



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS TERMOQUÍMICO DE LA CINÉTICA
AUTOCATALÍTICA DE MOTORES
MOLECULARES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

F Í S I C O

P R E S E N T A:

NAZUL JARED LÓPEZ ALAMILLA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. IVÁN SANTAMARÍA HOLEK
2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres por soportarme en todos los aspectos de mi vida, espiritual, moral y económicamente.

A la madre Mar por brindarme la bastedad de sus aguas sin la que la vida no podría existir. Y que gracias a su calma encontré la tranquilidad en mi ser y que también por el poderoso embate de sus olas hallé la fuerza para nunca darme por vencido.

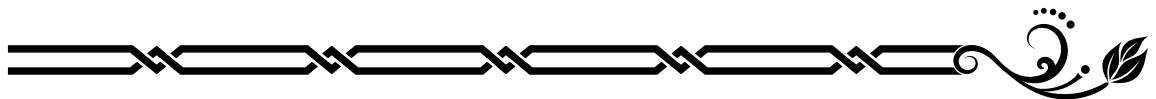
Datos del jurado

1. Datos del alumno
López
Alamilla
Nazul Jared
57120739
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Física
303123978
2. Datos del tutor
Dr.
Iván
Santamaría
Holek
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Karo
Michaelian
Pauw
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Luisa Alvarina
Alba
Lois
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Rolando Crisostomo
Castillo
Caballero
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Hector
Domínguez
Castro
7. Datos del trabajo escrito
Análisis termoquímico de la cinética autocatalítica de motores moleculares
123 p
2011

Notación

u	Energía interna específica
s	Entropía específica
σ	Densidad de producción de entropía
$\frac{D}{Dt}$	Derivada material o baricéntrica
β	Coefficiente de fricción de Stokes
ϱ	Densidad de probabilidad
J	Flujo
ν	Coefficiente estequiométrico
A	Afinidad de la reacción
μ	Potencial químico
ξ	Grado de avance de la reacción
w	Velocidad de la reacción
$[N]$	Concentración de la especie química
n	Fracción molar
k_i	Constante de velocidad de la reacción

Índice General



1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. El citoesqueleto	5
2.2. Los motores moleculares	8
2.2.1. El sistema cinesina microtúbulo	9
3. La TIL una herramienta para La biofísica química	11
3.1. El equilibrio local	11
3.2. Producción y balance de entropía	13
3.3. Relaciones lineales	16
3.4. Cinética química	16
3.4.1. Técnicas básicas de cinética química	20
3.4.2. Catálisis, enzimas e inhibidores	29
4. Movimiento Browniano y procesos estocásticos	39
4.1. Movimiento Browniano	40
4.2. Difusión	42
4.3. Ecuación de Langevin	44
4.4. Ecuación de Fokker-Planck	47
5. El modelo bioquímico	51
5.1. El efecto auto-inhibidor	59
5.2. Comparación entre los mecanismos con y sin inhibición	61
6. El perfil de energía	67

7. El modelo físico	77
7.1. Una velocidad no constante	81
8. Conclusiones	85
A. Transducción de energía química y metabolismo	89
A.1. Oxidación	90
A.2. El ATP como fuente de energía en sistemas biológicos	91
A.2.1. Generación de ATP	92
B. Las herramientas físicas	97
B.1. Ecuaciones de balance	97
B.1.1. Balance de masa y flujo de difusión	97
B.1.2. Balance de momento	99
B.1.3. Balance de energía	100
B.2. Ecuación de Smoluchowski	101
C. Las herramientas químicas	103
C.1. Más de la ley de Michaelis-Menten	103
C.2. Solución del modelo de Visscher y Schnitzer	104
C.3. Energías libres y coordenadas de reacción	109
Bibliografía	113

Capítulo 1

Resumen



En este trabajo se estudia el transporte activo de vesículas u otros organelos por medio de proteínas motoras como la cinesina. En particular, se propone un modelo que representa la participación de las cinesinas en el transporte de neurotransmisores contenidos en vesículas. Dicho modelo se formula sobre las bases de la termodinámica irreversible lineal y conlleva herramientas tanto biofísicas como bioquímicas.

El objetivo central de la modelación consiste en obtener una expresión para la velocidad de desplazamiento de la cinesina en función de fuerzas *mecanoquímicas* que participan en el movimiento de esta proteína motora y la descripción de como este proceso modula el desplazamiento de vesículas en células nerviosas. Para modelar el avance de la cinesina a lo largo de los microtubulos se optó por utilizar como base dos modelos bioquímicos previamente desarrollados de forma independiente. Cada uno de estos modelos predicen y ajustan a los datos experimentales correspondientes.

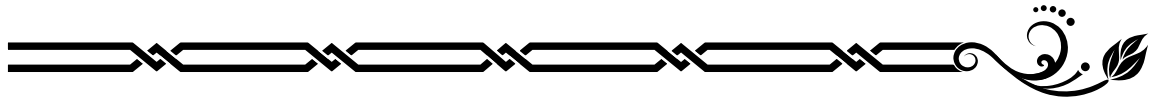
Estos modelos describen la cinética química de la reacción llevada a cabo entre las cinesinas y las moléculas de *ATP* sin tener en cuenta la autoinhibición debida al aumento en la concentración de *ADP* que es consecuencia del propio movimiento de la cinesina. El propósito de mi trabajo fue la recreación de dichos modelos y su generalización al caso de los mencionados procesos autoinhibitorios por *ADP*. Además, en el presente trabajo se obtuvieron dos expresiones para la velocidad de desplazamiento en función del tiempo y moduladas por distancias y tiempos característicos propios del sistema y calculados con base en relaciones químicas.

Los modelos bioquímicos usados no solo permitieron establecer una expresión para la velocidad de desplazamiento con las condiciones requeridas por el modelo físico que describe el movimiento de vesículas dentro de las células, sino que también permitió sentar las bases para reconstruir el paisaje energético del proceso realizado

por el sistema compuesto: microtubulo-cinesina-*ATP*. La reconstrucción del paisaje energético correspondiente a la reacción autocatalítica realizada por la proteína motora constituye la contribución original más importante del trabajo, ya que esta clase de reconstrucción teórica de potenciales energéticos han sido poco desarrollada en la literatura.

Capítulo 2

Introducción



La célula es la estructura precursora de la vida. Debido a esto, es parte fundamental del estudio de la biología y otras ciencias tales como la química y recientemente también de la física. Actualmente el origen de esta maravilla es aún desconocido. Sin embargo los avances de la biología nos han permitido identificar un tipo en particular de células como las más primitivas y simples en el mundo. Estas son las denominadas células procariontes. La gran mayoría de los organismos unicelulares, como las bacterias y algunas algas son individuos constituidos por un tipo específico de estas células procariontes.

Aunque las células procariontes son las más simples, tienen una estructura propia bastante compleja. Estas células, que varían en tamaño entre 1 y $10\mu\text{m}$ constan de una membrana plasmática que está formada por una doble capa lipídica. Esta estructura delimita a todas las células vivas, tanto a las procariontes como a las eucariontes. Ella establece el límite entre el medio intracelular (el citoplasma) y el medio extracelular (ambiente u otras células). La membrana está rodeada por una pared celular. La pared celular protege los contenidos de la célula, da rigidez a la estructura celular, media en todas las relaciones de la célula con el entorno y actúa como compartimiento celular.

En el interior de la célula encontramos: vacuolas, ribosomas y material genético. Las vacuolas son compartimientos cerrados que albergan diferentes sustancias como enzimas, sales, azúcares, algunas proteínas en disolución y fluidos tales como agua. La mayoría de las vacuolas se forman a través de la fusión de múltiples vesículas con la membrana. Su función es la de la desintegración de macromoléculas y el reciclaje de sus componentes dentro de la célula así como la hidratación de la célula.

Los ribosomas son organelos encargados de sintetizar proteínas a partir de la

información genética que les llega del ADN, transcrita en forma de ARN mensajero (ARNm), esta es su principal función. El material genético o nucleolo el ADN, que en el caso de este tipo celular se encuentra disperso en el citoplasma y carece de proteínas.

El siguiente tipo celular es el de las células eucariontes. Estas células cuentan con todos los constituyentes de las procariontes más otros organelos como: plastos, mitocondrias, aparato de Golgi, un núcleo celular y un citoesqueleto. Varios de estos organelos tiene la peculiaridad de poseer su propio material genético. El origen de los mismos es dudoso, mas la gran mayoría de los investigadores apoyan la teoría *endosimbiótica de Cajal* [1]¹, como la explicación más plausible para dicho origen. Las funciones de estos organelos son esenciales para mantener viva a la célula y a los organismos pluricelulares constituidos de este tipo de células.

Los plastos sólo están presentes en células vegetales (células encontradas en plantas y algas). Su principal función es la producción y almacenamiento de importantes compuestos químicos usados por la célula. Usualmente, contienen pigmentos utilizados en la fotosíntesis. El tipo de pigmento es variable en los distintos tipos de células y determina el color de las mismas. Las mitocondrias son organelos provistos de una doble membrana y se encuentran en la mayoría de las células eucariontes. Su principal función es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, beta-oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP² mediante la fosforilación oxidativa. El ATP se utiliza como fuente de energía química y la mayor parte del mismo es producido por las mitocondrias. Además de proporcionar energía a la célula, las mitocondrias están implicadas en otros procesos, como la señalización celular, diferenciación celular, muerte celular programada, así como el control del ciclo celular y el crecimiento celular.

El aparato de Golgi es otro organelo presente en todas las células eucariontes excepto los glóbulos rojos y células epidérmicas. Pertenece al sistema de endomembranas del citoplasma celular. Está formado por unos 4-8 dictiosomas, que son sáculos aplanados rodeados de membrana y apilados unos encima de otros, y cuya función es completar la fabricación de algunas proteínas. Funciona como una planta empaquetadora, modificando vesículas del retículo endoplasmático rugoso. El material nuevo de las membranas se forma en varios compartimientos del Golgi. Dentro de las funciones que posee el aparato de Golgi se encuentran la glicosilación³ de proteínas y lípidos,

¹Esta teoría establece que algunos de los organelos (que presentan su propio ADN) en las células deben su origen a una previa simbiosis entre algunas células primitivas y que con el tiempo evolucionaron conjuntamente para formar células más complejas.

²Adenosín trifosfato, formado por Adenina y una ribosa, enlazada a tres grupos fosfato.

³La glicosilación o glucosilación es un proceso químico en el que se adiciona un glúcido a otra

selección, destinación, almacenamiento y distribución de lisosomas y la síntesis de polisacáridos de la matriz extracelular.

El núcleo celular es un orgánulo membranoso que se encuentra en las células eucariontas. Contiene la mayor parte del material genético celular. Las principales estructuras que constituyen el núcleo son la envoltura nuclear, una doble membrana lipídica que rodea completamente al orgánulo y separa su contenido del citoplasma, y la lámina nuclear, una trama por debajo de ella que le proporciona soporte mecánico.

Por último el, *citoesqueleto* es un entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno a las células, ancla las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división. Es una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, facilita la movilidad celular (usando estructuras como los cilios y los flagelos), y desempeña un importante papel tanto en el transporte intracelular (por ejemplo, los movimientos de vesículas y orgánulos) y en la división celular. Los detalles de la morfología y constitución del citoesqueleto así como su papel en el transporte intracelular será descrito con más profundidad en la siguiente sección.

2.1. El citoesqueleto

Como su nombre lo indica, esta estructura celular conforma una clase de esqueleto celular, el cual da soporte y forma al citoplasma. Su composición esta basada en 3 clases de filamentos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios [1]. Estos componentes están distribuidos en el citoplasma de tal modo que entretejen una compleja red, como se esquematiza en la figura 2.1.

Como apreciamos en la figura 2.1, los filamentos de actina son los elementos más finos de esta red y se distribuyen principalmente cerca de la membrana plasmática. Mientras que los filamentos intermedios y microtúbulos se encuentran en todo el citoplasma, siendo los microtúbulos los filamentos más robustos de los tres. A continuación se discutirán las funciones y conformación de los tres tipos de filamentos.

Filamentos de actina

Estos filamentos son abundantes en células musculares y están constituidas por 2 proteínas globulares enrolladas como una hélice. En este estado, la proteína se llama **actina F** o polimerizada mientras que en estado disgregado se le denomina

molécula. Esta molécula se denomina aceptor. La molécula aceptor puede ser de muchos tipos, por ejemplo de naturaleza proteica o lipídica.

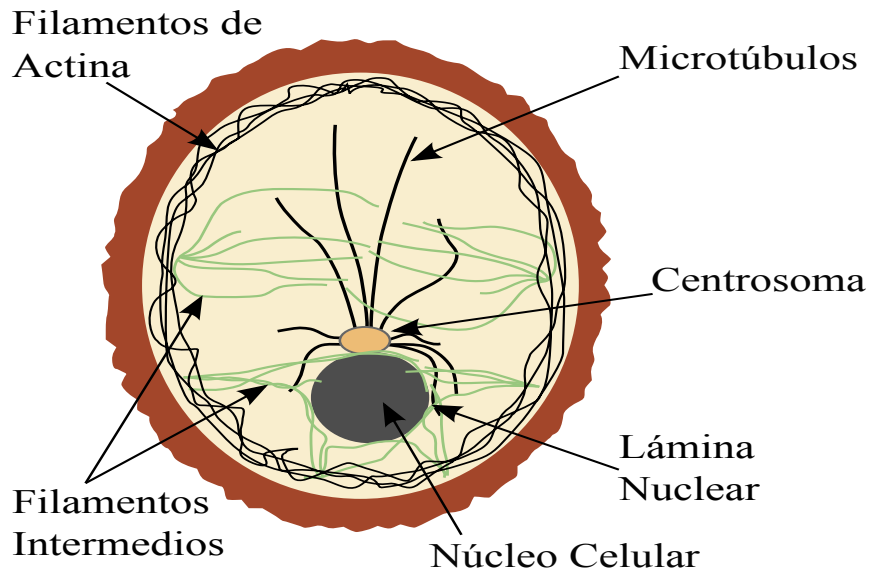


Figura 2.1: Disposición de los elementos del citoesqueleto en una célula.

actina G. Debido a que estos filamentos presentan polaridad, su principal función es la de la motilidad (movimiento celular) mediante cilios o flagelos.

Filamentos intermedios

Las proteínas que conforman estos filamentos, la citoqueratina, vimentina, neurofilamentos, desmina y la proteína fibrilar ácida de la glia, dependen del tejido en el que se hallen. Son filamentos de proteína fibrosa de unos 12nm de diámetro y son los componentes heterogéneos más estables del citoesqueleto [2], dando soporte a los orgánulos (por sus fuertes enlaces). Su función principal es la organización de la estructura tridimensional interna de la célula. También participan en algunas uniones intercelulares.

Microtúbulos

Estos son el principal componente citoesquelético de las células eucariontas y se encuentran tanto dispersos como formando cilios, flagelos y centriolos. Están formados por dos unidades básicas. Un par de monómeros llamados α y β . Estos monóme-

ros se agrupan en un heterodímero⁴ llamado tubulina, aunque también se pueden asociar en un homodímero⁵. Dicha tubulina construye cadenas de varios micrómetros de longitud llamados protofilamentos. Al agruparse varios de estos filamentos se forma un cilindro de unos 25nm de sección transversal y hueco. Estos cilindros son los microtúbulos y comúnmente tienen entre 9 y 14 protofilamentos dependiendo del tipo celular en cuestión. El hecho de que los microtúbulos estén constituidos por un heterodímero hace que este posea una polaridad definida y es común denotar sus extremos como «más» (plus end) y «menos» (minus end). En figura 2.2 se muestra un esquema del microtúbulo y sus constituyentes.

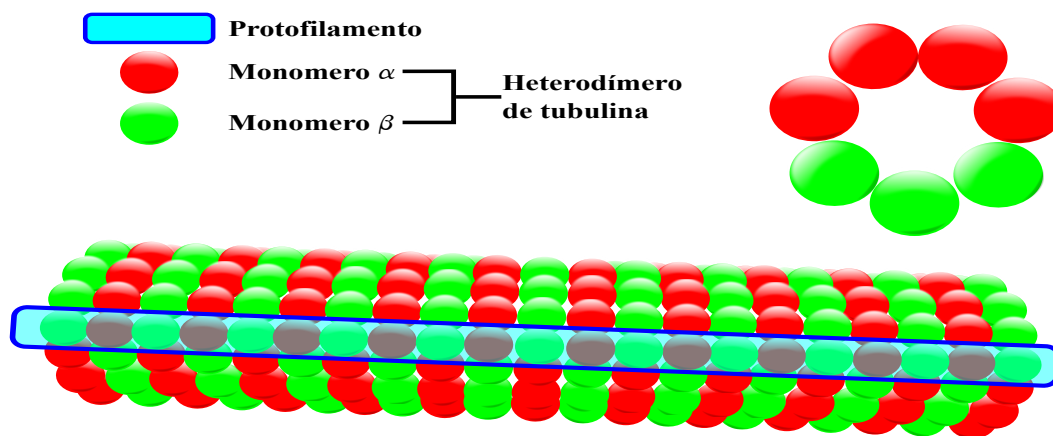


Figura 2.2: Estructura de un microtúbulo.

Las funciones asociadas a los microtúbulos son varias. Por ejemplo, tienen funciones mecánicas al ser el componente más abundante del citoesqueleto; en el transporte intracelular ya que sirven como sistema microcirculatorio de vesículas y otras macromoléculas. En la morfología de la célula, ya que estos dan su forma final a cada célula durante la morfogénesis. También son fundamentales para dar motilidad y polaridad a las células así como para influir en la disposición de los demás elementos del citoesqueleto, como los filamentos de actina e intermedios. Su papel como mediadores del transporte intracelular es interesante ya que cierto tipo de moléculas conocidas como motores celulares usan estos filamentos como si fueran un *camino* para guiar la carga que transportan a su destino final.

⁴Un heterodímero es un dímero formado por 2 unidades distintas

⁵Dímero cuyas 2 unidades son iguales.

2.2. Los motores moleculares

Existe una gran variedad de proteínas macromoleculares que actúan como motores moleculares. Estudios recientes han identificado 3 tipos de moléculas como las principales protagonistas en el transporte intracelular [3]. Estas tres moléculas son la *Miosina*, la *Dineína* y la *Cinesina*. Cada una de estas moléculas en realidad conforman una *familia*, habiendo una gran gama de ellas dependiendo del organismo o el tipo de tejido al cual pertenezca la célula en cuestión. Los 3 tipos son proteínas consideradas ATPasas, es decir son capaces de efectuar la hidrólisis del ATP (reacción química que libera un fosfato del ATP convirtiéndose en un ADP y una molécula de fosforo inorganico P_i)



Esta reacción es además exotérmica⁶. La función de dichos motores es variada ya que regulan el tráfico de moléculas hacia dentro de la célula y hacia afuera de la misma. El traslado de moléculas hacia el interior celular es llamado endocitosis. En este proceso se introducen moléculas que servirán a la célula como nutrientes y combustible para que la célula crezca, se reconstruya o se reproduzca.

El proceso de transporte de moléculas hacia el exterior de la célula es llamado exocitosis. En la exocitosis las moléculas transportadas son desechos del metabolismo celular, moléculas mensajeras que sirven como señales para comunicarse con otras células o simplemente útiles para activar funciones necesarias del metabolismo de la célula. En los proceso de endocitosis se han identificado la actividad de Dineína y Miosina, mientras que en los de exocitosis a la Cinesina y Miosina [3].

Como se mencionó con anterioridad, cada uno de estos tres tipos de proteínas constituyen por si mismos una familia. En el caso de la familia de las miosinas, la **miosina de tipo V**, será la más significativa, ya que en conjunto con los filamentos de actina participa activamente en el transporte intracelular [3]. De las tres es la única que realiza transporte en ambas direcciones. Esto lo hace a lo largo de los filamentos de actina y principalmente transporta vesículas.

La **dineína** es, junto con la cinesina, la proteína motora más importante asociada a los microtúbulos. Ésta se mueve hacia al extremo «menos» (Minus End) del microtúbulo (movimiento retrógrado) [3]. La dineína es clave en el transporte inverso de sustancias en la célula. Este hecho reviste gran importancia en el axón neuronal, y en el movimiento de Cilios y Flagelos.

La **cinesina** o **kinesina** es un dímero cuya función en la célula es la de mediar el transporte de vesículas y algunos organelos a lo largo de los microtúbulos. Dicho

⁶Reacción química la cual libera energía.

dímero, como se puede apreciar en la figura 2.3 consta de tres secciones. La sección superior se denomina cabeza y posee dos, la sección media se llama tallo, y la inferior cola de cual nuevamente posee dos. Los dominios cabeza son los que interactúan directamente con los microtúbulos y el ATP, mientras que el dominio cola se encarga de interactuar con las vesículas a transportar.

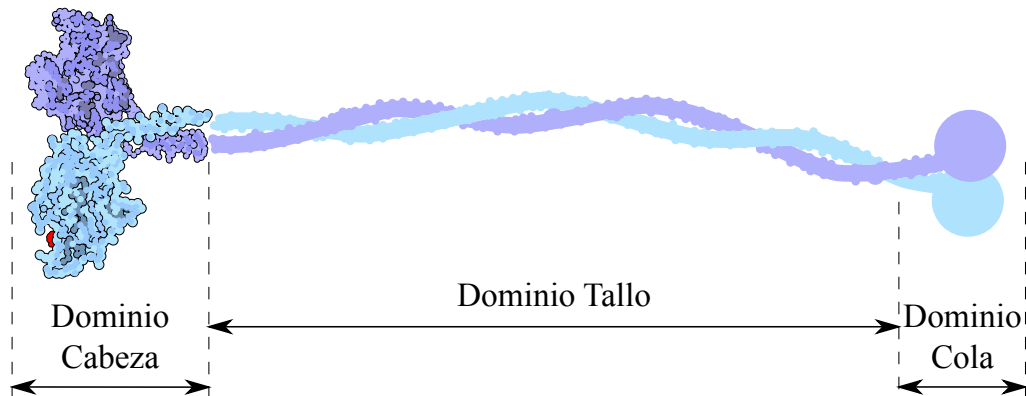


Figura 2.3: Estructura de la cinesina con ATP(rojo).

2.2.1. El sistema cinesina microtúbulo

La forma en que esta proteína transporta sus carga por los microtúbulos ha sido descrita como una caminata *sobre el microtúbulo*. Este supuesto caminar es originado por reacciones bioquímicas entre la cinesina, el microtúbulo y moléculas de ATP.

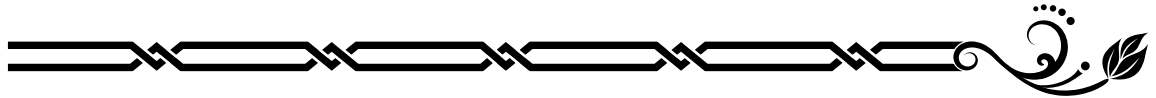
Dado que la cinesina es una ATPasa, la energía liberada por la hidrólisis del ATP es la que permite que los dominios cabeza de esta se muevan y unan a ciertos sitios en el microtúbulo, permitiendo que ésta vaya avanzando sobre el microtúbulo simulando así un caminar bípedo. Durante la hidrólisis del ATP se ha notado que aun para el transporte de cargas considerables el consumo de ATP es de un ATP por cada paso de la cinesina el cual es de 8nm [4], y cada cinesina se mantiene activa por a lo más unos cientos de nanómetros 400 ~ 800 nm lo cual promedia una procesividad máxima de unos 100 pasos para las cinesinas saludables en condiciones estándar de concentración de ATP [5]. El movimiento del motor se mantiene siempre y cuando el suministro de ATP (combustible) sea suficiente para completar su trayecto, es decir que la concentración de ATP en la célula debe estar por encima de un cierto umbral y además este solo se activa cuando una señal específica es enviada a la

célula, comúnmente una molécula de calcio mensajero. El ATP utilizado en este y otros procesos celulares es sintetizado dentro de las mitocondrias como parte del metabolismo celular ver Apéndice A. La descripción de esta complicada dinámica ha impuesto un reto para científicos en el mundo entero que tratan de encontrar los posibles mecanismos de reacciones químicas que impulsan este motor, así como entender las fuerzas asociadas a dicho movimiento, ambas asociadas al consumo de ATP.

En nuestro trabajo usaremos dos descripciones, una bioquímica y otra biofísica, para estudiar el problema de la procesividad de la cinesina así como del desplazamiento de su carga a lo largo de los microtúbulos. Ambas descripciones tienen como base general la *Termodinámica Irreversible Lineal*, la cual ha mostrado ser una herramienta eficaz y relativamente sencilla para la modelación de sistemas biológicos pequeños.

Capítulo 3

La termodinámica irreversible lineal una herramienta para la modelación en biofísica química



En este capítulo se dará una breve introducción a la *Termodinámica Irreversible Lineal* (TIL), su fundamentación y sus aplicaciones en el tema específico que nos interesa y que constituyen la base teórica de los modelos descritos en los siguientes capítulos. Esta teoría se formuló originalmente para estudiar procesos termodinámicos fuera del equilibrio (irreversibles) y como una extensión de la termodinámica de procesos reversibles.

Al igual que la termodinámica de equilibrio, la TIL se fundamenta en los principios de conservación de la energía y el aumento de la entropía. Pero a diferencia de su contraparte reversible, la TIL admite que las variables de estado, y en particular los potenciales termodinámicos, dependan del tiempo y la posición, teniendo como hipótesis principal la idea del *equilibrio local*.

3.1. El equilibrio local

Supongamos que un sistema macroscópico se encuentra fuera del equilibrio termodinámico¹ y que podemos dividirlo en varios subsistemas de dimensiones muy menores a las del sistema original, pero lo suficientemente grandes para poder definir cantidades termodinámicas en cada uno de ellos. Es decir si L es la dimensión del

¹Sus variables de estado varían en posición y tiempo.

sistema macroscópico, y la dimensión de cada subsistema es l debe cumplirse

$$1\text{\AA} \ll l \ll L.$$

Donde \AA es una medida de escala microscópica. El tamaño de l es tal que localmente se puede dar un tratamiento macroscópico a cada uno de los subsistemas, además el seccionamiento es tal que cada uno de los subsistemas por separado se supone en equilibrio, y para cada subsistema respecto a los subsistemas vecinos sus correspondientes estados de equilibrio alcanzados no varían mucho entre sí. Es decir, si nuestro sistema total denotado por \mathcal{S}_{Tot} esta constituido por el conjunto de subsistemas s_i , entonces cada subsistema tiene una temperatura de equilibrio local T_i y $T_i \approx T_j$ con $i \neq j$, de igual manera con las demás variables de estado que caracterizan los subsistemas, es decir los gradientes de las variables termodinámicas no son muy grandes, la figura 3.1 muestra esquemáticamente la idea.

El nivel de descripción comprendido entre \AA y l corresponde a una escala *mesoscópica*, en la cual las cantidades termodinámicas fluctúan, en tal caso la TIL debé ser completada con una teoría de fluctuaciones termodinámicas, teoría llamada *Termodinámica de no-equilibrio Mesoscópica* (NEMT) si se desea una descripción de sistemas de dicha escala.

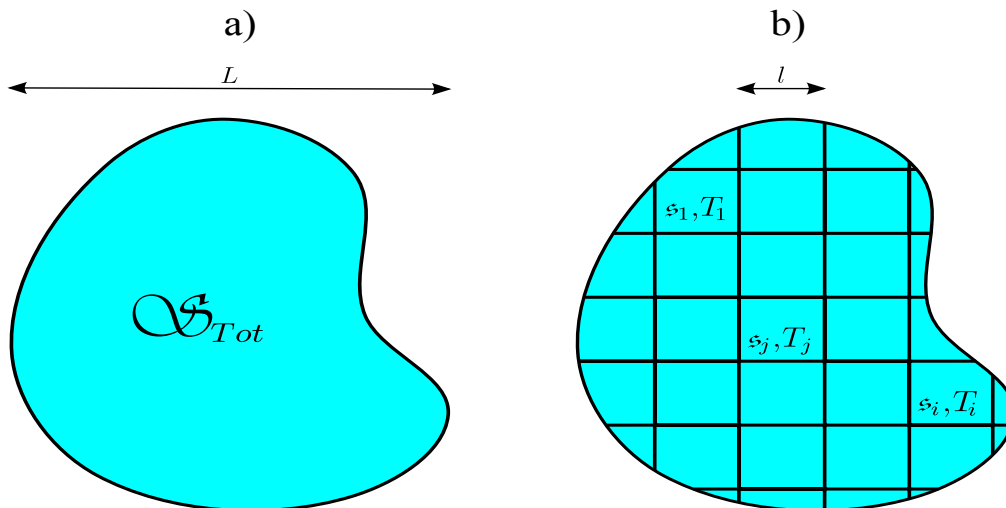


Figura 3.1: (a) Sistema total fuera de equilibrio, (b) Subsistemas cada uno en equilibrio local.

El concepto del equilibrio local (*l-eql.*) junto con la validez de la segunda ley de la termodinámica localmente nos permitirán aplicar el concepto de entropía a

sistemas alejados del equilibrio mediante ecuaciones de balance para las cantidades termodinámicas e hidrodinámicas, las cuales en forma local dependerán de la posición y el tiempo.

3.2. Producción y balance de entropía

Antes de discutir el concepto de entropía fuera de equilibrio y de introducir la ecuación de balance para la entropía, será conveniente recordar que el cambio de la entropía total de un sistema tiene dos contribuciones

$$dS = d_eS + d_iS, \quad (3.1)$$

donde el término d_eS es debido al intercambio de entropía del sistema con el exterior y d_iS es la producción de entropía debida a procesos irreversibles originados en el sistema.

La variación temporal de la entropía total del sistema en un volumen V arbitrario es

$$\frac{dS}{dt} = \int_V \frac{\partial}{\partial t}(\rho s) dV, \quad (3.2)$$

donde s es la entropía específica del sistema definida como la entropía S por unidad de masa.

El intercambio de entropía con los exteriores mediante el flujo de entropía \vec{J}_s [6].

$$\frac{d_eS}{dt} = - \int_V \nabla \cdot \vec{J}_s dV. \quad (3.3)$$

La producción interna de entropía, en términos de la densidad de producción de entropía σ la cual por hipótesis debe cumplir con la segunda ley de la termodinámica

$$\frac{d_iS}{dt} = \int_V \sigma dV, \text{ con } \sigma > 0 \text{ por segunda ley.} \quad (3.4)$$

Al sumar las ecuaciones (3.3) y (3.4) e igualarlas con (3.2) obtenemos la siguiente expresión

$$\int_V \frac{\partial}{\partial t}(\rho s) dV = - \int_V \nabla \cdot \vec{J}_s dV + \int_V \sigma dV, \quad (3.5)$$

que es válida para cualquier volumen arbitrario, de modo que

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho s) = -\nabla \cdot \vec{J}_s + \sigma, \quad (3.6)$$

que es en esencia una ecuación de balance para la entropía específica y vemos que tiene dos contribuciones una debida a un *flujo de entropía* y otra debida a la producción interna de entropía. Por otra parte para todo sistema macroscópico podemos introducir la entropía específica “s” como una función del tiempo y la posición $s(\vec{r}, t)$, está entropía específica es la entropía “S” por unidad de masa. De la termodinámica sabemos que la entropía es función de las variables extensivas:

$$s(\vec{r}, t) = s(u(\vec{r}, t), v(\vec{r}, t), n_i), \quad (3.7)$$

donde “u” es la densidad de energía interna, “v” es el volumen específico y n_i es la fracción másica de la sustancia i , que en equilibrio satisface la ecuación de Gibbs,

$$du = Tds - pdv + \sum_{i=1}^n \mu_i dn_i. \quad (3.8)$$

Para encontrar el balance de entropía nos valdremos de dos hipótesis.

Hipótesis (1): Aunque el sistema global no esta en equilibrio, en el elemento de volumen existe el estado de *l-eql.*, para el cual la entropía $s(u, v, n_i)$ es la misma que en equilibrio.

Hipótesis (2): La ecuación de Gibbs, continua siendo válida en ese elemento de volumen seguido a lo largo del movimiento de su centro de gravedad.

$$T \frac{Ds}{Dt} = \frac{Du}{Dt} + p \frac{Dv}{Dt} - \sum_{i=1}^n \mu_i \frac{Dn_i}{Dt}. \quad (3.9)$$

Donde $\frac{D}{Dt}$ denota la derivada material o baricéntrica definida como

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla.$$

La forma explícita de la ecuación de Gibbs se obtiene al sustituir las ecuaciones de balance para “u”, \vec{v} y ρ_i [7, 6] en el Apéndice B también se muestra de manera sencilla estos cálculos. El resultado en forma de una ecuación de balance es

$$\begin{aligned} \rho \frac{Ds}{Dt} = & -\frac{1}{T} \nabla \cdot \left[\vec{J}_q - \sum_{i=1}^n \mu_i J_i \right] - \frac{1}{T^2} \vec{J}_q \cdot \nabla T - \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n \vec{J}_i \cdot \left[T \nabla \left(\frac{\mu}{T} \right) - \vec{F}_i \right] \\ & - \frac{1}{T} \mathbf{\Pi} : \nabla \vec{v} - \frac{1}{T} \sum_{j=1}^r J_j^{chem} A_j, \end{aligned} \quad (3.10)$$

con A_j la afinidad de la j -ésima reacción química definida por $A_j = \sum_{i=1}^r \nu_i \mu_i$, la afinidad química es descrita como la fuerza que conduce a las reacciones químicas, en la sección 3.4 se explicara con más detalle esta variable. En la ecuación anterior se pueden identificar los siguientes términos, el flujo de entropía

$$\vec{J}_{s,tot} = \frac{1}{T} \left(\vec{J}_q - \sum_{i=1}^n \mu_i \vec{J}_i \right), \quad (3.11)$$

y la densidad de producción de entropía

$$\sigma = -\frac{1}{T^2} \vec{J}_q \cdot \nabla T - \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n \vec{J}_i^D \left[T \nabla \left(\frac{\mu_i}{T} \right) - \vec{F}_i \right] - \frac{1}{T} \mathbf{\Pi} : \nabla \vec{v} - \frac{1}{T} \sum_{j=1}^r J_j^{chem} A_j. \quad (3.12)$$

En la expresión anterior cada término debe ser mayor o igual a cero para que cumpla con la segunda ley y además la suma de los términos cumple también con la segunda ley, también debemos notar en la ecuación (3.11) los términos de la suma tiene el mismo carácter tensorial, de igual manera los términos en (3.12) esto de acuerdo al principio de simetría de Curie, el cual nos dice que para un material isotrópo *sólo se acoplan fuerzas y flujos del mismo carácter tensorial*. Las cantidades $J_{s,tot}$ y σ definidas por (3.11) y (3.12) respectivamente son exactamente las mismas que aparecen en la ecuación (3.6). La forma de la ecuación (3.12) permite identificar los flujos² y fuerzas termodinámicas que actúan sobre el sistema.

Así en el caso de las reacciones químicas, el flujo termodinámico asociado es J_j^{chem} , mientras que la fuerza termodinámica está dada por el cociente de la afinidad A_j sobre la temperatura T . En el caso de procesos difusivos el flujo asociado es \vec{J}_i^D y tiene como fuerza al gradiente del potencial químico μ_i dividido por la temperatura. Los dos ejemplos anteriores serán tratados con más detalle posteriormente en el inciso 3.4 y el Capítulo 4. En general todo flujo termodinámico \vec{J}_ϕ tiene asociado una fuerza termodinámica \vec{F}_ϕ , de modo que la densidad de producción de entropía puede ser escrita como una suma de los productos entre un flujo y su correspondiente fuerza

$$\sigma = \sum_{\phi} \vec{F}_\phi \vec{J}_\phi. \quad (3.13)$$

²Debemos aclarar que usamos la letra J para denotar a todos los flujos, y un subíndice para especificar el tipo de flujo que se trata, pero en el caso de flujos en el que intervienen más de una especie química como en flujos difusivos y químicos usamos el subíndice para denotar que especie produce el flujo y un superíndice para el tipo de flujo.

3.3. Relaciones lineales

En sistemas cercanos al equilibrio, se puede hacer una teoría general, que suponga que la relación entre las fuerzas termodinámicas y los flujos es lineal [8], es decir que los flujos son proporcionales de cierta manera a las fuerzas

$$\vec{J}_\phi \propto \vec{F}_\phi, \quad (3.14)$$

como es usual esta proporcionalidad es convertida en igualdad mediante la introducción de un coeficiente de proporcionalidad y en un esquema más general el flujo tiene la forma

$$\vec{J}_\phi = - \sum_{\varphi} \mathbb{L}_{\phi\varphi} \vec{F}_\varphi, \quad (3.15)$$

donde la matriz $\mathbb{L}_{\phi\varphi}$ es llamada matriz de coeficientes fenomenológicos o coeficientes de Onsager y donde el doble subíndice indica que fuerzas del tipo φ generan flujos del tipo ϕ . Tales fenómenos son conocidos como efectos cruzados tales como la termodifusión, el efecto Peltier, efecto Zebeck, etc. Pero para el fin de este trabajo nos enfocaremos a flujos producidos por una sola fuerza, del tipo $\vec{J}_\phi = -\mathbb{L}_\phi \vec{F}_\phi$, tales como el flujo de calor

$$\vec{J}_q = -K \nabla T, \quad (3.16)$$

que es mejor conocida como ley de Fourier para la conducción térmica y muy especialmente en el flujo por difusión

$$\vec{J}_k^D = -D \nabla n_k, \quad (3.17)$$

conocida como ley de Fick, y los flujos de reacciones químicas

$$J_j^{chem} = k_j A_j. \quad (3.18)$$

3.4. Cinética química

En la ecuación (3.12) podemos identificar cuatro términos asociados a la producción de entropía, el intercambio de calor, los flujos viscosos, los procesos difusivos y un cuarto debido a las reacciones químicas. Este último de será de particular interés en nuestro trabajo. Suponiendo que la única contribución no nula a la producción de entropía es la que proviene de las reacciones químicas entonces tenemos

$$\sigma_{chem} = \frac{1}{T} \sum_{j=1}^m J_j^{chem} A_j \geq 0. \quad (3.19)$$

El hecho que esta cantidad sea mayor o igual a cero se sigue de que σ_{chem} cumple con la segunda ley de la termodinámica. Partiendo de esta condición y suponiendo que los flujos son proporcionales a las fuerzas se encuentra que el flujo J_j^{chem} puede escribirse como $J_j^{chem} = k_j A_j$ lo cual garantiza se cumpla la desigualdad siempre que k sea positivo.

Para comprender mejor qué representa la afinidad A_j recordemos que en un esquema general de reacción tenemos



con ν_{ij} los coeficientes estequiométricos de la reacción y por convención definimos que el lado izquierdo de la reacción corresponde a los reactivos y el lado derecho a los productos. Para una reacción química en equilibrio las fuerzas y los flujos se anulan es decir $J_j^{chem} = 0$, esto implica que la afinidad de la reacción es cero $A_j = 0$, es decir en equilibrio la tasa de producción y consumo de las especies químicas se compensan de modo que no hay una reacción neta como tal, fuera de equilibrio hay una reacción neta hacia alguno de los lados de la ecuación (3.20) en tal caso el valor de A_j es distinto de cero. Esto quiere decir que la afinidad como su nombre lo indica nos indica *que tan afín es cierto reactivo a reaccionar*.

Por otra parte de la relación de Gibbs-Duhem a temperatura y presión constante, sabemos que en equilibrio G se minimiza, según

$$dG = \sum_{i=1}^r \frac{\partial G}{\partial n_i} dn_i = \sum_{i=1}^r \mu_i dn_i = 0, \quad (3.21)$$

donde μ_i es el potencial químico por unidad de masa por unidad de mol y n_i es la fracción molar.

Introduciremos ahora una nueva variable, el grado de avance de una reacción ξ_j , definido como

$$dn_i = -\nu_{ij} d\xi_j. \quad (3.22)$$

Esta nueva variable nos indica como disminuye la concentración de la i -ésima especie química en proporción con su estequiometría³ para la j -ésima reacción. Al sustituir (3.22) en (3.21) obtenemos

$$\sum_{i=1}^r \mu_i \nu_{ij} d\xi_j = 0,$$

³La definición de ξ en (3.22) solo es válida en sistemas homogéneos.

y puesto que las variaciones de $d\xi_j$ son arbitrarias se sigue que

$$\sum_{i=1}^r \mu_i \nu_{ij} = 0, \quad (3.23)$$

siguiendo la estructura de (3.20) al distinguir entre reactivos (lado izquierdo de una reacción) mediante los coeficientes ν_{ij} y productos (lado derecho) con coeficientes primados ν'_{ij} , tenemos que en equilibrio⁴

$$\sum_{i=1}^r (\nu_{ij} - \nu'_{ij}) \mu_i = 0,$$

la expresión anterior es la definición formal de la afinidad de una reacción [9]

$$A_j \equiv \sum_{i=1}^r (\nu_{ij} - \nu'_{ij}) \mu_i. \quad (3.24)$$

Al sustituir (3.24) en la definición del flujo (3.18), tenemos

$$J_j^{chem} = \kappa_j \sum_{i=1}^r (\nu_{ij} - \nu'_{ij}) \mu_i, \quad (3.25)$$

suponiendo que las sustancias involucradas en la reacción se comportan de manera ideal, es decir como un gas ideal o una solución diluida, el potencial químico se puede expresar como

$$\mu_i = RT \ln \left(\frac{n_i}{n_i^{eq}} \right), \quad (3.26)$$

de manera que al sustituir (3.26) en (3.25) y utilizando las propiedades de la función logaritmo obtenemos

$$J_j^{chem} = \kappa_j RT \left\{ \ln \left[\prod \left(\frac{n_i}{n_i^{eq}} \right)^{\nu_{ij}} \right] - \ln \left[\prod \left(\frac{n_i}{n_i^{eq}} \right)^{\nu'_{ij}} \right] \right\}. \quad (3.27)$$

Aproximando la función logaritmo por $\ln(x) \approx x - 1$ mediante la serie de Taylor tenemos

$$J_j^{chem} = \kappa_j RT \left[\prod \left(\frac{n_i}{n_i^{eq}} \right)^{\nu_{ij}} - \prod \left(\frac{n_i}{n_i^{eq}} \right)^{\nu'_{ij}} \right], \quad (3.28)$$

⁴El signo (-) para el coeficiente estequiométrico ν' esta dado por convención y puede verse la justificación en cualquier libro de química general o fisico-química.

la aproximación anterior esta justificada ya que las n_i 's están debidamente normalizadas. En este punto notemos que el coproducto de las n_i^{eq} es una cantidad constante así como RT , de modo que será útil absorberlas en unas nuevas constantes, definidas como

$$\begin{aligned} k_j &= \kappa_j RT \prod_i^r (n_i^{eq})^{-\nu_{ij}} \quad \text{y} \\ k_{-j} &= \kappa_j RT \prod_i^{r'} (n_i^{eq})^{-\nu'_{ij}}. \end{aligned} \quad (3.29)$$

Al realizar el cociente de k_j y k_{-j} encontramos la siguiente relación

$$\frac{k_j}{k_{-j}} = \frac{\prod_i^{r'} (n_i^{eq})^{\nu'_{ij}}}{\prod_i^r (n_i^{eq})^{\nu_{ij}}}, \quad (3.30)$$

que no es más que la definición de la constante de equilibrio de una reacción química

$$K(T, p) = \frac{\prod_i^{r'} (n_i^{eq})^{\nu'_{ij}}}{\prod_i^r (n_i^{eq})^{\nu_{ij}}}. \quad (3.31)$$

A partir de aquí las nuevas constantes k_j y k_{-j} serán nuestra definición de constante de velocidad o ritmo de la reacción. Al sustituir (3.29) en (3.28) tenemos.

$$J_j^{chem} = k_j \prod_i^r (n_i)^{\nu_{ij}} - k_{-j} \prod_i^{r'} (n_i)^{\nu'_{ij}}, \quad (3.32)$$

recordando lo expuesto en las secciones previas podemos identificar el flujo químico J_j^{chem} , como $J_j^{chem} = d\xi_j/dt$ ⁵. Esta definición conduce a la ley de acción de masas formulada por primera vez entre 1864 y 1879 de forma empírica por Guldberg y Waage. Esta ley nos da una relación explícita entre la velocidad de reacción, las

⁵Nuevamente esto solo ocurre en sistemas homogéneos, por lo que el término Dn_i/Dt en (3.9) es solamente $\partial n_i/\partial t$.

concentraciones de las especies químicas involucradas en la reacción y las constantes de ritmo de dicha reacción

$$J_j^{chem} = \frac{d\xi_j}{dt} = -\frac{1}{\nu_{ij}} \frac{dn_i}{dt} = k_j \prod_i^r (n_i)^{\nu_{ij}} - k_{-j} \prod_i^{r'} (n_i)^{\nu'_{ij}} \quad (3.33)$$

La ecuación (3.33) es la base de la toda la *cinética química* de reacciones elementales y será fundamental para el desarrollo del Capítulo 5 y el Apéndice C .

3.4.1. Técnicas básicas de cinética química

Profundicemos un poco más en el uso de la ecuación (3.33), su significado, resolución y aplicaciones. Como se dijo anteriormente la ecuación (3.33) nos da una relación para la velocidad de la reacción w_j en términos de las concentraciones molares de las especies químicas. También será de gran conveniencia expresar la ecuación (3.33) en términos de las concentraciones de las especies químicas y no solo de las fracciones molares de éstas como se había hecho anteriormente, es decir darle dimensiones a la ecuación de velocidad de la reacción. Así la ecuación de velocidad toma el aspecto

$$w_j = -\frac{1}{\nu_{ij}} \frac{d[N_i]}{dt} = k_j \prod_i^r [N_i]^{\nu_{ij}} - k_{-j} \prod_i^{r'} [N_i]^{\nu'_{ij}}, \quad (3.34)$$

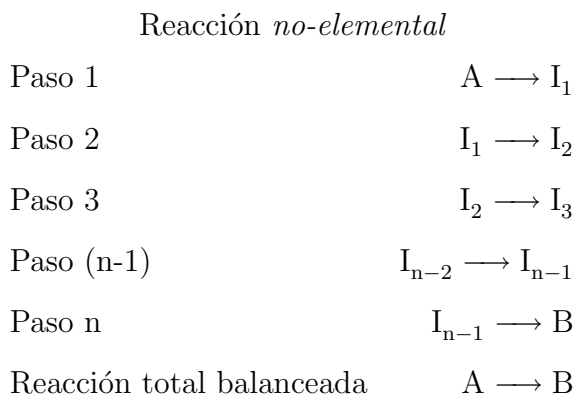
donde los $[N_i]$ denotan unidades de concentración para cada especie, por ejemplo moles por unidad de volumen, $mol dm^{-3}$. Esta definición, junto con la de w_j hacen que w_j tenga unidades de $mol dm^{-3} s^{-1}$, este uso de unidades aplica sobre las constante de ritmo k_i , aunque en su caso las unidades explícitas dependerán del tipo de reacción que se tenga, esto se conoce como orden de reacción.

Antes de considerar los distintos ordenes de reacción, debemos hacer una distinción entre dos tipos principales de reacciones. Las reacciones *elementales*, son aquellas que se llevan a cabo en un solo paso y sin la presencia de intermediarios y las reacciones *no-elementales*, en las cuales existen intermediarios aunque estos no aparecen en la reacción total balanceada. A continuación se esquematizan estas ideas.

Reacción *elemental*

Paso único $A \longrightarrow B$

Reacción total balanceada $A \longrightarrow B$



El orden de reacción

Permite conocer la dependencia de la velocidad de la reacción con las concentraciones de los reactivos. La ecuación (3.33) proporciona esta información de manera explícita, pero solo para reacciones elementales. A continuación desarrollaremos la cinética de reacciones elementales así como sus implicaciones.

Comencemos con la reacción más simple posible, una reacción elemental *unimolecular*



en tal caso la ecuación de velocidad de la reacción en función de la concentración del reactivo A será sencillamente $w = k[A]$, aquí para que ambos lados de la ecuación tengan las mismas unidades k debe tener unidades de s^{-1} . De modo que la reacción (3.35) es de primer orden y la constante k es una constante de velocidad de primer orden.

Además de (3.35) podemos plantear directamente una ecuación diferencial para hallar la concentración de A en función del tiempo dada por

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A], \quad (3.36)$$

cuya solución es una función exponencial decreciente $[A]_t = [A]_0 e^{-kt}$. Está es el comportamiento típico de una cinética de primer orden y dado que esta rama de la fisico-química es en gran parte experimental, siempre que se observe un comportamiento de este tipo en una reacción se puede suponer de primera instancia que sigue una cinética de primer orden, a no ser que halla evidencia experimental que indique otro orden de reacción.

El siguiente caso posible de reacción según su complejidad es tener una reacción *dimolécular*, en tal caso tenemos en realidad dos posibilidades



en el primero de los casos posibles la ecuación de velocidad será $w = k[A]^2$, y para el segundo caso $w' = k'[A][B]$, en ambos la constante de velocidad debe tener unidades de $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$.

Analicemos primero la ecuación diferencial que plantea el primer caso, para el cual

$$-\frac{1}{2} \frac{d[A]}{dt} = k[A]^2, \quad (3.38)$$

esta ecuación tiene por solución $[A]_t = 1/(2kt + [A]_o^{-1})$, que describe un comportamiento hiperbólico de la concentración de A como función del tiempo. El siguiente caso plantea la siguiente ecuación diferencial

$$-\frac{d[A]}{dt} = k'[A][B], \quad (3.39)$$

aquí tenemos una sola ecuación diferencial y dos incógnitas, se requiere conocer otra ecuación para resolver el problema, está ecuación ya la conocemos y hemos utilizado, es la relación que existe entre el grado de avance de la reacción y la concentración de las especies involucradas en la reacción, ecuación (3.22). Dicha ecuación permite plantear una relación según la estequiometría de la reacción entre las concentraciones de A y B .

Si consideramos que inicialmente cada especie química involucrada tiene una concentración inicial $[N]_o$ podemos establecer la siguiente tabla

	Concentración de reactivos	
Tiempo	$[A]$	$[B]$
$t = 0$	$[A]_o$	$[B]_o$
$t = \tau$	$[A]_o - x$	$[B]_o - x$

Tabla 3.1: Razón estequiométrica de las especies químicas a un tiempo dado según el grado de avance de la reacción.

Donde x no es más que el grado de avance expresado en unidades de concentración $mol\ dm^{-3}$, así la ecuación diferencial se convierte en

$$\frac{dx}{dt} = k'([A]_o - x)([B]_o - x), \quad (3.40)$$

la cual es resoluble mediante métodos de integración de fracciones parciales, teniendo por solución

$$\ln \left\{ \frac{[A]_o([B]_o - x)}{[B]_o([A]_o - x)} \right\} = ([B]_o - [A]_o)k't, \quad (3.41)$$

Otro caso importante es el de las reacciones *termoléculares*, de las que hay tres casos



Este tipo de reacciones son ya en sí mismas muy poco probables y no hay evidencia experimental de que haya reacciones elementales con molecularidad superior a tres. Aunque esto no implica que en una reacción *no elemental* su orden de reacción este limitado a tres, de hecho; en este tipo de reacciones se pueden tener no solo ordenes superiores a tres sino también órdenes fraccionarios.

En este caso el primer tipo de reacción termolecular nos plantea la siguiente ecuación

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^3, \quad (3.43)$$

el segundo caso

$$-\frac{d[A]}{dt} = k'[A]^2[B], \quad (3.44)$$

y el tercer caso

$$-\frac{d[A]}{dt} = k''[A][B][C], \quad (3.45)$$

en los tres la constante de velocidad debe tener unidades de $mol^{-2}\ dm^6\ s^{-1}$, para ejemplificar el comportamiento de estas reacciones bastara con resolver el primer caso, el cual tiene por solución $[A]_t = 1/\sqrt{6kt + [A]_o^{-2}}$, notemos que tanto la ecuación (3.42-a) como (3.37-a) tienen la forma general $d[A]/[A]^q = kdt$, el cual tiene como solución

$$-\frac{1}{q-1} \frac{1}{[A]^{q-1}} = kt, \quad (3.46)$$

se puede ver que para valores de $q = 0$ se tiene como resultado una expresión del tipo

$$([A]_o - x) = -kt, \quad (3.47)$$

está es una ecuación de orden cero, y su constante de velocidad deberá tener unidades de $\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$. El manejo de las reacciones anteriores es suficiente para desarrollar la cinética de reacciones no-elementales que es más compleja, pero primero comparemos sus comportamientos generales comenzando con sus distintas constantes de velocidad.

Orden de reacción	Unidades de la constante de velocidad
orden cero	$\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$
primer orden	s^{-1}
segundo orden	$\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$
tercer orden	$\text{mol}^{-2} \text{dm}^6 \text{s}^{-1}$

Tabla 3.2: Dependencia con el orden de reacción de las unidades de la constante de velocidad.

Mecanismos de reacciones

Un mecanismo es la secuencia de pasos elementales en la transformación de reactivos a productos. Es una descripción molecular de cómo los reactivos se convierten en productos durante la reacción.

Todo mecanismo involucra la presencia de un intermediario el cual se forma en un paso y se consume en otro. Como ejemplo tomemos una reacción de 2 pasos con un solo intermediario



este tipo de reacciones se conoce como *consecutivas*. Veamos que pasa con la cinética del reactivo A siguiendo el mecanismo antes mencionado y comparemos con la cinética de la reacción total balanceada $A \xrightarrow{k} B$, en el supuesto que se diera en solo paso elemental. En el caso del mecanismo la ecuación de velocidad para A es

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A],$$

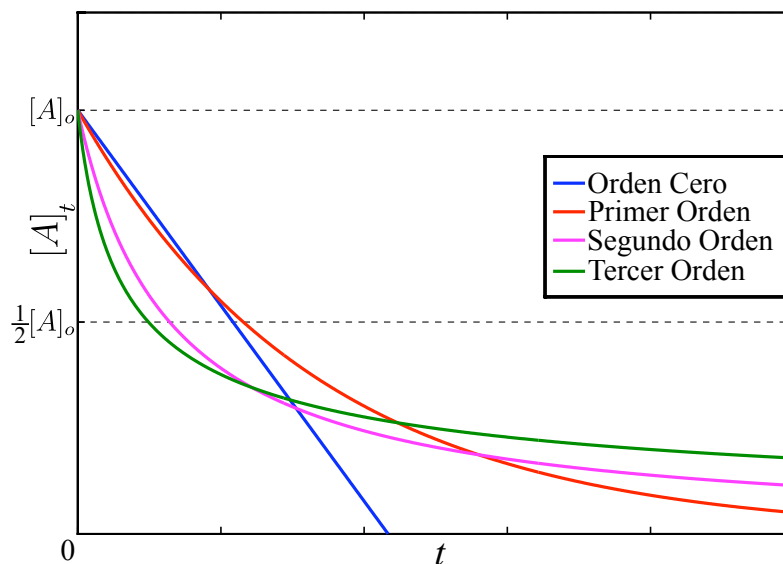


Figura 3.2: Comportamiento gráfico $[A]_t$, para distintos órdenes de reacción. En todos los casos los valores de k y de $[A]_o$ son los mismos.

mientras que en el segundo caso la ecuación de velocidad es (3.36), ambas tienen por solución una exponencial decreciente. De primer instancia uno deduciría que la reacción (3.48) es simplemente una reacción unimolecular elemental, pero ahora veamos que ocurre con la cinética del intermediario I y el producto B

$$\frac{d[I]}{dt} = k_1[A] - k_2[I] \text{ y } \frac{d[B]}{dt} = k_2[I], \quad (3.49)$$

la ecuación para $[I]$ tiene por solución

$$[I]_t = [A]_o \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}), \quad (3.50)$$

este resultado se sustituye en la ecuación planteada para $[B]$ y se obtiene el resultado

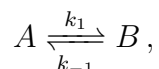
$$[B]_t = [A]_o \left[1 + \frac{1}{k_2 - k_1} (k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}) \right]. \quad (3.51)$$

En el caso de la reacción unimolecular elemental el resultado sería

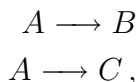
$$[B]_t = [A]_o (1 - e^{-kt}), \quad (3.52)$$

vemos que el comportamiento ha cambiado notoriamente, debido a la presencia de un solo intermediario. También que para realizar un correcto estudio cinético de una reacción no basta con conocer el comportamiento alguna de las especies involucradas en la reacción si no por el contrario en ocasiones para diferenciar entre una reacción elemental y una no-elemental y poder proponer un mecanismo en caso de ser necesario hay que conocer el comportamiento de todas las especies químicas involucradas. Las implicaciones de un mecanismo van aún más lejos de lo que se ha mostrado arriba, ya que estos inclusive cambian el orden cinético de las reacciones y en tales casos *no hay una correlación entre el coeficiente estequiométrico y el orden de reacción*. Todo esto hace que la proposición de mecanismos a partir de una reacción neta balanceada sea un asunto no trivial⁶.

La gama de reacciones no-elementales es muy amplia y entre ellas encontramos las reacciones en equilibrio o reversibles



las reacciones en paralelo



reacciones en cadena y reacciones catalíticas. Estas últimas son en verdad interesantes y como se menciona en el capítulo introductorio la reacciones catalíticas mediadas por enzimas serán una herramienta poderosa para la modelación de nuestro problema. A continuación explicaremos algunos métodos usados para analizar la cinética de este tipo de reacciones catalíticas cuyos mecanismos, en gran parte de las ocasiones, son realmente complicados.

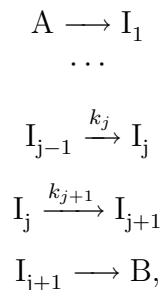
El estado estacionario

Se dice que un sistema cualquiera es estacionario si esté no cambia en el tiempo, es decir su derivada temporal es nula. En el caso de la cinética química dicho estado surge cuando en un mecanismo de reacciones la concentración de alguno de los intermediarios involucrados en la reacción se mantiene constante en el tiempo que dura dicha reacción en completarse.

Supongamos que tenemos un mecanismo como el mostrado a continuación con $(j+1)$ intermediarios y que el intermediario I_j se encuentre en un estado estacionario o

⁶A veces aparte de experimentos hay que tener mucha intuición y pericia para proponer un mecanismo.

muy cercano a este



el intermediario I_j participa en dos reacciones y su ecuación de velocidad es

$$\frac{d[I_j]}{dt} = k_j[I_j] - k_{j+1}[I_j],$$

usando la suposición de estado estacionario tenemos

$$\frac{d[I_j]}{dt} = k_j[I_j] - k_{j+1}[I_j] \approx 0,$$

tomando la igualdad a cero obtenemos una ecuación algebraica para $[I_j]$ en vez de una ecuación diferencial, esto nos facilitará la resolución de las demás ecuaciones de velocidad que plantea el mecanismo en las que pueda estar involucrada la concentración de I_j .

Esta aproximación sucede debido a que el intermediario es extremadamente reactivo y por eso su concentración nunca se incrementará a concentraciones significativas durante el curso de la reacción, es decir la velocidad total de producción del intermediario está balanceada con la velocidad de su consumo, en la figura 3.3 se muestra gráficamente esta idea.

Aproximación al equilibrio

Esta aproximación se da cuando una reacción esta en equilibrio o muy cerca del estado de equilibrio, en tal caso como se mencionó en al inicio de la sección la afinidad de la reacción es cero, y la relación entre las concentraciones de las especies involucradas en la reacción están determinadas por la constante de equilibrio de la

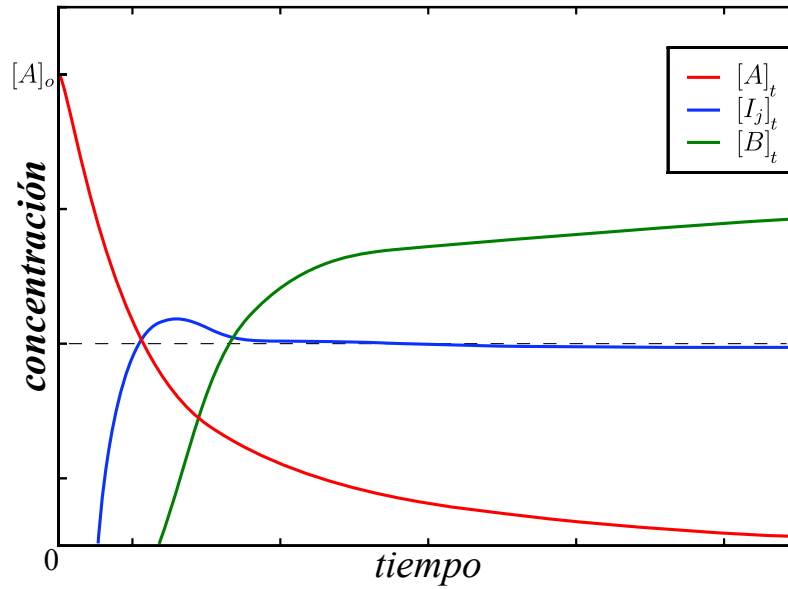
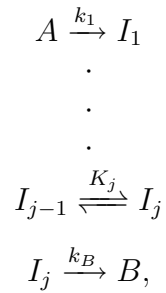


Figura 3.3: Concentraciones de las especies A , B e I_j como función del tiempo, donde la concentración de I_j en el tiempo alcanza un estado estacionario.

reacción (3.31), así para un mecanismo del tipo



suponiendo que el paso entre I_{j-1} e I_j esta en equilibrio estacionario, se puede expresar $[I_j]$ como función de $[I_{j-1}]$ como $[I_j] = K_j[I_{j-1}]$, y esta expresión puede ser usada en cualquier otra ecuación de velocidad en la que aparezca el término $[I_j]$ como la ecuación de velocidad para B que sería

$$\frac{d[B]}{dt} = k_B[I_j] = k_B K_j [I_{j-1}].$$

3.4.2. Catálisis, enzimas e inhibidores

Con las técnicas previamente descritas podemos estudiar el problema particular de reacciones catalíticas mediadas por enzimas, que como hemos dicho anteriormente, constituyen una poderosa herramienta en la modelación bioquímica de los motores moleculares.

En condiciones naturales ciertas reacciones químicas ocurren en lapsos de tiempo muy prolongados, es decir su velocidad de reacción es baja. Sin embargo existen ciertos agentes químicos llamados catalizadores que aceleran este proceso y que al final de la reacción se recuperan su concentración inicial, como si no hubieran participado en la reacción. Está es la definición de un catalizador.

Existen una gran variedad de catalizadores y son muchos los mecanismos de reacción a los que dan lugar. Sin embargo, para nuestro fin solo serán de interés los catalizadores conocidos como enzimas, moléculas biológicas sintetizadas por las mismas células y que sirven para regular los múltiples procesos que se llevan a cabo dentro de los organismos vivos.

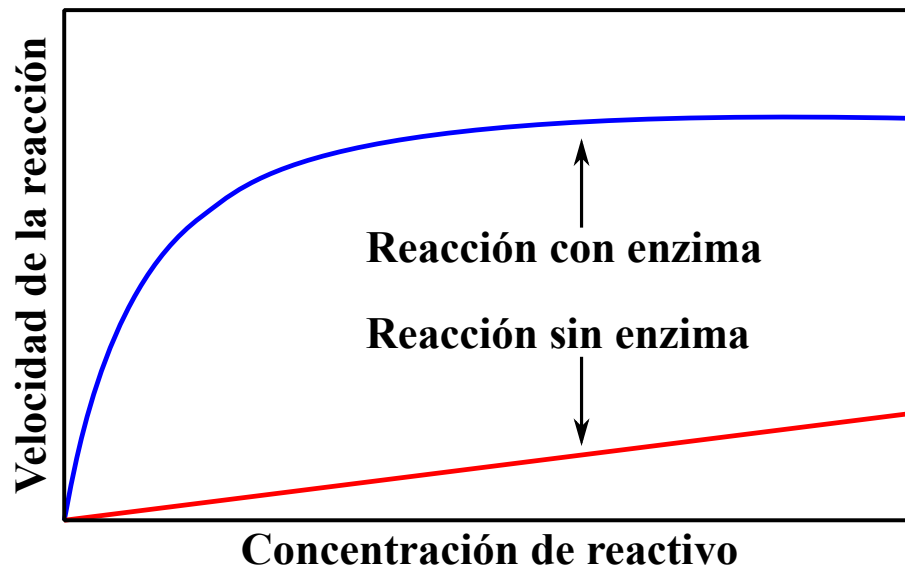


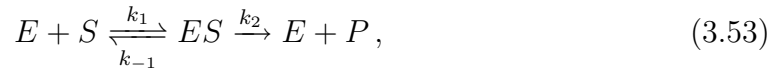
Figura 3.4: Comparación entre una reacción catalizada por enzimas y sin catalizador.

Enzimas

Las enzimas son biomoléculas presentes en todos los seres vivos y permiten la transformación de otros compuestos (sustratos) en productos útiles para el metabolismo de los seres vivos, replicación de cadenas de ARN, ADN, entre otros. Los sustratos en su mayoría solo son afines a un tipo específico de enzimas, por el contrario las enzimas pueden ser afines a más de un sustrato. La unión de la enzima con sus sustrato afín se lleva a cabo en un sitio específico de la enzima llamado sitio activo en el cual la transformación del sustrato a producto es llevada a cabo. Si la enzima es afín a más de un sustrato puede ser que la enzima posea más de un sitio activo o que ambos sustratos compitan por el mismo sitio activo, se cual sea el caso desde el punto de vista de uno de los sustratos el otro u otros sustratos actúan como inhibidores de la reacción del primero. Los motores moleculares son enzimas que pueden catalizar las reacciones asociadas al movimiento del motor con base en al menos dos sustratos, uno de ATP y otro de ADP. Más adelante mostraremos que el ADP juega el papel de inhibidor del movimiento del motor molecular basado en la reacción con ATP como sustrato.

Ley de Michaelis-Menten

La manera más sencilla de modelar la catálisis enzimática es mediante un mecanismo conocido como mecanismo de Michaelis-Menten (M-M), el cual se muestra a continuación



donde la enzima E actúa como catalizador en el proceso que permite la transformación del sustrato S a producto P , en un paso intermedio del proceso la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo llamado enzima sustrato ES . Siguiendo las leyes de la cinética química [10] podemos obtener la ecuación de velocidad para cualquiera de los reactivos y productos de la ecuación (3.53). En nuestro caso nos interesan tanto el complejo ES como el producto P . Las ecuaciones de evolución para sus respectivas concentraciones $[ES]$ y $[P]$ son:

$$\frac{d}{dt}[ES] = -k_2[ES] + k_1[E][S] - k_{-1}[ES], \quad (3.54)$$

$$w = \frac{d}{dt}[P] = k_2[ES]. \quad (3.55)$$

Si ahora se considera que la concentración de ES en toda la reacción es casi constante, es decir su variación en el tiempo es aproximadamente cero, entonces podemos usar el

método de aproximación al estado estacionario [10] para encontrar la concentración de ES en términos de la $[E]$, $[S]$ y la constante de equilibrio químico

$$\frac{d}{dt}[ES] \approx 0 = -k_2[ES] + k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \implies$$

$$(k_2 + k_{-1})[ES] = k_1[E][S].$$

En este paso se podría despejar ya el valor de $[ES]$, sin embargo es conveniente introducir un término nuevo antes. En cada instante de tiempo la concentración total de enzima es la cantidad $[E] + [ES]$ llamémosla, $[E]_o$. De aquí tenemos que

$$[E] = [E]_o - [ES]$$

y con esto obtenemos finalmente la concentración de ES como

$$(k_2 + k_{-1})[ES] = k_1([E]_o - [ES])[S]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_o[S]}{(k_{-1} + k_2) + k_1[S]}$$

$$[ES] = \frac{[E]_o[S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]}$$

Si definimos ahora los parámetros conocidos como parámetros de M-M:

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1, \quad (3.56)$$

$$v_{max} = k_2[E]_o, \quad (3.57)$$

con estos 2 parámetros la ecuación (3.55) queda expresada finalmente del siguiente modo

$$w = \frac{d}{dt}[P] = v_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}. \quad (3.58)$$

Esta ecuación tiene una forma hiperbólica al graficar $[S]$ v.s. w , sin embargo en esta forma la interpretación de los parámetros K_M y v_{max} es en ocasiones difícil de apreciar. Existe una representación análoga de la ecuación (3.58) conocida como representación de *Lineweaver-Burk*(L-B), la cual consiste en tomar el recíproco de (3.58), de modo que la nueva ecuación queda como

$$\frac{1}{w} = \frac{1}{v_{max}} \frac{K_M}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}, \quad (3.59)$$

que es lineal al graficar $\frac{1}{w}$ v.s $\frac{1}{[S]}$ y el parámetro v_{max} se convierte en la ordenada al origen de la recta con pendiente K_M/v_{max} . Usando directamente con la ecuación (3.58) el papel que juegan estos parámetros es diferente, siendo v_{max} la asíntota de la hipérbola descrita por (3.58) y K_M el valor de $[S]$ cuando $w = v_{max}/2$. En la figura 3.5 se muestran el comportamiento típico y la identificación de v_{max} y K_M en ambas representaciones.

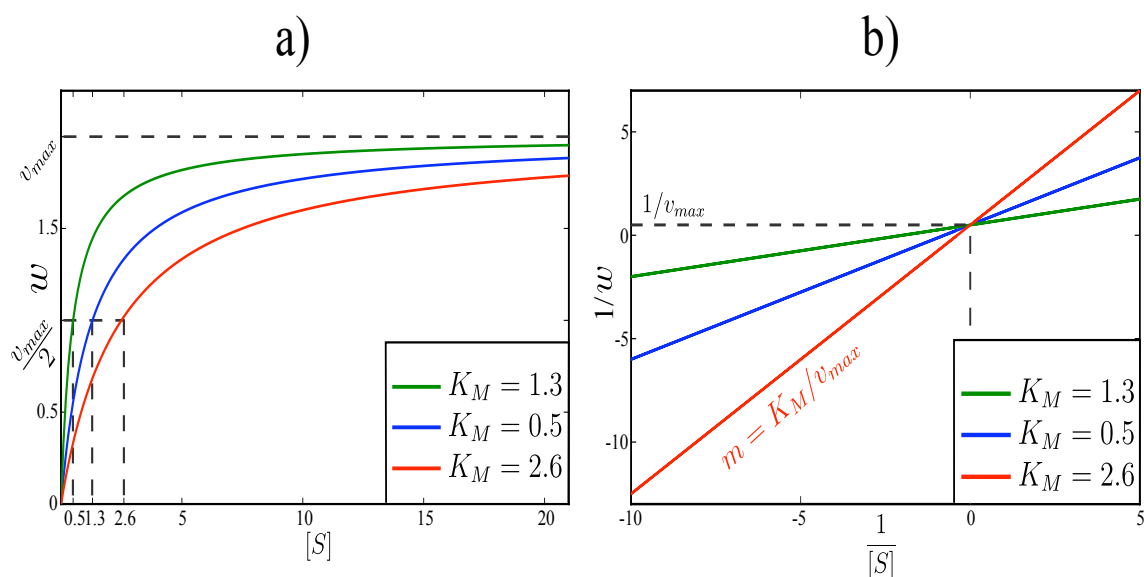


Figura 3.5: (a) Representación $[S]$ v.s. w de una cinética M-M *ideal* (b) representación de Lineweaver-Burk de los mismos datos. En ambos casos se modificó el valor de K_M y se usó el mismo valor de v_{max} .

Inhibición competitiva

Cuando el sustrato S , como el inhibidor I , compiten por el mismo sitio activo. En inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima-inhibidor EI , análogo al complejo enzima sustrato. Como se ve en la figura 3.6 el sitio activo es aquel donde se lleva a cabo el acoplamiento de la enzima con el sustrato o el inhibidor. El mecanismo propuesto en este caso es uno de tipo M-M solo que ahora existe una reacción reversible en paralelo de la enzima con el

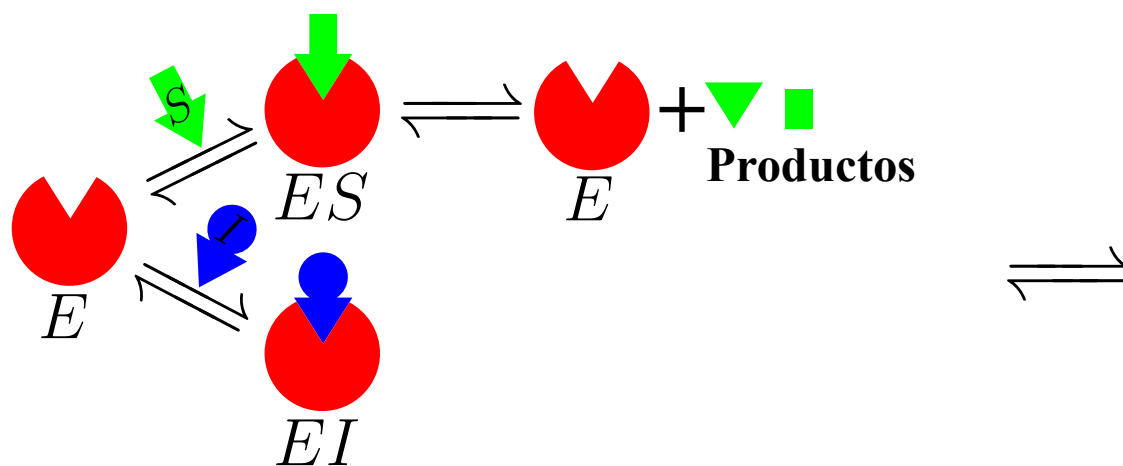
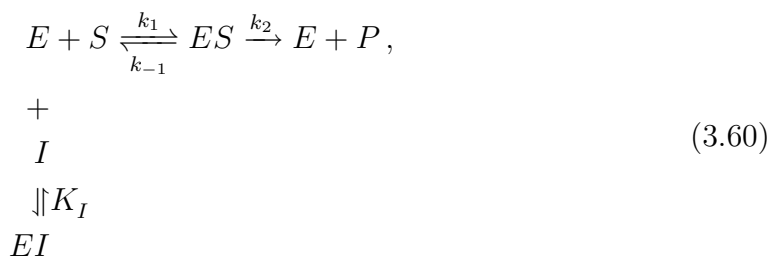


Figura 3.6: Esquema de un mecanismo con inhibición competitiva.

inhibidor



donde K_I es la constante de equilibrio asociada a la reacción de la enzima con el inhibidor definida como

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}. \tag{3.61}$$

De manera similar a como se hizo para el mecanismo de M-M se pueden escribir las ecuaciones de velocidad de las especies involucradas y en cuanto al efecto que causa el inhibidor al ser de tipo reversible este no experimenta reacciones químicas al unirse con la enzima y tras disociarse de la enzima esta recupera su actividad con el sustrato tal disociación ocurre por aumentos en la concentración del sustrato o disminución del inhibidor. De ahí que su efecto en la cinética pueda ser estudiado usando la aproximación al equilibrio para $[EI]$ y teniendo en cuenta que ahora la concentración total enzima $[E]_o$ debe incluir el término de $[EI]$, es decir $[E]_o = [E] + [ES] + [EI]$.

Se obtiene una expresión para la velocidad muy semejante a la de M-M

$$w = \frac{v_{max}[S]}{K_M (1 + [I]/K_I) + [S]} \quad (3.62)$$

El efecto del inhibidor en la representación de Lineweaver-Burk es fácil de apreciar ya que modifica el valor de la pendiente

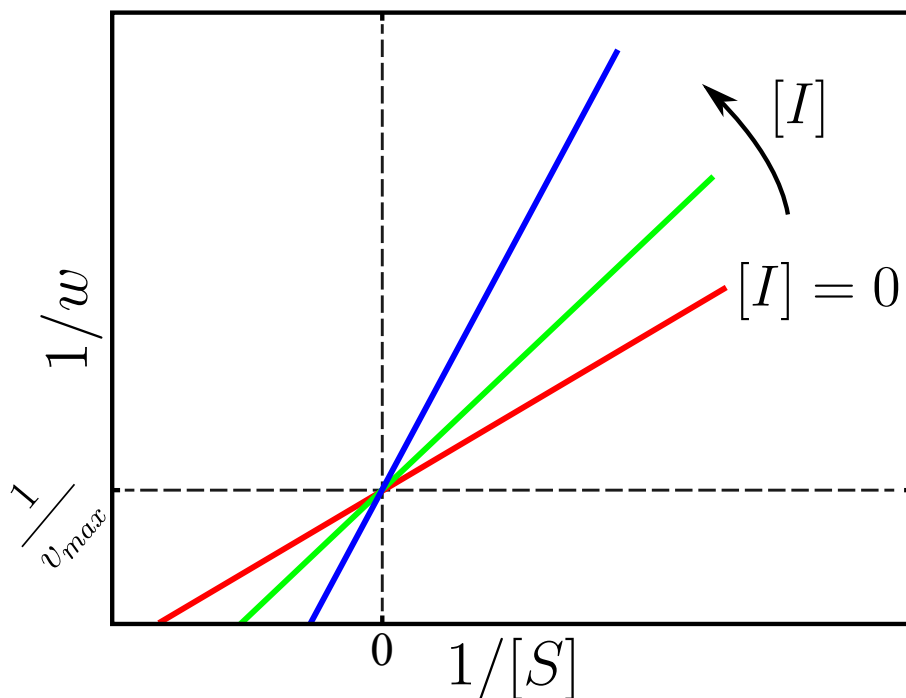


Figura 3.7: Representación de Lineweaver-Burk para una inhibición competitiva.

Debido a que la interacción del inhibidor con la enzima es reversible: Una disminución en la concentración del inhibidor desplazará el equilibrio hacia la regeneración de la enzima libre. Dado que tanto el inhibidor como el sustrato compiten por el mismo sitio de unión, un aumento en la concentración de sustrato, provee una segunda manera de revertir la inhibición competitiva. Mientras mayor sea la concentración de sustrato mayor será la cantidad de complejo ES .

Inhibición no-competitiva

En este caso el inhibidor no compite por el mismo sitio activo del sustrato, ya que la enzima posee un sitio activo para el sustrato y otro para el inhibidor lo que permite

que las dos tanto el sustrato como el inhibidor se unan a la enzima, a continuación se bosqueja esta idea. En este caso el mecanismo propuesto es el siguiente

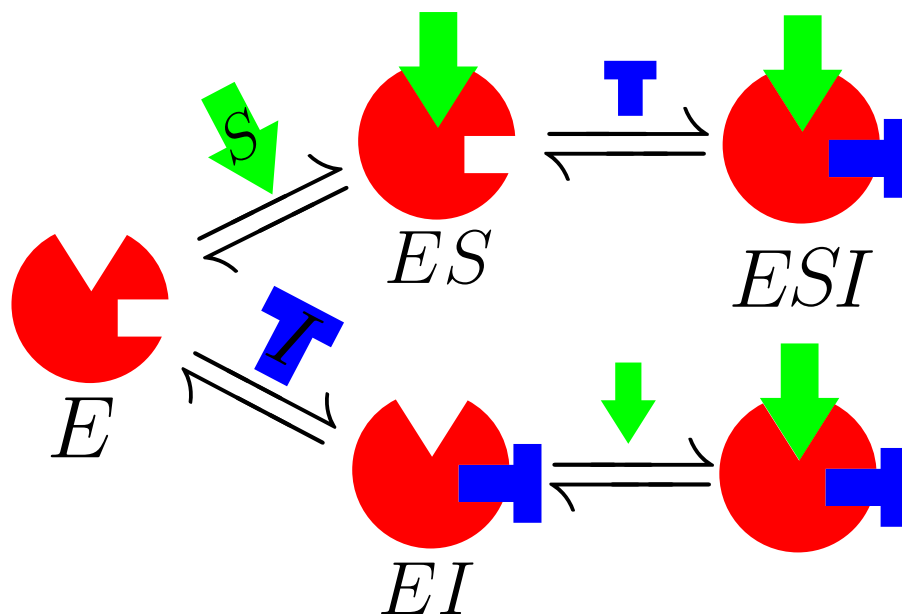
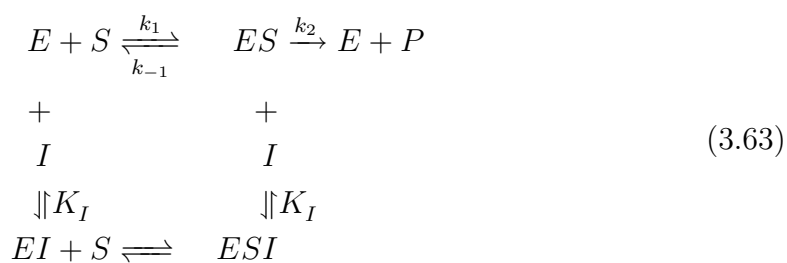


Figura 3.8: Esquema de un mecanismo con inhibición no-competitiva.



aquí la concentración total de enzima $[E]_o$ es $[E]_o = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$ y como se ve en el mecanismo de arriba, en ambos casos los equilibrios en los que participa I se aproximan con el mismo valor de K_I , es decir

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}. \tag{3.64}$$

Usando la aproximación al equilibrio en ambos caso se obtiene la siguiente ecuación de velocidad

$$w = \frac{v_{max}[S](1 + [I]/K_I)^{-1}}{K_M + [S]} \quad (3.65)$$

Notemos que la ecuación de velocidad se modifica por el mismo factor que en el caso anterior, solo que ahora multiplica por completo a la expresión de M-M, mientras que en el caso anterior rescala la constante K_M .

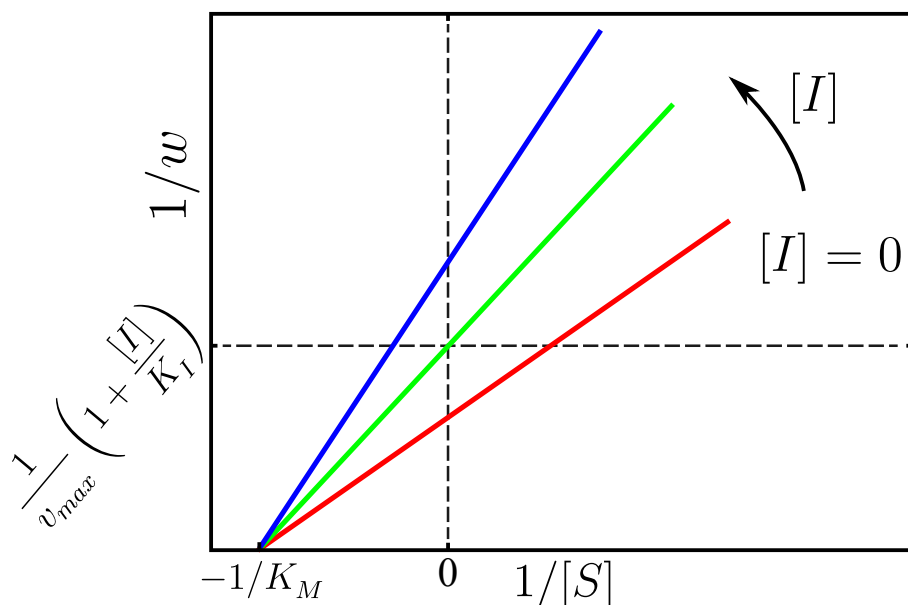


Figura 3.9: Representación de Lineweaver-Burk para una inhibición no-competitiva.

Debido a que el sustrato y el inhibidor no compiten por el mismo sitio de unión, un incremento en la concentración de sustrato no puede revertir la unión porque también se incrementaría el número de complejos que contienen inhibidor ESI . Por lo tanto, el efecto de un inhibidor no competitivo es reducir la concentración de complejos ES que pueden dar lugar a producto. Puesto que $v_{max} = k_2[E]_o$ y la concentración de enzima total disminuye debido a la formación de ESI , se espera que un inhibidor no competitivo disminuya a v_{max} .

Inhibición acompetitiva

Un inhibidor acompetitivo no se une a la enzima libre, sino al complejo enzima-sustrato, ES . La unión del sustrato modifica la estructura de la enzima, de tal manera

que la unión del inhibidor es posible, la siguiente figura ilustra el proceso:

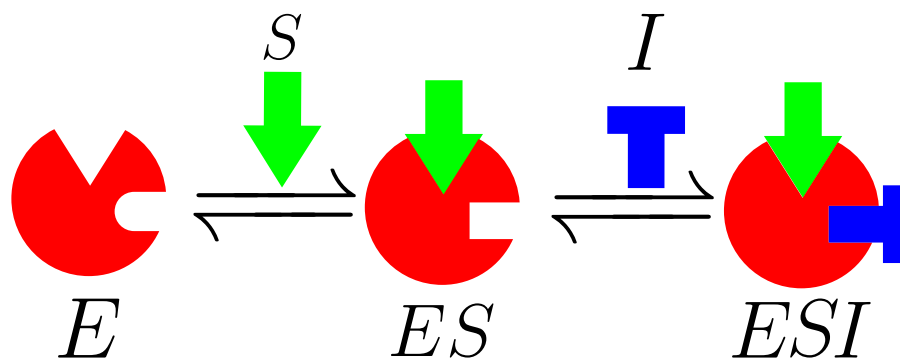
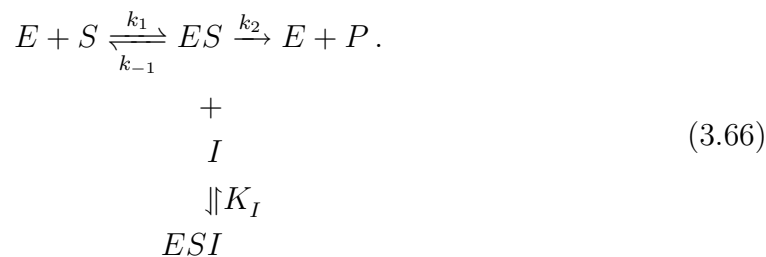


Figura 3.10: Esquema de un mecanismo con inhibición acompetitiva.

Así que el mecanismo propuesto es el siguiente



De igual manera que en los casos anteriores, la ecuación cinética queda modificada por el mismo factor solo que ahora aparece tanto en el numerador como en el denominador de la expresión para la velocidad:

$$w = \frac{v_{max}[S](1 + [I]/K_I)^{-1}}{K_M(1 + [I]/K_I) + [S]} \tag{3.67}$$

En resumen, las tres inhibiciones y sus efectos se pueden sintetizar en la tabla 3.3:

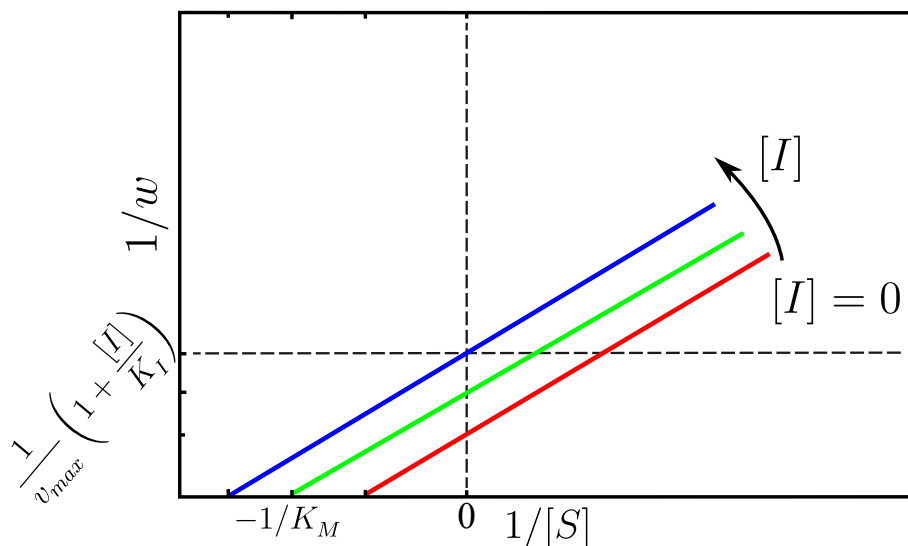


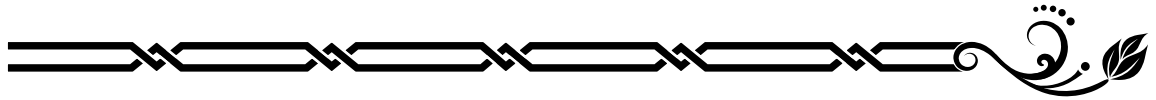
Figura 3.11: Representación de Lineweaver-Burk para una inhibición acompetitiva.

Tipo de Inhibición	Efecto en la gráfica de L-B	Efecto cinético
Competitiva	La pendiente incrementa cuando $[I]$ aumenta y la ordenada permanece.	v_{max} no cambia y K_M incrementa con $[I]$.
No-Competitiva	Ambas la pendiente y la ordenada incrementa si $[I]$ aumenta.	v_{max} disminuye con con $[I]$ mientras que K_M permanece.
Acompetitiva	La pendiente se mantiene y la ordenada aumenta con $[I]$.	v_{max} y K_I ambas disminuyen.

Tabla 3.3: Comparación de los distintos efectos inhibidores.

Capítulo 4

Movimiento Browniano y procesos estocásticos



Se dice que un proceso es *estocástico*, si presenta un comportamiento aleatorio (azaroso). A los físicos del siglo XVIII les parecía ridículo que en un sistema físico presentase esta clase de comportamiento. Sin embargo, el posterior desarrollo de la física de ese siglo y del siguiente demostrarían que dichos comportamientos eran usuales en muchos fenómenos físicos y que una de las claves para el desarrollo y comprensión de la teoría atómica de la materia.

Ya a finales del siglo XIX se habían obtenido algunos resultados que indicaban una conformación molecular de la materia. Sin embargo en ese entonces no había estimaciones del número de Avogadro o de la constante de Boltzmann, y nadie había podido observar una molécula por medios ópticos [11]. Suponer un tamaño para las moléculas no mejoraba el panorama, ya que plantear el sistema de ecuaciones diferenciales para tales partículas diminutas, y tratarlas de forma determinista era incomputable en esa época.¹

Algunos científicos de la época se darían cuenta que en sistemas de partículas diminutas y con un gran número de las mismas, el conocer las trayectorias individuales de cada una era imposible e innecesario, y que por otra parte era de más utilidad el conocer el comportamiento colectivo del sistema, comportamiento representado en buena medida por las leyes de la termodinámica. Esta nueva forma de pensar pronto sentaría las bases para el desarrollo de la *Mecánica Estadística*, y quizá uno de los fenómenos físicos más importante que dieron luz a esta controversia, sea el

¹Aun hoy en día con las modernas supercomputadoras disponibles, tratar de simular sistemas con un número grande de partículas es una tarea difícil.

movimiento Browniano², ya que el estudio de este fenómeno no solo demostró que la materia puede comportarse de manera aleatoria a escalas pequeñas, sino que también permitió estimar por primera vez la constante de Boltzmann así como el número de Avogadro y con esto estimar el tamaño de las moléculas.

4.1. Movimiento Browniano

La descripción de este fenómeno se originó al tratar de resolver el problema del movimiento de una partícula de polen en el agua. Este desplazamiento era ciertamente aleatorio ya que la partícula de polen no parecía seguir una trayectoria específica, véase la figura 4.1. Las primeras hipótesis planteadas alrededor de 1860 suponían que el extraño comportamiento de las partículas Brownianas se debía a colisiones de moléculas de agua con la partícula, y que dichas colisiones eran debidas al movimiento térmico. Sin embargo estas primeras explicaciones eran cualitativas y no

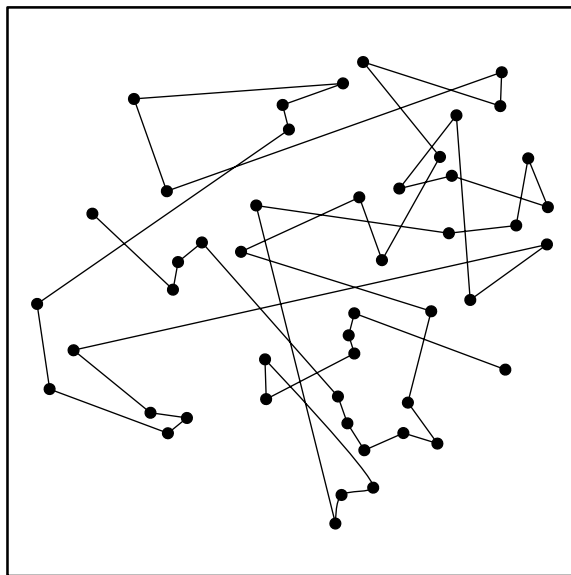


Figura 4.1: Desplazamiento en dos dimensiones de una partícula Browniana.

había experimentos cuantitativos. La primera explicación cuantitativa del fenómeno fue dada por Einstein ³.

²Estudiado por primera vez por el botánico Robert Brown.

³Hubo trabajos anteriores de igual importancia que el de Einstein sobre las partículas Brownianas, como el realizado por Thorvald N. Thiele en 1880 y el de Louis Bachelier en 1900, pero el

En esa época la naturaleza atómica de la materia aún era una idea controvertida. Einstein y Marian Von Smoluchowski dedujeron que si la teoría cinética de Boltzmann para los gases diluidos era correcta, entonces las moléculas de agua manifestarían movimientos aleatorios. Por lo tanto, las partículas pequeñas podrían recibir un número aleatorio de impactos, de fuerza y dirección aleatorias, en cortos períodos de tiempo. Este bombardeo aleatorio por las moléculas del fluido podría ser suficiente para que las partículas pequeñas se moviesen de la manera en que Brown había descrito. La idea esencial planteada por Einstein fue que, aunque los impactos eran en direcciones aleatorias, había una pequeña posibilidad que una cantidad suficiente de ellos fueran en una dirección definida (tal como la posibilidad de tirar 100 pares seguidos en un juego de dados) produciendo un desplazamiento neto y observable por los métodos ópticos de la época.

Afortunadamente, las matemáticas necesarias para describir el problema físico, el cálculo de probabilidades, ya habían sido ampliamente desarrolladas por los matemáticos. Soló había que dar una adecuada interpretación física a los parámetros probabilísticos. En lo siguiente presentaremos de manera sucinta las ideas básicas detrás de la descripción matemática del movimiento Browniano.

Pensemos en una partícula Browniana suspendida en cierto fluido de viscosidad η , restringida a moverse en una sola dimensión, si registramos de manera discreta la posición de la partícula a distintos tiempos, de modo tal que tenemos N mediciones, $x_0(0), x_1(t_1), \dots, x_N(t_N)$ de la posición. Estas mediciones forman lo que en mecánica estadística se conoce como *ensamble* y debido a la naturaleza estocástica del problema las mediciones no serán reproducibles. Repitiendo el muestreo un número suficiente de veces, en principio deberíamos ser capaces de encontrar la distribución seguida por las $x_i(t)$ [12].

El ensamble de las x_i puede ser representado por un vector $\vec{x}(t)$ cuyas entradas son las x_i . La pregunta es, como podemos interpretar \vec{x} en términos probabilísticos

$$\varrho(\vec{x}, t). \tag{4.1}$$

Este camino es largo y en ocasiones demasiado complicado. En vez de eso pensemos que ocurre si en lugar de tratar de hallar la distribución de probabilidad de una sola partícula, lo que requiere un gran tiempo, realizamos una sola medición en el tiempo de la posición para un sistema con n partículas brownianas, en un sistema ergódico este camino es equivalente y es el modelo más simple del movimiento Browniano.

resultado obtenido por Einstein fue decisivo para aceptar la teoría atómica, de ahí que se reconozca más su obra.

4.2. Difusión

La difusión es un proceso físico irreversible, en el que partículas materiales se introducen en un medio que inicialmente estaba ausente, aumentando la entropía del sistema conjunto formado por las partículas difundidas o soluto y el medio donde se difunden o disolvente [6]. Cada una de las partículas del soluto se comportan como una partícula Browniana y podemos suponer por su pequeño tamaño y baja saturación que no interactúan entre ellas.

En este caso nos interesa determinar como cambia la concentración de partículas en función de la posición y el tiempo. Para esto analizaremos al flujo de partículas J por unidad de tiempo en un área de control A . Si imponemos que las partículas de soluto solo se desplazan en una dimensión de acuerdo a lo estudiado en capítulo anterior, el flujo J deberá ser proporcional al cambio de la concentración de partículas n en esa dirección, en la forma

$$J_D = -D \frac{dn}{dx}. \quad (4.2)$$

La ecuación (4.2) se conoce como la *Ley de Fick* de la difusión, formulada por el fisiólogo alemán Adolf Eugen Fick en 1855. No es de sorprender que el coeficiente de difusión D aparezca en la expresión como parámetro de proporcionalidad, lo que nos indica que el flujo de partículas por área por tiempo es directamente proporcional al valor de D . Notemos además que para una distribución original de partículas de soluto que se encuentren distribuidas no homogéneamente en el disolvente, la Ley de Fick nos indica que esta distribución tenderá a homogeneizarse con el paso del tiempo. Esto quiere decir que n no sólo varía en x sino que de hecho también varía en el tiempo, y lo hace en la forma

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{d}{dx} J_D, \quad (4.3)$$

que no es más que la ecuación de continuidad[6]. Si derivamos a la ecuación (4.2) respecto a x y usamos el resultado anterior obtenemos

$$\frac{dn}{dt} = D \frac{d^2 n}{dx^2}, \quad (4.4)$$

que es la ecuación de difusión. Debemos notar que (4.2) y (4.4) son ecuaciones deterministas surgidas de un problema estocástico, y que (4.4) es análoga a la *Ley de Fourier* para la transmisión de calor, por lo que aceptará las mismas técnicas usadas para su resolución.

En un caso más general, tanto (4.2) como (4.4) pueden ser tratadas permitiendo que las partículas soluto se difundan en cualquier dirección e incluso teniendo más de una especie de soluto, en tal caso la ley de Fick y de difusión tendrán una forma vectorial [6].

Si las partículas están en presencia de un campo externo Φ , este campo creará un flujo uniforme extra determinado tanto por Φ como por la fuerza de fricción del fluido que contiene las partículas

$$J_{\Phi} = \frac{n\Phi}{m\beta}, \quad (4.5)$$

donde β es el coeficiente de fricción por unidad de masa del medio $\beta = 6\pi\eta/m$. Así el flujo total será

$$J = J_{\Phi} + J_D = \frac{n\Phi}{m\beta} - D\frac{dn}{dx}, \quad (4.6)$$

y la ecuación de difusión tomará la forma

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{d}{dx} \left(\frac{n\Phi}{\beta} \right) + D\frac{d^2n}{dx^2}. \quad (4.7)$$

Para cualquier distribución inicial de la densidad de partículas, a un tiempo suficientemente largo, estas alcanzarán el estado de equilibrio en presencia de un campo externo. Por ejemplo, en presencia de un campo gravitatorio surgirá un efecto de sedimentación en el equilibrio, con lo que la solución de (4.7) para el estado de equilibrio (no dependiente del tiempo) será [12]

$$n(x) = n_o e^{\Phi x/k_B T}, \quad (4.8)$$

con T la temperatura del fluido y k_B la constante de Boltzmann. Si sobre el sistema no se aplican fuerzas externas y el sistema es de extensión infinita, la distribución correspondiente se ensanchará indefinidamente.

Una relación importante que debe cumplirse para que el movimiento de las partículas ocurra de conformidad con las condiciones macroscópicas impuestas sobre el sistema es la siguiente:

$$D = \frac{k_B T}{m\beta}, \quad (4.9)$$

que es conocida como la *relación de Stokes-Einstein para la difusión* [13]. Esta relación es de suma importancia ya que tanto D como β y T son cantidades medibles y permiten dar un valor a la constante de Boltzmann k_B . Además, D y β son distintas para cada tipo de partícula y fluido, por lo que también caracterizan el experimento. Para ver una derivación más detallada y completa de (4.9) ver [13].

La importancia de estos dos parámetros se verá reflejado en todos los problemas cuyo tratamiento involucre en el fondo un comportamiento de partícula Browniana, tal como en fenómenos difusivos, de osmosis, de partículas coloidales y en suspensión. Y aparecerán como parámetros de importancia en las ecuaciones usadas para describirlos. En particular, en el siguiente inciso discutimos el movimiento Browniano a tiempos largos en el seno de un fluido estacionario el cual es bien descrito por un tipo de ecuaciones conocidas como ecuación de Langevin, así como por ecuaciones de tipo Fokker-Planck y de Smoluchowski [14], las cuales serán el fundamento teórico del modelo físico planteado en el Capítulo 7.

4.3. Ecuación de Langevin

En física estadística, la ecuación de Langevin es una ecuación diferencial estocástica que describe el movimiento browniano en un potencial. Esta ecuación es fenomenológica⁴ y newtoniana⁵. Las primeras ecuaciones de Langevin que fueron estudiadas fueron aquellas en las que el potencial es constante, de forma tal que la aceleración a de una partícula browniana de masa m se expresa como la suma de la fuerza viscosa $f_f(t)$ que es proporcional a la velocidad de la partícula (ley de Stokes)

$$f_f(t) = -\beta v(t), \quad (4.10)$$

donde β es el coeficiente de fricción por unidad de masa del fluido $\beta = 6\pi\eta a/m$ [15], y un término de *ruido* f_R . Esta cantidad representa el efecto de la serie continua de choques con los átomos del fluido que forma el medio, y al ser una fuerza de carácter aleatorio debemos esperar que cumpla las siguientes condiciones probabilísticas [14]

$$\langle f_R(t) \rangle = 0, \quad (4.11)$$

$$\langle f_R(t)f_R(t') \rangle = B\delta(t - t'). \quad (4.12)$$

La ecuación (4.11) nos indica que el promedio de esta fuerza aleatoria es cero, mientras que (4.12) nos indica que aunque la fuerza promedia a cero, el ruido térmico tiene una magnitud no nula. El resultado (4.12) es conocido como *Teorema de Fluctuación Disipación* [14].

Dicho teorema enuncia que la magnitud de la fuerza aleatoria es proporcional a la temperatura del baño térmico. Como la correlación es proporcional a una función

⁴Una ecuación fenomenológica es aquella cuyos parámetros de dependencia son ajustados directamente en base al experimento.

⁵Cumple la segunda ley de Newton.

Delta de Dirac, $\delta(t-t')$. Esto implica que la dependencia en la temperatura debe estar asociada al parámetro $B = B(T)$. Finalmente usando el hecho de que la ecuación de Langevin es de tipo newtoniano podemos escribirla como

$$\frac{dv(t)}{dt} = -\beta v(t) + f_R(t). \quad (4.13)$$

Para encontrar la dependencia específica de $B(T)$ en la temperatura deberemos resolver la ecuación diferencial (4.13). La forma en que se resolverá la ecuación será mediante la aplicación de la transformada de *Laplace* la cual nos permitirá transformar la ecuación diferencial (4.13) con dominio en el tiempo a una ecuación algebraica en el dominio de frecuencia temporal:

$$\mathcal{L} \left\{ \frac{dv(t)}{dt} = -\beta v(t) + f_R(t) \right\}, \quad (4.14)$$

donde \mathcal{L} es el operador de la transformada de Laplace [16]. Si además fijamos condiciones iniciales para $v(t)$, según las propiedades de la transformada de Laplace para derivadas de funciones obtenemos:

$$\mathcal{L}\{-\beta v(t)\} = -\beta \tilde{v}(s),$$

$$\mathcal{L} \left\{ \frac{dv(t)}{dt} \right\} = s\tilde{v}(s) - v(0),$$

$$\mathcal{L}\{f_R(t)\} = \tilde{f}_R(s),$$

donde las funciones $\tilde{v}(s)$ y $\tilde{f}_R(s)$ son las respectivas transformadas de las funciones $v(t)$ y $f_R(t)$, y $v(0)$ la velocidad inicial impuesta por las condiciones iniciales del problema. Así podemos rescribir (4.14) de la siguiente manera

$$s\tilde{v}(s) - v(0) = -\beta \tilde{v}(s) + \tilde{f}_R(s).$$

Reordenando los términos tenemos

$$(s + \beta)\tilde{v}(s) = v(0) + \tilde{f}_R(s),$$

finalmente podemos despejar $\tilde{v}(s)$

$$\tilde{v}(s) = \frac{v(0) + \tilde{f}_R(s)}{s + \beta}.$$

Ahora podemos aplicar la transformada inversa de Laplace \mathcal{L}^{-1} para encontrar una expresión para $v(t)$

$$v(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{v(0) + \tilde{f}_R(s)}{s + \beta} \right\}, \quad (4.15)$$

para aplicar la anti-transformada en el lado izquierdo de la ecuación solo hay que utilizar el teorema de traslación y convolución para transformadas [17], obtenemos entonces

$$v(t) = v(0)e^{-\beta t} + \int_0^t f_R(t')e^{-\beta(t-t')} dt', \quad (4.16)$$

donde el factor de la integral es la convolución de las funciones $f_R(t)$ y $e^{-\beta t}$ y el término $v(0)e^{-\beta t}$ representa el decaimiento exponencial de v debido a la fricción, mientras que el término de la convolución nos indica cuanto contribuye el ruido térmico a la velocidad.

Calculemos ahora el segundo momento de la velocidad, para esto primero debemos multiplicar por ella misma la ecuación (4.16)

$$\begin{aligned} v(t)^2 &= v(0)^2 e^{-2\beta t} + 2v(0)e^{-\beta t} \int_0^t f_R(t')e^{-\beta(t-t')} dt' + \\ &+ \int_0^t f_R(t')e^{-\beta(t-t')} dt' \int_0^t f_R(t'')e^{-\beta(t-t'')} dt'', \end{aligned}$$

promediamos ahora sobre el ensamble de realizaciones del ruido

$$\begin{aligned} \langle v(t)^2 \rangle &= \langle v(0)^2 e^{-2\beta t} \rangle + \langle 2v(0)e^{-\beta t} \int_0^t f_R(t')e^{-\beta(t-t')} dt' \rangle + \\ &+ \langle \int_0^t \int_0^t e^{-\beta(t-t')} e^{-\beta(t-t'')} f_R(t') f_R(t'') dt' dt'' \rangle \implies \\ \langle v(t)^2 \rangle &= v(0)^2 e^{-2\beta t} + 2v(0)e^{-\beta t} \int_0^t e^{-\beta(t-t')} \langle f_R(t') \rangle dt' + \\ &+ \int_0^t \int_0^t e^{-\beta(t-t')} e^{-\beta(t-t'')} \langle f_R(t') f_R(t'') \rangle dt' dt''. \end{aligned}$$

Usemos ahora las propiedades antes mencionadas para f_R , tenemos así

$$\langle v(t)^2 \rangle = v(0)^2 e^{-2\beta t} + \int_0^t \int_0^t e^{-\beta(t-t')} e^{-\beta(t-t'')} B \delta(t' - t'') dt' dt''.$$

Realizando la primer integral para dt'' y usando las propiedades de la función Delta de Dirac [17] obtenemos

$$\langle v(t)^2 \rangle = v(0)^2 e^{-2\beta t} + B \int_0^t e^{-\beta(t-t')} dt'.$$

Realizando la última integral obtenemos finalmente

$$\langle v(t)^2 \rangle = v(0)^2 e^{-2\beta t} + \frac{B}{\beta} (1 - e^{-\beta t}). \quad (4.17)$$

La ecuación (4.17) es conocida como el segundo momento de la velocidad [6], si ahora tomamos el límite $t \rightarrow \infty$ para el cual el sistema alcanza el estado de equilibrio tenemos

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle v(t)^2 \rangle = \langle v^2 \rangle_{eq} = \frac{B}{\beta}. \quad (4.18)$$

La ecuación (4.18) no es más que el teorema de equipartición [12], el cual nos dice que

$$\langle v^2 \rangle_{eq} = \frac{k_B T}{m}. \quad (4.19)$$

Combinando estas 2 últimas ecuaciones obtenemos la forma explícita de la dependencia de B en T

$$B = \frac{k_B T}{m} \beta. \quad (4.20)$$

El método utilizado para obtener (4.16) sólo es útil para la ecuación de Langevin con potencial constante, en general cuando el potencial no es constante la expresión (4.13) tendrá un término extra debido al potencial y no será tan fácil de resolver.

4.4. Ecuación de Fokker-Planck

Otra forma de describir el problema de movimiento Browniano es mediante la ecuación de Fokker-Planck, que presenta una ecuación determinística que es satisfecha por la densidad de probabilidad dependiente del tiempo. La ecuación de Fokker-Planck, denominada así por Adriaan Fokker y Max Planck, y también conocida como ecuación avanzada de Kolmogórov (por Andréi Kolmogórov), describe la evolución temporal de la función de densidad de probabilidad que depende de la posición y la velocidad de una partícula.

La ecuación se aplica a sistemas que pueden ser descritos por un pequeño número de "macrovariables", donde otros parámetros que varían rápidamente con el tiempo pueden ser tratados como ruido.

El primer uso de la ecuación de Fokker-Planck fue la descripción estadística del movimiento browniano de una partícula en el seno de un fluido. El movimiento browniano sigue la ecuación de Langevin, que puede resolverse para diferentes perturbaciones estocásticas, mediante resultados promediados. Sin embargo, como alternativa a

este procedimiento, puede usarse la ecuación de Fokker-Planck y considerar una densidad de probabilidad en la velocidad y el tiempo. Esta distribución de probabilidad dependiente del tiempo puede además depender de un conjunto de N macrovariables, de tal manera que el movimiento browniano en cuestión puede ser representado por una ecuación de Fokker-Planck (F-P) de la forma [14]

$$\frac{\partial \varrho}{\partial t} = \beta \frac{\partial (v\varrho)}{\partial v} + B \frac{\partial^2 \varrho}{\partial v^2}. \quad (4.21)$$

Aquí, ϱ es la densidad de probabilidad y es una función de la velocidad y el tiempo $\varrho = \varrho(v, t)$. Esta es una forma particular de la ecuación de F-P, que en forma general la ecuación de F-P se escribe como

$$\frac{\partial \varrho}{\partial t} = \left[-\frac{\partial}{\partial x} D^{(1)}(x) + \frac{\partial^2}{\partial x^2} D^{(2)}(x) \right] \varrho(x), \quad (4.22)$$

con $D^{(1)}(x)$ el llamado el coeficiente de fricción y $D^{(2)}(x)$ es el coeficiente de difusión. Ambos dependen de x (variable generalizada) y de t . Viendo la forma de (4.22) notaremos que es una ecuación de difusión⁶ con un término extra proporcional a una derivada de primer orden en x . En el caso en que ϱ dependa de N variables arbitrarias la ecuación (4.22) tendrá la siguiente forma

$$\frac{\partial \varrho}{\partial t} = \left[-\sum_{i=1}^N \frac{\partial}{\partial x_i} D_i^{(1)}(\{x\}) + \sum_{i,j=1}^N \frac{\partial^2}{\partial x_i \partial x_j} D_{ij}^{(2)}(\{x\}) \right] \varrho(\{x\}). \quad (4.23)$$

En este caso $D_i^{(1)}(\{x\})$ es un vector y $D_{ij}^{(2)}(\{x\})$ es un tensor. En general ambas cantidades dependen del conjunto de las N variables $\{x\} = x_1, x_2, \dots, x_N$. La expresión (4.23) es la forma más general de una ecuación F-P. Soluciones analíticas para (4.23) son posibles de encontrar en casos especiales tales como:

- Coeficiente de fricción lineal y tensor de difusión constante.
- Si el coeficiente de fricción y el tensor de difusión cumplen ciertas condiciones llamadas de balance, entonces una solución por cuadraturas se puede obtener en el caso estacionario.
- Par el caso de una ecuación de F-P de una variable, también por cuadraturas se obtiene una solución en el caso estacionario.

⁶La ecuación de difusión es también conocida como 2^{da} ley de Fick.

Veamos este último caso, que significa que la densidad de probabilidad ρ es constante en el tiempo por lo que $\partial\rho/\partial t = 0$, y en el caso F-P de una variable tendremos

$$0 = \left[-\frac{\partial}{\partial x} D^{(1)}(x) + \frac{\partial^2}{\partial x^2} D^{(2)}(x) \right] \rho_{st}(x) \quad (4.24)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} D^{(1)}(x) \rho_{st}(x) = \frac{\partial^2}{\partial x^2} D^{(2)}(x) \rho_{st}(x)$$

$$\int_0^x \frac{\partial}{\partial x} D^{(1)}(x') \rho_{st}(x') dx' = \int_0^x \frac{\partial^2}{\partial x^2} D^{(2)}(x') \rho_{st}(x') dx' \implies$$

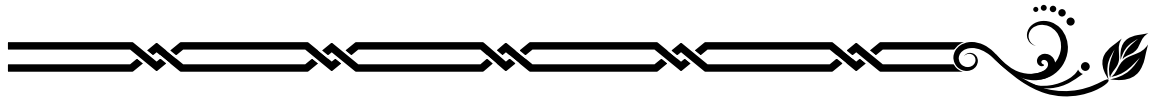
$$D^{(1)}(x) \rho_{st}(x) = \frac{\partial}{\partial x} D^{(2)}(x) \rho_{st}(x)$$

$$\rho_{st}(x) = \frac{A}{D^{(2)}(x)} \exp \left[\int_0^x \frac{D^{(1)}(x')}{D^{(2)}(x')} dx' \right] \quad (4.25)$$

En nuestro estudio sólo discutiremos la solución de un caso muy particular de (4.23) conocido como *Ecuación de Smoluchowski*, la cual será expuesta en el Apéndice B. La ecuación de Fokker-Planck en el dominio de posición y tiempo resulta de gran utilidad cuando se modela el transporte activo de vesículas en el medio celular. Esto será presentado con detalle más adelante.

Capítulo 5

El modelo bioquímico



A continuación desde la óptica bioquímica, modelaremos a los motores moleculares como la cinesina o la miosina en términos de reacciones químicas autocatalíticas mediadas por enzimas. Además, mostraremos que los ritmos de reacción dependen de la carga es decir, por la fuerza ejercida por el peso de las partículas transportadas.

Al ser una reacción catalítica, la primera impresión es que su cinética podría modelarse de una forma sencilla mediante la ley de Michaelis-Menten [10]. Sin embargo, la evidencia experimental no se ajusta adecuadamente con este modelo tan simple [18], debido a la dependencia en la carga de la velocidad máxima v_{max} de la reacción a niveles saturados de ATP y la constante de Michaelis K_M , ver Apéndice C sección C.1, por lo cual se usará un modelo un poco diferente al M-M básico. En la figura 5.1 se muestran algunos de estos resultados experimentales.

A continuación se analizará un posible mecanismo de avance del motor propuesto por Visscher y Schnitzer [11]. Este mecanismo establece un ciclo que modela la velocidad de avance de la cinesina sobre el microtúbulo suponiendo, con base en experimentos, que el doble dominio cabeza de la cinesina no sólo es receptor de moléculas de ATP (que a partir de ahora denominaremos T por comodidad) sino también de moléculas de ADP (D) [18]. Estos experimentos muestran también que el estado K (cinesina) y el estado KT (cinesina unida a un ATP) están fuertemente ligados al microtúbulo (M), mientras el estado ligado KD está débilmente ligado al microtúbulo. Ambos orientan la cabeza en un sentido específico respecto al microtúbulo; además las cabezas de cinesina sólo se acoplan en sitios activos del microtúbulo asociados con los monómeros que lo constituyen¹. Puesto que los protofilamentos formados por

¹La resolución de los métodos utilizados para el estudio del fenómeno no permiten identificar en cual de los dos monómeros sucede el acoplamiento.

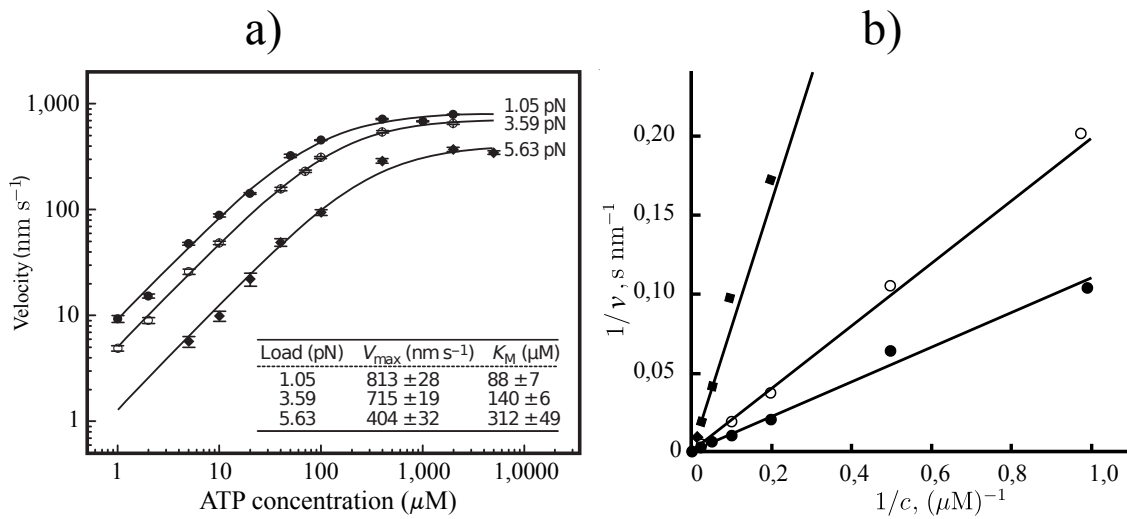


Figura 5.1: (a) Representación log-log de la velocidad de desplazamiento de la cine-sina en función de la concentración de ATP. (b) representación de Lineweaver-Burk de los mismos datos (Datos obtenidos por Visscher et al., 1999. Puntos datos experimentales, líneas ajuste con modelo teórico) [19]. El modelo usado para ajustar los valores experimentales, a diferencia del mecanismo de M-M supone la existencia de un paso de isomerización del complejo enzima sustrato previo al paso de liberación del producto con lo que se da un grado de libertad más a la ley de velocidad de la reacción que permite ajustar las sutilezas observadas en el valor de la constante de Michaelis.

los dímeros tiene un orden específico y polaridad definida, esto hace que el avance de la cinesina a lo largo del microtúbulo sea en esa dirección específica, impidiendo el retroceso del motor. Esta dirección de avance es en el sentido del extremo (+) del microtúbulo². Antes de describir el mecanismo, introduciremos una pequeña notación para entender mejor las ecuaciones que se presentarán.

Dado que las cabezas de K son equivalentes pero ambas interactúan de manera distinta con los monómeros del microtúbulo, en algunos de los pasos del mecanismo, usaremos los subíndices α y β para distinguirlas, y para enfatizar que moléculas están acopladas en cada momento a ellas³.

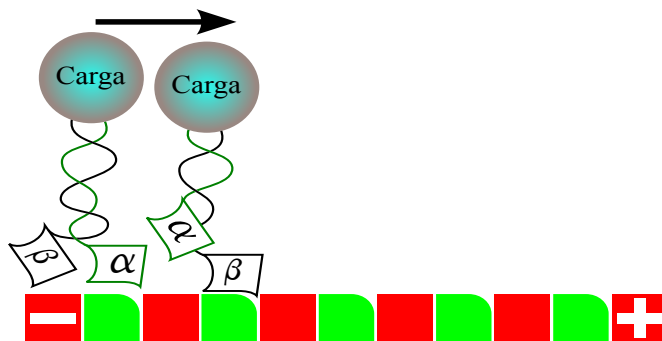


Figura 5.2: Esquema de una cinesina bicéfala desplazándose en un microtúbulo, con etiquetas α y β para diferenciar las cabezas.

El primer paso en este mecanismo es la fijación de la cabeza α de la cinesina al microtúbulo, dando lugar al estado MK que será tomado como nuestra enzima (E). Este primer acoplamiento entre K y M debe ser fuerte, por lo cual si la cabeza de la cinesina tiene una molécula de ADP deberá liberarse de ella si desea enlazarse de manera eficaz al microtúbulo. Supondremos que en nuestro caso las 2 cabezas llevan una molécula de ADP respectivamente, así nuestro estado inicial será KD y deberá reaccionar del siguiente modo.



²El extremo más o (plus end) es siempre el extremo del microtúbulo cercano a la membrana celular.

³Existen otros mecanismos que proponen que solo una de las cabezas de la cinesina es receptora de ATP en tal caso la cinesina no presenta el llamado caminar [20], en nuestro trabajo no estudiaremos tal caso.

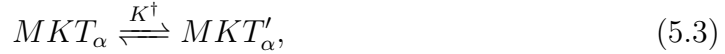
donde el subíndice α indica que la cabeza α de la cinesina se unió al microtúbulo, mientras la cabeza β aun está libre.

El segundo paso de este mecanismo de reacciones será el acoplamiento de un ATP al estado MK . Aquí la molécula de ATP jugará el papel de el sustrato.



con k_1 el ritmo de la reacción directa y k_{-1} el ritmo de la reacción en sentido inverso. Hasta este punto el mecanismo no es diferente de un mecanismo M-M clásico con el complejo MK como enzima y el ATP (T) como sustrato.

Sin embargo, Visscher y Schnitzer [18] propusieron que el estado KMT se isomeriza a un estado KMT' mediante un equilibrio químico. Esta isomerización corresponde al avance de la cabeza libre β hacia la posición activa siguiente a lo largo del microtúbulo. Estas dos conformaciones son el ingrediente clave para que la cinesina avance o no



donde K^{\dagger} es la constante de equilibrio de la reacción⁴. En condiciones adecuadas, la reacción completa debe estar balanceada a la derecha (la reacción en el sentido hacia MKT' es favorecida sobre la reacción inversa) por lo que ocurre un cuarto paso. En este paso la cabeza libre β de la cinesina se une débilmente al siguiente sitio activo mediante un ADP , formando un estado $MKT_{\alpha}D_{\beta}$



Dado que la cabeza β esta débilmente ligada a M también libera su ADP para formar un estado más ligado



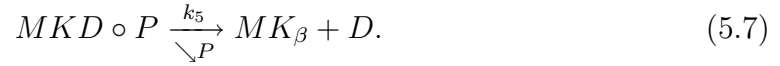
Este estado que esta fuertemente ligado tanto en la cabeza β como en la α . Y permite la hidrólisis del ATP sin correr el riesgo de que la cinesina se separe del microtúbulo:



Por último, la cabeza que hidroliza el ATP libera el fosfato y regresa al estado KM . Con la diferencia que ahora es la cabeza β la que halla unida al microtúbulo y que

⁴En lo consiguiente cada k_i que aparezca en una ecuación será la constante de ritmo de su correspondiente reacción y las K_i serán constantes de equilibrio.

se encuentra un sitio activo adelante de donde inicio la reacción



El producto final de las reacciones es el estado MK_β que es equivalente en sentido químico al estado MK_α obtenido en (5.1). Ya que los subíndices α y β son sólo etiquetas para diferenciar las cabezas de la cinesina, podemos observar que se ha cumplido un ciclo de la reacción y que se recupera el estado KM que establecimos como nuestra enzima en estado inicial.

Con suficiente suministro de ATP , este ciclo puede transcurrir hasta que la cinesina halla migrado a lo largo del microtúbulo, hasta agotar su ciclo útil⁵ siempre en un mismo sentido. Los pasos (5.4), (5.5), (5.6) y (5.7) pueden ser tratados como uno sólo sin pérdida de generalidad, simplemente teniendo en cuenta los subproductos producidos entre dichos pasos [18]. Lo verdaderamente significativo ocurre en el equilibrio $MKT_\alpha \rightleftharpoons MKT'_\alpha$, Schintzer propuso que este paso sucede muy cerca del equilibrio, esto implica que ocurre mucho más rápido que el resto [10]. En términos bioquímicos esto implica que el tiempo transcurrido en el estado MKT_α disminuye k_2 sin afectar k_{-1} , mientras que el tiempo transcurrido en MKT'_α reduce k_{-1}^\dagger dejando intacto el valor de k_2 . Esto hace que el modelo se comporte de manera cualitativamente similar a los resultados experimentales, ver Apéndice C sección C.2. En la figura 5.3 se esquematiza el mecanismo completo.

La ley de velocidad que se obtiene como resultado del mecanismo propuesto se muestra en la subsección C.2 ecuación (C.14) de modo general para cualesquiera enzimas y sustrato. A diferencia de la ley de velocidad del mecanismo M-M la ecuación (C.14) no sólo depende de la concentración del sustrato sino también de la carga, y en nuestro problema específico quedará expresada como

$$w(f, [ATP]) = \frac{v_{max}^\dagger(f)[ATP]}{K_M^\dagger(f) + [ATP]}, \quad (5.8)$$

donde $v_{max}(f) = k_2^\dagger[E]_o$ y $K_M^\dagger(f) = (k_{-1}^\dagger + k_2^\dagger)/k_1$, véase el Apéndice C, ecuaciones (C.16) y (C.15) respectivamente.

Realizando el análisis dimensional de la ecuación (5.8) notaremos que efectivamente $w(f, [ATP])$ tiene unidades de concentración por unidad de tiempo $mol\ s^{-1}$, pero en los datos expuestos en la figura 5.1 el valor de la velocidad está expresado en unidades de distancia por unidad de tiempo $nm\ s^{-1}$, hay una clara correspondencia entre la distancia que recorre la cinesina sobre el microtúbulo y el consumo

⁵La cinesina sólo puede realizar alrededor de unos 100 pasos, después de dichos pasos su carga es pasada a otra cinesina que continuará el recorrido y así sucesivamente.

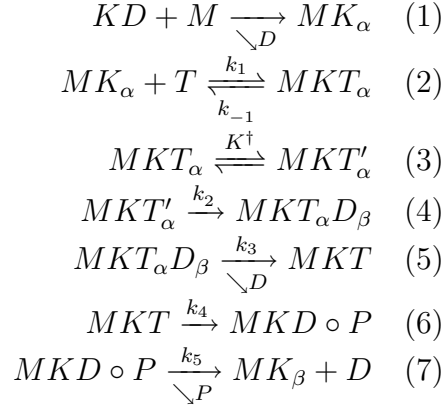
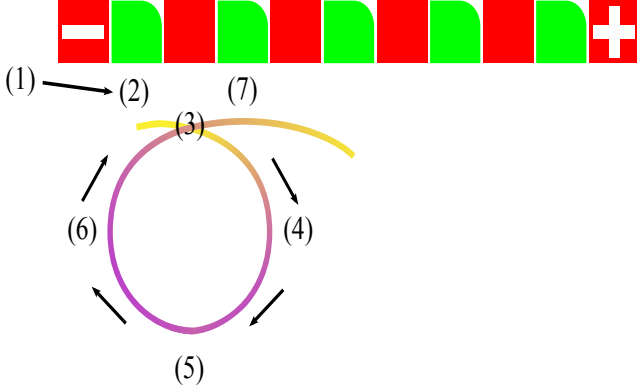


Figura 5.3: Esquema del mecanismo bioquímico asociado al movimiento de la cinesina a lo largo de un microtúbulo.

de ATP. Usando esta correspondencia, podemos definir la función de velocidad de desplazamiento asociada al modelo de Visscher [19] como

$$v(f, [ATP]) = \frac{d}{[MK]_o} w(f, [ATP]) = \frac{v_{max}^\ddagger(f)[ATP]}{K_M^\ddagger(f) + [ATP]}, \quad (5.9)$$

donde $d = 8nm$ es la distancia característica de un paso de la cinesina en el microtúbulo [5] y $[MK]_o$ se supone constante de acuerdo con las hipótesis del mecanismo de Michaelis-Menten. Tenemos entonces que la ecuación (5.9) está expresada en unidades $nm s^{-1}$ y v_{max}^\ddagger es la nueva *velocidad máxima* de la reacción definida como $v_{max}^\ddagger = d * k_2^\ddagger$ ⁶ que tiene unidades de $nm s^{-1}$.

La expresión anterior esta basada por completo en un modelo teórico. Sin embargo, es difícil medir el valor de la pseudo constante de primer orden k_2^\ddagger de forma experimental, por lo que resulta más fácil medir el valor del número de recambio k_{cat} ⁷.

⁶A partir de aquí puede ser complicado y confuso distinguir entre las constantes usadas, en especial el recordar las dimensiones de las mismas, con fin de facilitar la fluidez de la lectura, en la página 112 se incluye una tabla con las dimensiones de dichas constantes.

⁷El numero de recambio o constante catalítica es una constante de ritmo que cuantifica la velocidad máxima de la reacción cuando todos los sitios activos de la enzima están ocupados por sustrato, en otras palabras cuantifica la eficiencia de la reacción a niveles de saturación.

Mediante los análisis hechos en las secciones C.1 y C.2 por medio de la figura 5.1, podemos diferenciar dos comportamientos esenciales del mecanismo. El primero de estos mecanismos está asociado puramente al efecto catalítico mientras que otro al acoplamiento de la cinesina con el microtúbulo [21]. Esta diferenciación nos permite expresar (5.9) en la siguiente forma

$$v(f, ATP) = \frac{d * k_{cat}(f)[ATP]}{[ATP] + k_{cat}(f)/k_b(f)}, \quad (5.10)$$

donde $k_b = k_{cat}/K_M^\dagger$ es la constante asociada a la ligadura de la cinesina con el microtúbulo. Estas dos constantes también dependen de la fuerza y lo hacen en forma Boltzmaniana [19]:

$$k_{cat}(f) = \frac{k_{cat}^o}{p_{cat} + q_{cat}e^{f\delta/K_B T}}, \quad (5.11)$$

$$k_b(f) = \frac{k_b^o}{p_b + q_b e^{f\delta/K_B T}}. \quad (5.12)$$

En estas dos expresiones se introdujeron p y q , que son las probabilidades de ocupación del estado correspondiente siendo p la probabilidad de estar en el estado de *avance* y q del estar en el estado de *retroceso* [22]. k^o es el valor de referencia de la correspondiente constante que puede expresarse en términos de las constantes originales k_1 , k_{-1} y k_2 . La forma de encontrar dicha correspondencia será mediante una comparación directa de las constantes así como su relación con el proceso de catálisis o de acoplamiento de la cinesina.

Primero compararemos k_{cat} con k_2^\dagger ya que esta última está directamente relacionada con la catálisis y es este proceso el cual permite que la cinesina alterne sus cabezas produciendo el movimiento del motor

$$\begin{aligned} k_{cat} &= \frac{k_{cat}^o}{p_{cat} + q_{cat}e^{f\delta/K_B T}} = \frac{k_2 K_o}{K_o + e^{f\delta/K_B T}} = k_2^\dagger \\ \implies &\frac{k_{cat}^o q_{cat}^{-1}}{p_{cat}/q_{cat} + e^{f\delta/K_B T}} = \frac{k_2^\dagger K_o}{K_o + e^{f\delta/K_B T}}. \end{aligned}$$

Suponiendo que $p_{cat}/q_{cat} = K_o$ encontramos que

$$k_{cat}^o q_{cat}^{-1} = k_2 p_{cat} q_{cat}^{-1}$$

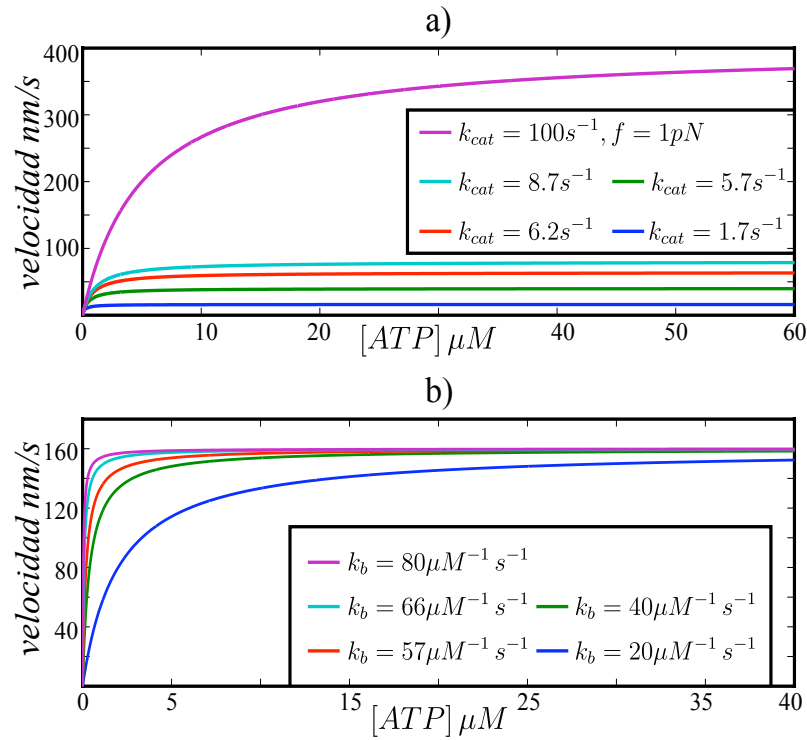


Figura 5.4: a) gráfica de la ecuación (5.10) para un mismo valor de $k_b = 1,3 \mu M^{-1} s^{-1}$ y dos valores de fuerza aplicada, en el primer caso $f = 1 pN$ en todos los demás $f = 8 pN$. b) el valor de $k_{cat} = 40 s^{-1}$ en todos los caso y $f = 6 pN$. Los valores usados se tomaron de [19].

y así obtenemos

$$k_{cat}^o = k_2 p_{cat}. \quad (5.13)$$

Este resultado nos indica que el valor de k_{cat}^o es proporcional al valor de k_2 y a la probabilidad de estar en dicho estado. En el caso de k_b compararemos contra el cociente k_{cat}/K_M^\dagger teniendo

$$k_b = \frac{k_b^o}{p_b + q_b e^{f\delta/k_B T}} = \frac{k_{cat}}{K_M^\dagger} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1}^\dagger + k_2^\dagger}$$

Desarrollando adecuadamente ambos miembros de la ecuación y recurriendo a las expresiones encontradas en el Apéndice C para k_{-1}^\dagger y k_2^\dagger obtendremos

$$\frac{k_b^o q_b^{-1}}{p_b/q_b + e^{f\delta/k_B T}} = \frac{k_1 K_o}{K_o + (k_{-1}/k_2) e^{f\delta/k_B T}}.$$

Suponiendo ahora que el cociente $p_b/q_b = K_o(k_2/k_{-1})$ encontramos

$$k_b^o q_b^{-1} = k_1 \frac{p_b}{q_b},$$

para finalmente obtener

$$k_b^o = k_1 p_b. \quad (5.14)$$

Estos comportamientos límite, el catalítico y el acoplamiento tomarán mayor sentido en el Capítulo 6, donde apreciaremos como el cambio de estos afectara directamente la procesividad de la reacción.

5.1. El efecto auto-inhibidor

Retomando el mecanismo propuesto en la primera parte del capítulo, sabemos que el complejo MK es afín tanto a las moléculas de ATP como a las moléculas de ADP . La afinidad asociada al complejo activado MKT es mayor que la correspondiente asociada al complejo MKD . Como consecuencia de esto el estado MKD está débilmente ligado en comparación con el estado MKT . Además en la reacción final del mecanismo ecuación (5.7) tenemos que como resultado de la hidrólisis del ATP se liberan una molécula de ADP y un P_i , tomando en cuenta esto y con la idea del ciclo autocatalítico como base, después de un gran número de ciclos la concentración de ADP aumentará considerablemente. Este hecho hace que la probabilidad de tener estados MKD se incremente con el tiempo, lo cual afectará la velocidad de avance de la reacción y ya que las moléculas de ADP compiten por el

mismo sitio activo que el ATP , es decir el ADP es un inhibidor competitivo. Dado que no produce ningún subproducto. Aun más, ya que el ADP es un producto de la reacción completa, ocurre que la reacción se auto-inhíbe [20].

Esta observación sobre la naturaleza inhibidora del ADP nos permite proponer un nuevo mecanismo que generaliza el mecanismo propuesto al inicio del capítulo. Agregando el efecto auto-inhibidor, tenemos el siguiente mecanismo con inhibición competitiva



La forma en que la presencia de un inhibidor competitivo afecta la ecuación de velocidad ya fue expuesta en la subsección 3.4.2 y en nuestro caso la ecuación (5.10) será modificada de igual manera, así obtenemos que

$$w(f, ATP, ADP) = \frac{v_{max}^{\dagger}[ATP]}{[ATP] + (1 + [D]/K_I)K_M^{\dagger}}, \tag{5.16}$$

donde K_I esta definida como

$$K_I = \frac{[MK][D]}{[MKD]}. \tag{5.17}$$

Tomando las reacciones en las que interviene el ADP tenemos



Al realizar la ecuación de velocidad para $[D]$ la parte del equilibrio con K_I se anula y solo queda

$$\frac{d[D]}{dt} = k_5[MKD \circ P]. \tag{5.20}$$

Experimentalmente se sabe que el cambio temporal de $[D]$ sigue una cinética de primer orden con respecto al sustrato ATP , de tal modo que la ecuación anterior queda expresada como

$$\frac{d[D]}{dt} = k_5([ATP]_0 e^{-k_5 t}), \tag{5.21}$$

resolviendo tenemos

$$[D]_t = [D]_o + [ATP]_o(1 - e^{-k_5t}). \quad (5.22)$$

Esta ecuación indica que la concentración de ADP aumenta con el tiempo, lo cual es concordante con el mecanismo y los experimentos [20]. Al sustituir la ecuación (5.22) en (5.16) obtenemos una expresión para la velocidad como función de la concentración de ATP y del tiempo $w(f, ATP, t)$.

5.2. Comparación entre los mecanismos con y sin inhibición

En este inciso haremos un análisis breve sobre el efecto cuantitativo de la auto-inhibición por producción de ADP en los resultados del modelo original.

A partir de la ecuación (5.8) es posible encontrar una expresión para $[ATP]_t$ tomando en cuenta que

$$-\frac{d[ATP]}{dt} = \frac{v_{max}^\dagger(f)[ATP]}{K_M^\dagger + [ATP]}, \quad (5.23)$$

se sigue que

$$K_M^\dagger \ln([ATP]_t/[ATP]_o) + [ATP]_t - [ATP]_o = -v_{max}^\dagger t, \quad (5.24)$$

si se desea obtener la expresión explícita de $[ATP]_t$ a partir de la ecuación anterior se debe hacer en términos de la función W de Lambert [23], aunque experimentalmente se obtiene con muy buena aproximación que $[ATP]_t$ es lineal en t véase figura 5.6, si en la ecuación anterior despreciamos el término logarítmico se tiene que

$$[ATP]_t = -(v_{max}^\dagger t - [ATP]_o), \quad (5.25)$$

resolviendo numéricamente la ecuación (5.23) la gráfica resultante se comporta lineal en un buen medida, para valores estándar de v_{max}^\dagger y K_M^\dagger

Considerando la expresión de $[D]_t$ en la ecuación (5.22) la ecuación resultante es

$$-\frac{d[ATP]}{dt} = \frac{v_{max}^\dagger(f)[ATP]}{K_M^\dagger(1 + [D + T]_o(1 - e^{-kt})/K_I) + [ATP]}, \quad (5.26)$$

esta ecuación no es resoluble analíticamente, por lo que se debe proceder directamente numéricamente para hallar $[ATP]_t$, en la figura 5.5 se muestra esta solución

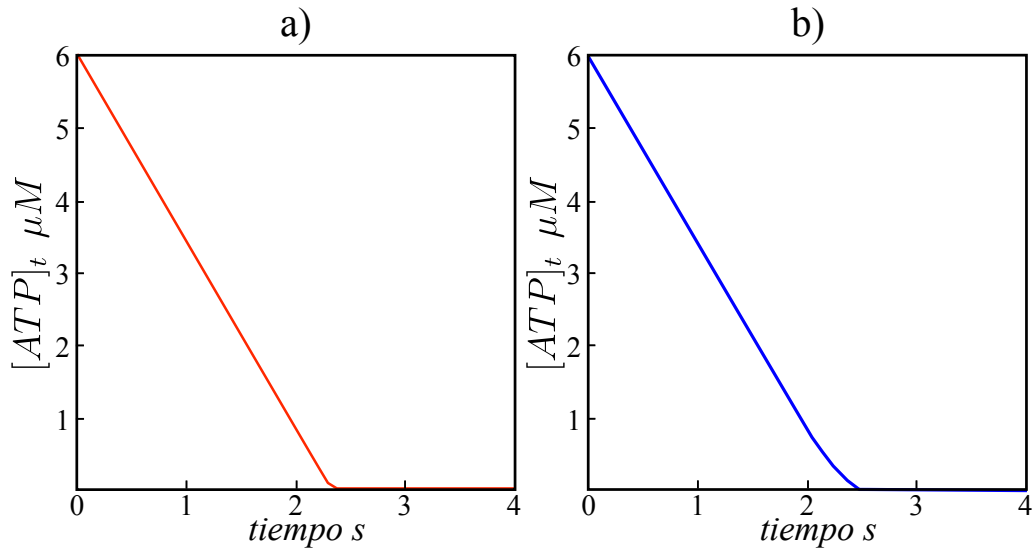


Figura 5.5: a) Solución numérica de (5.23) con un valor de $v_{max}^\dagger = 2,6\mu M s^{-1}$ y $K_M = 0,043\mu M$. b) solución numérica de (5.26) con un valor de $v_{max}^\dagger = 2,6\mu M s^{-1}$, $K_M = 0,043\mu M$ y $K_I = 0,2\mu M$. Este comportamiento se puede alejar de la linealidad cambiando los valores de K_M y K_I drásticamente, pero estos valores no reflejan el comportamiento experimental del sistema específico a estudiar.

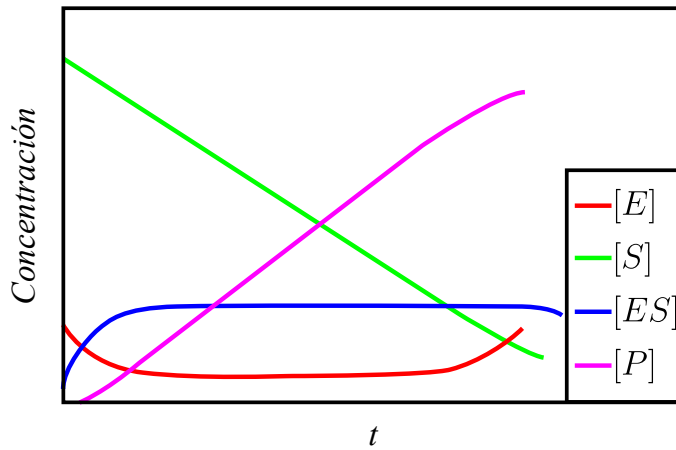


Figura 5.6: Seguimiento experimental de las concentraciones en el tiempo enzima, sustrato, complejo enzima-sustrato y producto que siguen una cinética de tipo M-M. Imagen original tomada de www.Arizona.edu ©.

5.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS MECANISMOS CON Y SIN INHIBICIÓN 63

Las relaciones anteriores sugieren que la concentración de ATP sigue una ley lineal de la forma: $[ATP]_t = -v_{max}t^\ddagger + [ATP]_o$. De este modo, está justificado proponer dos velocidades distintas de la reacción como función del tiempo

$$v(t) = \frac{-v_{max}^\ddagger(v_{max}^\ddagger t - [ATP]_o)}{K_M^\ddagger - (v_{max}^\ddagger t - [ATP]_o)} \quad (5.27-a)$$

$$v(t)_{I} = \frac{-v_{max}^\ddagger(v_{max}^\ddagger t - [ATP]_o)}{K_M^\ddagger[1 + [D + T]_o(1 - e^{-kt})/K_I] - (v_{max}^\ddagger t - [ATP]_o)}. \quad (5.27-b)$$

La primera de estas velocidades representa el proceso sin inhibición mientras que la segunda contiene el efecto de la inhibición. En las expresiones (5.27), el tiempo juega el papel de variable independiente. Si analizamos el término $v_{max}^\ddagger t - [ATP]_o$ sigue teniendo unidades de concentración y también el denominador de ambas ecuaciones. El resultado anterior es importante ya que da la expresión para la velocidad de desplazamiento de los motores moleculares controlados por cinéticas autocatalíticas como las consideradas en este capítulo. Adicionalmente, permite establecer un criterio bioquímico sobre las condiciones necesarias para que dicha velocidad sea constante con buena aproximación. Esto permite, en principio, justificar el modelo biofísico inicial considerado en el Capítulo 7 de esta tesis, [24]. Para poder implementarlas en el modelo biofísico del capítulo siguiente, las ecuaciones (5.27) deberán estar expresadas en términos de tiempos y distancias características. Para conseguir esto, hemos propuesto multiplicarlas por los factores que tienen en cuenta la longitud de cada paso y la concentración inicial de enzima MK , esto es

$$v(t)_J = (d/[MK]_o)v(t) \quad (5.28-a)$$

$$v(t)_{J_I} = (d/[MK]_o)v(t)_I, \quad (5.28-b)$$

así obtenemos

$$v(t)_J = \frac{-v_{max}^\ddagger(t - t_f)}{K_M^\ddagger/v_{max}^\ddagger - (t - t_f)} \quad (5.29-a)$$

$$v(t)_{J_I} = \frac{-v_{max}^\ddagger(t - t_f)}{K_M^\ddagger[1 + [D + T]_o(1 - e^{-kt})/K_I]/v_{max}^\ddagger - (t - t_f)}, \quad (5.29-b)$$

donde definimos dos nuevas constantes características

$$\frac{d[ATP]_o}{[MK]_o} = v_{max}^\ddagger t_f, \quad (5.30)$$

$$K_M^\ddagger = K_M^\ddagger \frac{d}{[MK]_o}, \quad (5.31)$$

La figura 5.7 muestra el comportamiento temporal de la velocidad de la reacción con y sin el término debido a la inhibición.

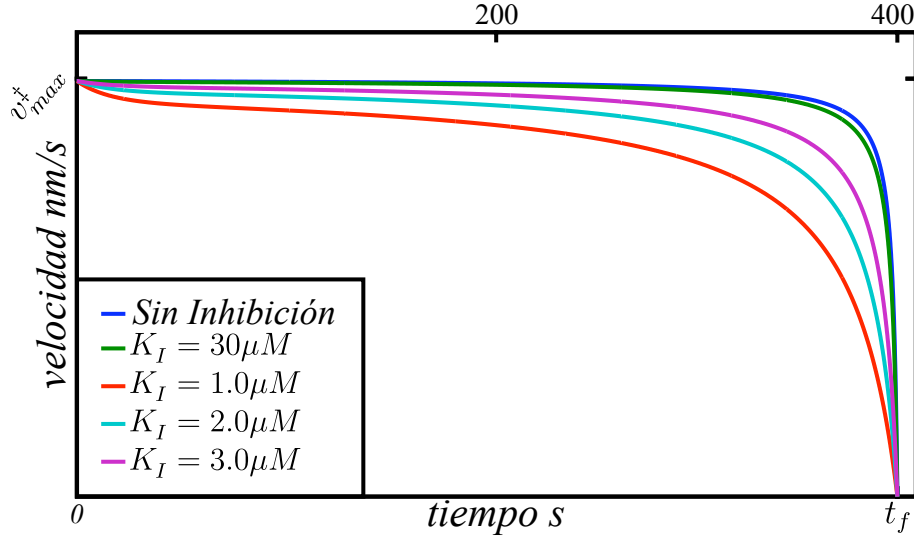


Figura 5.7: Comportamiento característico de $v(t)_J$ y $v(t)_{J_I}$ en todos los casos el valor de v_{max}^\ddagger y K_M^\ddagger es el mismo. Los valores usados fueron: $[ATP]_o = 1 \text{ mM}$, $[ADP]_o = 0$, $v_{max}^\ddagger = 900 \text{ nm s}^{-1}$, $K_M^\ddagger = 28 \text{ } \mu\text{M}$, $k_{cat} = 113 \text{ s}^{-1}$ y $k_5 = 5,600 \text{ s}^{-1}$ todos tomados de [20] también los valores de la constante de inhibición.

En el pie de la figura se muestran los valores usados para las constantes de las ecuaciones (5.29). Aunque no son todos los valores involucrados, conviene mencionar que el criterio usado para definir la concentración de microtúbulos y cinesinas con los que se establece el valor de la concentración de enzima total $[MK]_o$, consiste en tener en cuenta que la longitud promedio de los microtúbulos es de $5 \mu\text{m}$. Tomando como sistema un total de 10 a 50 microtúbulos, se estimó la concentración de tubulina polimerizada obteniéndose: $[M] = 32 \text{ nM}$. De manera similar, la concentración de cinesinas se estimó en $[K] \approx 10 - 100 \text{ nM}$ [20] de modo que si cada cinesina unida a un monómero de tubulina se considera un estado MK tenemos que $[MK]_o \approx 10 - 100 \text{ nM}$ y $K_M^\ddagger = 2,24 \mu\text{m}^8$.

En el desarrollo del capítulo se estudiaron dos mecanismos químicos para la descripción del proceso de avance de las cinesinas a lo largo de los microtúbulos, estos

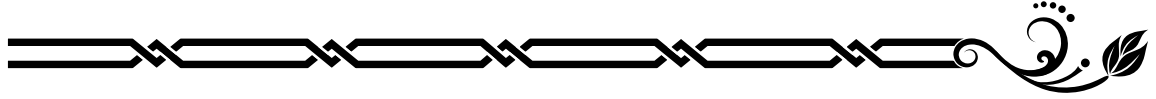
⁸El papel de la pseudo constante de Michaelis K_M^\ddagger es una distancia característica a la cual la velocidad se reduce a la mitad y esta dentro de la escala de la longitud de los microtúbulos.

5.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS MECANISMOS CON Y SIN INHIBICIÓN 65

mecanismo permiten establecer la velocidad de la reacción mediante ecuaciones del tipo Michaelis-Menten. La elección de estos mecanismos permitió el desarrollo de dos ecuaciones (5.29) para el avance de la cinesina en función del tiempo modulada por constantes de carácter mecánico: velocidades de desplazamiento, distancias y tiempo característicos obtenidos mediante relaciones bioquímicas del sistema y datos experimentales, estas expresiones complementaran el desarrollo del Capítulo 7 ya que estas serán utilizadas como la función de velocidad asociada al movimiento del motor. Además el primer mecanismo como veremos en el capítulo siguiente permitirá modelar el avance y procesión del motor en términos energéticos.

Capítulo 6

El perfil de energía



El mecanismo propuesto para correlacionar la velocidad de desplazamiento del motor molecular con la velocidad del proceso autocatalítico asociado al consumo de ATP, puede representarse en términos de un perfil de energía *cuasi*-periódico debido a que el proceso de avance ocurre en ciclos prácticamente idénticos que, como se observa en la figura 6.1, realmente favorece el desplazamiento de la cinesina en sentido anterógrado y hace energéticamente desfavorable el avance en sentido retrógrado.

Utilizaremos el grado de avance de la reacción ξ para deducir la forma de la energía libre de Gibbs, es decir $G = G(\xi)$. Usando los resultados de la teoría termoquímica expuesta en la sección 3.4, recurriremos a la relación

$$\left(\frac{dG}{d\xi}\right)_{T,p} = \sum_{\alpha} \nu_{\alpha} \mu_{\alpha}, \quad (6.1)$$

donde μ_{α} es el potencial químico de la α -ésima especie química involucrada en la reacción. Sabemos que en la aproximación ideal $\mu_{\alpha} = RT \ln(n_{\alpha}/n_{\alpha}^{\circ})$, de manera tal que la ecuación anterior se describe como

$$\left(\frac{dG}{d\xi}\right)_{T,p} = -RT \sum_{\alpha} \nu_{\alpha} \ln(n_{\alpha}) + RT \sum_{\alpha} \nu_{\alpha} \ln(n_{\alpha}^{\circ}), \quad (6.2)$$

en este caso n_{α} es la fracción molar de la especie química correspondiente y n_{α}° el valor en equilibrio.

Por definición, existe un grado de avance ξ para cada uno de los pasos del mecanismo de reacción mostrado en la figura 5.3. En nuestro caso, dadas las suposiciones ya mencionadas y la evidencia experimental [18, 19], consideraremos que el grado de

avance de las ecuaciones (5.2) y (5.3) es el mismo debido a la existencia de un equilibrio rápido en el proceso de isomerización de la proteína motora, ecuación (4.3)¹.

Utilizando la ecuación (6.2) tenemos que el diferencial de energía libre para la ecuación (5.2) es

$$dG = -RT \left[\nu_{MK} \ln \left(\frac{n_{MK}}{n_{MK}^o} \right) + \nu_{MKT} \ln \left(\frac{n_{MKT}}{n_{MKT}^o} \right) + \nu_T \ln \left(\frac{n_T}{n_T^o} \right) \right] d\xi, \quad (6.3)$$

mediante la suposición de que (5.2) y (5.3) tiene el mismo grado de avance el signo de los coeficientes estequiométricos en (5.3) se intercambian de modo que el estado MKT' actúa como reactivo en lugar de producto, esto lo podemos entender como invertir el sentido de la reacción



Así según la definición del grado de avance de una reacción tenemos que $d\xi_\rho = -\nu_i dn_i$ y considerando que inicialmente cada especie química involucrada tiene una concentración inicial n_i^o podemos establecer la siguiente tabla:

Concentración de reactivos y productos				
Tiempo	$[MK]$	$[T]$	$[MKT]$	$[MKT']$
$t = 0$	n_{MK}^o	n_T^o	n_{MKT}^o	$n_{MKT'}^o$
$t = \tau$	$n_{MK}^o - \xi$	$n_T^o - \xi$	$n_{MKT}^o + \xi$	$n_{MKT'}^o - \xi$

Tabla 6.1: Razón estequiométrica de las especies químicas a un tiempo dado según el grado de avance de la reacción.

El hecho de que en la tabla 6.1 los valores iniciales de $[MKT]$ $[MKT']$ sean distintos de cero, se debe a que en la célula medimos estos valores sobre un gran número de microtúbulos, los cuales contienen más de una cinesina adherida a ellos al iniciarse el proceso, también estas se encuentran en diferentes estados del mecanismo

¹Estás dos ecuaciones han sido las esenciales en todo el análisis cinético expuesto en el trabajo, además el equilibrio rápido en (5.3) apoya el hecho de considerar un solo grado de avance para estas dos reacciones.

propuesto. Utilizando ahora la condición de equilibrio entre MKT y MKT' sabemos que

$$n_{MKT} = \frac{n_{MKT'}}{K^\dagger},$$

con los datos expuestos en la tabla 6.1, usando (6.2) podemos establecer que al tiempo τ el diferencial de energía libre de la reacción en conjunto es

$$dG = -RT \left[\ln \left(\frac{n_{MK} - \xi}{n_{MK}^o} \right) + \ln \left(\frac{K^\dagger (n_{MKT'} - \xi)}{K^\dagger n_{MKT'}^o} \right) + \ln \left(\frac{n_T - \xi}{n_T^o} \right) \right] d\xi, \quad (6.4)$$

y simplificando la ecuación tenemos

$$\frac{dG}{RT} = - \{ \ln [(n_{MK} - \xi)(n_T - \xi)(n_{MKT'} - \xi)] - \ln (n_{MK}^o n_T^o n_{MKT'}^o) \} d\xi. \quad (6.5)$$

Para proseguir, es conveniente aproximar la función logaritmo de la forma $\ln(x) \approx x - 1$, que es válida ya que $0 \leq \xi \leq 1$ y las n_i^o están debidamente normalizadas [25]. Con esta aproximación podemos describir (6.5) como

$$dG \cong -RT [(n_{MK} - \xi)(n_T - \xi)(n_{MKT'} - \xi) - (n_{MK}^o n_T^o n_{MKT'}^o)] d\xi. \quad (6.6)$$

Desarrollando esta expresión se obtiene un polinomio de grado tres para ξ . Realizando la integración se obtiene el polinomio de grado cuatro².

$$G(\xi) = A\xi^4 + B\xi^3 + C\xi^2 + E, \quad (6.7)$$

donde los coeficientes están definidos como

$$A = \frac{RT}{4}, \quad (6.8-a)$$

$$B = RT \left[\frac{n_{MK} + n_T + n_{MKT'}}{3} \right], \quad (6.8-b)$$

$$C = RT \left[\frac{n_{MK}n_T + n_{MK}n_{MKT'} + n_Tn_{MKT'}}{2} \right], \quad (6.8-c)$$

$$E = G(a). \quad (6.8-d)$$

Es importante hacer notar que al hacer la integración de la ecuación (6.5) el término lineal de la energía libre desaparece. La asimetría del potencial es debida exclusivamente al término de tercer orden. La figura 6.2, en la ecuación (6.7) el grado de de

²el correspondiente desarrollo del polinomio se encuentran en el Apéndice C sección C.3, así como el cálculo de la integral.

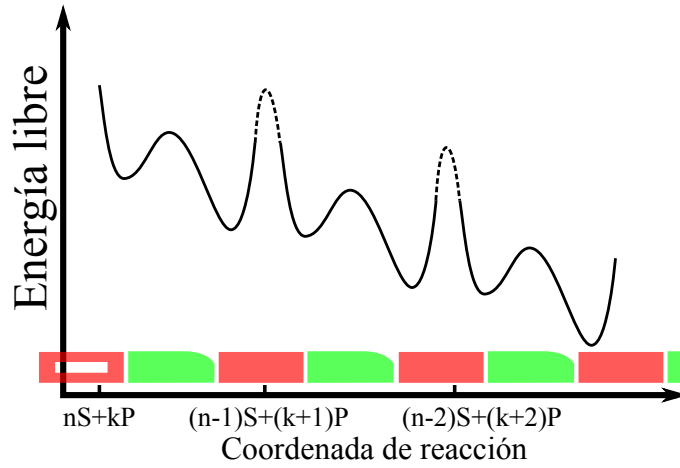


Figura 6.1: Paisaje energético de una reacción catalítica de varios ciclos.

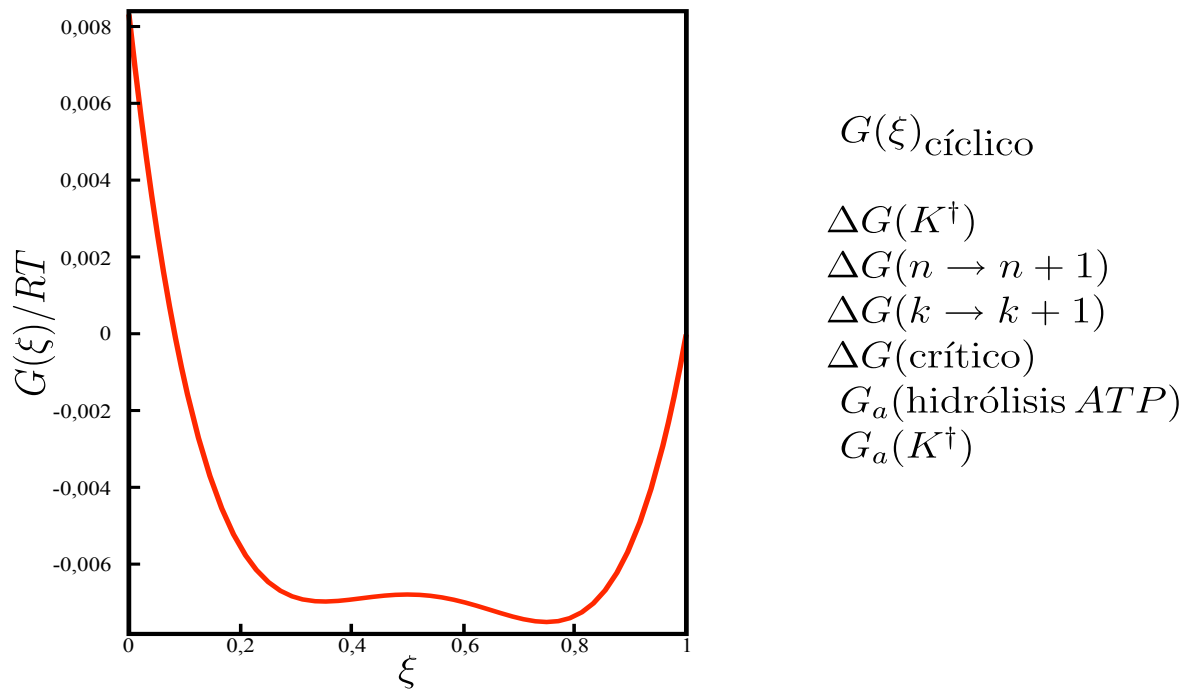


Figura 6.2: Modelo teórico del perfil energético ecuación (6.7). Los valores de los parámetros usados en la figura fueron tomados con base en resultados experimentales.

avance ξ el cual va de 0 a 1 indica el cambio entre el estado MKT y el estado MKT' siendo los mínimos del potencial las posiciones correspondientes a estos estados, este grado de avance local está asociado con la isomerización de la enzima más que con la hidrólisis de ATP . Considerando que el mecanismo propuesto se realiza sucesivamente en tanto la concentración de ATP sea la adecuada y debido también a que cada cinesina tiene una progresividad máxima de 100 pasos [4], este perfil energético se repetirá a partir del punto final mostrado en la figura 6.2. Sin embargo, es importante notar que al inicio de cada nuevo ciclo la concentración de ATP se verá disminuida debido al consumo de una molécula de ATP en el paso precedente. De este modo en un esquema de coordenada de reacción generalizada para este proceso el paisaje de energía libre se verá como el mostrado en la figura 6.3.

Basados en la consideración de que al transcurrir cada ciclo la forma del perfil energético descrito por la ecuación (6.7) debe en cierto modo repetir el comportamiento de una forma *cuasi-periódica*³, encontramos que una manera sencilla de reproducir un comportamiento de este tipo mediante un desarrollo en series de Fourier de la ecuación (6.7). La inclinación del potencial se reproduce añadiendo un término lineal en ξ , cuyo coeficiente depende del producto de concentraciones iniciales, que siempre es menor al inicio de cada ciclo. Es decir, la forma general del potencial catalítico es

$$G(\xi_g)_{ciclico} \approx \frac{\mathcal{A}_0}{2} + \sum_{i=1}^n \mathcal{A}_n \cos(2\pi n \xi_g) + \sum_{i=1}^n \mathcal{B}_n \sin(2\pi n \xi_g) - D \xi_g. \quad (6.9)$$

donde la variable ξ_g es el grado de avance global asociado a la transformación de ATP en $ADP + P_i$ por acción de la cinesina y este no está limitado a solo tomar valores entre cero y uno, ya que esta variable modela el comportamiento a tiempo largos. La forma propuesta para el potencial cíclico tiene una justificación sencilla, retomemos por un momento la ecuación (6.5) que tiene dos términos de orden cero que se anulan entre ellos. Estos términos están dados como el producto de las n_i^o que aparece con signo positivo y negativo. Del análisis de Fourier sabemos que para toda función $g(x)$ que se desarrolla mediante una serie de Fourier infinita se tiene

$$g(x) = \frac{\mathcal{A}_o}{2} + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{A}_n \cos(2\pi n \omega_o x) + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{B}_n \sin(2\pi n \omega_o x),$$

donde los \mathcal{A}_n y \mathcal{B}_n son los coeficientes de Fourier [17], de modo que si a la función

³La forma general del paisaje energético es asimétrico, sin embargo conserva la forma de un polinomio de grado cuatro en cada paso y este se repite en intervalos que se pueden considerar casi como periodos en una onda periódica.

$g(x)$ se le suma cualquier otra función $h(x)$ se sigue cumpliendo que

$$g(x) + h(x) = \frac{A_o}{2} + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{A}_n \cos(2\pi n\omega_o x) + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{B}_n \sin(2\pi n\omega_o x) + h(x).$$

De este modo, si durante el desarrollo e integración de (6.6) evitamos simplificar los términos que llevan el producto de las n_i^o , tenemos que podemos expresar a la ecuación (6.7) como

$$G(\xi) = A\xi^4 + B\xi^3 + C\xi^2 + E + D\xi - D\xi, \quad (6.10)$$

donde el coeficiente D es simplemente el producto de las n_i^o . Aplicando la propiedad antes mencionada de las series de Fourier para la parte $A\xi^4 + B\xi^3 + C\xi^2 + E + D\xi$ podemos expresar a la energía libre del proceso cíclico como

$$G(\xi) = \frac{A_o}{2} + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{A}_n \cos(2\pi n\omega_o \xi) + \sum_{i=1}^{\infty} \mathcal{B}_n \sin(2\pi n\omega_o \xi) - D\xi,$$

y al tomar una serie de Fourier finita la igualdad se convierte en una aproximación tal como aparece en (6.9). Los coeficientes de Fourier se obtienen mediante las relaciones

$$\mathcal{A}_n = \int_0^1 [G(\xi) + D\xi] \cos(2\pi n\xi) d\xi, \quad (6.11-a)$$

$$\mathcal{B}_n = \int_0^1 [G(\xi) + D\xi] \sin(2\pi n\xi) d\xi. \quad (6.11-b)$$

El resultado de este proceso genera una onda periódica con la forma de la figura 6.2, mientras que el término lineal inclina dicha onda. Hasta este punto, la forma de $G(\xi)_{ciclico}$ dada por la ecuación (6.9) solo modela la inclinación del potencial y la repetición de la forma de polinomio cuártico en cada periodo. Sin embargo, no contiene la información del cambio absoluto en los valores de las n_i al inicio de cada nuevo paso, esto se logra considerando que los valores de las n_i son en realidad una función del tiempo, es decir $n_i(t)$ lo cual afecta directamente a los coeficientes de Fourier de modo que estos también serán funciones del tiempo. En vista de esto, la ecuación (6.9) será ahora un función de dos variables

$$G(\xi_g, t)_{ciclico} \approx \frac{A_0}{2}(t) + \sum_{i=1}^n \mathcal{A}_n(t) \cos(2\pi n\xi_g) + \sum_{i=1}^n \mathcal{B}_n(t) \sin(2\pi n\xi_g) - D\xi_g. \quad (6.12)$$

Dicha dependencia temporal se obtiene directamente de la ecuación de velocidad de la reacción, esto genera en si una superficie de potencial, pero se puede modelar nuevamente con una sola variable si se logra colapsar la dimensión temporal. Esto es posible gracias a la correspondencia que existe entre el tiempo y el grado de avance de la reacción ecuación (3.33)

$$\begin{aligned} t &\xrightarrow{h(t)} \xi, \\ \xi &\xrightarrow{h^{-1}(\xi)} t. \end{aligned} \quad (6.13)$$

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se obtiene que el modelo final de $G(\xi_g)_{ciclico}$ será

$$G(\xi_g)_{ciclico} \approx \frac{\mathcal{A}_0}{2}(\xi_g) + \sum_{i=1}^n \mathcal{A}_n(\xi_g) \cos(2\pi n \xi_g) + \sum_{i=1}^n \mathcal{B}_n(\xi_g) \sin(2\pi n \xi_g) - D\xi_g. \quad (6.14)$$

Tomando en cuenta los resultados expuestos en el capítulo anterior sabemos que la concentración de enzima total se conserva en el proceso por lo que el valor de n_{MK} no se vera afectado tras cada nuevo ciclo, en cambio los valores de n_T y $n_{MKT'}$, si, la forma de está dependencia en ξ_g se propone lineal, para el primero: $n_T(\xi_g) = n_T^o - k_{cat}^o \xi_g$, esto en similitud con el caso $[ATP]_t = [ATP]_o - v_{max}^\dagger t$ y el segundo $n_{MKT'}(\xi_g) = n_{MKT'}^o - K_o \xi_g$, esto debido a que el valor efectivo K^\dagger se ve afectado por el aumento de moléculas de ADP y complejo MKD conforme aumenta ξ_g . La tarea de realizar la expansión en series de Fourier es en si laboriosa, considerando una dependencia funcional en el tiempo de los coeficientes de la misma complica aún más esta tarea de manera analítica, Por esta razón, se procedió a crear el codigo C.1 expuesto en el Apéndice C para realizar está tarea.

Interpretando de manera cualitativa lo que nos indica el modelo, analicemos qué sucede con dos ciclos subsecuentes cuando los valores de ATP son cercanos al valor de saturación, es decir, a tiempos cortos después de haber iniciado el movimiento del motor. De manera similar, analizaremos lo que sucede a tiempos largos con dos en los que los efectos de inhibición debidos a la presencia del ADP han afectado considerablemente la dinámica del sistema.

En cada paso individual tenemos tres puntos críticos de la energía libre dos estables y un tercero inestable. La diferencia de energía entre estos puntos y los puntos del siguiente paso, representan la energía que absorbe y libera el sistema durante el proceso de avance de un paso. En la figura 6.4 se indican estos puntos y sus diferencias de energía libre entre ellos en forma de energías de activación y diferencias de energía.

La curva azul muestra dos energías de activación y dos diferencias de energía. La primera de ellas es la $G_a(K^\dagger)$, la cual es la energía necesaria para pasar la barrera

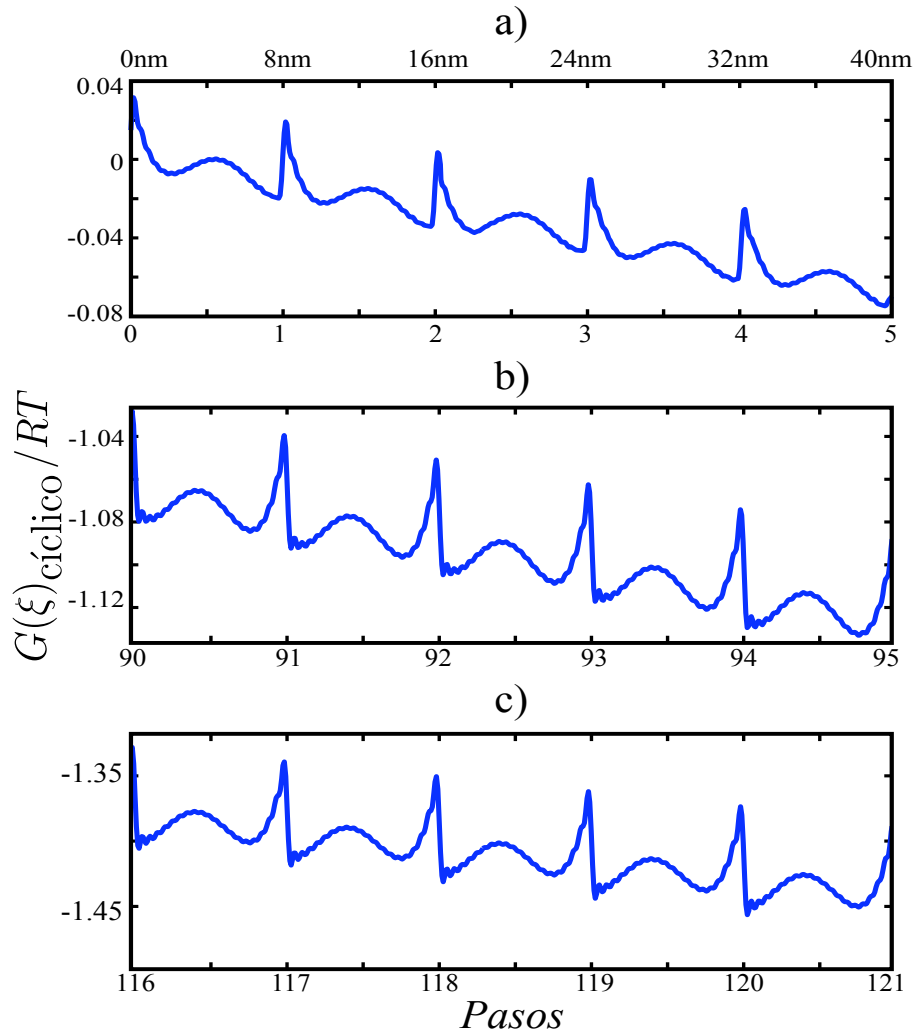


Figura 6.3: Modelo ajustado mediante modelo series de Fourier ecuación (6.14) para la reacción en varios ciclos subsecuentes. Con los correspondientes valores iniciales $n_{MKT}^o = 0,02$, $n_T^o = 0,78$ y $n_{MK}^o = 0,2$. a) los primeros cinco pasos y correspondencia en nm avanzados. b) del paso 90 al 95. c) del paso 116 al 121.

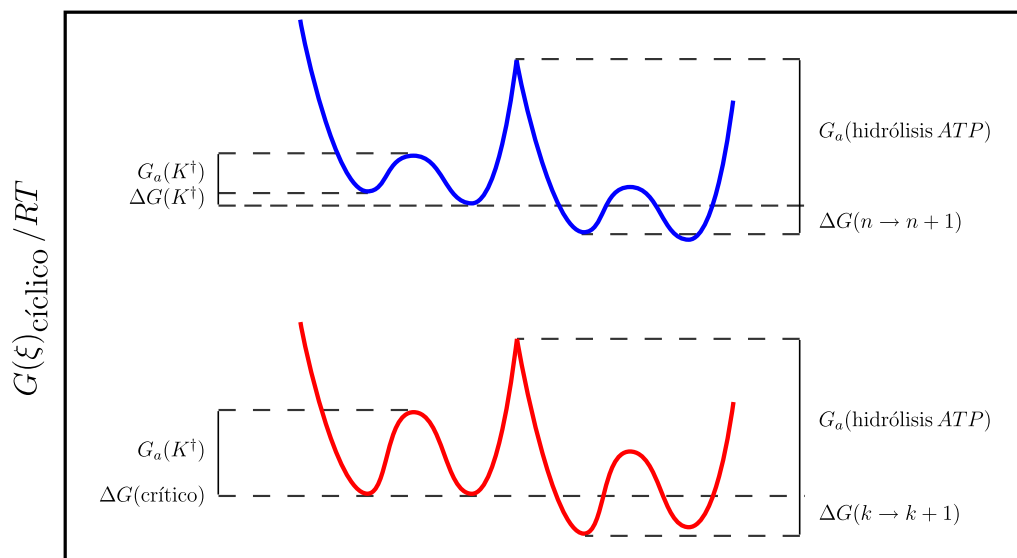


Figura 6.4: La curva azul corresponde a una escala de tiempo de unos cuantos segundos. La curva roja en rojo corresponde a una escala temporal de varias decenas de segundos después del arranque del sistema. A tiempos largos la barrera de potencial que separa ambos pozos se ha incrementado. En los estados finales del movimiento ambos pozos tienen la misma energía y posteriormente la inclinación se invierte. Esto sugiere que el motor se ha detenido. Este mecanismo inhibitorio podría explicar la procesividad de los motores observada en los experimentos.

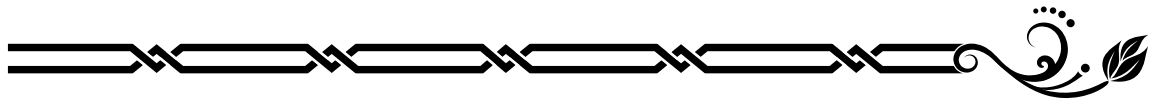
que separa el estado MKT del estado MKT' . En los primeros pasos esta barrera es pequeña y la cinesina obtiene la energía necesaria para pasar la barrera de las fluctuaciones del baño térmico. El siguiente valor es el de $\Delta G(K^\dagger)$, esta diferencia de energías es negativa e indica que el sistema favorece al estado MKT' sobre su antecesor. Después tenemos que la $G_a(\text{hidrólisis ATP})$ corresponde al punto donde se efectúa la hidrólisis del ATP , la cual libera una cantidad considerable de energía suficiente para librar la barrera entre el paso n y el paso $n+1$, esta barrera es más grande que la primera, lo que indica que sin la presencia de ATP le sería imposible a la cinesina dar un paso. Por último se muestra el $\Delta G(n \rightarrow n+1)$, esta diferencia de energías vuelve a ser negativa lo que indica que el sistema favorece el avance de paso a paso.

La forma del perfil mostrado en la curva roja ha cambiado considerablemente ya que, aunque el valor de $G_a(K^\dagger)$ sigue siendo relativamente pequeño en comparación con $G_a(\text{hidrólisis ATP})$, en comparación con su valor en los primeros pasos ha crecido un 40%. Esto repercute en la cinética del sistema haciendo que le sea más difícil pasar del estado MKT al estado MKT' , además este paso se escogió de manera que muestra un punto crucial del perfil en el que el valor de $\Delta G(K^\dagger)$ se anula, es decir, si bien el sistema logra superar la primer barrera ambos estados son igualmente probables. En términos del modelo bioquímico, ecuaciones (5.10) y (5.11), esto significa que los valores de p_{cat} y q_{cat} están equilibrados $K^\dagger = K_o = 1$. Sin embargo el valor de $\Delta G(k \rightarrow k+1)$ sigue favoreciendo el avance por lo cual aun es posible que la cinesina avance. En el paso $k+1$ sucede también un hecho crucial, el valor de $\Delta G(K^\dagger)$ cambia de signo es decir el sistema favorece la permanencia en el estado MKT y a partir de este paso la probabilidad de tener estos estados crece cada vez más hasta que el andar de la cinesina es detenido por este efecto originado en el consumo total de ATP .

Como hemos notado este modelo sirve para modelar el paisaje energético de la reacción autocatalítica en varios ciclos, así como permite explicar la procesividad del motor en términos energéticos debidos a una competencia entre moléculas de ATP y ADP que cambia la altura relativa entre los mínimos correspondientes a los estados MKT y MKT' que repercute en cambios de los valores efectivos de los ritmos de reacción asociados al proceso catalítico y acoplamiento de la cinesina al motor utilizados en el capítulo anterior.

Capítulo 7

El modelo físico



En esta sección discutiremos como puede usarse la física en la modelación de la actividad de la cinesina como máquina térmica, es decir una máquina que consume un suministro externo de energía el cual convierte en trabajo útil. En el caso de la cinesina, es claro que la fuente de energía externa será energía química en forma de moléculas de ATP, mientras que el trabajo producido servirá para desplazar a la cinesina a lo largo de los microtúbulos como se ilustra en la figura 7.1.

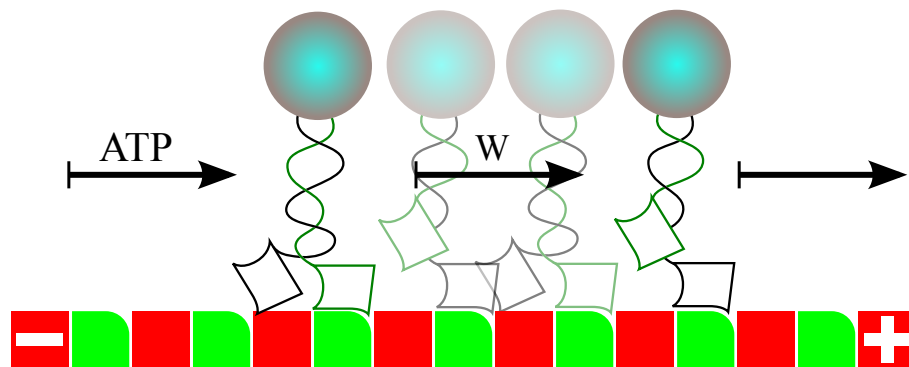


Figura 7.1: Cinesina desplazándose sobre microtúbulo.

Como mencionamos en la introducción, los datos experimentales muestran que el desplazamiento de la cinesina es siempre en dirección hacia la membrana plasmática

[3]. Este hecho hace pensar que el motor debe tener una conformación estructural que impida el movimiento en sentido contrario, previniendo así un uso ineficaz del ATP.

Conviene hacer notar que por su tamaño y la escala en la cual actúa, el motor puede ser afectado por las fluctuaciones térmicas del medio [24]. Para motivar mejor la presentación del modelo físico, haremos uso de recientes resultados experimentales y teóricos obtenidos en el estudio de la exocitosis de serotonina mediada por motores moleculares en neuronas de sanguijuela [24]. En dicho modelo se analiza la dinámica de la exocitosis siguiendo un modelo muy sencillo de comportamiento de los motores.

Nuestro trabajo consiste en parte en proponer los fundamentos bioquímicos de dicho modelo que representa fielmente los datos experimentales [24]. En dichos experimentos se analiza la migración de vesículas que contienen serotonina mediante motores de cinesina, a través de la cinética de fluorescencia del colorante FM1-43. Algunos de estos resultados se muestran en la figura 7.2. Mediante dichos resultados, los experimentos determinaron que la intensidad de la fluorescencia $F(t)$ es proporcional al número de vesículas por unidad de tiempo, en el área medida, en la forma:

$$F(t) = F_o + A \int_0^t J(d, t') dt', \quad (7.1)$$

donde F_o es el valor basal de la fluorescencia y J es la densidad de corriente de vesículas $J = \rho v$.

Sin ahondar en detalles, el modelo supone que el motor que mantiene unida a la carga con el microtúbulo mientras avanza de manera que puede ser modelado en términos de 4 fuerzas de naturaleza mecánica [24].

Una de ellas es responsable del acoplamiento de las vesículas u organelos a la cinesina, y puede ser modelada por una fuerza elástica \vec{f}_{el} (Hook) [24] debida a los enlaces moleculares entre la cinesina y la carga [24] y por tanto puede ser planteada como: $\vec{f}_{el} = w^2 \vec{r}(t)$, donde w es la frecuencia característica y $\vec{r}(t)$ es la posición de la carga como función del tiempo. La segunda fuerza es responsable del desplazamiento de la cinesina sobre el microtúbulo y está relacionada con la velocidad media v del motor. Como ambas fuerzas actúan de manera simultánea, la fuerza resultante está dada por la suma de fuerzas

$$F = \vec{f}_{mot} + \vec{f}_{el} = \omega^2 [\vec{v}t - \vec{r}(t)]. \quad (7.2)$$

La tercer fuerza involucrada en el movimiento del motor con la carga es una fuerza de carácter hidrodinámico; la fuerza de fricción $f_f(t) = -\beta u(t)$. Dicha fricción es ejercida por el medio celular principalmente sobre la carga. Aquí $u(t)$ es la velocidad instantánea de la carga y β el coeficiente de fricción por unidad de masa del medio

$\beta = 6\pi\eta a/m$ donde a es el radio de las vesículas, m la masa y η la viscosidad del fluido [15]. La otra fuerza añadida es una fuerza *aleatoria* \vec{f}_R que es debida a las fluctuaciones térmicas del medio, que a esta escala juegan un papel importante en el desplazamiento de partículas.

La fricción y la fuerza aleatoria modelan el movimiento **Browniano** confinado (difusión confinada), que es efectuado por vesículas y organelos de forma natural en el citoplasma [24]. Con estas cuatro fuerzas queda en principio determinado el movimiento de la carga de la cinesina dentro de la célula. La suma total de las cuatro fuerzas

$$\sum \vec{f}_i = -\beta\vec{u}(t) + \omega^2[\vec{v}t - \vec{r}(t)] + \vec{f}_R, \quad (7.3)$$

modela entonces de manera simple el desplazamiento de la cinesina y su carga por el microtúbulo, mas no explican como es que la carga llega en primer instancia a situarse lo suficientemente cerca de la cinesina para caer dentro del intervalo de acción de \vec{f}_{el} .

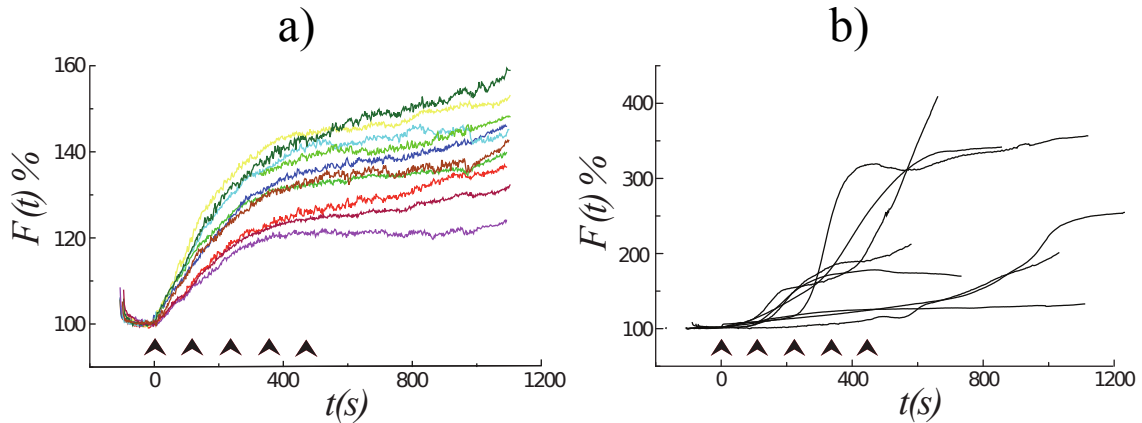


Figura 7.2: (a) Cinética de fluorescencia producida por estimulación eléctrica a 20Hz cada 2min. (b) Cinética de fluorescencia de un grupo de neuronas en las mismas condiciones. Imagen original tomada de [24].

La manera que se propone para hallar la expresión explícita de $J(d, t)$ en la ecuación (7.1) es usando una ecuación de Langevin. El planteamiento parte de considerar la segunda ley de Newton

$$\frac{d}{dt}\vec{u}(t) = \sum \vec{f}_i(t). \quad (7.4)$$

Aquí nuevamente $\vec{u}(t)$ es la velocidad instantánea de las vesículas y el lado derecho representa la suma de fuerzas, que puede ser sustituida por (7.3) obteniendo de esta

manera

$$\frac{d}{dt}\vec{u}(t) = -\beta\vec{u}(t) + \omega^2[\vec{v}t - \vec{r}(t)] + \vec{f}_R. \quad (7.5)$$

Como la velocidad promedio de la carga es casi constante y la viscosidad del medio es muy alta, se puede aproximar a cero el cambio en el tiempo de $\vec{u}(t)$ es decir $\frac{d}{dt}\vec{u}(t) \approx 0$, este régimen dinámico se conoce como régimen sobreamortiguado. De esta manera se obtiene la siguiente expresión aproximada para $\vec{u}(t)$

$$\vec{u}(t) \approx \beta^{-1} \left\{ \omega^2[\vec{v}t - \vec{r}(t)] + \vec{f}_R \right\}. \quad (7.6)$$

La ecuación (7.6) se conoce como ecuación de Langevin y es equivalente a la ecuación de Smoluchowski o difusión [14]:

$$\frac{\partial}{\partial t}\varrho(\vec{r}, t) = D\nabla^2\varrho(\vec{r}, t) + \frac{1}{\beta}\omega^2\nabla \cdot [\varrho(\vec{r}, t)(\vec{r} - \int_0^t \vec{v}dt')], \quad (7.7)$$

donde D es el coeficiente de difusión, $\varrho(\vec{r}, t)$ es la densidad de probabilidad de hallar a una partícula en \vec{r} al tiempo t , y cuya solución considerando a \vec{v} constante es¹:

$$\varrho(\vec{r}, t) = \varrho_o[4\pi D(1 - e^{-2t/\tau_s})]^{-3/2} \exp \left[-\frac{[\vec{r} - \vec{v}(t - \tau_s) - (\vec{r}_o + \vec{v}\tau_s)e^{-t/\tau_s}]^2}{2\tau_s D(1 - e[-2t/\tau_s])} \right]. \quad (7.8)$$

Usando (7.7) y la ecuación de continuidad

$$\frac{\partial}{\partial t}\varrho(\vec{r}, t) = -\nabla \cdot \vec{J}, \quad (7.9)$$

se puede obtener la siguiente expresión para la corriente \vec{J} [24].

$$\vec{J}(r, t) = -D\nabla\varrho(\vec{r}, t) - \frac{\omega^2}{\beta}\varrho(\vec{r}, t)(\vec{r} - \vec{v}t). \quad (7.10)$$

La expresión obtenida para la corriente es de gran importancia en el modelo teórico, ya que con ella se puede cuantificar la cinética de la fluorescencia. Mediante la implementación de las variables adimensionales $\tilde{r} = d^{-1}r$, $\tilde{t} = Dd^{-2}t$, $\tilde{v} = dD^{-1}v$ y $\tilde{\rho} = \eta^{-1}\rho$ podemos reescribir (7.10) como

$$\tilde{J}(r, t) = -\tilde{\nabla}\tilde{\varrho} - \tilde{\alpha}\tilde{\varrho}(\tilde{r} - \tilde{v}\tilde{t}), \quad (7.11)$$

donde \tilde{J} es la densidad de corriente adimensional, $\tilde{\nabla}$ es el operador gradiente adimensional y $\tilde{\alpha} = \omega^2 d^2 / (\beta D)$ es un parámetro adimensional que permite comparar el trabajo realizado por la fuerza elástica y la energía térmica. En la figura 7.3 se muestran algunos de los resultados obtenidos con este modelo teórico para la cinética de fluorescencia.

¹El procedimiento completo para la resolución de la ecuación puede verse en [26].

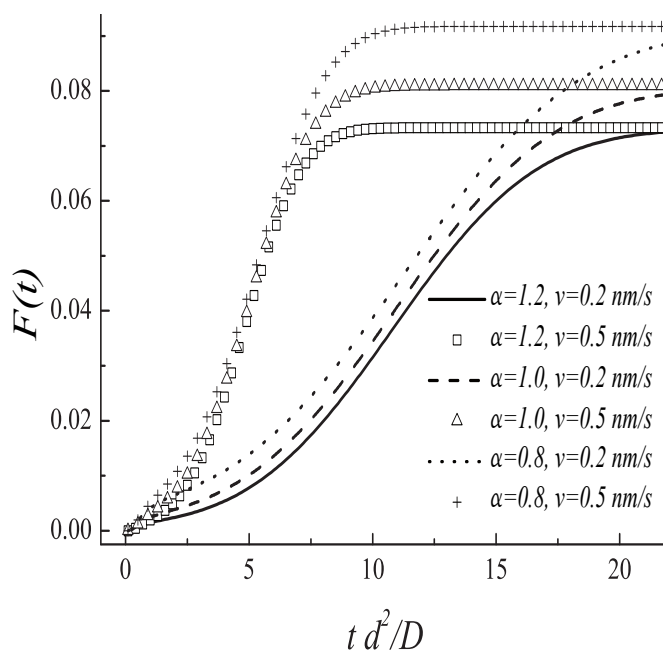


Figura 7.3: Comportamientos característicos de la fluorescencia predichos por el modelo teórico con actividad de los motores de cinesina y variaciones del parámetro α así como distintas velocidades promedio. Imagen original tomada de [?].

7.1. Una velocidad no constante

En la primera sección de este capítulo hemos discutido las bases de un modelo para describir el incremento de la fluorescencia como función del tiempo. Dicho incremento ocurre por la fusión de las vesículas que contienen a la serotonina con la membrana plasmática. Para estimar el ritmo con que la serotonina llega a la membrana se calculó la corriente de vesículas por unidad de tiempo que son transportadas por cinesinas dentro de células nerviosas. Este modelo establece que la carga de las cinesinas se mueve con una velocidad constante \vec{v} durante todo el proceso de exocitosis. Esta idea funciona y permite describir los datos experimentales es en realidad lejana a lo que realmente sucede, ya que el flujo de vesículas en las neuronas es ciertamente no constante ni ininterrumpido. En particular, dicho modelo no considera el arranque y frenado de los motores dictado por los requerimientos de las mismas células. En el Capítulo 5 mostramos que la reacción llevada a cabo por el sistema microtúbulo-cinesina-ATP es lo que permite el avance de la cinesina a lo largo del microtúbulo y se encontró una expresión para la velocidad de la reacción en función del tiempo en la ecuación (5.29), ahora de manera natural podemos establecer que esta velocidad es la misma con la que se desplazan las vesículas dentro de las

células al estar unidas a las cinesinas de manera rígida. También en el Capítulo 2 establecimos que para que el motor arranque es necesario superar cierto umbral en la concentración de ATP, de hecho este umbral se alcanza a niveles de saturación de ATP y en correlación con calcio mensajeros Ca_2^+ se indica a las cinesinas que se condensan en el microtúbulo y comiencen su avance. De esta forma, el proceso de arranque puede ser modelado en términos de un impulso unitario que sucede cuando se conjuntan las condiciones fisicoquímicas apropiadas, de modo que la expresión total de la velocidad que usaremos es²

$$v(t)_{J_I} = \Theta(t - t_i) \left[\frac{-v_{max}^\ddagger(t - t_f)}{K_M^\ddagger(1 + e^{-k_5 t}/K_I)/v_{max}^\ddagger - (t - t_f)} \right], \quad (7.12)$$

donde la función $\Theta(t - t_i)$ esta definida por

$$\Theta(t - t_i) = \begin{cases} 0 & \text{si } t < t_i \\ 1 & \text{si } t \geq t_i \end{cases} \quad (7.13)$$

Aquí t_i es el instante en que el motor inicia su movimiento y t_f es el instante en que se detiene. Este último esta definido por las condiciones iniciales y la ecuación (5.30), según la cual $t_f = [\text{ATP}]_o(v_{max}^\ddagger)^{-1}$ es el tiempo al cual se agota el suministro de ATP y ha sido transformado por completo en ADP.

Usando la expresión para $v(t)_{J_I}$ de la ecuación (7.12) en el modelo de la ecuación (7.7) obtenemos la siguiente ecuación de Fokker-Planck

$$\frac{\partial}{\partial t} \varrho(\vec{r}, t) = D \nabla^2 \varrho(\vec{r}, t) + \frac{1}{\beta} \omega^2 \nabla \cdot [\varrho(\vec{r}, t) (\vec{r} - \int_{t_i}^t v(t')_{J-V} dt')]. \quad (7.14)$$

Para resolver la ecuación, en este punto se debé proceder forzosamente usando un método numérico ya que la integral de $v(t)_{J_I}$ no se puede obtener en forma analítica. La forma obtenida para un caso particular $\rho(x, t)$ se presenta en la figura 7.5.

Usando este resultado es posible calcular la cinética de la fluorescencia de acuerdo con la ecuación (7.1). El resultado se muestra en la figura 7.6.

²En el Capítulo 5 la ecuación (5.29) nos permite establecer dos velocidades, pero la primera de ellas no toma en cuenta el efecto del inhibidor y además este comportamiento se puede replicar con la segunda en el caso limite K_I muy grande.

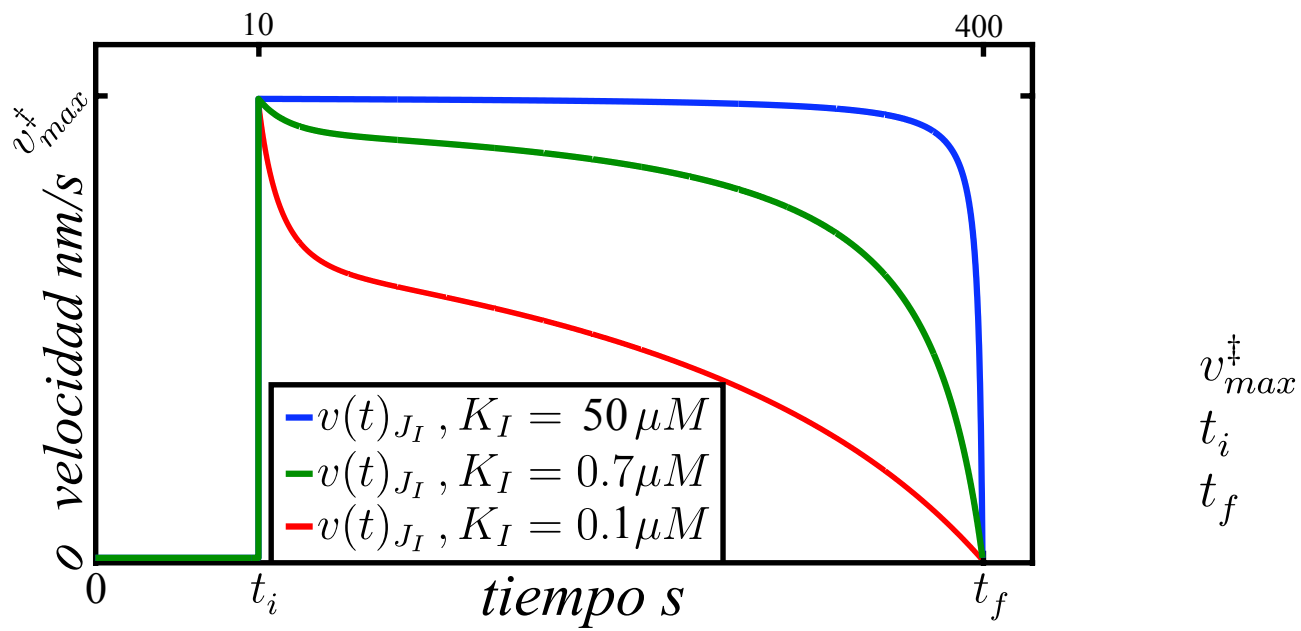


Figura 7.4: Gráfica de la velocidad de transporte de carga en un motor de cinesina con inhibición por *ADP*. En todos los casos $K_M^{\ddagger} = 2,47 \mu M$, $v_{max}^{\ddagger} = 400 \text{ nm s}^{-1}$ y $k_5 = 5,600 \text{ s}^{-1}$.

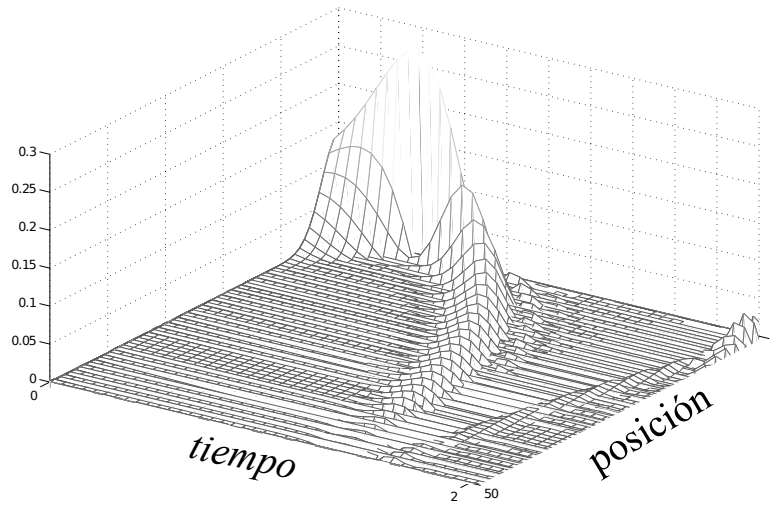


Figura 7.5: Distribución.

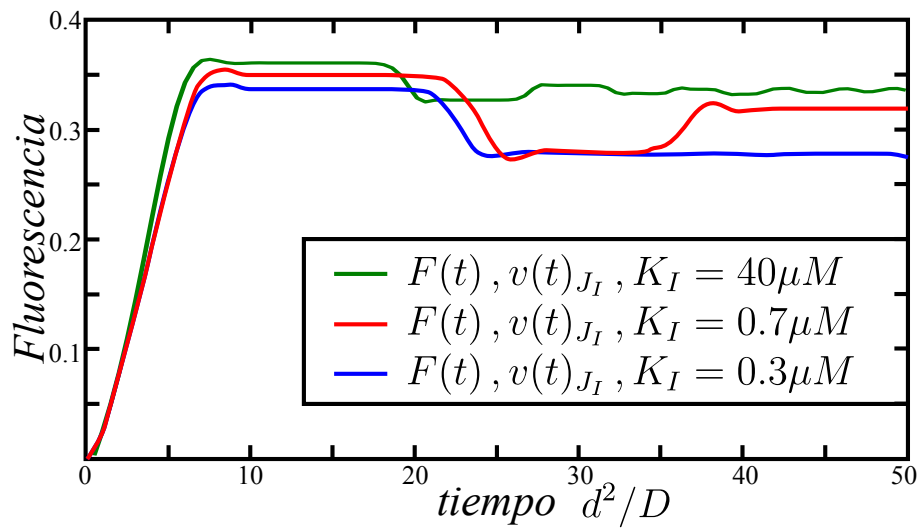


Figura 7.6: Cinética de la fluorescencia en términos del tiempo. Se conserva la cinética de tipo sigmoideal característica del proceso.

Capítulo 8

Conclusiones



Los principales resultados obtenidos en este trabajo están relacionados con la modelación bioquímica de la velocidad de desplazamiento de un motor molecular (cinesina) a lo largo de los microtúbulos que conforman parte del citoesqueleto celular. El modelo propuesto se basa en una modificación del modelo de *Visscher et al* en el que puede estimarse, además de la dependencia de la velocidad en la carga, el efecto de la autoinhibición por producción de ADP. Dicho modelo nos ha permitido reconstruir el paisaje energético de la reacción catalítica y mostrar que dicho paisaje es, además de asimétrico, inclinado. Los resultados obtenidos fueron usados en modelos biofísicos adecuados que a su vez permiten describir procesos de exocitosis en los que la cuantificación de la secreción de sustancias contenidas en vesículas es de primordial interés. De esta forma el modelo propuesto en esta tesis establece un puente entre dos escalas de tiempo y longitud diferentes asociadas tanto a los procesos de exocitosis como a su dependencia en la bioquímica de reacciones enzimáticas asociadas al consumo de ATP por el motor molecular.

El mecanismo propuesto por *Visscher et al* fue modificado al añadir un término debido al inhibidor competitivo ADP. Además de este mecanismo añadido, nuestro modelo es relevante porque va más allá de los análisis cinéticos previos en los que solo se establece la dependencia de la velocidad de la reacción en función de las distintas concentraciones de reactivos involucrados. En nuestro caso conjuntamos soluciones numéricas y evidencia experimental sobre la ley de velocidad de la reacción con el objeto de establecer una velocidad de la reacción solo en función del tiempo. Este resultado es relevante porque permitió encontrar una velocidad de desplazamiento del motor que, a su vez, fue implementada en el Capítulo 5 para la modelación de la corriente de vesículas movilizadas por los motores y que participan en el proceso

de exocitosis de sustancias. El modelo obtenido en esta tesis describe de forma más realista el desplazamiento de las cargas y también permite estimar en con bastante precisión, en principio, el peso de las mismas usando las expresiones correspondientes para $v_{max}^\dagger(f)$ y $k_2^\dagger(f)$. Aunque este cálculo no se realizó de forma explícita, queda pendiente como una de las perspectivas del trabajo.

Una conclusión interesante de nuestro modelo con inhibición es que, para valores grandes de K_I , la velocidad v_{J_I} se comporta como el modelo sin inhibición, el cual describe una hipérbola rectangular que se comporta de manera muy similar al modelo biofísico original en el que la velocidad de desplazamiento del motor se supuso constante. Un valor de K_I grande implica que la reacción de inhibición esta balanceada hacia el lado de los reactivos, por lo que el complejo MKD se encuentra a bajas concentraciones en comparación con MKT por lo que la reacción ocurre en niveles muy cercanos a los de saturación de ATP para los cuales $v(t)_{J_I}$ se puede aproximar muy bien por su valor de saturación $v(t) = v_{max}^\dagger$. Por el contrario, para valores pequeños de K_I la concentración del complejo MKD es grande, es decir la cinesina esta ocupada por con moléculas de ADP por más tiempo que con ATP . Esto hace que la velocidad del motor decrezca considerablemente en lapsos cortos de tiempo ya que el término exponencial decreciente domina el comportamiento de $v(t)_{J_I}$. Lo que afecta directamente en el comportamiento de la fluorescencia, que aunque conserva un comportamiento sigmoidal, este se satura a un nivel más bajo que en el caso original o con valores altos de la constante de inhibición.

El desarrollo de una expresión para el gasto energético de la reacción a lo largo de ciclos subsecuentes es sin duda un resultado importante, ya que mediante un análisis termodinámico es posible entender el funcionamiento de este y otros motores moleculares similares. Además, en el caso del sistema de cinesina microtúbulo hay una clara correspondencia entre el *grado de avance local* de la reacción ξ , el *grado de avance total* de la reacción ξ_g y el *avance espacial del motor* ya que cada periodo del potencial corresponde a un desplazamiento neto de $8nm$. El modelo nos indica que, por que una vez iniciado el movimiento del motor, se favorece el avance de la cinesina en el sentido esperado mientras que el retroceso resulta energéticamente desfavorable. Esto tiene lugar tanto a nivel local como a nivel global, pero ha medida que se agota el combustible o la competencia con el ADP inhibidor es comparable con el sustrato, vemos que localmente el avance se desfavorece hasta que se suprime por completo, ya que se vuelve energéticamente desfavorable. Observamos que en ningún momento ni bajo ninguna condición entre sustrato y producto inhibidor se revierte el sentido de avance global del motor lo cual concuerda ampliamente con todos los experimentos realizados los cuales reportan que la probabilidad de un avance en sentido contrario es del 0.1 % [20].

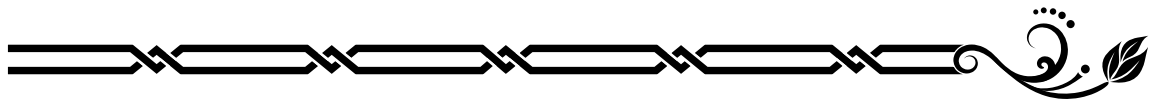
Como parte complementaria del presente trabajo se debe realizar una comparación experimental con el nuevo modelo de velocidad de desplazamiento de las vesículas y tratar de estimar de forma experimental la masa de las mismas para así comparar con las predicciones de velocidad y consumo energético del modelo. Estas caracterizaciones permitirán establecer un *control* involucrado en la modelación de $G(\xi)_{ciclico}$ para hacer una estimación más precisa de la energía consumida y liberada en el proceso. Por supuesto, dichos resultados deben de ser congruentes con las energías de activación y los saltos energéticos entre los distintos puntos estables del potencial teórico.

Estas estimaciones permitirán, en principio determinar la procesividad (numero de pasos) del motor. Así estimar que porción de la energía liberada por la hidrólisis de *ATP* es transformada en la energía mecánica responsable de la fuerza asociada al motor y utilizada en la movilización de las vesículas, como lo describe el modelo físico.

También debemos notar que el modelo presentado para la descripción del flujo de serotonina y la medición de la fluorescencia son aun modelos preliminares, ya que la presencia del termino fuente en la ecuación (7.14) relacionado con $v(t)_{J_I}$ hizo que el cálculo numérico de las soluciones no sea una tarea trivial usando los métodos estándar de solución de ecuaciones diferenciales, por los que se deberá trabajar aun más en el método numérico a emplear.

Apéndice A

Transducción de energía química y metabolismo



Todos los organismos vivos requieren de energía para seguir viviendo, en los organismos macroscópicos es fácil ver que dicha energía la obtienen de sus alimentos, ya sea por ingesta o por absorción si se trata de organismo heterótrofos o autótrofos. Sin embargo, no es tan claro como esta energía llega a las células individuales de los organismo pluricelulares y unicelulares, esto es posible gracias a un proceso que todos los seres vivos tienen, el *metabolismo*. En este proceso, pequeñas moléculas absorbidas por las células son guiadas por enzimas a través de mecanismos de reacciones los cuales, mediante pequeños cambios en las estructuras de estas moléculas, liberan y almacenan energía en forma de moléculas especializadas como *ATP* y *GTP*, entre otras. La energía almacenada en estas moléculas es usada para sintetizar componentes celulares y generar movimiento en las células [27]. En el capítulo introductorio se mencionó la forma en la que las moléculas entran y salen del medio celular median los procesos de endocitosis y exocitosis, y los usos que se les dan a estas moléculas, en este apéndice se describirá de manera sencilla lo que sucede con los hidrocarburos ingresados a las células mediante la endocitosis.

Una vez que las moléculas energéticas entran a la célula son dirigidas a las mitocondrias celulares las cuales son los organelos encargados de llevar a cabo la respiración celular. En el interior de la mitocondria es donde se llevan a cabo los procesos más importantes del metabolismo, podemos separar en dos grandes grupos estos procesos el *anabolismo* y el *catabolismo*.

Anabolismo

Son todos los procesos del metabolismo que tienen como fin la síntesis de moléculas complejas a partir de otras más sencillas. Mediante los procesos anabólicos se obtiene componentes celulares, se sintetiza ARN, se duplica o replica ADN, proteína, glúcidos, lípidos, tejidos y demás biomoléculas necesarias para el desarrollo de los organismos.

Catabolismo

Son todos aquellos procesos metabólicos que implican la descomposición de moléculas energéticas en moléculas más sencillas. En estos procesos grandes cantidades de energía son liberadas a consecuencia de la ruptura de los enlaces moleculares, como ejemplo de un proceso catabólico tenemos la ruptura de moléculas grasas o cadenas de azúcares como lactosas y sacarosas en glucosa y fructosa que son los azúcares más sencillos de la naturaleza. Durante estas rupturas la energía liberada es usada para la síntesis de ATP a partir de moléculas de ADP y fosfatos, todo esto sucede mediante ciclos que oxidan las moléculas de combustible.

A.1. Oxidación

La transducción de energía está fuertemente ligada a la oxidación de moléculas energéticas como los carbohidratos como glucosas y ácidos grasos, que son la fuente primordial de energía en los animales. Para liberar la energía de estas moléculas se recurre a la combustión de las mismas, para ello es requerido oxígeno (obtenido de la respiración) y en consecuencia de la combustión de las moléculas se producen dióxido de carbono y agua. Esta combustión es esencialmente equivalente a la realizada por los motores de combustión a gasolina o diesel que usamos cotidianamente, solo que en las células este proceso ocurre de una forma menos *violenta*, en procesos más largos, complejos y con ayuda de un gran número de enzimas y proteínas altamente especializadas.

La combustión es conducida por la oxidación en la forma de remoción de electrones y/o agregación de protones (H^+) en ciclos presentes en las células, tales como el ciclo de Krebs o la cadena de transporte de electrones ETC [28]. La forma en que estos procesos y ciclos se llevan a cabo es tal que las cantidades de energía transferida, usada o liberada son similares a la liberada durante la hidrólisis del ATP.

A.2. El ATP como fuente de energía en sistemas biológicos

La energía liberada durante los procesos catabólicos es capturada en moléculas que después son usadas para la realización de proceso anabólicos, los cuales son reacciones endotérmicas. Muchas son las moléculas disponibles para liberar su energía y permitir que estas reacciones ocurran, pero la mayoría de ellas requieren una cantidad de energía similar a la que proporciona la hidrólisis del ATP, de ahí que sea la molécula más utilizada durante estos procesos. Durante la hidrólisis del ATP se rompe el enlace del último grupo fosfato de esta y se obtiene una molécula de ADP (adenosín difosfato) y un fosfato inorgánico. En la figura A.1 se muestra la estructura del ATP y la localización del enlace mencionado.

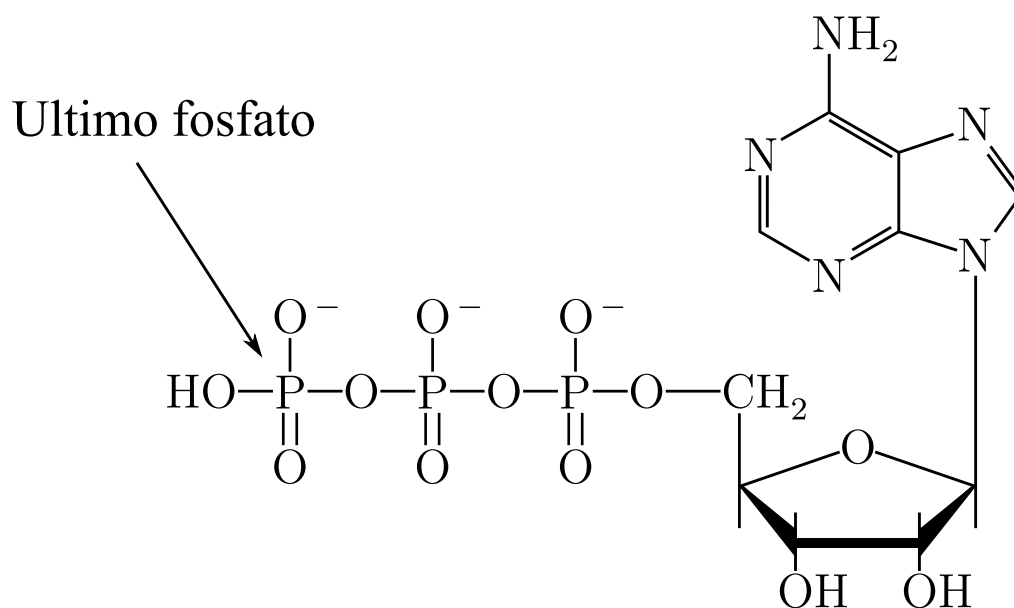


Figura A.1: Estructura química de la molécula de ATP.

El ADP resultante puede hidrolizarse nuevamente obteniendo así una molécula de AMP (adenosín monofosfato) y otro fosfato inorgánico, sin embargo la cantidad de energía liberada en esta reacción es menor al energía liberada en la primer reacción, y para las células resulta más eficiente conservar las moléculas de ADP para después sintetizar ATP mediante la reacción inversa.

A.2.1. Generación de ATP

El proceso para producir *ATP* a partir de *ADP* y fosfatos se conoce como fosforilación del *ADP*. Este proceso sucede en el espacio intermembranal de las mitocondrias donde reside un fascinante complejo molecular, la F_0F_1 ATPasa que en conjunto con la ETC realizan un proceso llamado fosforilación oxidativa.

La F_0F_1 ATPasa

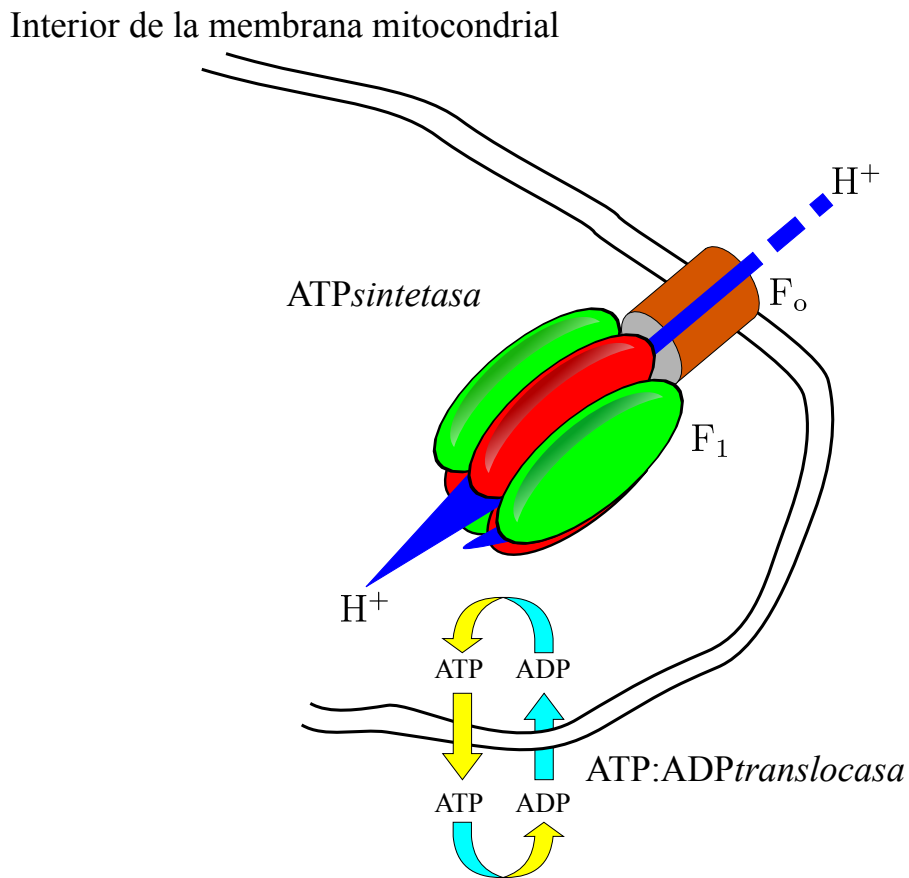


Figura A.2: Esquema de la F_0F_1 ATPasa.

La F_0F_1 ATPasa es también un motor molecular que funciona como una especie de revolver. En lugar de *balas*, carga con moléculas de *ADP* y fosfatos P_i , y mediante la rotación del revolver se *cataliza* la formación de *ATP*. La fuerza que genera

está rotación es de carácter electromotriz debida a la entrada de protones a la matriz mitocondrial mediante un bombeo de los mismos. Pero esta entrada es posible sólo si la F_0F_1 ATPasa genera *ATP*, es decir la F_0F_1 ATPasa solo funciona si hay un flujo de H^+ al interior de la mitocondria. Pero el flujo de protones es debido a su vez por la síntesis de *ATP* lo que implica que ambos procesos están acoplados formando parte del mismo ciclo. Una vez concluida la síntesis de *ATP*, éste es expulsado de la mitocondria mediante otra enzima llamada *ATP:ADP*translocasa y el bombeo de protones y absorción de *ADP* y fosfatos comienza nuevamente.

El bombeo es llevado a cabo por la sección F_0 de la sintetasa que es descrita como un canal por el cual pasan los protones y generan la rotación la sección F_1 que es la que se encarga de la síntesis de *ATP*. en esta sección se hayan 3 subunidades que actúan como sitios activos para el *ADP* y los P_i 's, así en cada rotación de la sección F_1 son generados tres *ATP*'s con el bombeo de 10 protones. Este modelo para la F_0F_1 ATPasa fue propuesto por Paul Boyer y es una pieza clave de su trabajo acreedor al premio Nobel de química de 1997. En la figura A.3 se muestra un esquema de este modelo.

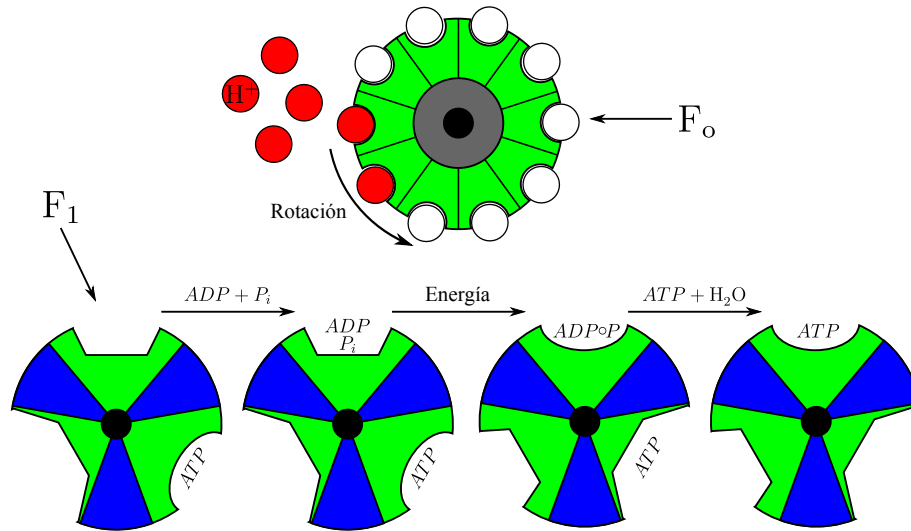


Figura A.3: Esquema del modelo de Boyer para las secciones F_0 y F_1 .

El bombeo de H^+ , también llamado (transporte vectorial) [28] esta a su vez acoplado a la ETC, ya que el gradiente de protones generado durante el bombeo impulsa el movimiento de electrones de la ETC.

La ETC

La ETC consiste en cuatro largas cadenas protéicas contenidas en el interior de la membrana mitocondrial, de las cuales tres de ellas interactúan tanto con el núcleo de la mitocondria como con la membrana misma mientras que la otra solo con el núcleo de la mitocondria. Esta interacción se da de manera sincronizada debido a dos pequeñas moléculas presentes en la membrana mitocondrial, una de ella es la *ubiquinona* [28] la cual es hidrofóbica. Su contraparte es una proteína hidrofílica¹ llamada *citocroma c*, estas moléculas generan las fuerzas que permiten la transferencia de protones y electrones de un lado a otro de la membrana mitocondrial. En la figura A.4 se muestran las componentes de la ETC.

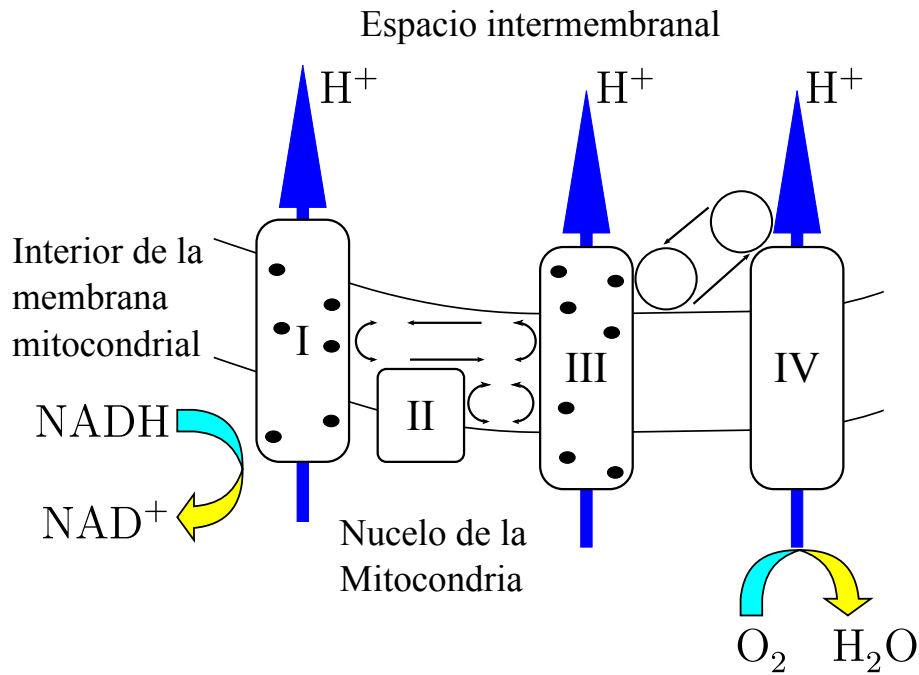


Figura A.4: Esquema de la ETC.

La ATP:ADPtranslocasa

La expulsión de *ATP* de las mitocondrias y el ingreso de *ADP* a las mismas, es un proceso catalizado por una misma membrana protéica la ATP:ADPtranslocasa,

¹Soluble en agua.

la inhibición de este proceso de transporte impide la síntesis de *ATP*, que a su vez frena el bombeo de protones y detiene la ETC y los ciclos subsecuentes anidados. Esto ocurre cuando las necesidades energéticas del organismo están satisfechas.

En la figura A.5 se muestra la interconexión de los procesos metabólicos antes mencionados que sirven en la generación de *ATP* y el mecanismo de movilización de vesículas.

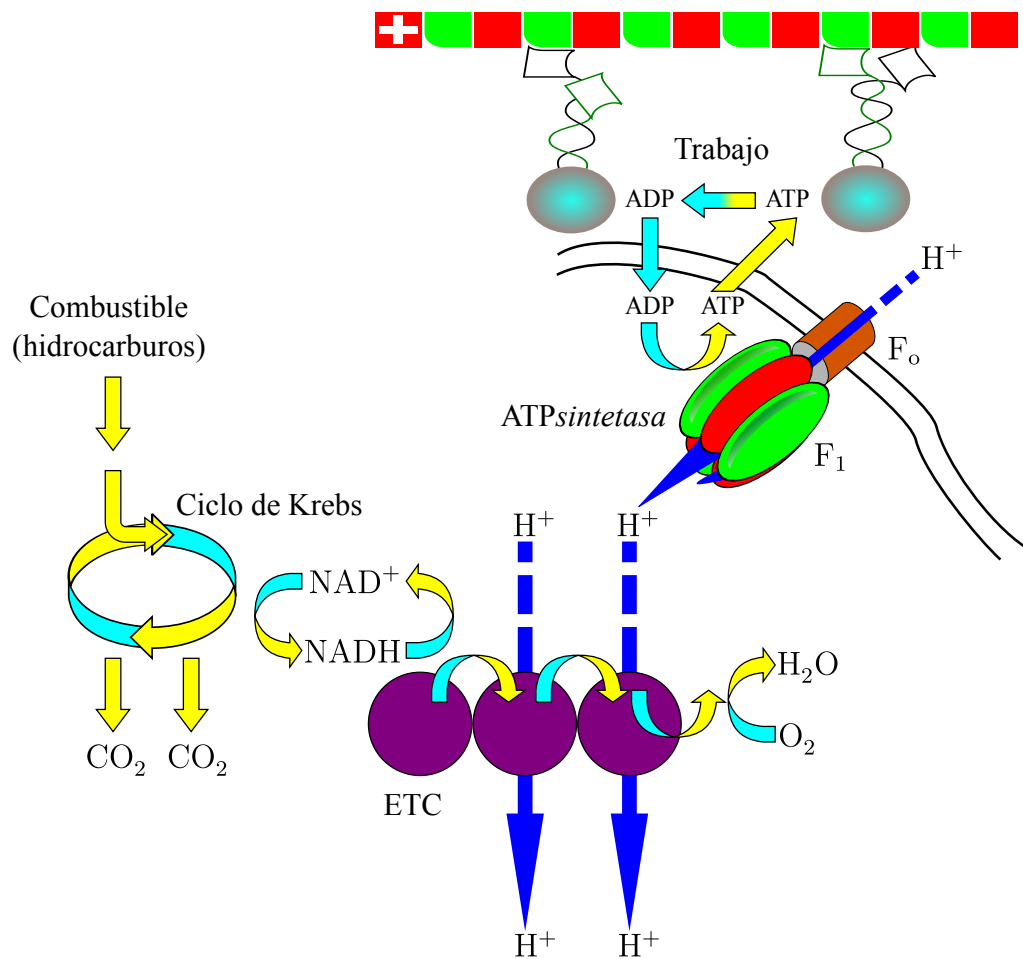
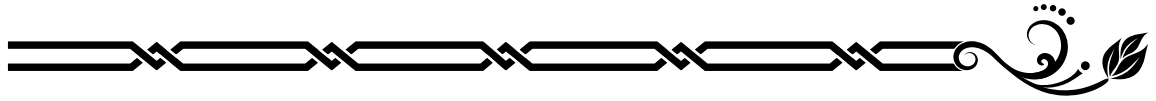


Figura A.5: Esquema simplificado de la oxidación de carbohidratos y ciclo síntesis/consumo del *ATP* y su uso en procesos celulares.

Apéndice B

Las herramientas físicas



B.1. Ecuaciones de balance

En esta sección se mostrara de manera simplificada la deducción de las ecuaciones de balance de masa, momento y energía, cantidades heredadas de la hidrodinámica clásica a partir de las cuales y con la hipótesis de equilibrio local. Obtendremos el equivalente a la ecuación de Gibbs para la termodinámica en la formulación de la TIL.

B.1.1. Balance de masa y flujo de difusión

Comencemos con el balance de masa del sistema. Supongamos que nuestro sistema se puede dividir en n elementos de volumen. La tasa de cambio de masa del i -ésimo elemento en un volumen V será

$$\frac{d}{dt} \int_V \rho_i dV = \int_V \frac{\partial \rho_i}{\partial t} dV, \quad (\text{B.1})$$

donde ρ_i es la densidad parcial del i -ésimo elemento de volumen, ρ_i es una función de la posición y del tiempo, $\rho_i = \rho_i(\vec{r}, t)$. Además la densidad parcial cumple

$$\rho = \sum_{i=1}^b \rho_i. \quad (\text{B.2})$$

En la ecuación (B.1), el cambio temporal de la densidad en un volumen debé ser

igual al flujo de materia a través de la frontera del volumen [15], es decir

$$\int_V \frac{\partial \rho_i}{\partial t} dV = - \int_{\Omega} \rho_i \vec{v}_i \cdot d\vec{a}, \quad (\text{B.3})$$

donde $\vec{v}_i(\vec{r}, t)$ es la velocidad del i -ésimo elemento de volumen. Mediante la aplicación del teorema de Gauss en (B.3) obtenemos la ecuación de balance para la especie i -ésima

$$\frac{\partial \rho_i}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho_i \vec{v}_i). \quad (\text{B.4})$$

Sumando la ecuación (eq-cont-i) sobre los b elementos del sistema obtenemos

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho \vec{v}), \quad (\text{B.5})$$

donde $\vec{v}(\vec{r}, t)$ es la llamada velocidad del centro de masa o baricéntrica definida como

$$\vec{v} = \sum_{i=1}^n \frac{\rho_i \vec{v}_i}{\rho}. \quad (\text{B.6})$$

La ecuación (B.5) es conocida como ecuación de continuidad [15], y mediante la expansión del término de $\nabla \cdot (\rho \vec{v})$ se puede reescribir, es decir

$$\nabla \cdot (\rho \vec{v}) = \vec{v} \cdot \nabla(\rho) + \rho \nabla \cdot \vec{v},$$

con lo que (B.5) se convierte en

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla(\rho) = -\rho \nabla \cdot \vec{v}.$$

Si utilizamos la derivada material obtenemos finalmente

$$\frac{D\rho}{Dt} = -\rho \nabla \cdot \vec{v}. \quad (\text{B.7})$$

Respecto al movimiento baricéntrico del sistema se puede definir una cantidad relevante en el transporte de masa, el flujo de difusión de la sustancia i -ésima como

$$\vec{J}_i = \rho_i(\vec{v}_i - \vec{v}), \quad (\text{B.8})$$

que satisface la relación

$$\sum_{i=1}^n \vec{J}_i = \sum_{i=1}^n \rho_i(\vec{v}_i - \vec{v}) = 0, \quad (\text{B.9})$$

la ecuación anterior indica que no todas las corrientes de difusión son independientes entre sí.

Cuando tenemos producción de masa de alguna de las componentes (especie química) debido a r reacciones químicas en el sistema, deberemos agregar a la ecuación de balance un término debido a estas reacciones

$$\frac{\partial \rho_i}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho_i \vec{v}_i) + \sum_{j=1}^r \nu_{ij} J_j^{chem}, \quad (\text{B.10})$$

con ν_{ij} el coeficiente estequiométrico de la i -ésima componente en la j -ésima reacción y J_j^{chem} es el flujo o velocidad de la reacción [6, 10, 9].

B.1.2. Balance de momento

Al igual que en la sección anterior partiremos suponiendo que tenemos b elementos de volumen en nuestro sistema. Nos interesa establecer conocer la relación entre la aceleración de los elementos y las fuerzas que actúan sobre cada uno de ellos. Podemos fácilmente diferenciar dos tipos de fuerzas que actúan en nuestro sistema, las fuerzas de cuerpo, tal como la gravedad, y las fuerzas de superficie como los esfuerzos viscosos [29]. De forma general el balance de momento seguirá el esquema

Cambio de ímpetu = Fuerza de superficie + Fuerza de cuerpo.

De manera formal el balance de momento está dado por

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = -\nabla \cdot \mathbb{P} + \sum_{i=1}^b \rho_i \vec{F}_i, \quad (\text{B.11})$$

donde \mathbb{P} es el tensor de esfuerzos y \vec{F}_i es la fuerza ejercida por un campo sobre el i -ésimo componente del sistema [29]. Desde un punto de vista microscópico, el término \mathbb{P} es el resultado de las fuerzas de interacción de corto alcance entre las partículas que conforman al sistema, mientras que \vec{F}_i es debida a las fuerzas externas y contribuciones posibles de interacciones de largo alcance, es decir, es resultado de los distintos potenciales a los que este sujeto el sistema, gravitacional, confinamiento en un volumen, etcétera [7].

Suponiendo que el sistema se encuentra inmerso en un campo conservativo, tendremos que las fuerzas \vec{F}_i serán debidas a la acción de un potencial conservativo, es decir

$$\vec{F}_i = -\nabla \Psi_i.$$

Usando la siguiente relación

$$\rho \frac{D\vec{f}}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} (\rho \vec{f}) + \nabla \cdot (\rho \vec{f} \vec{v}), \quad (\text{B.12})$$

válida para todo vector [30] y el hecho de que las fuerzas son conservativas, podemos reescribir (B.11) como [25]

$$\frac{\partial \rho \vec{v}}{\partial t} = -\nabla \cdot (\mathbb{P} + \rho \vec{v} \vec{v}) - \sum_{i=1}^b \rho_i \nabla \Psi_i. \quad (\text{B.13})$$

B.1.3. Balance de energía

Aquí expondremos el balance de energía mecánica (cinética+potencial), así como el balance de energía interna. La importancia de obtener una expresión para el balance de energía mecánica radica en que nos permitirá obtener a partir de ella el balance de energía interna, la cual realmente es importante en el desarrollo de la TIL. A partir de las dos secciones anteriores resulta natural comenzar con el balance de la energía cinética. Multiplicando por \vec{v} la ecuación (B.11) y usando la identidad (B.12) se obtiene el balance de energía cinética

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{1}{2} \rho v^2 \right) = -\nabla \cdot \left[\frac{1}{2} \rho v^2 \vec{v} + \mathbb{P} \cdot \vec{v} \right] + \mathbb{P} : \nabla \vec{v} + \sum_{i=1}^b \rho_i \vec{F}_i \cdot \vec{v}. \quad (\text{B.14})$$

Para hallar el balance de energía potencial no solo basta con tener en cuenta el balance de momento (B.11), sino que hay que considerar la conservación de energía potencial en una reacción química $\sum_{i=1}^r \Psi_i \nu_{ij} = 0$ [31], obtenemos la siguiente expresión para el balance de energía potencial

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho \Psi) = -\nabla \cdot \left[\rho \Psi \vec{v} + \sum_{i=1}^r \Psi_i \vec{J}_i \right] - \sum_{i=1}^b \rho_i \vec{F}_i \cdot \vec{v} - \sum_{i=1}^b \vec{J}_i \cdot \vec{F}_i. \quad (\text{B.15})$$

Sumando (B.11) y (B.15) inmediatamente encontramos la expresión de balance de la energía mecánica¹

$$\varepsilon = \frac{1}{2} v^2 + \Psi, \quad (\text{B.16})$$

¹Al solo sumar E_K y E_P , encontramos que la ecuación de balance de energía mecánica tiene términos fuente, lo que haría pensar que no se conserva la energía, pero esto pasa por no tomar en cuenta el balance de energía interna.

mas cabe recordar que esta no es la energía total del sistema, la cual debe incluir la energía interna

$$\mathbf{e} = \frac{1}{2}v^2 + \Psi + \mathbf{u}, \quad (\text{B.17})$$

donde “u” es la energía interna por unidad de masa o energía interna específica. Suponiendo ahora que \mathbf{e} satisface una ecuación de continuidad y realizando el álgebra correspondiente tenemos que el balance de energía interna esta dado por

$$\rho \frac{D}{Dt}(\mathbf{u}) = -\nabla \cdot \vec{J}_q - p\nabla \cdot \vec{v} - \mathbf{\Pi} : \vec{v} + \sum_{i=1}^b \vec{J}_i \cdot \vec{F}_i, \quad (\text{B.18})$$

B.2. Ecuación de Smoluchowski

En la sección 4.4 mostramos que las ecuaciones de Langevin son equivalentes a ecuaciones de tipo F-P. Y dado que la ecuación de Smoluchowski es un caso particular de F-P, la solución hallada para la ecuación de Smoluchowski será equivalente a resolver la ecuación de Langevin correspondiente.

Comencemos por establecer la ecuación de Smoluchowski

$$\frac{\partial \varrho}{\partial t} = \frac{1}{m\beta} \left[-\frac{\partial}{\partial x} F(x) + k_B T \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right] \varrho, \quad (\text{B.19})$$

la ecuación (B.19) es equivalente a la ecuación diferencial estocástica

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F(x)}{m\beta} + \frac{\Gamma(t)}{\beta}, \quad (\text{B.20})$$

que no es más que una ecuación de Langevin. Notemos que (B.19) no es más que F-P en el límite de *alta fricción* [14], donde

$$D^{(1)}(x) = (m\beta)^{-1} F(x), \quad (\text{B.21})$$

$$D^{(2)} = (m\beta)^{-1} k_B T. \quad (\text{B.22})$$

La solución que hallaremos es para el caso estacionario en el cual ϱ es constante en el tiempo, tenemos entonces que

$$0 = \frac{1}{m\beta} \left[-\frac{\partial}{\partial x} F(x) + k_B T \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right] \varrho_{st}. \quad (\text{B.23})$$

Reordenando términos en la ecuación anterior obtenemos

$$\frac{\partial}{\partial x} F(x) \varrho_{st} = k_B T \frac{\partial^2}{\partial x^2} \varrho_{st},$$

integrando una vez respecto a x' tenemos

$$\int_0^x \frac{\partial}{\partial x'} F(x') \varrho_{st}(x') dx' = k_B T \int_0^x \frac{\partial^2}{\partial x'^2} \varrho_{st}(x') dx' \implies$$

$$F(x) \varrho_{st}(x) = k_B T \frac{\partial}{\partial x} \varrho_{st}(x),$$

despejando $F(x)$ e integrando una vez más obtenemos

$$\int_0^x F(x') dx' = k_B T \ln(\varrho_{st}(x)/A).$$

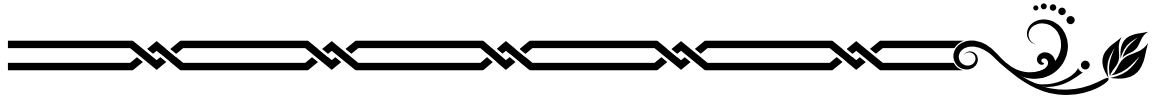
Aplicando ahora antilogaritmo a la expresión anterior obtenemos

$$\varrho_{st}(x) = A * \exp \left[\frac{1}{k_B T} \int_0^x F(x') dx' \right], \quad (\text{B.24})$$

con A la constante de normalización necesaria para cumplir que $\int \varrho(x) dx = 1$.

Apéndice C

Las herramientas químicas



C.1. Más de la ley de Michaelis-Menten

Ahora interpretaremos los resultados mostrados en la figura 5.1. Para ello recurriremos a lo expuesto en la subsección 3.4.2. En nuestro caso particular como se mencionó en el Capítulo 5, el papel de E lo tomará el complejo MK , mientras que S será el ATP , de este modo las ecuaciones de M-M quedarán expresadas como:

$$w = v_{max} \frac{[ATP]}{K_M + [ATP]} \quad (C.1)$$

$$\frac{1}{w} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[ATP]} + \frac{1}{v_{max}}. \quad (C.2)$$

Con este conocimiento es posible ahora analizar los datos reportados en la figura 5.1. Notaremos que al incrementar el valor de la carga f aplicada¹ sobre el motor el valor de v_{max} decrece, este es un resultado esperado ya que mientras mayor sea la carga, mayor será la resistencia que se opondrá al movimiento del motor, por lo cual la velocidad máxima (ritmo máximo de catalización del sustrato) disminuirá. Esta disminución puede deberse a dos posibilidades: un decremento en k_2 o la reducción de la concentración total de enzima MK . En nuestro caso para todo fin práctico la concentración total de enzima dentro de la célula será constante, por lo que la disminución de v_{max} sólo puede deberse a un decremento en k_2 .

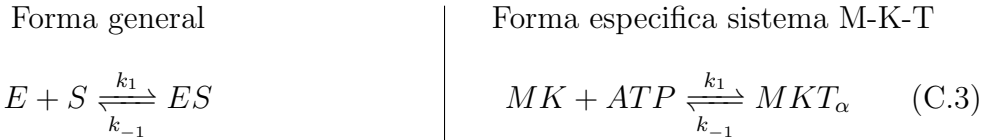
¹En el caso del experimento del cual se tomaron los datos para las gráficas presentadas en la figura 5.1 la fuerza que ejerce la carga es debida a una trampa óptica.

El otro efecto que produce un incremento en la carga es el aumento en el valor de K_M , lo que implica que la afinidad entre el sustrato y la enzima se ve reducida [10]. Dado que tanto v_{max} como K_M dependen del valor de k_2 , esto implica que sólo un aumento sustancial en el valor de k_{-1} aumentaría el valor de K_M , lo cual a su vez no permitiría el avance de la cinesina sobre el microtúbulo [18]. Este efecto es el que hace descartar el modelo básico de Michaelis-Menten.

C.2. Solución del modelo de Visscher y Schnitzer

Para encontrar la ley cinética que rige el mecanismo propuesto por las ecuaciones (5.1)-(5.7), Primero prescindiremos de (5.1) y asumiremos que la cinesina ya se encuentra acoplada al microtúbulo en el estado MK_α , tal como se muestra en (5.2). También por simplicidad supondremos que el paso lento del mecanismo es (5.4), así la ley cinética será regida por (5.4) y los pasos (5.5)-(5.7) no afectarán la expresión de velocidad [10].

De esta manera, el mecanismo completo se reducirá a los siguientes tres pasos.



Donde como se menciono con anterioridad E es el estado MK , S son las moléculas de ATP y E'' el estado en que ambas cabezas de la cinesina están unidas al microtúbulo. Como en la sección C.1 las leyes de evolución en el tiempo para las concentraciones de los complejos ES , ES' y E'' son

$$\frac{d}{dt}[ES] = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_+^\dagger[ES] + k_-^\dagger[ES'], \quad (C.6)$$

$$\frac{d}{dt}[ES'] = -k_2[ES'] + k_+^\dagger[ES] - k_-^\dagger[ES'], \quad (C.7)$$

$$w = \frac{d}{dt}[E''] = k_2[ES'] \quad (\text{C.8})$$

Usando ahora el hecho del equilibrio rápido en (5.3) y (C.7) y recordando la definición de la constante de equilibrio químico K^\dagger

$$K^\dagger = \frac{k_+^\dagger}{k_-^\dagger} = \frac{[ES']}{[ES]} \quad (\text{C.9})$$

entonces encontramos que $[ES'] = K^\dagger[ES]$. Sustituyendo esta expresión en (C.8) obtenemos

$$w = k_2 K^\dagger [ES]. \quad (\text{C.10})$$

El siguiente paso es aplicar aproximación al estado estacionario en las ecuaciones (C.6) y (C.7) y sumarlas, es decir,

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[ES] \approx 0 &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_+^\dagger[ES] + k_-^\dagger[ES'] \\ &+ \\ \frac{d}{dt}[ES'] \approx 0 &= -k_2[ES'] + k_+^\dagger[ES] - k_-^\dagger[ES'] \\ \implies 0 &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES']. \end{aligned}$$

De igual modo que en el tratamiento de las ecuaciones de M-M, la concentración total de la enzima, que en este caso es $[E]_o = [E] + [ES] + [ES']$, puede usarse de modo tal que

$$\begin{aligned} k_1([E]_o - [ES] - [ES'])[S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES'] &= 0 \\ \implies k_1[E]_o[S] &= [ES](k_1[S] + k_{-1}) + [ES'](k_1[S] + k_2). \end{aligned}$$

Aplicando de nuevo la aproximación de equilibrio obtenemos

$$\begin{aligned} k_1[E]_o[S] &= \frac{[ES']}{K^\dagger}(k_1[S] + k_{-1}) + [ES'](k_1[S] + k_2) \\ \implies k_1[E]_o[S] &= [ES']\left(\frac{k_1[S] + k_{-1}}{K^\dagger} + k_1[S] + k_2\right). \end{aligned}$$

Ahora podemos ya despejar una expresión para la concentración de ES' que sólo depende de constantes de ritmo y de la concentración del sustrato y de enzima total.

$$[ES'] = \frac{k_1[E]_o[S]}{\left(\frac{k_1[S]+k_{-1}}{K^\dagger} + k_1[S] + k_2\right)}.$$

La expresión anterior podría ser ya sustituida en (C.10), sin embargo es conveniente presentarla de una forma más familiar mediante un reordenamiento de términos adecuado. Dicho reordenamiento es

$$[ES'] = \frac{k_1[E]_o[S]}{\frac{k_1[S]+k_1K^\dagger[S]}{K^\dagger} + \frac{k_{-1}+k_2K^\dagger}{K^\dagger}}.$$

Multipliquemos y dividamos ahora por $K^\dagger/(K^\dagger + 1)k_1$ para finalmente expresar la concentración de ES' como

$$[ES'] = \frac{\left(\frac{K^\dagger}{K^\dagger+1}\right)[E]_o[S]}{\frac{(k_{-1}+k_2K^\dagger)}{k_1(K^\dagger+1)} + [S]}. \quad (C.11)$$

En esta ecuación el término $1/(K^\dagger + 1)$ es común a k_{-1} y a k_2 , así que podemos definir convenientemente dos nuevas constantes de velocidad como

$$k_2^\dagger = k_2 \frac{K^\dagger}{K^\dagger + 1}, \quad (C.12)$$

$$k_{-1}^\dagger = \frac{k_{-1}}{K^\dagger + 1}. \quad (C.13)$$

Con estas dos nuevas constantes y sustituyendo (C.11) en (C.10) obtenemos la siguiente expresión que es muy parecida a la del caso MM

$$w = \frac{v_{max}^\dagger [S]}{K_M^\dagger + [S]}, \quad (C.14)$$

donde el término K_M^\dagger es

$$K_M^\dagger = \frac{k_{-1}^\dagger + k_2^\dagger}{k_1} = \frac{k_{-1} + k_2K^\dagger}{k_1(K^\dagger + 1)}, \quad (C.15)$$

y v_{max}^\dagger esta dada por

$$v_{max}^\dagger = k_2^\dagger [E]_o = k_2 \frac{K^\dagger}{K^\dagger + 1} [E]_o. \quad (C.16)$$

La ecuación (C.14) a diferencia de (3.58) da un grado más de libertad a los pseudo-parámetros de Michaelis-Menten v_{max}^\dagger y K_M^\dagger . Dicho grado de libertad es debido al equilibrio rápido de la isomerización del estado ES y también permite un correcto ajuste de los datos experimentales [19], ya que la constante de equilibrio K^\dagger tiene una dependencia en la fuerza aplicada por la carga sobre el motor. Dicha dependencia se obtiene al aplicar la *Teoría del estado de transición* [10] para definir K^\dagger , según la cual

$$K^\dagger = \frac{z_{eq}(ES)}{z_{eq}(ES')}, \quad (C.17)$$

donde z_{eq} es la función de partición [9] correspondiente a cada sub-estado del equilibrio. En general esta función se expresa como

$$z(V, T) = e^{-F/k_B T}, \quad (C.18)$$

donde F es la energía libre de Helmholtz. Con esta definición de $z(V, T)$ podemos expresar (42) de la siguiente manera

$$K^\dagger = K_o \frac{e^{-F_{ES}/k_B T}}{e^{-F_{ES'}/k_B T}} = K_o e^{-\Delta F/k_B T}. \quad (C.19)$$

Aquí K_o es el valor de referencia de la constante de equilibrio. Recurramos ahora a la definición del potencial de Helmholtz $F = U - TS$ y supongamos que el proceso ocurre a temperatura constante. En este caso el diferencial de la energía libre es $(dF)_T = -pdV + \zeta d\mathcal{A} + \tau d\mathcal{L}$, con ζ la tensión superficial y τ la tensión lineal [6]. Dado que el sistema en cuestión se puede suponer unidimensional en primera aproximación, entonces sólo contribuirá a F el término de la tensión lineal y la diferencial de longitud $\tau d\mathcal{L}$. En nuestro caso esta cantidad será proporcional a la fuerza ejercida por la carga f y la distancia media del paso de la cinesina sobre el microtúbulo [19]

$$\tau d\mathcal{L} \approx f\delta/2, \quad (C.20)$$

donde $\delta \approx 4nm$ es la distancia entre los monómeros componentes del microtúbulo. De esta forma, así el cambio total en la energía libre se puede aproximar como

$$\Delta F = F_{ES} - F_{ES'} \approx f\delta/2 - (-f\delta/2) = f\delta. \quad (C.21)$$

Con esta aproximación podemos expresar (C.19) del siguiente modo

$$K^\dagger(f) = K_o e^{-f\delta/k_B T}, \quad (C.22)$$

la figura C.1 muestra gráficamente esta dependencia en la fuerza para K^\dagger . Como

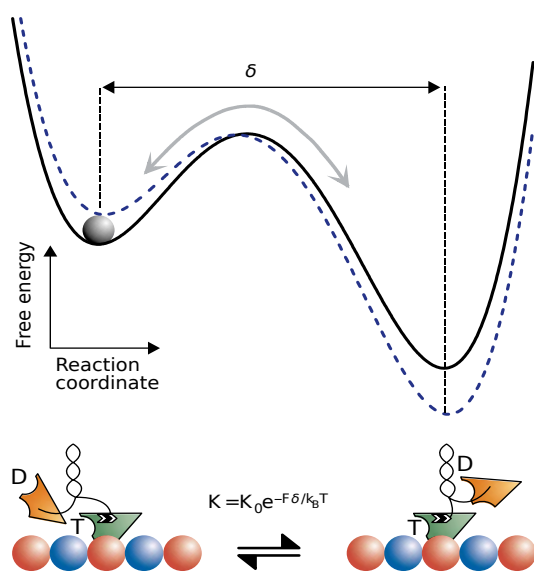


Figura C.1: Isomerización con dependencia en la carga. Arriba: esquema de la energía libre, con dos pozos de potencial estables separados una distancia δ por una barrera. Línea punteada: sin carga aplicada. Línea continua: con carga aplicada. Abajo: representación del equilibrio rápido sobre el microtúbulo, imagen tomada de [19].

consecuencia de ésta dependencia de K^\dagger en f y δ , encontramos que las constantes k_{-1} y k_2 también dependerán del factor (C.22) en la forma

$$k_{-1}(f) = \frac{k_{-1}^\dagger}{K_o e^{-f\delta/k_B t} + 1} = \frac{k_{-1}^\dagger e^{f\delta/k_B T}}{K_o + e^{f\delta/k_B T}}, \quad (\text{C.23})$$

$$k_2(f) = \frac{k_2^\dagger K_o e^{-f\delta/k_B T}}{K_o e^{-f\delta/k_B T} + 1} = \frac{k_2^\dagger K_o}{K_o + e^{f\delta/k_B T}}. \quad (\text{C.24})$$

Esta dependencia en la fuerza de k_2 y k_{-1} permite recuperar el comportamiento observado de los pseudo-parámetros de M-M v_{max}^\dagger y K_M^\dagger y deja intactas las constantes originales k_2^\dagger y k_{-1}^\dagger que no dependen de la fuerza y así la afinidad entre la enzima y el sustrato queda intacta. Las relaciones (C.23) y (C.24) fueron propuestas inicialmente en la referencia [22] y fueron usadas para describir el mecanismo de transcripción del RNAm mediante la enzima RNA-polimerasa.

C.3. Energías libres y coordenadas de reacción

Retomando la ecuación (6.6) y desarrollándola explícitamente obtenemos el siguiente resultado

$$dG(\xi) = -RT \left[-\xi^3 + (n_{MKT'} + n_{MK} + n_T)\xi^2 + \dots \right. \\ \left. + (n_{MKT'}n_T - n_{MK}n_{MKT'} - n_{MK}n_T)\xi \right], \quad (\text{C.25})$$

que al integrar

$$G(\xi) = -RT \int_a^\xi \left[-\chi^3 + (n_{MKT'} + n_{MK} + n_T)\chi^2 + \dots \right. \\ \left. + (n_{MKT'}n_T - n_{MK}n_{MKT'} - n_{MK}n_T)\chi \right] d\chi, \quad (\text{C.26})$$

obtenemos la siguiente expresión para $G(\xi)$

$$G(\xi) = RT \left[\frac{1}{4}\xi^4 - \frac{(n_{MKT'} + n_{MK} + n_T)}{3}\xi^3 + \dots \right. \\ \left. - \frac{(n_{MKT'}n_T - n_{MK}n_{MKT'} - n_{MK}n_T)}{2}\xi^2 \right] + \dots \quad (\text{C.27}) \\ + G(a).$$

A continuación se muestra el código “Autocatal.m” usado para obtener las graficas $G(\xi)$:

Autocatal.m

```

% La función calcula todo a partir del modelo diferencial:
%  $dG = -RT[(n_{MK}-x)(n_T-x)(n_{MKT}-x) + n_{MK}n_Tn_{MKT}]dx$ 
function [out,out1,out2] = Autocatal(n1,n2,n3,x,n,t) % defino la
función y sus argumentos
% n1 fracción molar de MK, n2 fracción molar de T
% n3 fracción molar de MKT, x t variables de calculo simbolico
% n numero de modos de Fourier usados en la expansión

e=n1*n2*n3 % e coeficiente del término lineal extra
N2=n2-0.0051*t;
N3=n3-0.0017*t;
dG=(n1-x)*(n2-x)*(n3-x); % expresion que define el modelo diferencial
G=-int(dG,x,1,x); % se integra suponiendo RT=1 y de 1 a x

dG1=(n1-x)*(N2-x)*(N3-x);
G1=-int(dG1,x,1,x);
fun1=matlabFunction(G-e*x); %convierte G-e*x en una función del
sistema
y=0:0.009:50; %variable discreta
out= y; %guarda el valor en archivo
out1= fun1(y);%discretiza el valor de G-e*x y guarda
figure;
plot(out,out1,'linewidth',2.5);
xlim([0 1]);
% Cada coeficiente de Fourier A y B es declarado como entrada de un
vector

A(1,1)=int(G1,0,1); % define el primer coeficiente Ao
B(1,1)=0*int(G1,x,0,1); % impone el termino Bo como cero

```

```

for i=2:n
    A(1,i)=int(G1*cos(2*pi*i*x),0,1);%usa la forma recursiva de los An
    B(1,i)=int(G1*sin(2*pi*i*x),0,1);%usa la forma recursiva de los Bn
end

P=A(1,1);%P(x) es la suma de los An*cos(2n*pi*x)+Bn*sin(2n*pi*x)

for j=2:n
    P=P+A(1,j)*cos(2*pi*j*t)+B(1,j)*sin(2*pi*j*t);
end

fun2=matlabFunction(P-e*t);
out2=fun2(y);
figure;
subplot(3,6,1:6);
plot(out,out2,'linewidth',2.5);
xlim([0 5]);
ylim([-0.03 0.04]);
subplot(3,6,7:12);
plot(out,out2,'linewidth',2.5);
xlim([90 95]);
ylim([-0.43 -0.35]);
subplot(3,6,13:18);
plot(out,out2,'linewidth',2.5);
xlim([116 121]);
ylim([-0.56 -0.46]);

```

Código C.1: Función de Matlab© Autocatal.m usada para modelar $G(\xi)$.

La secuencia de comandos para utilizar el código se muestra a continuación:

1. `>> syms x t;`
2. `>> [out,out1,out2]=Autocatal(n1,n2,n3,x,n,t);`

Constantes usadas y sus dimensiones



Constante	Unidades	Descripción
k_2	s^{-1}	Constante de primer orden del mecanismo original de Michaelis Menten.
k_2^\ddagger	s^{-1}	Pseudo constante de primer orden del mecanismo modificado de M-M, con dependencia en la carga.
k_1	$mol^{-1} s^{-1}$	Constante de segundo orden del mecanismo de Michaelis Menten.
k_1^\ddagger	$mol^{-1} s^{-1}$	Pseudo constante de segundo orden con dependencia en la carga.
K_M	mol	Constante de Michaelis.
K_M^\ddagger	mol	Pseudo constante de Michaelis depende de la carga.
K_M^\ddagger	nm	Segunda pseudo constante de Michaelis.
v_{max}^\ddagger	$mol s^{-1}$	Velocidad máxima de la reacción depende de la carga.
v_{max}^\ddagger	$nm s^{-1}$	Segunda velocidad máxima de la reacción.

Bibliografía



- [1] Enriqueta Muñiz Hernando y Benjamín Fernández Ruiz. *Fundamentos de Biología Celular*. Editorial Síntesis, 1998.
- [2] Kermit L. Carraway, Coralie A. Carraway, and Kermit L. Carraway III. *Signaling and the Cytoskeleton*. Springer, 1998.
- [3] Ronald D. Vale. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**:467–480, 2003.
- [4] Howard J., Hudspeth A. J., and Vale R. D. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature*, **342**:154–158, 1989.
- [5] Svoboda K., Schmidt C. F., Schampp B. J., and Block S. M. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, **365**:721–727, 1993.
- [6] Ilya Prigogine and Dilip Kondepudi. *Introduction to Thermodynamics of Irreversible Process*. John Wiley and Sons, 1955.
- [7] Sybren Ruurds de Groot and Peter Mazur. *Non-equilibrium Thermodynamics*. Dover, 1956.
- [8] Ilya Prigogine and Dilip Kondepudi. *Modern Thermodynamics. From Heat Engines to Dissipative Structures*. John Wiley and Sons, 1998.
- [9] Ira Levine. *Physical Chemistry*. McGraw-Hill, 2000.
- [10] S. R. Logan. *Fundamentos de Cinética Química*. Addison Wesley, 2000.

- [11] Philip Nelson. *Biological Physics Energy, Information and Life*. W. H. Freeman, 2007.
- [12] R. Kubo, M. Toda, and N. Hashitsume. *Statistical Physics II Nonequilibrium Statistical Mechanics*. Springer, 1978.
- [13] Einstein Albert. *Investigations on the theory of Brownian movement*. Dover, 1984.
- [14] H. Risken. *The Fokker-Planck Equation*. Springer, 1989.
- [15] Lev D. Landau and E. M. Lifshitz. *Course of theoretical physics. Vol. 6 Fluid Mechanics*. Pergamon Press, 1980.
- [16] Murray R. Spiegel. *Transformadas de Laplace*. McGraw-Hill, 1967.
- [17] Joseph W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill, 1985.
- [18] Koen Visscher, Mark J. Schnitzer, and Steven M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, **400**:184–189, 1999.
- [19] Koen Visscher, Mark J. Schnitzer, and Steven M. Block. Force production by single kinesin motors. *Nature Cell Biology*, **2**:718–723, 2000.
- [20] William R. Schief, Rutilio H. Clark, Alvaro H. Crevenna, and Jonathon Howard. Inhibition of kinesin motility by ADP and phosphate supports a hand-over-hand mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**:1183–1188, 2004.
- [21] Susan P. Gilbert, Martin R. Webb, Martin Brune, and Kenneth A. Johnson. Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. *Nature*, **373**:671–676, 1995.
- [22] Michelle D. Wang, Mark J. Schnitzer, Hong Yin, Robert Landick, Jeff Gelles, and Steven M. Block. Force and velocity measured for single molecules of RNA. *Science*, **282**:902–907, 1999.
- [23] Atkins G. L. and Nimmo I. A. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochemistry Journal*, **149**:775–777, 1975.
- [24] Ivan Santamaría Holek, P. Noguez, C. Bustos, Francisco F. De-Miguel, and J. M. Rubi. Analysis of molecular motor-induced vesicle migration for exocytosis in the soma of a serotonergic neuron. In Progress.

- [25] Iván Santamaría Hólek. Elementos de termodinámica de no equilibrio. Unpublished.
- [26] Astumian D. Equilibrium theory for a particle pulled by a moving optical trap. *J. Chem. Phys*, **126**:102–111, 2007.
- [27] Philip W. Kuchel and et al. *Biochemistry*. McGraw-Hill Schaum's series, 2009.
- [28] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 2004.
- [29] Lev D. Landau and E. M. Lifshitz. *Course of theoretical physics. Vol. 7 Theory of Elasticity*. Pergamon Press, 1980.
- [30] Iain G. Currie. *Fundamental Mechanics of Fluids*. CRC Press, 2002.
- [31] Leopoldo García-Colín Scherer and Patricia Goldstein Menache. *Física de los Procesos Irreversibles Tomo I*. El Colegio Nacional, 2003.