen, 1993. *The Fractal Company*, Springer-Verlag.

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP	Adenosin Trifosfato
d	Dimensión euclídea.
d_f	Dimensión fractal
d_s	Dimensión espectral
d_w	Dimensión fractal del caminante aleatorio
E	Enzima
ES	Complejo enzima-sustrato
K_m	Constante de reacción de Michaelis and Menten
k_1, k_2 y k_{-1}	Constantes de velocidad de las reacciones descritas para la ecuación de Michaelis y Menten
MDSE	Modelo dual de sitios y enlaces
MM	Michaelis and Menten
r	Distancia recorrida por el caminante aleatorio.
S	Sustrato
t	tiempo
u.r.	Unidades de red



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00037

Matrícula: 207381043

"CINETICA DE
MICHAELIS-MENTEN EN SISTEMAS
TORTUOSOS: UNA APROXIMACION
FRACTAL"

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 18 del mes de abril del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FERNANDO ROJAS GONZALEZ
DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS
DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

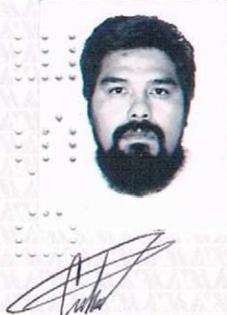
MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: MARCO ANTONIO CANTOR ARELLANO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARCO ANTONIO CANTOR ARELLANO
ALUMNO

REVISÓ



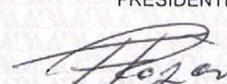
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



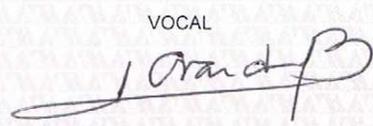
DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES
HEREDIA

PRESIDENTE



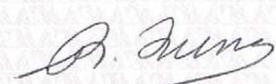
DR. FERNANDO ROJAS GONZALEZ

VOCAL



DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS

SECRETARIO



DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA