

AMORTIGUAMIENTO Y DESFASE DE SEÑALES PERIÓDICAS EN RUTAS METABÓLICAS

(oscilaciones metabólicas/amortiguamiento/desfase)

YOEL RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ*, JUAN C. NUÑO SANZ*,**, MÓNICA LLORÉNS FERRERO*, JOSÉ I. SÁNCHEZ-VALDENE BRO* Y FRANCISCO MONTERO CARNERERO*.

* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

** Departamento de Matemática Aplicada a los Recursos Naturales. E. T. S. I. de Montes. Universidad Politécnica. 28040 Madrid.

RESUMEN

El metabolismo celular es una red altamente compleja de reacciones bioquímicas. Dicha complejidad se produce a dos niveles: (i) *estructural*, debido al elevado grado de interconectividad de las redes, y (ii) *dinámico*, al poder presentar un comportamiento temporal no lineal, por ejemplo, oscilatorio o caótico. Ambos niveles deben estar perfectamente sincronizados para asegurar el correcto funcionamiento del metabolismo como un todo. En este trabajo se analiza la transmisión de señales periódicas a través de rutas metabólicas. En particular se estudia tanto el grado de amortiguamiento como el desfase de un flujo periódico forzado al propagarse a través de cadenas de reacción.

Se muestra que el grado de amortiguamiento y el desfase dependen críticamente de factores tanto cinéticos como estructurales. En el caso de rutas lineales simples, dichas magnitudes son función del cociente entre la frecuencia de la señal y las constantes cinéticas del sistema. Esta dependencia varía con el número de intermediarios de la ruta, produciéndose un aumento del amortiguamiento y del desfase conforme aumenta la longitud de la cadena. Por último, se discute la extensión de estos resultados a rutas ramificadas con un producto común.

ABSTRACT

Cell metabolism is a highly complex network of biochemical reactions. This complexity is twofold: (i) *structural*, due to its large degree of interconnectivity of the network, and (ii) *dynamical*, since it can develop non-linear temporal behaviour, e.g. oscillatory and chaotic. To carry out its main tasks metabolism must be perfectly synchronised at these two levels. This paper concerns with the transmission of periodic signals through a metabolic pathway. In particu-

lar, it is studied both the degree of quenching and the phase shift of a forced periodic input flux.

It is proved that the degree of quenching as well as the phase shift of the input flux depends critically on both structural and kinetic factors. For simple linear reaction chains, they are functions of the relationship between the frequency of the signal and the kinetic constants of the reactions. This dependence varies with the number of intermediates of the route, increasing the quenching and the phase shift as the chain enlarges. Finally, the generalisation of these results to branched pathways with a common product is also discussed.

INTRODUCCIÓN

Los comportamientos oscilatorios sostenidos están muy extendidos en la fenomenología biológica y a muy diferentes niveles de complejidad [para una amplia revisión ver (1)]. El periodo característico de estos osciladores varía desde el rango de los segundos, en el caso de los ritmos neuronales (2), hasta los años en el caso de las epidemias. Entre estos dos regímenes extremos se encuentran los ritmos asociados con el metabolismo celular. Ejemplos típicos de ritmos metabólicos, todos ellos con períodos del orden de los segundos o minutos, son: (i) las oscilaciones glicolíticas (1), (ii) las oscilaciones de AMP cíclico (3-9), o (iii) las oscilaciones del Ca^{2+} intracelular (10-13). El papel de dichas oscilaciones puede ser muy diferente. Así, por ejemplo, el AMP cíclico participa en procesos de comunicación celular y morfogénesis en *Dictyostelium discoideum* (14), mientras que en otros casos las oscilaciones metabólicas pueden ser la causa de determinados ritmos circadianos y otros comportamientos macroscópicos (15). En algunos, incluso pueden estar relacionados con la división celular (1).

La causa de dichas oscilaciones bioquímicas radica en la presencia de una enzima alóstérica que provoca inestabilidades estructurales; esto es, el abandono de estados estacionarios hacia dinámicas no estacionarias (por ejemplo, oscilaciones sostenidas). En la mayoría de los modelos desarrollados sólo se consideran dos o tres especies interconectadas por una enzima con dichas características (16). Sin embargo, generalmente la reacción oscilante se encuentra dentro de un esquema de una ruta metabólica, como ocurre en la glicolisis. Esto hace que, en principio, no sólo puedan oscilar los intermediarios directamente conectados por medio de la enzima alóstérica (la fosfofructoquinasa en el caso de la glicolisis), sino todos los metabolitos implicados en la transformación (17,18). No obstante, tanto la amplitud como la fase de las oscilaciones asociadas con los distintos metabolitos deben depender de su posición relativa respecto de la reacción oscilante. En el caso de la ruta glicolítica este hecho fue ya descrito experimentalmente a finales de los años sesenta (17,18), lo que se ilustra en la figura 1. En general, lo que se observa es un amortiguamiento de la amplitud y un desfase de la señal. Este amortiguamiento y desfase debe ser función tanto de las características cinéticas como del diseño (conexiones entre los distintos intermediarios) de la ruta. En algunos casos la oscilación que realmente puede jugar un papel fisiológico no es la de los intermediarios directamente relacionados con la enzima causante de la inestabilidad estructural, sino la de algún otro metabolito separado de dicha enzima por un número determinado de etapas metabólicas. Por tanto, el posible amortiguamiento de la señal va a tener una importancia relevante. También la fase a la cual oscila un determinado producto es una cuestión importante, sobre todo si éste ha de interaccionar con otros metabolitos que a su vez oscilan. El desfase entre las distintas reacciones puede dar lugar a fenómenos de interferencia que se traducirían en un mayor amortiguamiento en la amplitud de la oscilación resultante. En la figura 2 se esquematiza el efecto que un sistema metabólico puede tener sobre la amplitud y la fase de una señal de entrada. La cuestión fundamental que este artículo plantea es la de determinar la relación que debe existir entre la frecuencia de la oscilación y las constantes cinéticas de la ruta para que dichas oscilaciones no se amortigüen considerablemente.

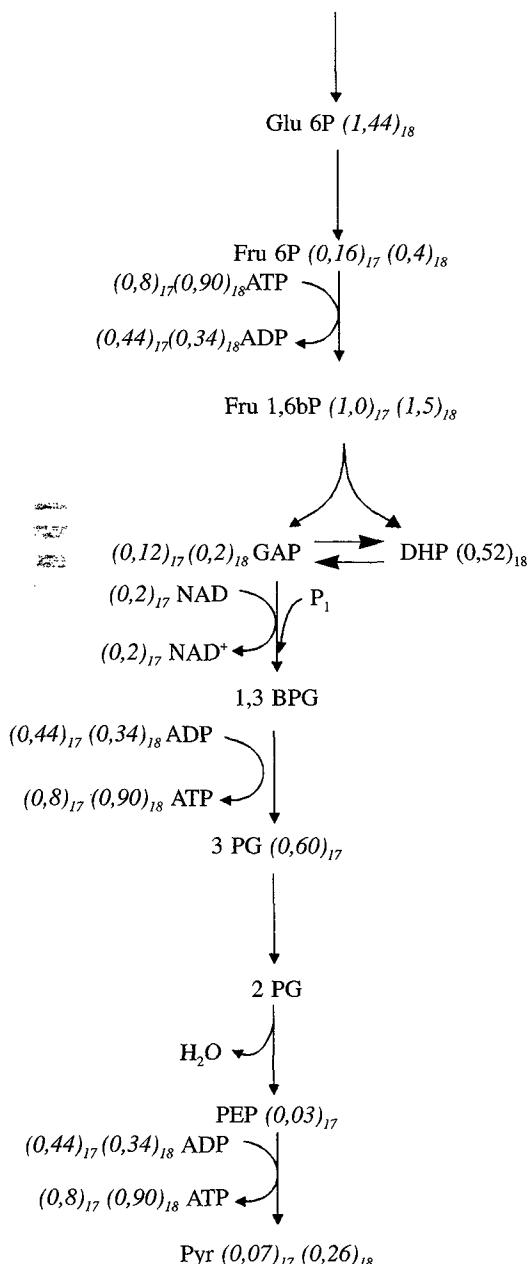


Figura 1. Amortiguamiento de las oscilaciones glicolíticas conforme nos alejamos de la enzima fuente de dichas oscilaciones, la PFK. Los datos han sido obtenidos de las fuentes bibliográficas (17) y (18).

térica (la fosfofructoquinasa en el caso de la glicolisis), sino todos los metabolitos implicados en la transformación (17,18). No obstante, tanto la amplitud como la fase de las oscilaciones asociadas con los distintos metabolitos deben depender de su posición relativa respecto de la reacción oscilante. En el caso de la ruta glicolítica este hecho fue ya descrito experimentalmente a finales de los años sesenta (17,18), lo que se ilustra en la figura 1. En general, lo que se observa es un amortiguamiento de la amplitud y un desfase de la señal. Este amortiguamiento y desfase debe ser función tanto de las características cinéticas como del diseño (conexiones entre los distintos intermediarios) de la ruta. En algunos casos la oscilación que realmente puede jugar un papel fisiológico no es la de los intermediarios directamente relacionados con la enzima causante de la inestabilidad estructural, sino la de algún otro metabolito separado de dicha enzima por un número determinado de etapas metabólicas. Por tanto, el posible amortiguamiento de la señal va a tener una importancia relevante. También la fase a la cual oscila un determinado producto es una cuestión importante, sobre todo si éste ha de interaccionar con otros metabolitos que a su vez oscilan. El desfase entre las distintas reacciones puede dar lugar a fenómenos de interferencia que se traducirían en un mayor amortiguamiento en la amplitud de la oscilación resultante. En la figura 2 se esquematiza el efecto que un sistema metabólico puede tener sobre la amplitud y la fase de una señal de entrada. La cuestión fundamental que este artículo plantea es la de determinar la relación que debe existir entre la frecuencia de la oscilación y las constantes cinéticas de la ruta para que dichas oscilaciones no se amortigüen considerablemente.

La mayoría de los procesos de transformación que ocurren en el metabolismo celular están mediados por enzimas, lo que desde un punto de vista formal se traduce en la aparición de términos no lineales en las ecuaciones de evolución del sistema. La complejidad asociada a estos modelos no permite su solución analítica. Este hecho impide el análisis exhaustivo de su comportamiento y la obtención de conclusiones generales. Sin embargo, el comportamiento de las rutas metabólicas puede considerarse lineal siempre que las concentraciones de los diferentes metabolitos sean inferiores a las constantes de Michaelis de las respectivas enzimas que participan en su transformación (19). En estas condiciones se pueden considerar constantes cinéticas aparentes que vienen dadas por $k = k' E_T$, donde E_T es la concentración total de enzima y la k' es la constante cinética de la reacción.

Con la intención de obtener conclusiones generales, en la siguiente sección se analiza un modelo lineal simple cons-

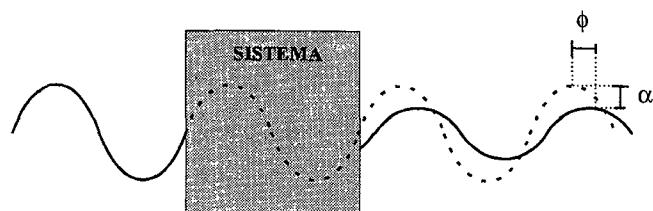


Figura 2. Significado del amortiguamiento ϕ y del desfase α de una señal oscilatoria.

tituido por un intermediario, sometido a una oscilación forzada caracterizada por una determinada amplitud y frecuencia (Esquema 1). En este caso es posible deducir expresiones analíticas que relacionan tanto la amplitud del flujo de salida como el desfase de la señal con la frecuencia y constantes cinéticas de la reacción. Posteriormente, el estudio se generaliza a cadenas lineales con más de un intermediario (Esquema 2). Esto permitirá analizar la influencia del número de pasos en el amortiguamiento y el desfase de la señal de salida.

Por otra parte, puesto que el interés de este trabajo se centra en la propagación de la oscilación y su posible amortiguamiento, no en su generación, la etapa generadora de las oscilaciones se ha modelado mediante la entrada en el sistema de un flujo oscilatorio simple, J_{in} , dependiente de dos parámetros fácilmente controlables: la amplitud y la frecuencia. Los resultados obtenidos se discutirán posteriormente.

MODELO LINEAL CON UN SOLO INTERMEDIARIO

El sistema más simple a considerar es aquel en el que sólo interviene un intermediario S . Éste entra en el sistema mediante un flujo oscilante, J_{in} , y sale del mismo con una velocidad irreversible proporcional a su concentración, tal como aparece en el siguiente esquema:



Esquema 1

donde k_s es la constante de salida.

El flujo de entrada tiene la forma:

$$J_{in}(t) = 1 + \frac{F}{F+1} \cos(\omega t) \quad (1)$$

siendo ω la frecuencia de la oscilación. Se puede demostrar fácilmente que la amplitud de entrada viene dada por

$A_{in} = \frac{2F}{F+1}$. Para evitar los efectos producidos por la variación en el flujo de entrada, éste se ha normalizado en el período, $T = \frac{2\pi}{\omega}$, es decir,

$$\int_t^{t+T} J_{in}(t) dt = 1 \quad (2)$$

De esta forma es posible variar la amplitud del flujo de entrada manteniendo constante su valor medio en T .

Este sistema tiene un único grado de libertad, la concentración del sustrato S , que denotaremos por s . La evolución de esta variable está regida por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{ds}{dt} = J_{in}(t) - J_{out}(t) \quad (3)$$

donde $J_{out} = k_s s$ es el flujo de salida del sistema. La función solución de la ecuación diferencial lineal de primer orden forzada (Ecuación 3) se puede encontrar fácilmente (20). Suponiendo la condición inicial $s(t = 0) = s_0$, ésta se expresa como,

$$s(t) = \frac{1}{k_s} + ce^{-k_s t} + \frac{F}{(F+1)\sqrt{\omega^2 + k_s^2}} \cos(\omega t - \phi) \quad (4)$$

donde el desfase ϕ verifica que $\cos \phi = \frac{k_s}{\sqrt{\omega^2 + k_s^2}}$ y $\operatorname{sen} \phi = \frac{\omega}{\sqrt{\omega^2 + k_s^2}}$. La constante de integración c depende de la condición inicial, s_0 , y viene dada por,

$$c = s_0 - \left[\frac{1}{k_s} + \frac{\omega A}{(A+1)(\omega^2 + k_s^2)} \right] \quad (5)$$

A partir de esta solución se obtiene directamente el flujo de salida a tiempo infinito,

$$J_{out}(t) = 1 + \frac{F}{(F+1)\sqrt{1 + \left(\frac{\omega}{k_s}\right)^2}} \cos(\omega t - \phi) \quad (6)$$

desapareciendo la dependencia exponencial y permaneciendo el término periódico. Esta corresponde a un comportamiento oscilatorio sostenido con la misma frecuencia que el flujo de entrada, ω , (Ecuación 1) pero que difieren en la amplitud y la fase (Figura 3).

Directamente a partir de la ecuación 6 se puede deducir que la amplitud de salida, A_{out} , viene dada por la expresión,

$$A_{out} = \frac{A_{in}}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega}{k_s}\right)^2}} \quad (7)$$

que, salvo para casos en los cuales la relación $\frac{\omega}{k_s}$ tienda a cero rendirá valores de A_{out} inferiores a A_{in} . Por tanto, la señal sufrirá un amortiguamiento, que puede ser medido cuantitativamente a través del *grado de amortiguamiento*,

$$\alpha = 1 - \frac{A_{out}}{A_{in}} \quad , \text{cuyos valores están comprendidos entre } 0$$

(cuando la amplitud de salida es igual a la amplitud de entrada, es decir, no hay amortiguamiento) y 1 (cuando la amplitud de salida tiende a cero, es decir, se alcanza el máximo amortiguamiento).

La ecuación 7 se puede escribir como:

$$\frac{A_{out}}{A_{in}} = \frac{1}{\sqrt{1+\theta^2}} \quad (8)$$

donde, $\theta = \frac{\omega}{k_s}$ es un parámetro adimensional que mide el número de oscilaciones que ocurren durante un proceso de transformación química. En otras palabras, la relación entre las escalas temporales del sistema y de la señal de entrada. Por tanto, el amortiguamiento es idéntico para todos los sistemas que guarden una misma relación de ω sobre k_s (Figura 3).

El desfase temporal entre las señales de entrada y salida, $\Delta\phi$, que viene dado por la diferencia de tiempos en alcanzar el n -ésimo máximo en los flujos de entrada, t_n^{in} , y de salida, t_n^{out} , se puede obtener fácilmente a través de las Ecuaciones 1 y 6, dando lugar a la expresión:

$$\Delta\phi = \frac{\phi}{\omega} \quad (9)$$

Nótese que esta diferencia es siempre positiva, lo que significa que se ha producido un retraso en la transmisión de la señal. Como se puede observar, el desfase entre la entrada y la salida depende también de la misma manera que lo hacía el amortiguamiento, de la relación entre la frecuencia de la señal de entrada ω y el valor de la constante cinética k_s . En la figura 4 se representa el desfase ϕ en función de ω . Como se ve, dicho desfase es idéntico siempre que la relación ω/k_s , es decir, θ , se mantenga constante. El desfase aumenta con-

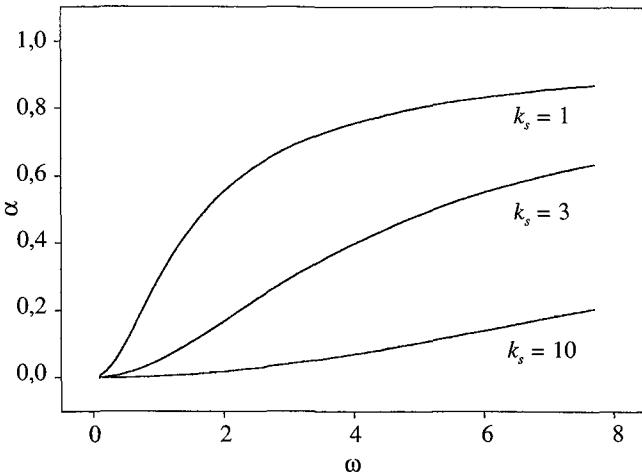


Figura 3. Amortiguamiento de la señal en el sistema de un solo intermediario mostrado en el Esquema 1. Se representa el grado de amortiguamiento, α , frente a la frecuencia de la señal de entrada, ω , para diferentes valores de la constante de salida, k_s . Para la obtención de J_{in} se ha utilizado un valor de $F = 1$ en la ecuación (1). Puede observarse cómo cuanto mayor es la k_s , las frecuencias necesarias para que se amortigüe la amplitud son mayores. Si esta representación se lleva a cabo frente a θ las tres curvas coinciden, haciéndose idénticas a la mostrada para $k_s = 1$.

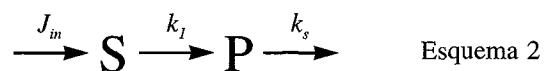
forme se incrementa el valor de ω con respecto a k_s , observándose un comportamiento asintótico para valores de θ altos, que corresponde a la máxima diferencia de fase, $\frac{\pi}{2}$.

Por consiguiente, tanto el amortiguamiento como el desfase dependen críticamente de la relación entre la frecuencia de la señal de entrada ω y la constante cinética de salida k_s , es decir, de θ .

DEPENDENCIA DEL AMORTIGUAMIENTO DE LA SEÑAL Y DE LA FASE CON EL NÚMERO DE PASOS

En el apartado anterior se ha estudiado cómo influye la relación entre la constante cinética de salida, k_s , y la frecuencia en la señal de entrada, ω , en el amortiguamiento y fase del flujo de salida para un sistema muy simple, constituido únicamente por un intermediario. Es de esperar que si el número de intermediarios se incrementa, tanto el amortiguamiento como el desfase, aumenten. No obstante, la dependencia de estas variables con las constantes intrínsecas del sistema es difícil de intuir *a priori*.

Para el caso de dos intermediarios, interconectados por una conversión irreversible, tal como se muestra en el siguiente esquema,



todavía es posible encontrar analíticamente las soluciones de las magnitudes antes referidas.

Utilizando la misma expresión para el flujo de entrada que en el apartado anterior (Ecuación 1), la expresión de la relación entre la amplitud de los flujos de salida y entrada resulta ser,

$$\frac{A_{out}}{A_{in}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{\omega^4}{(\lambda_1 \lambda_2)^2} + \frac{\lambda_1^2 + \lambda_2^2}{(\lambda_1 \lambda_2)^2} \omega^2 + 1}} \quad (10)$$

donde λ_1 y λ_2 son los autovalores del sistema diferencial correspondiente a las dos variables S y P , cuyos valores vienen dados por:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= -k_s \\ \lambda_2 &= -k_1 \end{aligned} \quad (11)$$

Por otra parte, el desfase del flujo de salida ha de satisfacer las expresiones:

$$\cos(\phi) = \frac{\omega^2 - k_1 k_s}{\sqrt{\omega^4 + (k_1^2 + k_s^2) \omega^2 + (k_1 k_s)^2}} * \quad (12)$$

$$\sin(\phi) = \frac{-\omega(k_1 + k_s)}{\sqrt{\omega^4 + (k_1^2 + k_s^2) \omega^2 + (k_1 k_s)^2}}$$

Si se considera el caso particular en el cual $k_1 = k_s = k$, la expresión de los autovalores (ecuación 11) se reduce considerablemente, resultando un valor doble, $\lambda_1 = \lambda_2 = -k$. Estos valores, sustituidos en la ecuación 10, proporcionan la siguiente expresión para la relación entre la amplitud de los flujos de salida (A_{out}) y de entrada (A_{in}):

$$\frac{A_{out}}{A_{in}} = \frac{1}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \quad (13)$$

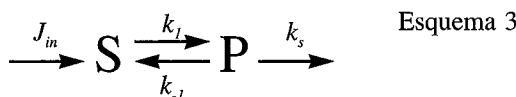
Puesto que el denominador de esta expresión siempre es mayor que la unidad, en todos los casos tiene lugar un amortiguamiento de la señal. A través de dicha expresión se pueden extraer dos conclusiones principales: en primer lugar, al igual que ocurría en el caso de un solo intermediario, la amplitud de salida depende del valor de θ , de manera que cuanto mayor sea la frecuencia de entrada en relación con las constantes cinéticas, mayor es el amortiguamiento. En segundo lugar, si se compara con la ecuación 7, puede observarse que, para idéntico valor de θ , el amortiguamiento es mayor para el caso de dos intermediarios. Es decir, como consecuencia de aumentar el número de pasos, disminuye la amplitud de salida.

Algo semejante sucede con la diferencia de fase entre la entrada y la salida, la cual se obtiene a partir de las siguientes expresiones,

$$\cos\phi = \frac{\theta^2 - 1}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \text{ y } \operatorname{sen}\phi = \frac{-2\theta}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \quad (14)$$

y se encuentra siempre en el intervalo $[0, \pi]$.

Una cuestión igualmente interesante es el análisis del efecto que produce la reversibilidad en las interconversiones entre metabolitos. Muchos de los pasos que tienen lugar en las rutas metabólicas son reversibles. En concreto, en la glicolisis, exceptuando los pasos que implican a la fosfofructoquinasa, la hexoquinasa y la piruvato quinasa, todos los demás presentan unos incrementos de energía libre estándar lo suficientemente bajos como para que la reacción progrese en sentido contrario, al menos localmente. En el caso de dos intermediarios, mostrado a continuación,



es posible obtener expresiones analíticas para la amplitud y la fase de la señal de salida, que son similares a las de las Ecuaciones 10 y 12, diferenciándose en el valor de los autovalores, cuya ecuación resulta ser,

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(k_1 + k_2 + k_s) \pm \sqrt{(k_1 + k_s)^2 + 2k_s(k_2 - k_1) + k_s^2}}{2} \quad (15)$$

En el caso particular de que todas las constantes cinéticas sean iguales entre sí e iguales a la constante de salida, $k_1 = k_{-1} = k_s = k$, resulta que la relación entre A_{out} y A_{in} es:

$$\frac{A_{out}}{A_{in}} = \frac{1}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \quad (16)$$

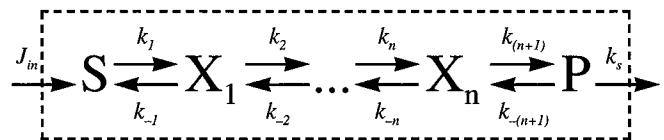
De igual forma el desfase de la onda viene dado por expresiones similares al sistema irreversible (Ecuación 14):

$$\cos(\phi) = \frac{\theta^2 - 1}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \text{ y } \operatorname{sen}(\phi) = \frac{-3\theta}{\sqrt{\theta^4 + 7\theta^2 + 1}} \quad (17)$$

Como en ese caso (caso irreversible), $\phi \in [0, \pi]$. No obstante, nótese la aparición de diferentes constantes numéricas en dichas expresiones.

La comparación de estas expresiones (Ecuaciones 16 y 17) con las ecuaciones 13 y 14, respectivamente, permite llegar a las siguientes conclusiones: (i) como consecuencia de la reversibilidad existe un mayor amortiguamiento de la señal de salida; (ii) el desfase es también mayor en el caso reversible, aunque ambos tienden asintóticamente al valor π para valores altos de θ . Así, cuando todas las constantes cinéticas son iguales, la forma de la curva es similar a la de los esquemas de una especie y de dos especies irreversible (Figura 4).

Desafortunadamente, para rutas de más de dos intermediarios conectados entre sí por reacciones reversibles (Esquema 4) es difícil obtener expresiones analíticas para la amplitud y el desfase de salida.



Esquema 4

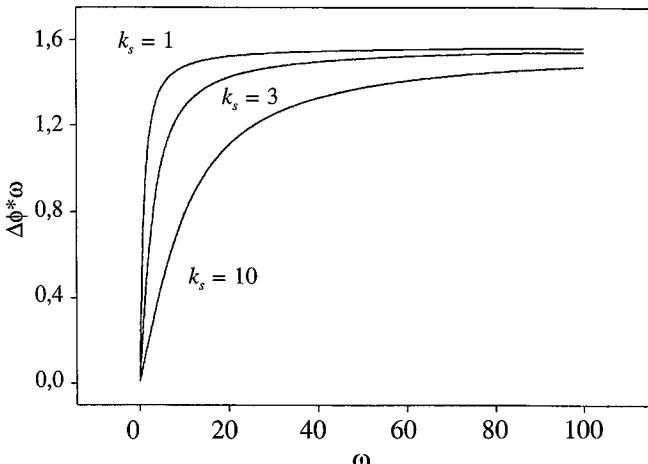


Figura 4. Variación del desfase, expresado en radianes ($\Delta\phi^*\omega$), en función de la frecuencia de la señal de entrada (ω). Se ha empleado un valor de $F = 1$. Al aumentar la frecuencia puede observarse cómo aumenta el desfase de forma asintótica, tiendiendo a un valor máximo de $\pi/2$ (1.57 expresado en radianes). Por otra parte, al disminuir la constante de salida k_s , el desfase se aproxima más rápidamente a dicha asintota. Del mismo modo que ocurre con el amortiguamiento, el desfase toma idénticos valores siempre que la relación (ω/k_s) (es decir, θ) se mantenga constante.

Con el ánimo de obtener la dependencia del amortiguamiento y del desfase del flujo de salida para este tipo de sistemas se procedió a la integración numérica de las correspondientes ecuaciones diferenciales. En el caso general lineal, las ecuaciones diferenciales se pueden escribir como,

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= J_{in}(t) - k_1 S + k_{-1} X_1 \\ \frac{dX_1}{dt} &= k_1 S - (k_{-1} + k_2) X_1 + k_{-2} X_2 \\ \dots & \\ \frac{dX_n}{dt} &= k_n X_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1}) X_n + k_{-(n+1)} P \\ \frac{dP}{dt} &= k_{n+1} X_n - (k_{-(n+1)} + k_s) P \end{aligned} \quad (18)$$

donde el término $k_s P$ corresponde al flujo de salida, J_{out} . Las figuras 5-7 muestran los resultados obtenidos para el amortiguamiento y el desfase de J_{out} para cadenas lineales reversibles de cinco o menos intermediarios. Si todas las constantes cinéticas se consideran iguales entre sí, e iguales a la constante de salida del sistema, k_s , se sigue verificando que para las cadenas de más de dos elementos el amortiguamiento del flujo de salida es una función de θ . Como se observa en la figura 5, al aumentar el número de pasos de la cadena de reacción, aumenta dramáticamente el amortiguamiento de la señal de salida. Una magnitud bastante representativa es el valor de θ al cual se produce un amortiguamiento del 50%, el denominado θ_m . En la figura 6 se muestra la variación de θ_m para cadenas constituidas por un distinto número de intermediarios, observándose el incremento abrupto que antes se comentaba.

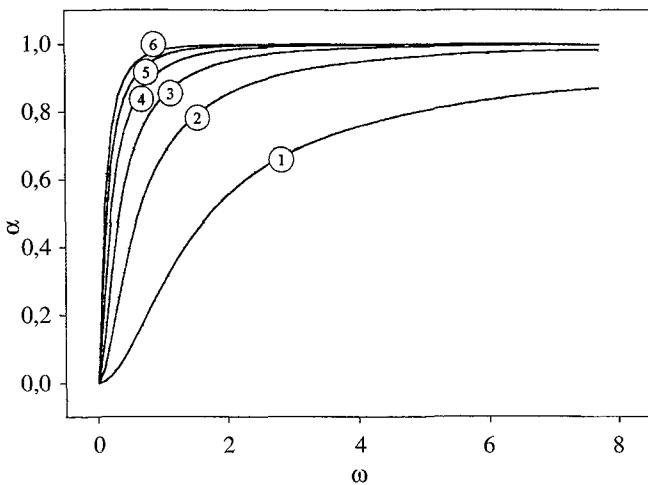


Figura 5. Variación del grado de amortiguamiento, α , con la frecuencia de entrada (ω) conforme aumenta el número de especies de la ruta metabólica, desde 1 hasta 6 especies. En todos los casos, como ya se vio en la Figura 2, el amortiguamiento de la señal aumenta conforme lo hace ω . Pero puede observarse cómo dicho amortiguamiento es mayor cuanto mayor es el número de especies que componen la ruta. Los parámetros empleados en esta figura fueron $F = 1$, y $k_s = k_i = 1$.

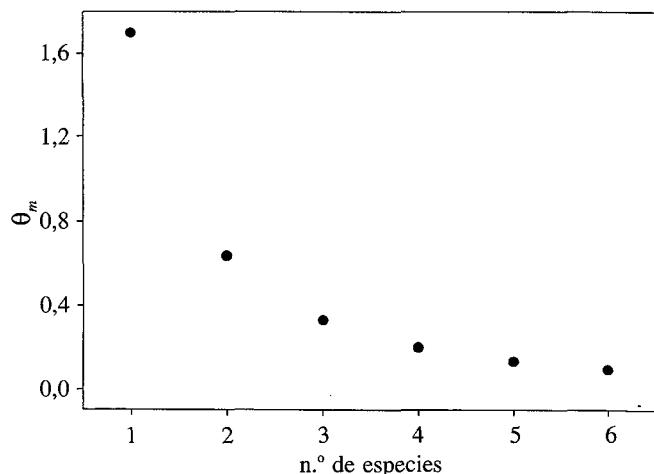


Figura 6. Variación de la función θ_m para cadenas de reacción formadas por un distinto número de especies (n.º de especies). Se comprueba que conforme aumenta el número de especies, el valor de θ necesario para conseguir un 50% de amortiguamiento disminuye. ($F = 1$).

Por otro lado, tal como se muestra en la figura 7, el desfase entre el flujo de entrada y salida aumenta. Tal como se observa en la figura 8 el desfase es progresivo en los diferentes intermediarios. Obviamente, cuando el número de pasos llega a un valor determinado, existirá una discontinuidad en esta variación, apareciendo nuevamente menores desfases entre la señal de entrada y salida, lo cual se repetirá periódicamente.

DISCUSIÓN

Los comportamientos oscilatorios que se observan en diversas rutas metabólicas pueden tener una gran trascenden-

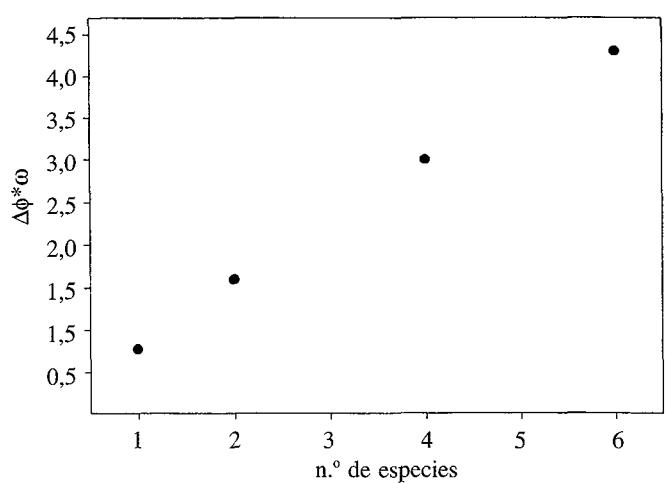


Figura 7. Desfase, expresado en radianes, ($\Delta\phi^* \omega$), de la señal de salida con respecto al flujo de entrada, en función del número de especies de la ruta (n.º de especies). Los parámetros empleados fueron $F = 1$, $k_s = k_i = 1$ y $\omega = 1$. Aunque parece lineal, el máximo valor que puede alcanzar es de $3\pi/2$, repitiéndose periódicamente a partir de un número determinado de pasos.

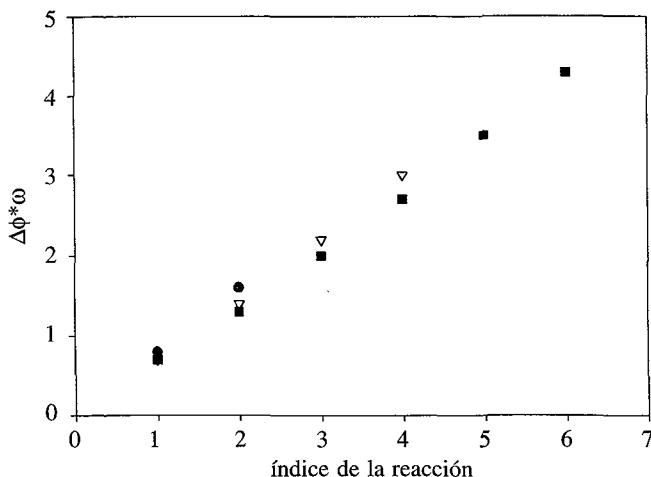


Figura 8. Desfase, expresado en radianes, ($\Delta\phi^*\omega$) de cada velocidad individual con respecto al flujo de entrada, en función de su posición dentro de la cadena (índice de reacción), para rutas lineales de 1 (●), 3 (▽) y 5 pasos (■). Los parámetros empleados fueron $F = 1$, $k_s = k_i = 1$ y $\omega = 1$. Para cada paso de reacción de una ruta se demuestra que el desfase es menor o igual para rutas más largas. Así, por ejemplo, para una cadena de un paso el desfase de la primera reacción es de 0.8 radianes, mientras que cuando la ruta tiene tres y cinco pasos el desfase de esta velocidad vale en ambos casos 0.7 radianes.

cia funcional. Por ejemplo, se ha sugerido que las oscilaciones metabólicas, todas ellas con períodos de oscilación del orden de los minutos, pudieran estar en la base de algunos ritmos circadianos por medio de acoplamientos superarmónicos con una oscilación externa con periodo aproximadamente de 24 horas (1, 21). También, los pulsos periódicos de AMP ciclico que ocurren en *Dictyostelium discoideum* se sabe que están directamente implicados en procesos de diferenciación y morfogénesis (22). No obstante, el papel de este comportamiento presenta todavía algunas importantes incógnitas. Así, a pesar de que variaciones periódicas de los intermediarios de la glicolisis han sido descritas, tanto en extractos naturales como en sistemas reconstituidos, y se ha identificado a la PFK como la enzima responsable de la inestabilidad estructural y en último término de las oscilaciones, todavía no se conoce bien cuál puede ser la principal función de éstas en dicha ruta.

El intermediario metabólico implicado en el efecto biológico no tiene por qué ser aquel directamente asociado con la enzima causante de dicha oscilación. Más bien, ambos compuestos pueden estar conectados a través de una serie de pasos metabólicos. Es precisamente el efecto que dichas etapas tienen sobre la amplitud del intermediario lo que se ha estudiado en este artículo. Para ello se ha analizado un modelo suficientemente sencillo (lineal) de manera que pueda ser resuelto completamente, pero que a la vez contenga las características esenciales del problema. Esto ha permitido extraer algunas conclusiones de carácter general aplicables a rutas metabólicas reales.

Un resultado importante, aunque *a priori* previsible, es que el amortiguamiento de las oscilaciones aumenta al in-

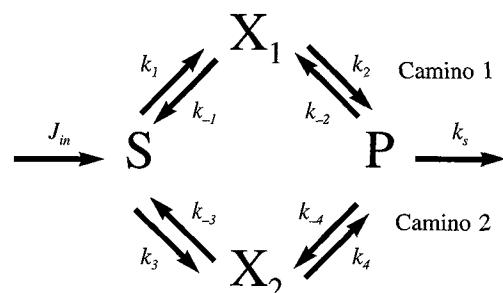
crementar el número de etapas o pasos metabólicos. Este decrecimiento es de tal naturaleza que la oscilación sería prácticamente inobservable tras un número determinado de etapas. Dada una ruta con una longitud fija, una magnitud que resulta decisiva para que la oscilación se conserve es la relación existente entre la frecuencia de la oscilación originaria (ω) y el valor de las constantes cinéticas de los pasos sucesivos (k_i), es decir, θ . Para valores de θ muy bajos, lo cual implica que la frecuencia de la oscilación de entrada en el sistema es mucho menor que las constantes cinéticas, existe poco amortiguamiento, aunque se aumente mucho el número de pasos. Si se tiene en cuenta que los períodos de oscilaciones metabólicas son del orden de los minutos, sus frecuencias serán del orden del 10^{-2} s^{-1} , una cantidad muy inferior a las constantes cinéticas de los pasos enzimáticos, que aunque difieren mucho de unos a otros, siempre suelen ser mayores que 10^6 s^{-1} . Por tanto, las oscilaciones metabólicas tienen aseguradas su propagación incluso en rutas relativamente largas como la glicolisis. Tal como se mostró en la figura 1, aunque el origen de las oscilaciones se encuentra en la PFK, se siguen observando en todos los intermediarios, incluyendo en el producto final láctico. No obstante, se observa un amortiguamiento notable en el paso de la Fru 1,6P al GAP. Este aspecto se discutirá más adelante. Por otra parte, una oscilación metabólica (cuyo periodo es del orden de los minutos) difícilmente se propagará produciendo una oscilación epigenética (por ejemplo, en la oscilación en la concentración de una enzima), ya que las constantes cinéticas globales de los pasos implicados en transcripción y traducción son muy bajas, y por tanto, la relación $\theta = \frac{\omega}{k}$ aumenta considerablemente.

Un aspecto que pudiera tener un efecto importante en el amortiguamiento de la oscilación es la existencia de ramificaciones en la ruta metabólica que converjan al mismo producto final. Tal es el caso, por ejemplo, de la existencia en la glicolisis del "shunt" de las pentosas, o de la ramificación producida por la actuación de la aldolasa y la posterior isomerización de la dihidroxiacetona fosfato (DHP) para dar lugar a gliceraldehído fosfato (GAP) (Figura 1). Este último ejemplo se discutirá más adelante.

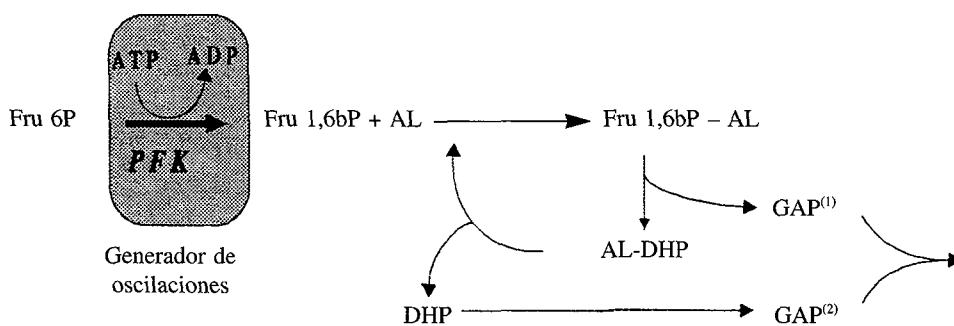
Como consecuencia de la ramificación pudiera tener lugar un desfase entre las señales que se propagan por ambas ramas, de manera que al converger nuevamente en un determinado metabolito dicho desfase se puede traducir en un mayor amortiguamiento de la señal. Si la ramificación fuera completamente simétrica, no cabría esperar un mayor amortiguamiento que el debido a la existencia de pasos metabólicos sucesivos (Esquema 5). Entendemos por completamente simétrico no solamente que tenga el mismo número de pasos en cada una de las ramas, sino además el mismo valor de las constantes cinéticas. En ese caso, el desfase producido en la señal por el camino 1 sería idéntico al desfase producido por el camino 2, y como consecuencia ambas señales llegarían al producto de convergencia en fase, produciéndose una adición constructiva de las mismas. Por el contrario, si la ramificación es asimétrica, bien porque las constantes cinéticas de ambas ramificaciones sean distintas

entre sí, bien porque, como ocurre en el esquema de la aldolasa (Esquema 6), el número de pasos implicados en cada una de las ramificaciones fuera distinto, las fases de las señales convergentes serían distintas, y como consecuencia se podría obtener un efecto destructivo, que se manifestaría en un mayor amortiguamiento de la señal con respecto a una ruta lineal. Aún cuando este efecto es dependiente tanto de la estructura como de las propiedades cinéticas de la red.

En el esquema 6 se representa con algo más de detalle el mecanismo de acción de la aldolasa y posterior conversión del DHP en GAP por medio de la isomerasa. A partir de dicho esquema (Esquema 6) se puede observar que para formar el GAP 1 son necesarios menos pasos que



Esquema 5



Esquema 6

para formar el GAP 2. Por tanto, las dos señales de GAP deben estar desfasadas, y como consecuencia se produce un mayor amortiguamiento en la concentración total de GAP. De hecho el amortiguamiento observado experimentalmente en GAP es mucho mayor que el observado en DHP, lo cual podría ser explicado teniendo en cuenta el efecto discutido anteriormente. El estudio de este sistema es objeto de investigación en la actualidad.

Para finalizar, es importante resaltar que aunque el estudio presentado ha sido llevado a cabo bajo la suposición de linealidad, y por tanto, en una situación de baja saturación de las enzimas, los hechos más generales aquí extraídos se deben seguir cumpliendo en situaciones más realistas de concentraciones de enzimas y sustratos. En estos casos no es factible obtener una solución analítica para las distintas magnitudes, pero siempre es posible realizar la integración numérica de las ecuaciones cinéticas. Estudios previos en este sentido (resultados no mostrados) están corroborando estas conclusiones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos BIO96-0895 del Programa Nacional de Biotecnología (Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología) y el DGICYT PB95-0406. M. Lloréns es becaria del programa FPI del Ministerio de Educación y Cultura de España. Y. Rodríguez es becaria del programa ICI de la Agencia Española de Cooperación Internacional, a través de la

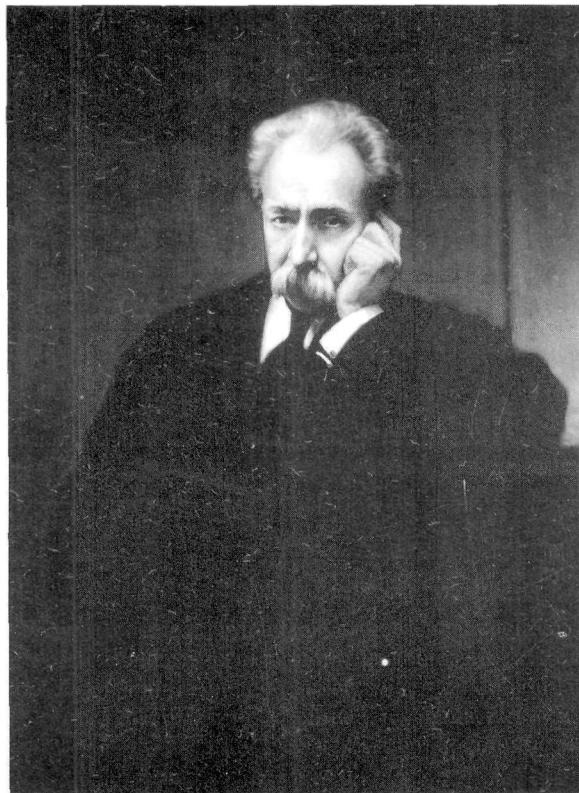
Universidad de La Habana, Cuba. J. Ignacio Sánchez es becario de la Universidad Complutense de Madrid.

REFERENCIAS

1. Goldbeter, A. (1996) *Biochemical oscillations and cellular rhythms*. Cambridge University Press.
2. Koch, C. y Segev, I. (1989) *Methods in neuronal modeling. From synapses to networks*. MIT Press, Cambridge, MA.
3. Robertson, A. & D.J. Drage (1975) Stimulation of late interphase Dictyostelium discoideum amoebae with an external cyclic AMP signal. *Biophys. J.* **15**, 767-775.
4. Gingle, A.R. & A. Robertson (1976) The development of the re-laying competence in Dictyostelium discoideum. *J. Cell. Sci.* **20**, 21-27.
5. Gerisch, G., D. Malcow, W. Roos & U. Wick (1979) Oscillations of cyclic nucleotide concentrations in relation to the excitability of Dictyostelium cells. *J. Exp. Biol.* **81**, 33-47.
6. Goldbeter, A. (1981) Bifurcations and the control of developmental transitions: Evolution of the cyclic AMP signalling system in Dictyostelium discoideum. En: *Mathematical Biology. Towards a Molecular Science*. T. Burton, ed. Pergamon Press, New York, pp. 79-95.
7. Martiel, J.L. & A. Goldbeter (1987) A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in Dictyostelium cells. *Biophys. J.* **52**, 807-828.

8. Martiel, J.L. & A. Goldbeter (1987) Origin of bursting and birhythmicity in a model for cyclic AMP oscillations in Dictyoslelium cells. *Lect. Notes Biomath.* **71**, 244-255.
9. Li, Y.X. & A. Goldbeter (1990) Frequency encoding of pulsatile signals of cyclic AMP based on receptor desensitization in Dictyostelium cells. *J. Theor. Biol.* **146**, 355-367.
10. Berridge, M.J. (ed.) (1995) Ca^{2+} Waves, Gradients and Oscillations. CIBA Found. Symp. Wiley, Chichester.
11. Dupont, G. & A. Goldbeter (1992) Oscillations and waves of cytosolic calcium: Insights from theoretical models. *BioEssays* **14**, 485-493.
12. Fewtrell, C. (1993) Ca^{2+} oscillations in non-excitable cells. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 427-454.
13. Stucki, J.W. & R. Somogyi (1994) A dialogue on Ca^{2+} oscillations: An attempt to understand the essentials of mechanisms leading to hormone-induced intracellular Ca^{2+} oscillations in various kinds of cell on a theoretical level. *BBA Bioenerg.* **1183**, 453-472.
14. Gerisch, G. y Wick, U. (1975) Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from Dictyostelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 364-370.
15. Young, M. W. (1993) Molecular genetics of circadian rhythms. Marcel Dekker, New York and Basel.
16. Goldbeter, A. & Nicolis, G. (1976) *Progress in theoretical Biology*. Academic Press, INC. Vol. 4.
17. Hess, B. y Boiteux, A. (1968) *Regulatory functions of biological membranes*. Elsevier Publishing Company.
18. Betz, A. y Sel'kov, E. (1969) *FEBS Letters*, **3**, 5-9.
19. Heinrich, R. & Schuster, S. (1996) *The Regulation of Cellular Systems*. Chapman Hall, New York.
20. Fernández, C. (1992) *Ecuaciones Diferenciales I*. Ediciones Pirámides, S.A., Madrid.
21. Edmunds, L.N. Jr. (1988) *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks. Models and Mechanisms for Circadian Timekeeping*. Springer, New York.
22. Goldbeter, A. & J.L. Martiel. (1988) Development control of a biological rhythm: the onset of cAMP oscillations in Dictyostelium cells. En: *From Chemical to Biological Organization*. M. Markus, S. Müller and G. Nicolis, Eds. Springer, Berlin, pp. 248-254.

SERIE «GALERÍA PRESIDENTES»
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS



D. José Rodríguez Carracido

VI Presidente

1922-1928

*Nació en Santiago de Compostela el 21 de mayo de 1856.
Fue elegido Académico el 11 de mayo de 1887, leyendo su discurso
de ingreso el 19 de febrero del año siguiente, que versó sobre
«Concepto actual del elemento químico».
Fue Bibliotecario de esta Academia desde 1902 a 1922, en que fue
nombrado Presidente, hasta el 3 de enero de 1928 en que falleció.*

