Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Procesos de auto-organización en sistemas biológicos

Strier, Damián

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Físicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Strier, Damián. (2002). Procesos de auto-organización en sistemas biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3489_Strier.pdf

Cita tipo Chicago:
Strier, Damián. "Procesos de auto-organización en sistemas biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3489_Strier.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Procesos de Auto-organización en Sistemas Biológicos

por Damián Strier

Director de Tesis: Silvina M. Ponce Dawson

Lugar de Trabajo: Departamento de Física, UBA

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Físicas

29/07/2002

№ 3489

Procesos de Auto-organización en Sistemas Biológicos

Lic. Damián Strier

Tesis de Doctorado
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Director: **Dra. Silvina M. Ponce Dawson**

Resumen

Este trabajo está dedicado a cubrir aspectos referidos a mecanismos generadores de orden a nivel celular o supracelular. En particular, haremos especial hincapié en el rol que juegan las diversas escalas temporales inherentes a la bioquímica celular, y su impacto en las rutas de auto-organización relacionadas con mecanismos de reacción-difusión.

Palabras claves:
Auto-organización, ecuaciones de reacción-difusión, patrones de Turing en sistemas biológicos, múltiples escalas temporales en ecuaciones en derivadas parciales.

Self-organized processes in Biological Systems

Lic. Damián Strier
Advisor: **Dra. Silvina M. Ponce Dawson**

Abstract

This work is intended to cover some features about order generating mechanisms at the cellular and/or supra-celullar level. In particular, we will focus on the rol played by the presence of the different time-scales that are inherent to the biochemical reactions at the cellular level, and their impact in the emergence of self-organized structures driven by reaction-diffusion mechanisms.

Keywords:
Self-organization, reaction-diffusion equations, Turing patterns in biological systems, multiple time-scales in partial differential equations.

A Laura.

Prefacio

Dado que el tema de la tesis está relacionado con dos disciplinas, es nuestra aspiración y desafío que sea de interés en ambas. Por ello, trataremos de exponer el trabajo de una manera que resulte accesible –y en lo posible, amena– para los dos tipos de lectores a quienes está dirigido.

La estructura de la tesis puede dividirse en tres partes. La primera parte, que comprende al capítulo 1, es una recopilación extensa, aunque en absoluto exhaustiva, de fenómenos relevantes dentro del campo de la biología, cuyo denominador común es la presencia de mecanismos capaces de producir estructuras auto-organizadas. En la mayoría de los sistemas descriptos en este capítulo introductorio, la dinámica subyacente es compatible con una descripción macroscópica en término de ecuaciones de reacción-difusión. Asimismo, una característica esencial para todos estos sistemas, es la presencia de mecanismos operando simultáneamente en distintas escalas de tiempo. Si bien sólo unos pocos de los ejemplos presentados aquí son estudiados posteriormente en la tesis (en particular, todo lo que se refiere a sistemas excitables extensos no se vuelve a mencionar en el resto del trabajo), consideramos importante incluirlos, ya que las herramientas desarrolladas y aplicadas en este trabajo pueden servir de base para el estudio de los mismos.

En la segunda parte, que comprende a los capítulos 2 y 3, se desarrollan distintos métodos para tratar con sistemas de reacción-difusión en presencia de dos escalas temporales bien diferenciadas (rápida y lenta). Asimismo, se hace un esfuerzo por proveer una interpretación física de los términos que aparecen en las ecuaciones resultantes en la escala lenta (ecuaciones reducidas). El objetivo de esta segunda parte de la tesis, es proporcionar una metodología que sea a la vez rigurosa y sistemática, a partir de la cual se facilite la interpretación de experimentos en los cuales sólo la escala lenta resulta accesible a la observación. Es importante aclarar que los resultados obtenidos en estos capítulos son válidos en general, *i.e.* independientemente de la naturaleza del sistema de reacción-difusión. Nuestra motivación es, sin embargo, de carácter netamente biológico, por lo que en las aplicaciones estudiadas en este trabajo, no aparecen otro tipo de sistemas (especialmente físicos y químicos) para los cuales el formalismo desarrollado sería aplicable de igual manera.

La tercera parte de la tesis (capítulos 4, 5 y 6) está dedicada justamente a las aplicaciones del método de reducción en diversas situaciones de interés. En los capítulos 4 y 5 se estudia fundamentalmente el rol que juegan cierto tipo de interacciones rápidas (inspiradas en las reacciones con buffers rápidos) en la aparición de patrones de Turing, el cual es –entre otras cosas– uno de los ejemplos más apasionantes relacionados con la auto-organización que ocurre durante la morfogénesis. En el capítulo 6, estudiamos la validez de las ecuaciones reducidas en las cercanías de canales de calcio, el cual es un problema de gran relevancia en la actualidad. En esta última parte, hemos procurado focalizar nuestra atención en temas que surgen del estudio de problemas reales. Si bien esto impone restricciones "extras", es probablemente el único camino para que la tesis sea verdaderamente útil e interesante para quienes investigan en una rama intrínsecamente interdisciplinaria como la biofísica, donde es más importante intentar resolver problemas inspirados en los muchos que ya existen, que proponerse resolver otros que son sólo hipotéticos, y que frecuentemente están motivados más por la base previa del investigador que por un interés genuino de la comunidad.

Si bien lo ideal es leer la tesis completa y en forma secuencial, los lectores de formación biológica deberían saltear todos los detalles matemáticos del capítulo 2, y pasar rápidamente al capítulo 3. También pueden prescindir del material de los apéndices B y C. Los físicos pueden evitar el material del apéndice A.

Índice general

1. Introducción **1**
1.1. Sistemas físicos y biológicos 1
1.2. Importancia de la auto-organización en los sistemas biológicos 2
1.3. Motivaciones para el presente trabajo 11
1.4. Sistemas de reacción-difusión 18
1.5. La importancia de las escalas en la naturaleza 20
1.6. Esquema de la tesis 23

2. Reducción de un sistema de reacción-difusión **25**
2.1. Resumen 25
2.2. Métodos para simplificar sistemas dinámicos 26
2.3. Reescaleo de sistemas de reacción-difusión 28
2.4. Haciendo la reducción por el método de las escalas múltiples 30
2.5. Reobteniendo los resultados por otra vía: extensión de la hipótesis cuasi-estacionaria 37
2.6. Aplicación del formalismo en algunos casos de interés 38

3. El problema de la reducción desde un punto de vista microscópico **41**
3.1. Resumen 41
3.2. Interpretación microscópica en un caso límite 42
3.3. Interpretación en el caso general 44
3.4. Aplicación a un caso simple 48
3.5. Simulaciones numéricas 52

4. Patrones de Turing en sistemas con buffers: análisis general **61**
4.1. Resumen 61
4.2. Patrones de Turing y su relevancia en biología 61
4.3. Condiciones para los patrones en sistemas sin buffers 67
4.4. Agregando los buffers 69
4.5. Aplicación al modelo de Schnackenberg 74

5. Patrones de Turing en la glucólisis **79**
5.1. Resumen 79
5.2. El modelo de Selkov 80
5.3. Estructuras de Turing en la glucólisis 85

6. Validez de la descripción reducida en la propagación de ondas de calcio **89**
6.1. Resumen 89
6.2. Consideraciones preliminares 90
6.3. Comparación de las escalas temporales 91
6.4. Algunos experimentos numéricos 94

7. Conclusiones y perspectivas

A. Descripción matemática: las ODEs y las PDEs

B. Fluctuaciones en el lattice gas

C. Condiciones necesarias y suficientes para los patrones de Tu

1. Introducción

In crossing a heath, suppose I pitched my foot against a stone, and were asked how the stone came to be there; I might possibly answer, that, for anything I knew to the contrary, it had lain there for ever ... but suppose I had found a watch upon the ground, and it should be inquired how the watch happened to be in that place; I should hardly think of the answer which I had given before, ... the watch must have had a maker ... Every indication of contrivance, every manifestation of design, which existed in the watch, exist in the works of nature, with the difference, on the side of nature, of being greater or more, and that in a degree which exceeds all computation. William Paley [124].

1.1. Sistemas físicos y biológicos

Si bien el objetivo de la física es, en términos generales, comprender los fenómenos naturales, los problemas sobre los que más se ha teorizado y experimentado están casi por completo sesgados hacia los fenómenos que surgen en sistemas inanimados, tales como átomos, gases, fluidos, sólidos, o cuerpos celestes. Este hecho es razonable, ya que la materia viva constituye sin duda la forma más escasa y compleja que existe en nuestro universo, y por consiguiente, si la física fuese capaz de explicar todos los fenómenos desconectados de los sistemas vivientes, habría cumplido con éxito sus objetivos. Sin embargo, el hecho de que nosotros mismos seamos parte de esa ínfima fracción, nos obliga de algún modo a mirarla con el mismo ánimo inquisidor con el que los primeros físicos analizaron el movimiento planetario en busca de sus leyes de movimiento.

Seguramente porque somos parte del mundo vivo, en principio no encontramos demasiado sorprendente a una planta o un animal cualquiera, pero sí nos fascinamos -desde el hombre primitivo hasta el actual- contemplando los lejanos planetas o la Via Láctea. Pero cuando percibimos por primera vez en la forma más somera, la odisea fenomenal que supone la aparición y el mantenimiento de la vida de una simple célula, es difícil no quedar atónitos, con un grado de asombro semejante al que habrá experimentado un hombre de la Edad de Piedra mirando un cometa o un eclipse.

Afortunadamente, las mismas leyes físicas que se han descubierto en el contexto más sencillo de los sistemas inanimados son aplicables a los seres vivos [1]. Son efectivamente leyes universales. No hay hasta el momento razones objetivas por las cuales suponer que la enorme complejidad de los organismos se deba a la existencia de nuevas leyes por descubrir. Más bien parece ser que la complejidad se encuentra escondida dentro de las leyes que ya conocemos, pero que aún no sabemos leer

[1] En algunos casos notables se ha dado el camino inverso, por ejemplo, con la ley de conservación de la energía, la que fue formulada por primera vez por el médico alemán Johann Mayer, en 1842. Mayer dedujo que había una relación entre el calor generado por el organismo y la energía consumida para realizar trabajo, dando una formulación particular de la primera ley de la termodinámica.

completamente [2].

Aplicar las ideas de la física para extender nuestra comprensión acerca del funcionamiento de los organismos vivos, es uno de los grandes desafíos de las próximas décadas, que servirá tanto para interpretar observaciones, como para formular nuevas hipótesis dentro del campo de la biología, y promover nuevos desarrollos tecnológicos basados en sistemas vivos. En algunos casos la aplicación de las leyes es directa, ya que muchos procesos biológicos involucran circuitos eléctricos, bombas, o están gobernados por gradientes de presión, diferencias de concentración, o por la circulación de fluidos a lo largo de tuberías. Una ilustración simple e interesante para comprender este punto sería, por ejemplo, explicar la razón para el rango de frecuencias (ultrasónicas) del sonar con el que los murciélagos guían su vuelo en la oscuridad. A partir del estudio de sus hábitos (se alimentan de insectos durante la noche, viven en cavernas) y de algunas nociones básicas de la teoría ondulatoria, surge inmediatamente que el rango es consecuencia de la necesidad de resolver espacialmente objetos cuyo tamaño varía desde el diámetro de la entrada a su caverna, hasta el del insecto que conforma su dieta. De modo análogo puede entenderse el motivo por el que ajustan continuamente la frecuencia de la onda emitida una vez localizada su presa: es para compensar el corrimiento Doppler hasta hacer coincidir la frecuencia de la onda reflejada con la de mayor sensibilidad de sus oídos [29]. En otros casos, sin embargo, el uso de las leyes no es directo, y frecuentemente puede aprenderse mucha física analizando un sistema biológico, ya que usualmente en el contexto biológico, las leyes se expresan de un modo nuevo al que no estamos acostumbrados dentro del marco que proveen los sistemas físicos ortodoxos [8, 130].

Asimismo, la utilización de las herramientas de la física puede servir para explicar el surgimiento de ciertas leyes en los sistemas biológicos, tal como ocurre con las *leyes alométricas*, conocidas hace más de un siglo, e interpretadas recientemente. Si por ejemplo, graficáramos la tasa de producción de calor en función de la masa de los organismos en escala logarítmica, se encontraría que los diferentes puntos (cada una de las especies conocidas) se ubican a lo largo de una recta de pendiente 3/4 a través de los 21 órdenes de magnitud que van desde la masa de un microbio ($10^{-13}g$) hasta la de una ballena ($10^{8}g$). No sólo la velocidad metabólica varía con la masa del organismo a través de una ley de potencias, sino cuestiones tan diversas como el tiempo de circulación de la sangre, el diámetro del tronco de los árboles y de las arterias aortas, o el número total de latidos del corazón. Las limitaciones físicas y geométricas que surgen de maximizar la capacidad metabólica y minimizar los tiempos de transporte de nutrientes, sirven para entender por qué todos los exponentes de las leyes alométricas deben ser múltiplos de 1/4 [172, 173].

1.2. Importancia de la auto-organización en los sistemas biológicos

Las leyes físicas se manifiestan también en los seres vivos como promotores de patrones y formas. En los últimos años, el estudio de sistemas físicos y químicos sujetos a condiciones externas de no-equilibrio, ha mostrado cómo un conjunto de elementos

[2] Como dijo H. Poincaré, a propósito de una fórmula que resultaba muy sencilla de obtener pero muy difícil de interpretar: *"Las ecuaciones se han vuelto más inteligentes que quienes las escriben"*. R. P. Feynman también enfatizó este aspecto, al referirse a la ecuación de Navier-Stokes y a la de Schroedinger, destacando que el próximo desafío del conocimiento pasa por comprender el contenido cualitativo de las ecuaciones diferenciales [44].

microscópicos interactuantes pueden dar lugar a fenómenos emergentes a nivel macroscópico, de carácter colectivo. La manifestación característica de estos fenómenos es la aparición espontánea de alguna clase de inhomogeneidad macroscópica espacial y/o temporal en las variables relevantes a la descripción. Ejemplos de tales procesos de *auto-organización* son la formación espontánea de zonas de diferentes concentraciones de las moléculas involucradas en una reacción química, o la aparición de vórtices u otras estructuras coherentes en fluidos. En la última década se ha comprobado la existencia de este tipo de mecanismos de auto-organización operando en diversos sistemas vivientes, como por ejemplo, en la dinámica de la agregación de hongos y bacterias, o en los patrones de las manchas de la piel de diversos mamíferos y peces [3]. El hecho de que los seres vivos no sean sólo exitosas adaptaciones a las restricciones físicas impuestas, sino también hábiles usufructuadores de sus elementos creadores de estructura y complejidad, abre una nueva perspectiva desde donde pensar los sistemas biológicos y su evolución. Para ilustrar el rol de los procesos de organización espontáneos en los sistemas biológicos, que es el tema central de esta tesis, mencionaremos a continuación varios ejemplos relevantes.

1.2.1. Auto-organización temporal en el metabolismo celular

La existencia de *oscilaciones temporales* es quizás, la manifestación más evidente de los procesos de auto-organización en los sistemas biológicos. Los llamados *ritmos biológicos* abarcan las escalas temporales más diversas, desde las milésimas de segundo para los ritmos neuronales, hasta los años para los ciclos de contagio de las epidemias. Al nivel de la bioquímica celular, incluso los mecanismos más básicos de activación o inhibición de cadenas de reacciones mediadas por enzimas, dan lugar a diversos patrones de organización temporal, tales como las oscilaciones auto-sostenidas, excitabilidad, coexistencia de varios regímenes periódicos estables, o de diversos puntos fijos estables [58, 59, 179]. En la organización del metabolismo celular, vale aclarar, confluyen también otros aspectos espaciales y funcionales. La organización espacial se manifiesta, por ejemplo, en la localización intracelular de los diferentes procesos bioquímicos, y la funcional a través de la respuesta celular a diversos estímulos, provocando por ejemplo, cascadas en la producción de distintas enzimas controladas por mensajeros intracelulares, como el calcio o el $cAMP$ [4].

La interrelación de los aspectos temporales, espaciales y funcionales se advierte, por ejemplo, al analizar los distintos comportamientos de las células ante señales de agentes extracelulares, tales como hormonas o neurotransmisores: en muchos casos el ingreso de estos agentes al medio intracelular provoca oscilaciones en la concentración de calcio, que se manifiestan bajo la forma de pulsos repetitivos, en cuya

[3] E. Schroedinger fue uno de los primeros en conjeturar que los procesos de reducción de entropía son una propiedad inherente a la existencia de los seres vivos [139].

[4] La adenosina monofosfato cíclica ($cAMP$), es un nucleótido generado a partir de la adenosina trifosfato ATP (ver más abajo) en respuesta a estímulos hormonales. El $cAMP$ actúa como molécula señalizadora mediante la activación de ciertas proteínas intracelulares [1]. El ATP es el portador más común de energía química en las células, la cual se halla almacenada en los enlaces entre los grupos fosfato HPO_4^{2-}. El ATP se forma a partir de la adición de un grupo fosfato al ADP (adenosina difosfato) en una reacción conocida como *fosforilación*, o la de dos de estos grupos al AMP (adenosina monofosfato). Dado que cada grupo fosfato está negativamente cargado, es necesaria una considerable cantidad de energía para formar una molécula de ATP. Por consiguiente, en la *hidrólisis* (la rotura de una de estas uniones entre grupos fosfato, en presencia de agua) se liberan grandes cantidades de energía.

frecuencia (que varía entre unos pocos segundos, hasta 30 minutos) se halla codificada la información proveniente de la señal externa [1, 11]. Otra clase común de auto-organización temporal es la de los ritmos circadianos: oscilaciones en la temperatura, en la secreción de hormonas, o en la producción de proteínas, que ocurren con un período de 24 horas en casi todos los seres vivos. Para algunos organismos tales como la *Drosophila* [5], el mecanismo molecular responsable de las oscilaciones circadianas en el nivel de ciertas proteínas, ha sido prácticamente dilucidado en término de la retroalimentación ejercida por las mismas proteínas sobre los genes que las codifican [60, 95] [6](ver la figura 1.1). Otros ejemplos notables de patrones temporales cuya causa no está relacionada con variaciones periódicas del medio externo –como ocurre con los ciclos del sueño, o los ciclos de reproducción en plantas– sino a factores endógenos, son los ritmos de contracción del músculo cardíaco, la respiración, y las oscilaciones en la síntesis de proteínas, o en otras actividades metabólicas claves para animales, plantas o bacterias, tales como la glucólisis [7] o la fotosíntesis [8].

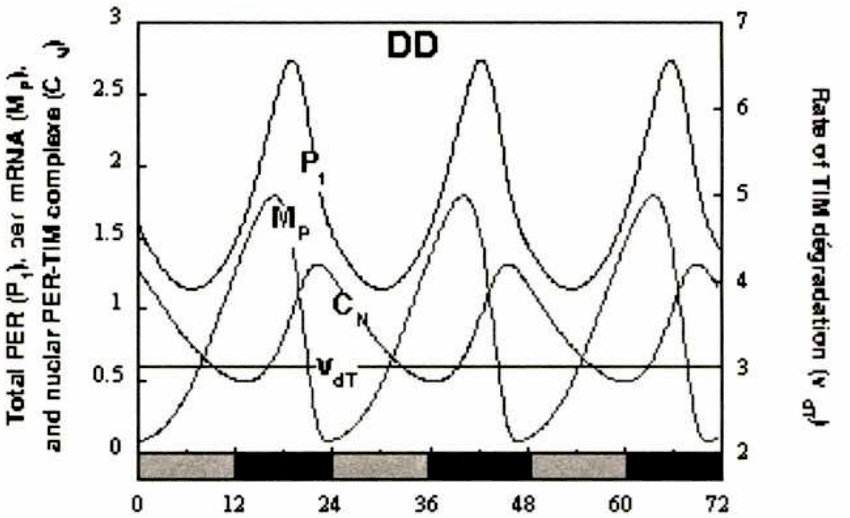

Figura 1.1: Oscilaciones circadianas en el nivel de la proteína PER (P_1), en el de su $ARNm$ (M_p), y en el del complejo formado con la proteína TIM (C_N), para la Drosophila [95].

Es notable que los mecanismos moleculares que dan origen a los ritmos biológicos no difieran de los mecanismos que producen oscilaciones temporales en diversas reacciones químicas en sistemas artificiales. El ejemplo paradigmático de una reacción química oscilante es la de Belousov-Zhabotinsky (BZ), la cual ha sido extensamente estudiada tanto experimental como teóricamente. La reacción, inicialmente investigada por B. Belousov (1950) como caricatura del ciclo de Krebs [9], consis-

[5]La mosca *drosophila melanogaster*, más conocida como "la mosca de la fruta", es uno de los organismos complejos más estudiados en biología, dado su relativamente corto período de vida (10 a 14 días), su alta tasa de reproducción y su fácil manejo en el laboratorio [91].

[6]La presencia de estos mismos genes en mamíferos (incluido el hombre) sugiere que el mecanismo del reloj circadiano ha sido conservado, al menos en parte, durante millones de años.

[7]Proceso metabólico en el cual se obtiene energía en forma de ATP a partir de la degradación (incompleta) de azúcares.

[8]Proceso por el cual las plantas y algunas bacterias utilizan la energía solar para sintetizar moléculas orgánicas a partir de dióxido de carbono y agua.

[9]Un proceso metabólico central encontrado en todos los organismos aeróbicos, que consiste en la

te básicamente en la oxidación de ácido malónico por iones bromato, en presencia de cerio como catalizador, en un medio de ácido sulfúrico. Belousov descubrió que la mezcla se tornaba –en conjunto– amarilla, luego perdía el color, para retornar pasado un minuto, a tomar la misma coloración amarilla que al comienzo. Las oscilaciones periódicas espontáneas se mantenían aproximadamente durante el lapso de una hora, antes de alcanzar finalmente un estado de equilibrio. Hasta que el desarrollo de la termodinámica de los procesos irreversibles hizo posible comprender los mecanismos por los cuales una reacción química no necesariamente evoluciona en forma monótona hacia el equilibrio, el hallazgo de Belousov fue tan sorprendente, que en su momento se adjudicó a algún error en sus experimentos. Nadie se animó a publicar su trabajo. La confirmación posterior por parte de Zhabotinsky, junto con el interés que comenzaba a evidenciarse hacia el comienzo de la década del '70 por las oscilaciones bioquímicas [22], convirtieron al experimento de BZ en el prototipo de la reacción oscilante, a partir de la cual la analogía entre el comportamiento de sistemas químicos artificiales y el de reacciones comunes dentro de la bioquímica celular se hizo evidente.

A través del estudio de sistemas químicos artificiales se han aclarado los ingredientes básicos que son indispensables para encontrar esta clase de auto-organización temporal: la presencia de no-linelidades y la distancia al equilibrio termodinámico [132]. Ambas características, inherentes a los seres vivos, se ven plasmadas en la compleja maquinaria química que subyace a todos los organismos a nivel celular. La necesidad de regular entre muchas otras cosas, la producción de proteínas o el encendido de genes, es una fuente de no-linealidad, así como la necesidad de controlar los gradientes de concentraciones iónicas entre el medio intra y extracelular a través del transporte activo de materia, garantiza el apartamiento de un estado inmutable de equilibrio termodinámico. La posibilidad de permanecer continuamente alejados del equilibrio, en lugar de tender irremediablemente hacia él, se debe a que los sistemas capaces de auto-organizarse (sean físicos, químicos o biológicos) son *sistemas abiertos* al intercambio de energía con el medio circundante. Este aspecto fue largamente analizado por I. Prigogine y sus colegas [118], quienes desarrollaron gran parte de la teoría de formación de estructuras desde el punto de vista de la termodinámica de sistemas abiertos. Para enfatizar la importancia crucial de este flujo de energía –posteriormente disipada–, en la formación de estructuras coherentes, se las suele denominar **estructuras disipativas**.

1.2.2. Auto-organización espacio-temporal en seres vivos

Las vías posibles de auto-organización en sistemas vivos no se reducen a la aparición de patrones temporales. Por el contrario, existe una enorme riqueza en término de patrones espaciales y/o espacio-temporales. Uno de los ejemplos mejor estudiados de un patrón espacio-temporal en un sistema biológico es el de la propagación de impulsos eléctricos a lo largo de la membrana de una célula nerviosa. El sistema compuesto por la membrana [10], los canales iónicos transmembrana (selectivos al paso de los distintos iones y sensibles al voltaje de la membrana), y las especies iónicas (esencialmente los iones de sodio y potasio) conforman un sistema excitable por el cual pueden propagarse pulsos eléctricos repetitivos, a través de los cuales

oxidación de grupos acetilo en dióxido de carbono y agua. Ocurre en las mitocondrias de las células eucariotas (células con núcleo) [1].

[10] La bicapa lipídica que envuelve las células.

se comunican las distintas células que componen el tejido nervioso. Como resultado de una serie de experimentos admirables, Hodgkin y Huxley [76] desarrollaron un detallado modelo empírico para el caso espacialmente homogéneo (que era el que correspondía en sus experimentos controlados), que se tradujo en un conjunto de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias [11] para las corrientes y los voltajes de las diferentes especies de iones involucradas en la transmisión del potencial de acción. El modelo de Hodgkin y Huxley fue posteriormente simplificado por FitzHugh [48] y Nagumo [110] a través de una caricatura del modelo original, en la cual se colapsa la dinámica de las cuatro variables en sólo dos, permitiendo de este modo hacer un análisis de la dinámica global en un espacio de fases plano [12]. Diferentes valores de los parámetros del modelo de FitzHugh-Nagumo conllevan a distintos comportamientos dinámicos observables, tales como excitabilidad, periodicidad, o biestabilidad, los cuales se corresponden con los diferentes modos de comportamiento neuronal. Para describir la situación real, en la cual los cambios del voltaje de la membrana son locales, y en la que estas inhomogeneidades en el potencial son sucesivamente regeneradas en el espacio, se planteó posteriormente un modelo en donde las variables dependen tanto del tiempo como de las coordenadas espaciales. En el caso de la propagación del potencial de acción, la ecuación dinámica que describe su evolución es una ecuación en derivadas parciales que puede reducirse a una de tipo reacción-difusión [107]. Como veremos, las ecuaciones de reacción-difusión son adecuadas para modelar diversos fenómenos naturales. Presentaremos una descripción más detallada en la sección 1.4 (ver también la sección A.0.2 del apéndice). A pesar de la simplicidad de estas ecuaciones en el caso del modelo de neuronas, es notable que el comportamiento espacio-temporal resultante es semejante tanto cualitativa como cuantitativamente al del sistema neuronal que procura describir.

El problema de la propagación del potencial de acción a lo largo de un axón es un caso particular de una *onda en un medio excitable*. La propagación de ondas en medios excitables es un fenómeno común en diversos sistemas alejados del equilibrio termodinámico. Probablemente, la prueba más notable de la similitud en el comportamiento macroscópico de los sistemas excitables, ya sean éstos naturales o artificiales, es el fenómeno de formación espontánea de *ondas espirales rotantes*. Tal como se observa en las imágenes de la figura 1.2, aún cuando los mecanismos subyacentes que generan la excitabilidad difieran por completo, la organización que surge espontáneamente en esta clase de sistemas es completamente análoga. La figura (a) muestra una población de ondas espirales con distintos períodos de rotación (de aproximadamente 20 s), en una reacción de oxidación de CO sobre una superficie de platino (Nettesheim *et al.* [113]). La

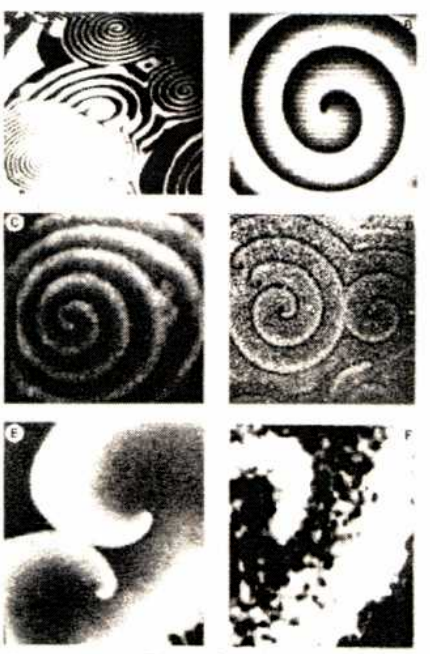

Figura 1.2: Ejemplos de ondas espirales en distinto tipo de medios excitables.

[11] Un conjunto de ecuaciones que determinan, en cada instante, las variaciones temporales de las distintas concentraciones como función de los valores instantáneos de las mismas (ver apéndice A).

[12] Para ello notaron que la suma de dos de las variables permanecía aproximadamente constante, y que existían dos escalas temporales presentes en la operación de los canales.

figura (b) es la onda espiral observada en una reacción de Belousov-Zhabotinsky. Las zonas claras en el experimento de BZ corresponden a regiones de máxima concentración de un indicador de color (ferroína). El período de rotación de los espirales es de alrededor de 1 minuto (Winfree y Strogatz [178]). La longitud de la onda es de 2 mm. En la figura (c) se observa un patrón de ondas espirales de iones de calcio, Ca^{2+}, en ovocitos de *Xenopus Laevis* (longitud de onda 60 μm, período 3 s). La liberación de calcio a través de canales mediados por IP_3 (Inositol trifosfato, ver sección 1.3.3) es detectada por un microscopio láser confocal (Lechleiter y Clapham [92]). Otro ejemplo interesante de estructura espacio-temporal controlada por mecanismos de reacción-difusión, es la transformación de un agregado de colonias unicelulares en un organismo multicelular [90, 107, 114, 163], tal como ocurre en las estructuras supracelulares del *Dictyostelium Discoideum*. Las células del dictyostelium comienzan a agregarse en respuesta a la disminución de la cantidad de bacterias de las cuales se alimentan. Este movimiento está controlado por el $cAMP$, que cumple el rol de señalizador. Según Hagan y Cohen [66], a medida que la cantidad de alimento disminuye el sistema pasa gradualmente de tener un comportamiento excitable con baja concentración de $cAMP$, a uno oscilatorio, y luego a un modo excitable con alta concentración de $cAMP$. Este comportamiento está en íntima relación con los sucesivos estadíos de desarrollo observado en los experimentos [66]. Los espirales que se visualizan en la fotografía (d) (tomada de Foerster, Muller y Hess [49, 50]) corresponden a diferentes propiedades refractivas de las células de *Dictyostelium Discoideum* como consecuencia de un pulso de $cAMP$ [107]. Cada espiral tarda alrededor de 7 minutos en realizar una rotación completa. La longitud de onda es de 2,5 mm. En la figura (e) se muestra la colisión de dos ondas espirales en tejido neuronal de la retina de una gallina. Las ondas se mueven a una velocidad de 2,2 mm/min. Finalmente, la figura (f) muestra una onda espiral rotante en músculo cardíaco aislado de perro. El período de rotación es de 180 ms (Davidenko *et al.* [27, 28]). En conexión con esta última observación experimental, en la figura 1.3 se muestra una simulación numérica de este sistema utilizando el modelo de FitzHugh-Nagumo.

Las características de la dinámica de la reacción de BZ pueden estudiarse a partir de varios modelos de reacción-difusión, en particular de uno conocido como el Oregonador [45]. Tyson y Keener [162] compararon el resultado numérico de este modelo con el experimento real, demostrando que un sistema sencillo de ecuaciones de reacción-difusión con sólo dos especies químicas (Oregonador), captura el comportamiento complejo de una reacción química en la que intervienen varias especies, interactuando en distintas escalas temporales (como es el caso de Belousov-Zhabotinsky), la cual a su vez imita el comportamiento de diversos sistemas biológicos reales, tal como enfatizamos anteriormente. Parte del valor de los modelos físicos en biología, es la síntesis que implica encontrar el conjunto mínimo de ingredientes que hace que un sistema biológico se comporte del modo que observamos.

Otro caso relevante de auto-organización espacial en un sistema biológico donde se forman patrones de tipo espiral tridimensionales [176], es el músculo cardíaco [177] (otro ejemplo de un medio excitable). Si bien la manera usual de estudiar el comportamiento del corazón es a través de la señal temporal del electrocardiograma, la información que se obtiene es un promedio complicado sobre la actividad eléctrica del órgano en su conjunto. Sin embargo, la evidencia clínica sugiere que la organización espacial de la actividad eléctrica es relevante para la función cardíaca normal [56, 57]. El corazón está compuesto por un número enorme de células de diferentes tipos,

donde el acoplamiento entre las células está gobernado por corrientes iónicas y otras sustancias llamadas mediadores. Bajo condiciones normales, la sincronización de las contracciones del músculo cardíaco se debe a la propagación de una onda eléctrica de excitación que forma un patrón conocido como *target* (un patrón de anillos concéntricos con forma de blanco de tiro) similar al que se observa en la reacción de BZ. La excitación se origina localmente, en un conjunto de células cuya dinámica es oscilatoria (marcapasos), con un período aproximado de un segundo. Fuera de esta región, el tejido cardíaco excitable retransmite la onda que les llega desde la zona del marcapasos. En ciertas situaciones patológicas, pueden aparecer otras estructuras distintas al patrón "target" emanando de la zona del marcapasos. Por ejemplo, si existe una pequeña región del tejido, cuyas características de excitabilidad son ligeramente distintas a las del resto de las células del corazón, la onda de excitación se perturba al pasar por esta región "anormal" y puede incluso quebrarse formando dos bordes libres. Estos bordes tienden a curvarse sobre sí mismos formando dos espirales, en forma completamente similar a la que ocurre en los experimentos de laboratorio con reactores químicos (nuevamente BZ es un buen ejemplo), donde se hace colisionar a un target con un defecto, formando un par de espirales cuyos bordes rotan en sentidos opuestos. La aniquilación del target junto con la consecuente aparición del patrón espiral, tiene graves consecuencias para el individuo, ya que la frecuencia a la que oscilará el tejido cardíaco es la del espiral, la cual es mucho mayor que la del target. Este efecto se cree que es el responsable de la taquicardia paroxística, en la que la frecuencia de los latidos puede incrementarse hasta en un factor 10. Muy interesante desde un punto de vista médico es el hecho de que el precursor de la rotura del target pueda ser un defecto topológico (singularidad) en un tejido homogéneo (sano), lo que parece ser un primer ejemplo de una *enfermedad dinámica* [179].

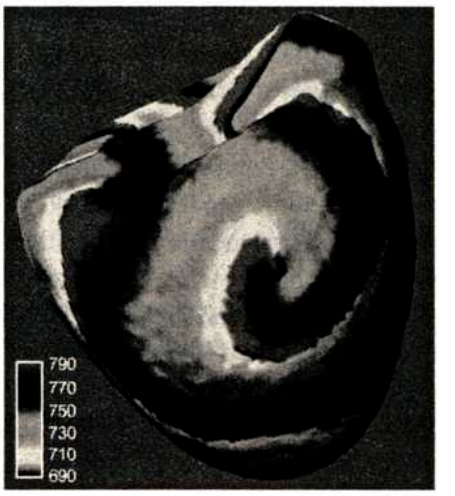

Figura 1.3: Onda de excitación espiral reentrante obtenida para la anatomía propia del corazón de un perro. El medio excitable se modeló a través de las ecuaciones de FitzHugh-Nagumo [57, 125]. El código de color corresponde a los tiempos de activación en milisegundos.

Un último ejemplo de formación de estructuras espacio-temporales son los *patrones de vegetación*, los que han sido largamente estudiados por botánicos y ecólogos [64, 98]. En varias zonas áridas de los continentes Africano, Australiano y Americano, se encuentran grandes extensiones territoriales en donde la vegetación está distribuida no-uniformemente, con una periodicidad espacial de 1 a 500 metros. Recientemente, se ha propuesto que el origen de este tipo de estructura es el juego entre las interacciones cooperativas de corto alcance involucradas en la reproducción, y las interacciones auto-inhibitorias de largo alcance originadas por la competencia por un re-

Figura 1.4: Fotografía de patrones de vegetación laberínticos [167].

curso escaso, como puede ser el agua [93]. La descripción de campo medio analizada en [93] reproduce todas las características topológicas de estas estructuras tanto en medios isótropos como anisótropos, y con diversos grados de aridez e inclinación del terreno. Se han introducido recientemente nuevos modelos, basados en la dinámica de las densidades de biomasa y de agua subterránea, los cuales reproducen toda la gama de patrones observados en zonas desérticas, tales como laberintos, manchas, agujeros y bandas [167].

1.2.3. Auto-organización en la teoría de la evolución

A partir del descubrimiento de la estructura química del material hereditario y de la información de la que es portador, el alcance de las ideas de Charles Darwin sobre la evolución de las especies ganó en profundidad, cambiando por completo el panorama de la biología del siglo XX. El hecho de que tanto el material genético como los mecanismos moleculares por los cuales su información es expresada, resulten invariantes a través de todos los seres vivos, dejó al descubierto de manera extraordinaria los lazos que unen a todas las formas de vida pasadas y presentes. La selección natural constituye, por otro lado, un mecanismo robusto no sólo para explicar la generación de orden y complejidad en escalas microevolutivas (donde la teoría está claramente definida), sino también para entender fenómenos característicos de las escalas macroevolutivas, tales como las extinciones en masa de especies, los procesos de especiación y diversificación. A partir del estudio de registros fósiles [142] surgen propiedades estadísticas tales como las leyes de potencia que vinculan la frecuencia de las extinciones con el tamaño de las mismas, las cuales han sido interpretadas tanto a través de modelos fenomenológicos a nivel macroevolutivo [5], como también a partir de modelos que describen la evolución temporal de una población de genotipos en paisajes adaptativos fluctuantes [54, 149].

Sin embargo, no es claro que la evolución biológica guiada por la selección natural operando sobre individuos con variaciones genéticas aleatorias (variaciones que además, son independientes de su utilidad respecto a la supervivencia y reproducción del individuo), sea capaz de explicar por sí sola cualquier cambio adaptativo, y menos aún, que el tiempo transcurrido desde la aparición de la vida en la Tierra haya sido suficiente para explicar la complejidad actual de los organismos [13]. La evidencia indica que los mecanismos espontáneos de auto-organización tienen un papel relevante en el desarrollo evolutivo. Ya hemos mencionado un ejemplo en este sentido, con la agregación espontánea de células individuales del *Dictyostelium Discoideum*. Efectivamente, un mecanismo de reacción-difusión actúa como disparador de la atracción entre las células, y explica cómo un grupo de células autónomas es capaz de comunicarse para generar un individuo pluricelular coherente. Desde un punto de vista evolutivo, la importancia crucial del paso entre organismos unicelulares a los multicelulares difícilmente pueda ser sobreestimada. Basta pensar en los cambios estructurales y funcionales que deben ocurrir para posibilitar la transformación de organismos cuyas escalas de longitud accesibles se reducen a unas decenas o centenas de micrones, a otros, que van desde algunos milímetros a varios metros. Tal como se advierte incluso en los casos intermedios donde una misma célula puede vivir aislada o formando colonias, el aumento de tamaño producido por la agrega-

[13] Ver, por ejemplo, los comentarios al respecto de J. Maynard Smith y R. Lewontin en el libro de S. Kauffman [79].

ción, trae aparejado el comienzo de la división de labores. La situación extrema la constituyen los organismos multicelulares. Una planta, por ejemplo, posee células especializadas en absorber agua y nutrientes en sus raíces, unos centímetros o metros hacia arriba, las células en las hojas están adaptadas para aprovechar la energía proveniente de la luz solar. Entre ellas, otro grupo de células trabaja para llevar los nutrientes y el agua de las raíces a las hojas.

Tal como ha sido enfatizado por Kauffman [79] haciendo referencia a los procesos de agregación de colonias unicelulares, debemos entender hasta qué punto la generación espontánea de organización y complejidad que subyace a los mecanismos de selección natural, es facilitada o limitada por las características (auto-organizativas) intrínsecas de los sistemas sobre los que actúa. Tanto experimentos como desarrollos teóricos aplicables a una etapa prebiótica [41], sugieren que quizás sea más apropiado pensar a la selección natural operando sobre entidades capaces de exhibir cierta clase de organización aún en ausencia de ella [79]. Por ejemplo, el proceso de diferenciación celular que comienza a partir del cigoto, constituye otra ilustración interesante en varios aspectos (algunos de los cuales discutiremos luego). El mecanismo de diferenciación produce varios tipos distintos de células, cuyo número varía según la complejidad del organismo. Es sabido que los seres vivos de menor complejidad poseen un menor número de tipos celulares. Por ejemplo, la levadura tiene 3 tipos celulares [6], la hydra y las esponjas, de 15 a 17 [15, 100], tanto las lombrices como los insectos, alrededor de 60 tipos celulares distintos [15]. En el ser humano, se calculan unas 250 clases de células [80]. Si se grafica el número de tipos celulares como función del número estimado de genes presentes en el organismo, se encuentra que existe una relación funcional, la que resulta ser extremadamente simple: el número de tipos celulares aumenta como la raíz cuadrada del número de genes, lo cual puede parecer notable, teniendo en cuenta que en la comparación entran organismos que divergieron en la evolución hace más de 600 millones de años. Podríamos estar inclinados a creer que por algún motivo aún desconocido, los organismos que cumplen con esta relación poseen ciertas ventajas con respecto a otros, y que por lo tanto el proceso de selección natural los favorece. El trabajo de Kauffman [79] muestra, sin embargo, que el orden que impone esta relación funcional no ha sido seleccionado, sino que es una de las características inevitables que se deducen de las propiedades generales de una red regulatoria de elementos interactuantes, del mismo tipo que la genómica. De este modo, es el juego entre este orden intrínseco que se genera de manera espontánea, y las fuerzas de selección quienes delinean la trayectoria en el camino de la evolución.

1.2.4. Auto-organización en la división celular

Cada vez que una célula se divide, las células hijas deben recibir la dotación de cromosomas correcta. Graves enfermedades (síndrome de Down, cáncer) pueden producirse al fallar este mecanismo en la meiosis o mitosis [115, 116, 117, 185]. El aparato mitótico es el gran protagonista de esta etapa de la división. Los microtúbulos, (polímeros de tubulina que conforman uno de los tres filamentos proteicos del citoesqueleto de toda célula eucariota [1]), no sólo constituyen el huso mitótico, sino que atrapan a los cromosomas en sitios específicos de unión (cinetocoros). Una característica de los microtúbulos, la inestabilidad dinámica (un proceso en el cual

la hidrólisis de GTP [14] es usada para producir cambios macroscópicos en la longitud del microtúbulo), permite el encuentro con los cinetocoros, los cuales a su vez estabilizan a los microtúbulos una vez que los han unido.

Cuando un mismo cromosoma es atrapado por microtúlos emanando de los polos opuestos del huso, el cromosoma es transportado hacia el ecuador del huso mitótico. Un proceso de conversión de la tensión de los microtúbulos en señales químicas es el responsable de indicarle a la célula que debe proseguir con la división, una vez que todos los cromosomas han sido llevados hasta el ecuador [1, 116, 117, 185]. Los experimentos de R. B. Nicklas [117, 185] son tan notables como contundentes al respecto: fue capaz de generar el estímulo químico que hace que la célula continúe la división normal a través de un estímulo mecánico artificial: simplemente enganchó con una aguja el cinetocoro de un cromosoma unido por microtúbulos a un único polo, tensándolos artificialmente (tirando de la aguja). La célula prosiguió con los estadíos subsecuentes. Ahora bien, ¿ son estas características claves del biopolímero el resultado de la selección natural, o son más bien intrínsecas a la molécula ? Diversos experimentos muestran que un conjunto de microtúbulos y motores moleculares *in vitro*, son capaces de formar espontáneamente un huso mitótico funcional en ausencia del entorno celular [70, 111], así como también es posible observar artificialmente la secuencia crecimiento y decrecimiento abrupto típica de la inestabilidad dinámica [53]. Puede decirse que las estructuras celulares son establecidas y mantenidas en el tiempo a través de una compleja interacción entre procesos regulatorios y de ensamblaje [85]. La auto-organización de los componentes moleculares da lugar a una variedad de posibles estructuras, las cuales son seleccionadas por la maquinaria regulatoria de las células para expresar una dada función. En este sentido, podemos inferir que una proteína como la tubulina persistió en la evolución dado que sus *propiedades auto-organizativas propias* resultaron funcionales en la célula.

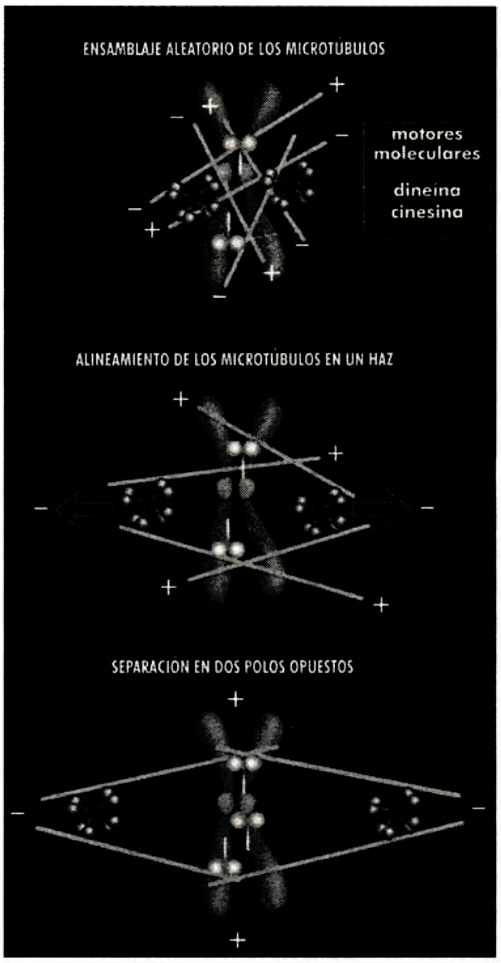

Figura 1.5: Auto-organización del huso mitótico [70].

1.3. Motivaciones para el presente trabajo

Los ejemplos de procesos de auto-organización que introduciremos a continuación (secciones 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3), han servido de motivación tanto para los desarrollos

[14] El GTP (guanosina trifosfato), es un nucleósido importante no sólo para el ensamblaje de los microtúbulos, sino para la síntesis de proteínas, de ARN, y para la señalización celular [1].

analíticos expuestos en la segunda parte (capítulos 2 y 3), como para las aplicaciones analizadas en la tercera parte (capítulos 4, 5, y 6) del presente trabajo. Es por ello que, a pesar de caber su mención dentro de los ejemplos de auto-organización espacio-temporal en seres vivos comentados en las secciones anteriores, preferimos incluirlos aquí, separados del resto.

1.3.1. La morfogénesis

La morfogénesis es el desarrollo de patrones y formas en un embrión. Luego de la fertilización del huevo (el cigoto), comienza un proceso de divisiones celulares. Cuando suficientes divisiones han ocurrido en un embrión en desarrollo, la pregunta clave es cómo ese conjunto de células idénticas, se auto-organiza espacialmente de modo que el proceso de desarrollo pueda proseguir, ya que en una etapa posterior, estas células (y sus hijas) serán parte de tejidos completamente diferenciados. La organización espacial es fundamental, ya que las células se diferencian de acuerdo al lugar que ocupan (información posicional) [1] y migran dentro del embrión en crecimiento. Lo notable es que el genoma de todas las células diferenciadas es el mismo, lo que cambia en ellas es el patrón con el cual los genes son expresados. Así, la diferenciación es el producto del encendido selectivo de distintos genes. El

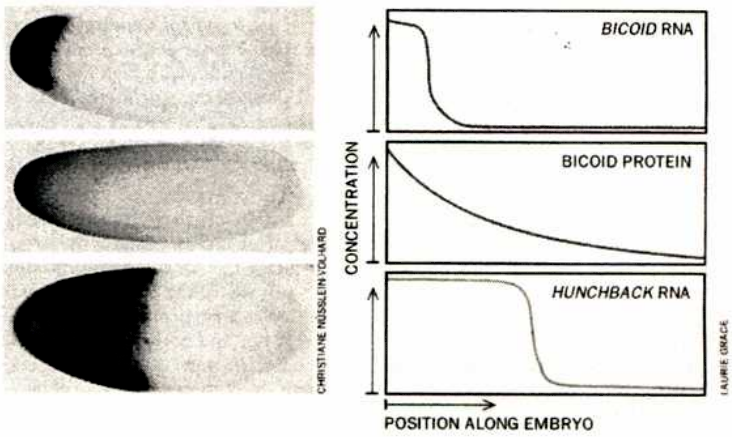

Figura 1.6: La distribución desigual de ARN mensajero a lo largo del eje antero-posterior de un embrión de la *drosophila melanoganster* (figuras de arriba), produce un gradiente de la proteína (bicoid) correspondiente (figuras centrales). Esta proteína actúa como factor de transcripción del gen hunchback [121]. A través de la manipulación de estos gradientes es posible producir embriones (inviables) que posean simetrías de reflexión artificiales, por ejemplo, embriones cuyos dos extremos correspondan a la cabeza, o al abdomen.

disparador para el encendido selectivo puede ser una división desigual del material citoplasmático [15], por el cual ciertas proteínas y especialmente $ARNm$ [16] superan ciertos umbrales. Asimismo, patrones espaciales pueden originarse en un conjunto

[15] El citoplasma es el contenido de la célula dentro de la membrana que rodea a la célula (membrana plasmática) y, en el caso de las células eucariotas, fuera del núcleo.

[16] El ácido ribonucleico mensajero ($ARNm$) es la clase de molécula de ARN que especifica la secuencia de aminoácidos con la que se formará una dada proteína.

de células idénticas por la aplicación de un mismo estímulo en todas ellas, pero de manera asincrónica, ya que las células están provistas de un reloj intracelular, y tienen memoria [1]. También es posible que la presencia de gradientes químicos de ciertas moléculas (morfógenos) a escalas intra o intercelulares, sean capaces de organizar un patrón de respuestas celulares [63, 97, 161, 181]. Esta última posibilidad fue analizada originalmente por Alan Turing en 1952, quien propuso un modelo sencillo (y extraordinariamente novedoso) en el trabajo "The chemical basis of morphogenesis" [161]. Allí, Turing demostró la plausibilidad de la formación espontánea de un patrón espacial estacionario de morfógenos en un medio inicialmente uniforme. Para ello supuso solamente la existencia de reacciones químicas y de un proceso de transporte difusivo de los morfógenos. Bajo ciertas condiciones que discutiremos en detalle más adelante (ver sección C del apéndice), la difusión es capaz de estabilizar estructuras inhomogéneas, las que podrían actuar posteriormente como promotoras de la diferenciación celular. La idea fue muy novedosa, teniendo en cuenta que, hasta entonces, la expresión típica de los procesos difusivos era la de suavizar gradientes, no la de estabilizarlos.

Una de las primeras aplicaciones de estas ideas es debida al mismo Turing, acerca del proceso que lleva a la formación de tentáculos en la *hydra*. Utilizando técnicas modernas de la biología molecular, en trabajos recientes sobre el hongo *Polyspondilium Discoideum* (un pariente cercano del *Dictyostelium Discoideum*) se presentan evidencias indirectas de que una inestabilidad de Turing podría operar en el proceso de diferenciación celular que se observa bajo condiciones extremas de inanición. Al reducir por debajo de cierto umbral la cantidad de bacterias de las que se alimentan las células independientes que conforman el *Polyspondilium Discoideum*, se produce la migración de las células individuales hacia un centro organizador formado por un grupo reducido de células que actúa como emisor de señales químicas (*cAMP*). Esta migración sincronizada por el estímulo, lleva a la formación de una masa celular compacta (sorogium), y a la posterior diferenciación en dos tipos celulares: uno con fines estructurales (las que forman el tallo), y otras con fines reproductivos (esporas). Para testear la hipótesis, Byrne y Cox [16] visualizaron el patrón naciente en el sorogium a nivel molecular, a través de la producción de anticuerpos monoclonales capaces de marcar antígenos específicos. La estructura macroscópica emergente en el *Polyspondilium Discoideum* fue coincidente con el prepatrón de antígenos, cuya distribución espacial es compatible con la presencia de una inestabilidad de Turing.

Un ejemplo de morfogénesis sobre el cual volveremos a lo largo de este trabajo, es la formación de filamentos en el alga marina *Acetabularia* (ver la figura 4.3). En este sistema, existen evidencias sobre la identidad de los morfógenos, y se ha propuesto un modelo que captura gran parte de las observaciones experimentales, tales como las mediciones sobre el efecto de agentes externos sobre la regeneración del tallo del alga, o el espaciado mismo entre los filamentos. Esta y otras evidencias parecen indicar que la naturaleza del patrón es compatible con la idea original de Turing [62, 107].

El sistema biológico más estudiado en cuanto al proceso de desarrollo que se inicia con el huevo fertilizado y finaliza en el adulto, es la mosca de la fruta *Drosophila*, para la cual, las preguntas claves como de qué forma las células son elegidas con un cierto propósito de acuerdo a su posición, o cuáles son los cambios moleculares y genéticos que ocurren dentro de la célula una vez que su destino se ha determinado, han sido en gran medida contestadas [91]. A medida que el huevo de la mosca

crece, comienza a segmentarse en un cierto número de regiones que se convertirán en las diferentes partes de la mosca adulta. La forma de estas regiones, llamados *discos imaginales*, es la de pequeñas elipses deformadas. Existe evidencia que estos discos a su vez se segmentan en subregiones más finas, las cuales adquieren roles específicos. El disco imaginal que da lugar a las alas de la mosca ha sido estudiado detalladamente. Según S. A. Kauffman *et. al.* [79, 81], la formación secuencial de estos compartimentos obedece un modelo de reacción-difusión sencillo, en el cual los compartimentos se agregan a medida que el disco crece simplemente porque aumenta el número de modos inestables compatibles con las dimensiones del disco. Las subregiones determinadas experimentalmente para el disco correspondiente a las alas de la drosophila son topológicamente cercanas al patrón ideal hallado por estos autores. En resumen, la evidencia indica que, a pesar de que la morfogénesis está controlada genéticamente, no son precisamente los genes quienes conducen el proceso que lleva a la formación del patrón espacial. Es más bien la conjunción de mecanismos espontáneos de organización espacio-temporal y de procesos aleatorios operando sobre los productos de los genes (e indirectamente sobre los genes mismos), los que subyacentemente guían esta etapa crucial en el desarrollo de un individuo.

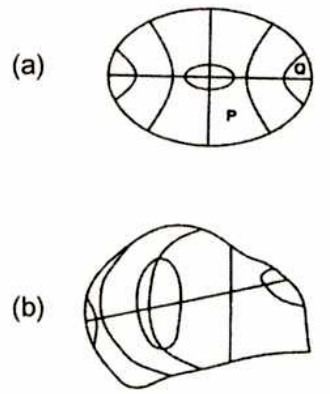

Figura 1.7: Comparación entre las subregiones del disco imaginal correspondientes al ala de la drosophila (a) determinadas experimentalmente, (b) a partir de un modelo de reacción-difusión [81].

1.3.2. La glucólisis

Seguramente, las primeras células que aparecieron en la historia de la vida en la Tierra eran similares a algunas bacterias que aun existen en la actualidad, mayormente en forma de parásitos. Pequeñas bolsas de membranas lipídico-proteicas llenas de agua, con algunos genes, enzimas y ribosomas. La capacidad de estas bacterias para producir sus propios nutrientes es limitada, y el reducido material genético que poseen es insuficiente para fabricar muchas de las proteínas que necesitan para su subsistencia y reproducción. Es por ello que estas bacterias eran (y son) especialistas en la importación de complejos moleculares del medio exterior (del mismo modo que hoy lo hacen de la planta o animal hospedador). Se cree que en el mundo en el que aparecieron las primeras células, había un enorme producción espontánea de compuestos orgánicos básicos. Para llevar a cabo los procesos internos esenciales de crecimiento y duplicación del material hereditario (*ADN*) y proteínas, a partir de sus precursores orgánicos, estas células necesitaron energía en forma de *ATP*. Los experimentos realizados en atmósferas semejantes a las que reinaban en esta era primitiva (el Arqueano Inferior), muestran que el *ATP* puede formarse espontáneamente con relativa facilidad [101]. Por lo tanto, se cree que inicialmente las células obtuvieron el *ATP* extrayéndolo del medio circundante. Conforme pasó el tiempo, probablemente la cantidad de *ATP* libre disminuyó, y sólo aquellas bacterias que desarrollaron un mecanismo interno para producirlo subsistieron. Como ejemplo rotundo de la idea de que en la evolución biológica, lo que tiene éxito se perpetua, un mecanismo extraordinariamente primitivo, sigue siendo muy utilizado en la ac-

tualidad por diversas células: *la fermentación* [17]. Como impronta de las condiciones atmosféricas que reinaban en el momento de su aparición, la fermentación es un proceso que se produce en ausencia de oxígeno, cuyo resultado es la formación de *ATP* a partir de la degradación de azúcares.

La mayoría de los organismos utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, cuyo efecto neto es la glucólisis [166]. En este proceso que involucra 10 pasos enzimáticos, la glucosa es degradada produciendo ácido pirúvico. Por cada molécula de glucosa que se degrada se producen dos de *ATP*. La glucólisis, probablemente la ruta metabólica más estudiada en bioquímica, provee a las células de una porción importante de la energía utilizable para las reacciones del metabolismo, y sus productos son la base para la degradación oxidativa posterior.

Bajo ciertas condiciones, la tasa a la que se produce la glucólisis es oscilatoria. El patrón oscilatorio de la producción de *ATP*, tanto en poblaciones de mitocondrias (*in vitro*) como en células intactas aisladas de *Saccharomyces carl bergensis* (*in vivo*) es el caso más estudiado en la literatura [13, 22, 72]. Recientemente, utilizando una suspensión de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se demostró la posibilidad de mantener en un estado oscilatorio permanente (bajo condiciones de no-equilibrio apropiadas) a un conjunto de células vivas [26]. Siendo la glucólisis

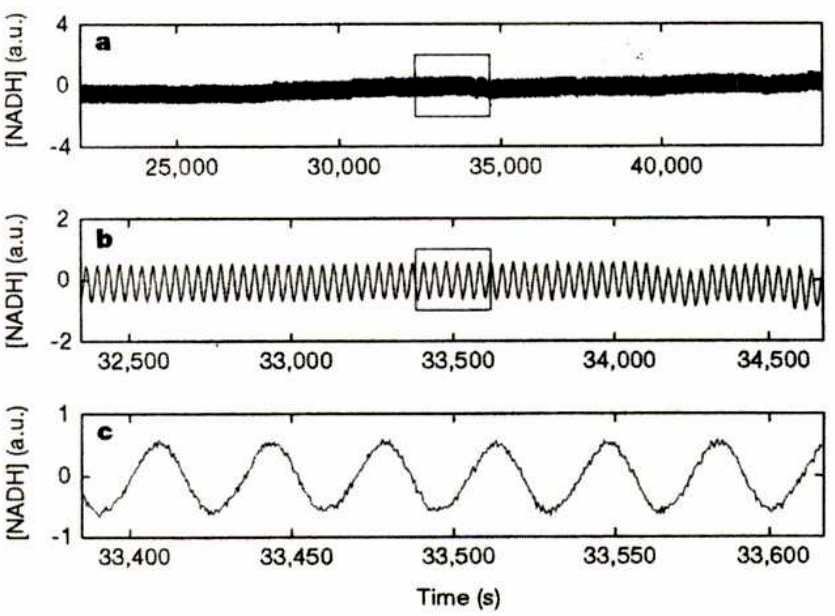

Figura 1.8: Oscilaciones glicolíticas en células vivas [26].

una ruta metabólica ubícua y esencial para la vida, se ha tratado de comprender mediante modelos teóricos, el orígen de este régimen oscilatorio en término de la

[17] Entre 1854 y 1864, Luis Pasteur estableció que la fermentación, antiguamente conocida en la producción del vino y la cerveza, se debía a la existencia de pequeños microorganismos. Unas décadas más tarde, Eduard Buchner demostró que extractos de células de levadura eran capaces de producir la fermentación, dando por tierra con las teorías en boga sobre las "fuerzas vitales" inherentes a la materia viva. El problema de la fermentación quedó desde entonces despojado de cualquier connotación que fuese más allá de lo que en verdad es: una simple cuestión de reacciones químicas propias del metabolismo celular.

bioquímica subyacente. A partir de un análisis detallado de los experimentos de la época [72, 131], Selkov [141] propuso que el paso catalizado por una enzima alostérica [18] (la fosfofructokinasa, *PFK*) era el responsable de producir las oscilaciones. Selkov escribió un modelo matemático para este paso central de la glucólisis, teniendo en cuenta en forma simplificada el alosterismo de la *PFK*. Su modelo fue posteriormente perfeccionado por Goldbeter y Lefever [61]. A pesar de la simplicidad y de las numerosas aproximaciones introducidas dentro del esquema de Selkov, gran parte de las características observadas en los experimentos se deducen del mismo. En el capítulo 5 expondremos este importante modelo de la glucólisis, y mostraremos que si acoplamos las reacciones con un proceso difusivo para el sustrato (ATP) y el producto (ADP), el sistema resultante es capaz de generar inhomogeneidades espaciales estacionarias (patrones de Turing). Es importante destacar que la posibilidad de que una reacción clave dentro de la bioquímica celular, sea a la vez un mecanismo promotor de inhomogeneidades intra y/o intercelulares, resulta sumamente interesante, ya que daría a las células la capacidad de crear dominios relativamente estables con alta concentración de ciertas moléculas. A pesar de no estar físicamente delimitados, dentro de estos dominios, ciertas reacciones o procesos metabólicos podrían llevarse a cabo de modo muy eficiente dada la alta concentración local de algunos insumos claves como el ATP. Si bien la existencia de este tipo de estructuras no ha sido hasta el momento reportada (aparentemente, su visualización sería sumamente compleja experimentalmente), la confirmación teórica que proveemos en el capítulo 5 *para un rango de parámetros razonables* [19], podría ser el motor de nuevos experimentos en este sentido.

1.3.3. Las ondas de calcio

La concentración de calcio libre en el citosol [20] de cualquier célula es extremadamente baja (menor que $10^{-7} molar$), mientras que la concentración extracelular o en los retículo endoplasmático (ER) [21] o sarcoplasmático (SR) [22] es mucho mayor ($\sim 10^{-3} molar$). Este gradiente tiende naturalmente a llevar Ca^{2+} hacia el citosol, a través de la membrana celular o de la del ER o SR. Cuando algún estímulo produce la apertura temporaria de canales transmembrana específicos al calcio, se produce un violento flujo de iones de Ca^{2+} a favor del gradiente, los cuales son capturados por diversas moléculas activando en la célula respuestas específicas. Diversos tipos de bombas activas y de proteínas especializadas en unir iones de calcio, se encargan de mantener la concentración intracelular de Ca^{2+} en valores suficientemente bajos, que garantizan entre otras cosas, el funcionamiento normal de este importante mecanismo de señalización. La primera evidencia del rol de los iones de calcio como

[18] Una enzima es alostérica, cuando su afinidad por el sustrato puede ser modificada (activada o inhibida) debido a la unión de otra molécula en un sitio regulador de la enzima.

[19] En el trabajo de Hasslacher, Kapral y Lawniczak [69], se encuentran numéricamente patrones de Turing de tamaño micrométrico en un modelo levemente distinto de la glucólisis [134]. Sin embargo, el cociente de las difusividades libres del ATP y el ADP utilizado en este trabajo es absolutamente ficticio, y el argumento expuesto para justificarlo, es, como veremos en el capítulo 4, incorrecto.

[20] Es el contenido de los compartimentos más importantes de citoplasma, excluyendo organelas tales como el retículo endoplasmático, o las mitocondrias [1].

[21] Compartimento de forma laberíntica ubicado en el citoplasma de células eucariotas, rodeado por una membrana, en el que se sintetizan lípidos y proteínas de membrana [1].

[22] Red de membranas internas en el citoplasma de células musculares. Los iones de calcio secuestrados dentro de este retículo son liberados al citosol en el momento de la excitación del músculo [1].

segundos mensajeros [23] en las células provino de la observación de que la inyección de pequeñas cantidades de Ca^{2+} eran capaces de provocar la contracción de músculo esquelético. En efecto, en la mayoría de las células capaces de contraerse (sean estas musculares o no), la contracción es producida por el deslizamiento de filamentos de actina [24] contra moléculas de miosina [25]. La actividad contráctil es controlada por la fosforilación (regulada por Ca^{2+}) de cadenas de miosina [1]. La perfección de los mecanismos moleculares (en este caso particular, responsables de la contracción) se advierte al observar que la misma señal de Ca^{2+} que inicia la contracción, asegura que haya suficiente glucosa presente como para propulsar el trabajo del músculo, anticipando de este modo el incremento en la demanda de energía [1]. La rol del Ca^{2+} como mensajero intracelular se pone en evidencia a través de otros tipos de respuestas celulares, incluyendo la secreción de neurotransmisores en una sinapsis química entre dos células nerviosas, y la proliferación celular. Una de las rutas de señalización más ubicuas en todo tipo de células eucariotas es a través de iones de calcio. En esta ruta, la unión de moléculas del medio extracelular en receptores específicos de membrana, causa la liberación de calcio desde el *ER*. Los eventos de unión al receptor y liberación en el *ER* están acoplados a través de otra molécula señalizadora, el IP_3 (inositol trifosfato).

Uno de los fenómenos de auto-organización espacio-temporal más interesantes observados en diversas células es la propagación de ondas de calcio. Tal como hemos mencionado anteriormente, la concentración de calcio intracelular frecuentemente experimenta oscilaciones temporales en respuesta a agonistas tales como hormonas o neurotransmisores. Estas oscilaciones no ocurren en forma uniforme a lo largo de la célula, sino que se propagan a través de la misma como ondas. El fenómeno de la propagación de *ondas intracelulares* es particularmente claro en células de gran tamaño, como en los ovocitos de *Xenopus Laevis* (huevos de rana, de 600 μm), donde utilizando un microscopio confocal, pueden observarse distintos tipos de patrones dinámicos, tales como ondas planas, espirales y concéntricas *in vivo* [92]. Existen diferentes tipos de propagación del calcio intracelular. Por ejemplo, mientras que en ovocitos inmaduros de *Xenopus*, la propagación ocurre de un modo saltatorio [17, 126, 127, 182], en la fertilización del ovocito maduro, la propagación es continua [51]. En varios tipos de células (entre las cuales se encuentran las del hipocampo cerebral, del hígado, epiteliales y gliales), se han observado ondas de calcio propagándose entre células. Así como la función exacta de los pulsos repetitivos de calcio intracelular sigue siendo aún materia de debate, lo mismo sucede

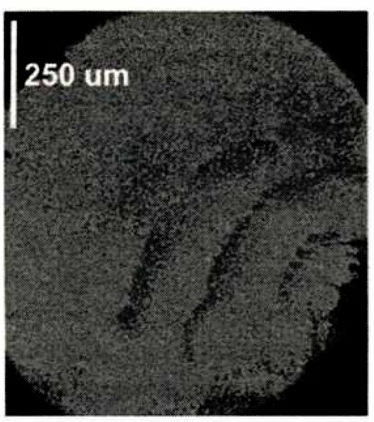

Figura 1.9: Onda de calcio intracelular en un ovocito de Xenopus Laevis en respuesta a un aumento de la concentración de IP_3 [17].

[23] Pequeñas moléculas que son formadas o liberadas en el citosol en respuesta a señales externas, y que colaboran en la retransmisión de la señal hacia el interior de la célula. Además del Ca^{2+}, el IP_3, el $cAMP$ son otros ejemplos de segundos mensajeros.

[24] Proteína helicoidal formada por la polimerización de moléculas de actina globulares. Es un componente esencial del citoesqueleto de todas las células eucariotas, y forma parte del aparato contráctil del músculo esquelético [1].

[25] Más exactamentente, miosina II, que es una clase de motor molecular que utiliza ATP para producir movimientos a lo largo de filamentos de actina. Esta clase de miosina forma filamentos que se deslizan sobre los de actina durante las contracciones.

con las ondas de calcio intra o intercelulares. Se supone que son importantes para comunicar a distintas partes de una misma célula o para llevar información entre células, y que son incluso capaces de sincronizar una respuesta multicelular a un estímulo localizado.

Uno de los problemas teóricos fundamentales referidos a las ondas de calcio, es comprender el mecanismo subyacente que origina la propagación. A pesar de que existen controversias al respecto, y que además, el mecanismo exacto pueda diferir entre los distintos tipos celulares, es aceptado que las ondas intracelulares están gobernadas por la difusión de calcio entre sitios localizados de liberación. Estos sitios corresponden a canales de calcio, los cuales individualmente o formando pequeños grupos, liberan iones almacenados en altas concentraciones dentro de compartimientos específicos, tales como el *SR* o el *ER*. Uno de los mecanismos propuestos es el de la liberación de calcio inducida por el propio calcio (conocido como *calcium induced calcium release (CICR)*). El *fire-diffuse-fire (FDF)* es uno de los modelos esquemáticos que mejor capturan el mecanismo de propagación implícito en el proceso de *CICR*, y tiene la gran ventaja de que, en su versión más simple, es exactamente soluble. El *FDF* asume que existe un arreglo unidimensional de fuentes puntuales (canales o clusters) equiespaciados, ubicados en un continuo donde los iones de calcio pueden difundir. La sensibilidad de los canales de calcio respecto a la concentración del mismo en el citosol, se simplifica introduciendo un valor umbral, el cual, una vez sobrepasado, produce la apertura del canal de calcio (o conjunto de canales), permitiendo la difusión a favor del gradiente de un pulso de Ca^{2+}. Los iones posteriormente difunden en el citoplasma, provocando eventualmente la liberación en sitios apartados del mismo [33, 36, 84, 157]. Esta clase de modelos reproduce diversas observaciones experimentales, y en particular sirve para explicar la existencia de los dos tipos de propagación (continua y saltatoria) en función de la distancia media entre canales, la corriente iónica que atraviesa los canales, el tiempo medio que los canales permanecen abiertos y un coeficiente de difusión efectivo para el calcio, que tiene en cuenta en forma simplificada la presencia de proteínas especializadas en unir rápidamente iones de calcio (*buffers* de calcio endógenos). La importancia de la interacción del calcio con los buffers se pone de manifiesto al considerar que, a diferencia de lo que ocurre con otros segundos mensajeros, el calcio no puede ser metabolizado, y su presencia, si bien es esencial para la vida de las células, conduce a la muerte celular ante una exposición prolongada a niveles elevados. Por lo tanto, el citoplasma de las células está poblado por numerosos buffers, con uno o más sitios de ligadura para el calcio. En la mayoría de las células, cerca del 99 % del calcio se halla ligado en grandes complejos proteicos [83].

1.4. Sistemas de reacción-difusión

Así como las ecuaciones de Navier-Stokes constituyen el modelo estándar de los fluidos clásicos, las ecuaciones de reacción-difusión (RDE [26]) caracterizan la dinámica macroscópica espacio-temporal de un sistema en el cual las moléculas experimentan transformaciones químicas, y están sujetas a un movimiento térmico perpetuo [27]. Como vimos en las secciones anteriores, gran parte de los fenómenos biológicos pue-

[26] Reaction-Diffusion Equations

[27] Las RDE representan un caso particular de las ecuaciones en derivadas parciales (A.2) (ver apéndice A), donde los términos que involucran los gradientes están ausentes, y cuando la matriz $D_{ij} = D_i\delta_{ij}$, con $\delta_{ij} = 0$ si $i \neq j$, y 1 cuando $i = j$.

den ser interpretados partiendo de una descripción en término de un conjunto de RDE. Es por ello que este tipo de ecuaciones *constituyen las herramientas centrales a lo largo de este trabajo.*

La forma genérica de las ecuaciones de reacción-difusión puede obtenerse tanto a partir de un análisis microscópico como macroscópico. La derivación desde un punto de vista macroscópico es más sencilla, ya que resulta de la aplicación directa del teorema de la divergencia [136]. Vale aclarar, sin embargo, que tanto la interpretación física de los coeficientes de transporte que se definen (las difusividades de las distintas especies), como sus valores numéricos, están fuera del alcance de la derivación fenomenológica de estas ecuaciones, y por lo tanto deben ser determinados en forma experimental, o bien a través de una teoría microscópica del proceso de transporte [55, 180].

En el contexto de la derivación macroscópica que desarrollaremos a continuación, las RDE representan las leyes de conservación de la cantidad de un conjunto de reactivos, suponiendo un tipo particular de flujo (transporte difusivo). Si $U_i(\mathbf{x},t)$ es la concentración de la especie *i-ésima* en el punto $\mathbf{x}$ a tiempo t, y tomamos una superficie arbitratria Σ encerrando un volumen V, la cantidad de partículas de esta especie dentro del volumen es $\int_V U_i(\mathbf{x},t)d\mathbf{x}$. En forma general, podemos decir que la tasa de variación de esta cantidad puede deberse a un flujo neto a través de la superficie Σ, a la creación (destrucción) de partículas como consecuencia de reacciones químicas, o a la presencia de fuentes (sumideros) dentro en V. Esto es:

$$\frac{\partial}{\partial t}\int_V U_i(\mathbf{x},t)d\mathbf{x} = -\int_\Sigma \mathbf{J}_i \cdot d\mathbf{S} + \int_V F_i(\{U\},\mathbf{x},t)d\mathbf{x} \tag{1.1}$$

donde $\mathbf{J}_i$ representa el flujo de materia de la especie *i-ésima*, y F_i las reacciones que involucran a la especie *i-ésima*, y/o las fuentes (o sumideros) de estas partículas. En principio, el término de reacción puede depender explícitamente tanto de las concentraciones del conjunto de especies con las cuales la especie *i-ésima* interactúa, como de la posición y el tiempo. Usualmente, la forma explícita de las reacciones es provista por la ley de acción de masas (ver la sección 2.3). Aplicando el teorema de la divergencia a la integral de superficie y suponiendo que U_i es una función continua, llegamos a la ecuación de conservación deseada:

$$\frac{\partial U_i}{\partial t} + \nabla \cdot \mathbf{J}_i = F_i(\{U\},\mathbf{x},t)\,. \tag{1.2}$$

Si $\mathbf{J}_i = -D_i \nabla U_i$ (ley de Fick) obtenemos:

$$\frac{\partial U_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 U_i + F_i(\{U\},\mathbf{x},t)\,, \tag{1.3}$$

las cuales representan el sistema de ecuaciones de reacción-difusión buscado, siendo D_i el coeficiente de difusión de la *i-ésima* especie, que por simplicidad se considera constante, aunque en general puede depender tanto de la posición en el espacio como de la concentración U_i. Un análisis microscópico sencillo es suficiente para demostrar que el coeficiente de difusión D_i es proporcional al producto del camino libre medio de una partícula de la especie *i-ésima* y la velocidad media de la misma [28] [133].

Los sistemas de reacción-difusión son el típico ejemplo de sistemas *espacialmente extendidos* (ver A.0.2). Excepto en casos excepcionales, a pesar de la simplicidad

[28] Es decir, a la distancia promedio que recorre una partícula entre dos choques sucesivos con el solvente que está implícito dentro de la hipótesis del transporte difusivo.

aparente de estas ecuaciones, es imposible obtener soluciones analíticas, es decir, hallar una función de las coordenadas y el tiempo que satisfaga las ecuaciones en derivadas parciales (1.3), junto con una condición inicial para cada campo y condiciones en los contornos. Sin embargo, gracias a la capacidad de cómputo actual, es posible determinar y visualizar la evolución de un sistema de ecuaciones de reacción-difusión en forma numérica, dado un conjunto de parámetros (en el caso de las RDE, los coeficientes de difusión y tasas de reacción). Analíticamente, en principio es posible determinar los comportamientos esperables segun los valores de estos parámetros [29]. En este sentido, los dos enfoques se utilizan en forma complementaria. Desde el punto de vista analítico, la identificación de parámetros adimensionales pequeños en un sistema cualquiera permite simplificar las ecuaciones de partida a través de un enfoque perturbativo. Una parte importante de este trabajo explota este hecho para el caso de sistemas de reacción-difusión, teniendo en cuenta que, en la gran mayoría de los sistemas biológicos capaces de ser descriptos por medio de estas ecuaciones, la presencia de múltiples escalas temporales está garantizada, y por lo tanto, la definición de uno o más parámetros pequeños es directa en término de distintos cocientes entre escalas.

1.5. La importancia de las escalas en la naturaleza

Una de las características más básicas de los sistemas naturales es la enorme diversidad en escalas espaciales y temporales. Excepto en situaciones especiales donde un mismo fenómeno abarca al mismo tiempo todas las escalas, en general no es necesario hacer una descripción detallada de todas las escalas simultáneamente. Este hecho asombroso de la naturaleza es, en última instancia, el que permite analizar cada rango de escalas en forma independiente, en el sentido que tanto la dinámica de los elementos de las escalas más finas, como sus interacciones, pueden ser descriptos con un grado de detalle relativamente bajo en las escalas más gruesas [30]. De este modo, la identificación de diversas escalas espaciales y temporales de los procesos que forman parte de un sistema, es una de las primeras herramientas que sirven para simplificar el análisis, al evitarnos considerar cuestiones irrelevantes provenientes de procesos que ocurren en otras escalas. Por ejemplo, para describir una ola o una corriente oceánica, no es necesario amplificar primero una gota mil millones de veces, para ver que es un conjunto de moléculas de 10^{-8} cms de longitud, y describir luego el movimiento de cada una, procurando entender a partir de esa escala el comportamiento agregado de todas ellas. Suponer que el medio es un continuo es una aproximación suficiente. Por el contrario, si lo que nos interesa es un fenómeno asociado a la interacción entre dos moléculas vecinas, será igual si la misma ocurre en el mar o en el vaso que tengo en mi escritorio.

[29] Ver, por ejemplo, el apéndice C. Ejemplos más completos de este tipo puede encontrarse en [25] y en [170].

[30] Uno de los ejemplos mejor estudiados con respecto al tratamiento de las distintas escalas es el modelo usual de un fluido clásico disipativo. Estos fluidos se representan mediante las ecuaciones de Navier-Stokes, las cuales pueden obtenerse aplicando las leyes de conservación de la masa, el momento y la energía a un elemento de fluido, sin hacer mayores referencias a la naturaleza discreta de sus componentes [89]. Las interacciones entre los átomos se manifiestan a través de coeficientes de transporte tales como la conductividad térmica o la viscosidad, los cuales –en este contexto– no sólo carecen de una interpretación directa, sino que sus valores deben ser introducidos desde afuera del modelo fenomenológico. Al igual que en el caso de las RDE, sólo en las teorías de fluidos microscópicas, la interpretación física y los valores de estos parámetros surgen de manera endógena, al hacer las aproximaciones y desarrollos compatibles con el límite continuo.

Un ejemplo más afín a esta tesis lo constituyen las reacciones químicas. El proceso que lleva a la disociación de un complejo molecular, por ejemplo, involucra el paso por diversos estados vibracionales internos, los cuales se recorren a medida que la molécula colisiona con otras, cediendo o absorbiendo energía. El paseo entre estados vibracionales hasta el momento en el que el complejo remonta la barrera energética que mantiene ligadas a las distintas moléculas que lo componen, resulta irrelevante en una escala de tiempo grande con respecto a los tiempos típicos que duran los procesos involucrados en las transformaciones reactivas. En esta escala gruesa, el estado del sistema en un dado instante queda definido exclusivamente a través del número presente de moléculas de cada especie, sin importar la distribución de las mismas sobre el conjunto de estados internos [31]. La evolución estará dada por los cambios en estos números durante intervalos de tiempo sucesivos. De esta manera, la información de la distribución sobre los distintos estados vibracionales se condensa en este nivel en una simple probabilidad por unidad de tiempo de que un dado complejo se disocie.

Gran parte del éxito de la física ha sido aislar en cada situación, un rango limitado de escalas y proveer una descripción rigurosa de lo que ocurre para ese rango particular. Desde un punto de vista práctico, la identificación de las diversas escalas en un problema tiene otra ventaja adicional importante: puede definirse un parámetro pequeño (cuyo significado físico depende del sistema particular) el cual permite simplificar la descripción a través de un análisis perturbativo, tal como veremos en detalle en el Capítulo 2.

1.5.1. El rol de las escalas temporales y espaciales en biología

La presencia de diversas escalas temporales es una propiedad inherente de todos los sistemas biológicos. Al nivel más global de ecosistemas, las comunidades de especies que los componen evolucionan al ritmo de los cambios en el entorno físico, de las variaciones en las relaciones entre las especies, de los cambios evolutivos que se generan dentro de las mismas especies, o de la llegada y/o migración de algunas poblaciones. Existe una distribución de tiempos característicos para cada uno de estos procesos, que van desde algunas decenas hasta varios miles de años [37]. Asimismo, en cada uno de los individuos que componen un ecosistema, coexisten diversos procesos con tiempos característicos que varían en más de 7 órdenes de magnitud [59]. Al nivel más fino, en las células, son las reacciones químicas las que imponen las reglas de reproducción y muerte para las diferentes especies moleculares que las componen. La figura 1.10 sintetiza la enorme complejidad de la redes de interacciones del metabolismo celular, a través de las rutas más importantes en células eucariotas. Tanto los tiempos característicos de cada una de estas rutas, como los de las reacciones individuales que componen una cualquiera de ellas, abarcan escalas temporales de lo más diversas. El hecho de que las decenas de miles de reacciones simultáneas procedan de un modo regular y hasta cierto punto predecible, respondiendo apropiadamente a las variaciones del entorno, indica evidentemente un alto grado de organización. Esta organización se logra a través de una *jerarquía* que involucra diversas escalas temporales y espaciales, a través de la cual cada célula convierte procesos microscópicos desordenados como intrínsecamente lo son el transporte y las reacciones, en mecanismos robustos, que se manifiestan a través de redes

[31] Excepto por la hipótesis de que esta distribución es la de equilibrio.

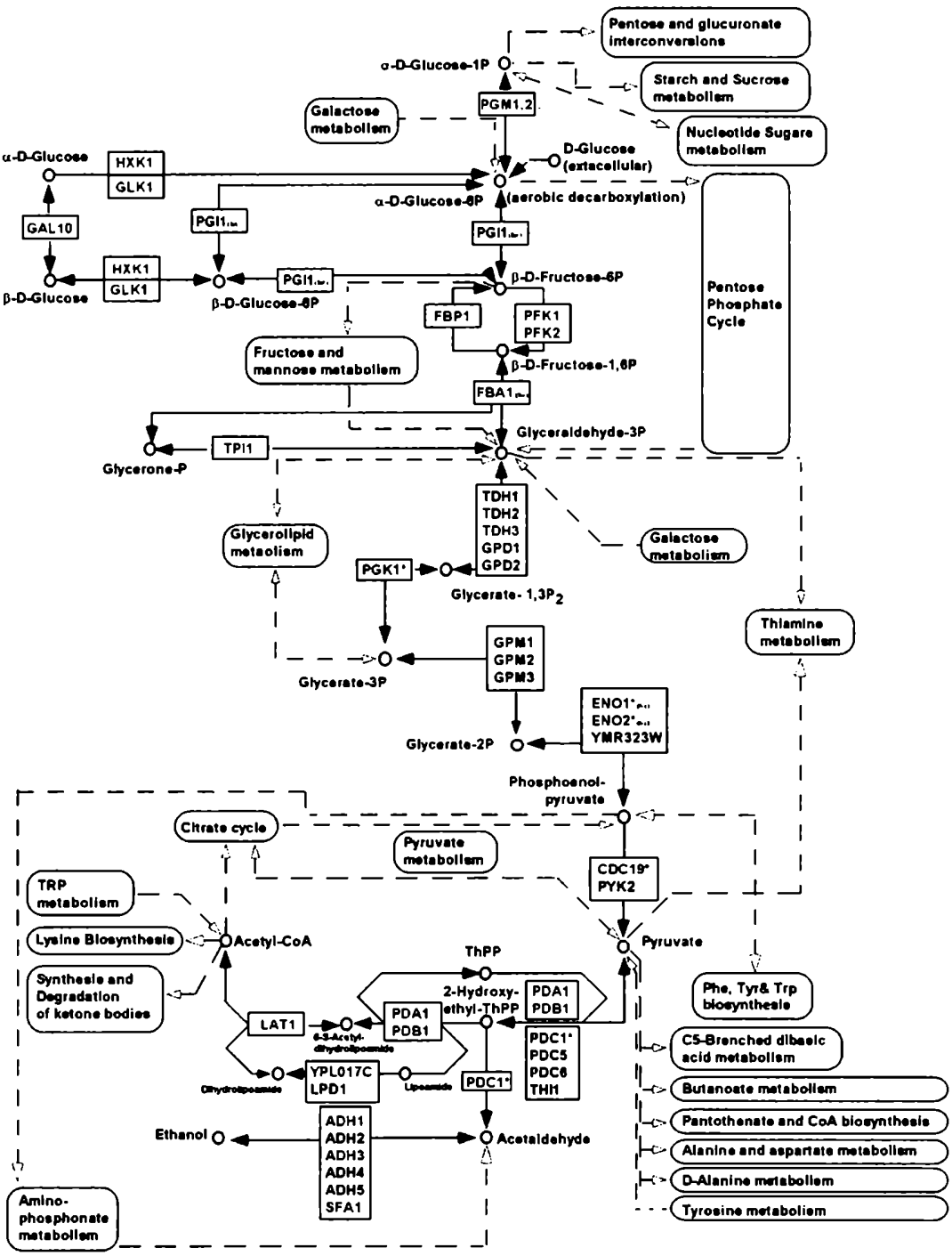

Figura 1.10: Mapa con las interacciones entre la glucólisis y las principales rutas metabólicas de las células (sintetizadas con sus nombres recuadrados). Todas las rutas metabólicas involucran diversos pasos enzimáticos, con diferentes energías de activación, y por lo tanto, con tiempos característicos muy disímiles. La glucólisis juega un rol preponderante en un tramo de la *cadena de degradación* que comienza en los alimentos ingeridos (proteínas, lípidos, polisacáridos), y finaliza en las pequeñas subunidades útiles para las células del organismo, tales como el *ATP*. La hidrólisis del *ATP*, por ejemplo, se acopla a reacciones energéticamente desfavorables, como las de biosíntesis, permitiendo de este modo la formación de los grandes complejos moleculares necesarios para el mantenimiento y función de las células.

de máquinas moleculares (proteínas) operando a una escala global (celular). Esta jerarquía hace que la dinámica que hace posible la vida de una célula, sea mucho más elaborada que los mecanismos aleatorios de reacción y difusión que la subyacen. Las proteínas, valiéndose de estos mecanismos básicos [32], operan en una escala superior, interactuando con otras proteínas o conjuntos de ellas para llevar a cabo cada uno del los procesos básicos de la célula. Cualquiera de los procesos relevantes en una célula está gobernado por complejos de al menos diez proteínas distintas [1]. En una escala aún mayor, grupos de estos complejos interactúan en sintonía para llevar a cabo la tarea necesaria. Por ejemplo, en la degradación específica de ciertas proteínas que se produce durante la mitosis, un complejo de unas 10 proteínas selecciona una proteína a ser degradada y le coloca una especie de "marca". Luego, otro complejo de unas 20 proteínas la ubica, y la transfiere a la máquina degradadora, que no es más que otro complejo proteico que la convierte en un conjunto de péptidos. La existencia de compartimentos dentro de la célula (organización espacial) está relacionada con la eficiencia necesaria para algunas de estas reacciones. Mikhailov y Hess [105] han propuesto que el modo sincrónico [33] con el que –se estima– operan ciertas maquinarias de producción biológicas, puede autogenerarse, siempre que el volumen en el cual se producen las reacciones sea lo suficientemente reducido. La aparición espontánea de este comportamiento coherente, constituye uno de los primeros ejemplos de auto-organización en un sistema biológico a nivel microscópico (escala molecular) [105].

1.6. Esquema de la tesis

En este trabajo nos centraremos en algunos aspectos referidos a mecanismos que originan orden a nivel celular. Para ello, analizaremos el rol que juegan las diversas escalas temporales de la bioquímica celular, en las rutas de auto-organización relacionadas con mecanismos de reacción-difusión.

En el capítulo 2, desarrollaremos dos métodos sistemáticos para simplificar sistemas de reacción-difusión en los cuales todos los procesos pueden clasificarse dentro de dos grandes categorías: rápidos y lentos. El objetivo es encontrar un conjunto de ecuaciones reducidas (de menor dimensión que el sistema original) que describa la dinámica en la escala lenta, que es usualmente la única escala accesible experimentalmente. La interpretación desde un punto de vista microscópico de esta reducción está fuera del alcance de estos métodos, ya que el punto de partida para ambos es la descripción macroscópica promediada que refleja el conjunto de ecuaciones de reacción-difusión. Esto hace difícil o imposible (excepto en ciertas circunstancias excepcionales) comprender físicamente el origen de los términos que aparecen en el sistema reducido. Para una reacción relativamente sencilla, el análisis desde

[32] Para tener dimensión de las velocidades de los procesos celulares, notemos que en el lapso de un segundo, mientras una enzima típica es bombardeada aleatoriamente por millones de moléculas de agua, haciéndola rotar alrededor de diferentes ejes, su sitio activo es embestido por las moléculas de su sustrato específico unas 500,000 veces (asumiendo una concentración de sustrato igual a 0,5 milimolar (mM), es decir, suponiendo que hay 10^5 moléculas de agua por cada una de sustrato).

[33] En este modo, los productos de una máquina son generados en el momento exacto en el que otra máquina los necesita. De esta manera, se agiliza notablemente toda la cadena de producción, y se evita la generación de moléculas que se degradan antes de ser utilizadas por la maquinaria posterior en el proceso. A diferencia del modo sincrónico, en el asincrónico, los productos de una máquina son "depositados" en un reservorio (citoplasma) para el uso posterior (eventual) por otras máquinas moleculares.

un punto de vista microscópico está desarrollado en el capítulo 3, aunque las conclusiones pueden extenderse a casos más complicados, ya que la clase de términos que surgen en las ecuaciones reducidas son, en cierta medida, universales. En el capítulo 4 estudiamos de qué forma la existencia de varias escalas temporales en un sistema de reacción-difusión del tipo activador-inhibidor, altera la posibilidad de observar estructuras inhomogéneas estacionarias en las concentraciones de los reactivos (patrones de Turing). El método desarrollado en el capítulo 2 permite sacar conclusiones muy generales sin tener que especificar un mecanismo particular de activación–inhibición. Como veremos, la clase de resultados derivados en esta sección pueden ser útiles para aquéllos que diseñan experimentos en los cuales se desea observar patrones de Turing. Por otro lado, constituyen un punto de partida más realista en el intento de identificación de los morfógenos responsables de la diferenciación celular. La primera aplicación concreta de la reducción en un sistema de interés biológico es a través de una modificación del modelo de Schnackenberg (sección 4.5), el cual ha sido utilizado para explicar ciertas características morfológicas en una alga marina (Acetabularia). En el capítulo 5 analizamos la dinámica espacio-temporal que surge de un mecanismo crucial (y ubicuo) para las células como es la glucólisis (ver 1.3.2). Incorporando la dinámica rápida de las reacciones del ATP y el ADP con las enzimas y los complejos, obtenemos las ecuaciones que rigen la dinámica espacio-temporal en la escala lenta. El análisis del sistema reducido muestra que, debido a la interacción selectiva con las enzimas, las difusividades libres y la cinética se reescalean de modo tal que, en una región de los parámetros del problema que es física y biológicamente plausible, es de esperar la aparición de patrones de Turing. Finalmente, en el capítulo 6 analizamos la validez de las ecuaciones reducidas en el problema de la difusión de calcio intracelular en presencia de buffers, en las cercanías de canales de calcio. El sistema reducido para este caso (obtenido por primera vez por Wagner y Keizer [168]) ha sido extensivamente utilizado en la literatura para analizar resultados experimentales en este problema que es de enorme interés biológico. Como veremos, a diferencia de lo que ocurre en los casos previos donde aplicamos el método de reducción, en este caso, la identificación de los procesos rápidos y lentos puede cambiar en forma dinámica, invalidando *a priori* las hipótesis necesarias para la aplicación del formalismo, al menos en las regiones cercanas a la boca de los canales de calcio. Analizaremos un caso relevante desde el punto de vista biológico (el de la propagación de ondas de calcio intracelular), donde las diferencias entre el tratamiento exacto y reducido puede resultar crucial. Posteriormente discutimos las conclusiones de la tesis y las perspectivas que abre para futuros trabajos. Para hacer la presentación más autocontenida, al final se incluye un apéndice sobre ecuaciones diferenciales, donde se exponen las diferencias entre los sistemas homogéneos y espacialmente extendidos. Sugerimos que aquellos lectores no familiarizados con estos términos prosigan con la lectura de la tesis luego de leer este material accesorio. Los demás apéndices contienen material complementario de algunos capítulos.

2. Reducción de un sistema de reacción-difusión

Experience has taught us that in spite of our ignorance of most of the microscopic variables it is still possible to detect regularities in the macroscopic behavior and formulate them in laws ... It is the task of the physicist to explain how this miracle comes about, and in particular to understand what distinguishes the irrelevant microscopic variables from the remaining macroscopic ones.
Van Kampen [164].

2.1. Resumen

Frecuentemente, los sistemas naturales están gobernados por procesos que ocurren en escalas de tiempo muy diferentes. Cuando esto ocurre, suele ser posible reducir el número de ecuaciones diferenciales que describen matemáticamente su evolución, incorporando la dinámica rápida en las escalas más lentas. Para sistemas espacialmente homogéneos (capaces de ser descriptos a través de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) [1]), existen métodos sistemáticos para reducir la dimensionalidad del problema, con la consiguiente simplificación en el análisis. Para sistemas extensos (descriptos a través de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales (PDE) [2]), esta reducción suele ser más compleja. En ciertos casos, es posible utilizar algunos métodos sistemáticos heredados del análisis de las ODE, para incorporar los procesos rápidos como perturbaciones de soluciones estacionarias tanto en los mismos campos cuya evolución describe el conjunto de PDE, como en los valores que toma el campo en los contornos o en la posición de éstos [74].

Los sistemas de reacción difusión discutidos en la introducción, son el ejemplo más relevante de sistemas extensos dentro del campo de la biología. El comportamiento de un conjunto de ecuaciones de reacción difusión depende de la velocidad relativa de los procesos de reacción y difusión. En diversas situaciones resulta válido suponer que el sistema que pretendemos describir se encuentra en una de las dos siguientes situaciones extremas, en las cuales el análisis es más sencillo. En la primera, la difusión es suficientemente rápida comparada con las reacciones, de modo que las concentraciones resultan en todo momento uniformes a lo largo del volumen donde evoluciona el sistema. En esta situación, los términos de transporte (que son proporcionales a los laplacianos de las concentraciones) se anulan, y el comportamiento es controlado únicamente por las reacciones locales. Esto lleva a una enorme simplificación, ya que la descripción puede hacerse en términos de un conjunto de ecuaciones ordinarias, por tratarse de un sistema espacialmente homogéneo. Este conjunto incluso puede ser posteriormente simplificado si entre las reacciones existen diversas escalas de tiempo. En la próxima sección se ofrece un breve resumen de los métodos de reducción de la dimensionalidad de sistemas dinámicos homogéneos, con especial hincapié en aquellos que se basan en la presencia de varias escalas temporales. A pesar de que el caso límite opuesto, donde la difusión de los reactivos

[1] Ver la sección A.0.1 del apéndice.
[2] Ver la sección A.0.2 del apéndice.

es lenta comparada con las reacciones, es una situación usual en diversos sistemas reales, y como veremos, particularmente en los sistemas biológicos, éste no había sido estudiado en la literatura. Ciertamente, a diferencia del caso anterior, el alcance de la simplificación es en este caso más acotado, y la complejidad de las ecuaciones resultantes (ecuaciones reducidas) hace incluso difícil su interpretación. En efecto, el sistema que surge luego de la reducción por lo general ya no es de reacción difusión: aparecen difusividades dependientes de las concentraciones junto con términos de difusión cruzados, que pueden resultar negativos [3]. A partir de estas ecuaciones reducidas es posible entender observaciones experimentales (tales como mediciones de la difusividad efectiva del calcio intracelular [2]), ya que los procesos rápidos generalmente no son accesibles, y a lo que el investigador verdaderamente se enfrenta es al sistema colapsado en las escalas lentas. Contar con un método sistemático para eliminar las variaciones en las escalas rápidas en un sistema de reacción difusión provee, desde un punto de vista numérico, una ventaja adicional importante: permite hallar de manera rigurosa un conjunto de ecuaciones que, representando fielmente la dinámica en la escala lenta, pueden ser integradas con un paso de tiempo relativamente grande. La reducción del tiempo de cómputo es un aspecto importante para los proyectos de construcción de células virtuales [169].

Este capítulo es probablemente el más árido para aquellos lectores de orientación biológica. Si bien es fundamental dentro de la estructura del presente trabajo en su conjunto, no es esencial seguir los detalles de índole matemática para comprender las ideas. La intuición probablemente se vea fortalecida con la lectura del próximo capítulo.

2.2. Métodos para simplificar sistemas dinámicos

Gran parte del éxito de la física se basa en hallar precisas aproximaciones (analíticas o numéricas) evitando en lo posible transitar por el generalmente inaccesible camino de las soluciones exactas. Hay circunstancias en las que, incluso teniendo la solución exacta a un dado problema, el comportamiento resulta más transparente de entender analizando casos límites e interpolando adecuadamente en los casos intermedios.

Ya hemos notado previamente que es posible describir la evolución de los sistemas naturales a través de conjuntos de ecuaciones diferenciales, que en general resultan ser no-lineales y que involucran múltiples procesos operando en distintas escalas temporales. Usualmente es posible aislar un rango de escalas temporales en el cual la dinámica pueda pensarse en forma aproximada como si estuviese gobernada por una combinación de dos clases de procesos: rápidos y lentos. Cuando esto ocurre, es posible hacer un análisis perturbativo del sistema, es decir, definir un parámetro pequeño (en este caso está dado por el cociente entre las dos escalas temporales) y hallar de este modo una solución aproximada al problema, que puede ser, en principio, tan precisa como se desee. Esta simplificación es importante tanto desde un punto de vista puramente operacional como conceptual. Es por ello que el desarrollo

[3] El origen y la interpretación de esta clase de términos, se expone en forma separada en el próximo capítulo. Partiendo de un análisis microscópico del sistema, allí estudiaremos cómo se expresa en las ecuaciones el hecho de que las concentraciones de las distintas especies alcanzan valores de equilibrio locales. Por otra parte veremos de qué forma la velocidad efectiva de las reacciones es regulada por la tasa a la cual los reactantes son suministrados por el (relativamente) lento proceso difusivo.

de distintos métodos de reducción de sistemas dinámicos resulta uno de los capítulos más relevantes de la teoría. Para ecuaciones diferenciales ordinarias o mapas, existen dos métodos de simplificación fundamentales y estándar. El primero es la *teoría de las formas normales*, cuyo objetivo es encontrar una transformación no-lineal capaz de remover algunos de los términos no-lineales del sistema de ecuaciones en las cercanías de un punto fijo. La transformación de coordenadas no-lineal, se halla resolviendo una secuencia de transformaciones lineales. Las ecuaciones simplificadas resultantes se llaman *formas normales* y son útiles entre otras cosas para la clasificación de las bifurcaciones de los sistemas dinámicos [65, 147, 175]. El segundo método consiste en reducir el número de variables dinámicas involucradas en la descripción, utilizando el hecho de que cerca de una bifurcación local, ocurre una separación de las escalas temporales. En la bifurcación, un conjunto de los autovalores del sistema linealizado alrededor del punto fijo cruzan el cero al mover los parámetros, haciendo que la evolución en las direcciones correspondientes a estos autovalores ocurra en una escala muy lenta, comparada con las demás. En efecto, en lugar de haber un decaimiento (o alejamiento) exponencial hacia el punto fijo, ocurre uno algebraico, fenómeno conocido como "critical slowing down". Exactamente en el valor de los parámetros donde ocurre la bifurcación, existen métodos sistemáticos para hallar la evolución del sistema dinámico, convenientemente colapsada sobre una variedad de menor dimensión que el espacio de fases completo, conocida como *la variedad central* [65, 147, 175]. Uno de los métodos que desarrollaremos en este capítulo está inspirado en esta clase de reducción, adaptada al caso de las ecuaciones en derivadas parciales.

La proyección a *la variedad inercial*, es otro tipo de reducción de dimensionalidad, similar en esencia al caso anterior, pero aplicable para sistemas disipativos de ecuaciones en derivadas parciales [158]. Cuando es posible realizar la proyección, la evolución del sistema dinámico infinito-dimensional (el conjunto de PDEs) colapsa a tiempos largos básicamente sobre la variedad inercial, que tiene una dimensión finita. Por lo tanto, lo que la proyección permite es describir al sistema de PDEs originales mediante un conjunto finito de ODEs.

Tanto la reducción a la variedad central como inercial se basan en la posibilidad de reemplazar un subconjunto de las ecuaciones diferenciales originales por relaciones algebraicas (eliminación adiabática). Resulta clave para el éxito del método que sea posible reescribir al sistema original de modo que sólo un subconjunto de las variables evolucione en la escala rápida (variables rápidas). Luego, tantas ecuaciones diferenciales como cantidad de variables rápidas tenga este subconjunto pueden ser eliminadas, en el sentido que son reemplazadas por ecuaciones algebraicas, las cuales son incorporadas en la evolución de las variables lentas. Esta clase de análisis es común en sistemas homogéneos de reacciones químicas en presencia de enzimas. En este contexto, la reducción a la variedad central es conocida como la *hipótesis cuasi-estacionaria* (quasi-steady state assumption) [52, 140]. Introduciendo reescaleos apropiados de las variables, es posible identificar las variables rápidas que se ajustarán muy rápidamente a las lentas, cuya evolución ocurre en la escala que estamos interesados en describir.

Existe otro método diferente de trabajar con problemas que tengan muchas escalas temporales, llamado el *método de las escalas múltiples* [74], que es particularmente adecuado en los casos en los que hay varios procesos actuando simultáneamente, cada uno con su propia escala, y donde no es evidente la existencia de una relación unívoca entre escalas temporales y variables, en el sentido que puede no ser cierto que a cada variable le podamos asignar una escala única. El ejemplo clásico

de este tipo de problemas en el contexto de ODEs es el de un oscilador débilmente no-lineal, tal como el oscilador de van der Pol o de Duffing, en el límite de baja disipación [9, 156]. Los procesos simultáneos aquí son la oscilación del péndulo, que ocurre en una escala rápida, y la disipación, que ocurre en una escala lenta. La idea del método es proponer una expansión de la solución (la posición del péndulo como función del tiempo, dada una posición y velocidad inicial) en potencias de un parámetro pequeño (ϵ), haciendo depender explícitamente a la solución de las dos escalas temporales, que *son tratadas del mismo modo que si fueran dos variables independientes.* De este modo, es posible integrar las ecuaciones al orden mayor en la escala rápida, y considerar a las constantes de integración que aparecen como funciones de la escala lenta. Estas funciones se determinan luego en el siguiente orden de la expansión, de modo de asegurar que la solución se comporte correctamente (ver más adelante). En el caso del péndulo, el método hace explícita la idea intuitiva de que, si la disipación es suficientemente pequeña, durante el período de una oscilación (escala rápida) podemos aproximar a la amplitud de la oscilación por una constante, cuando en verdad se trata de una función que evoluciona lentamente. En otras palabras, las variaciones de la amplitud son apreciables a tiempos relativamente largos, del orden de ϵ^{-1} (escala lenta). En el orden siguiente de la expansión se determina la forma de la dependencia temporal de la amplitud. En la determinación de esta dependencia temporal se utiliza explícitamente el hecho de que la solución debe ser bien comportada (no diverger) con lo cual la función de la amplitud se elige de modo de anular los términos resonantes. Esta libertad que se tiene al separar las escalas es clave, y la falta de la misma es la que origina la falla de los métodos de perturbaciones regulares en los problemas con múltiples escalas, ya que éstos no permiten remover los términos resonantes, lo que hace diverger (artificialmente) la solución perturbativa. La extensión del método de escalas múltiples para casos donde más de dos escalas temporales son relevantes no introduce conceptualmente ninguna diferencia [4].

Los resultados más importantes de la siguiente sección pueden encontrarse en [150], en el que se encuentran además algunas aplicaciones del método al modelo de Selkov [141] de la glucólisis, y a la reacción FIS (ferrocyanide-iodide-sulfite reaction) [40]. La derivación detallada que mostraremos en esta sección es parte de las notas auxiliares [151].

2.3. Reescaleo de sistemas de reacción-difusión

Consideremos un conjunto de ecuaciones de reacción difusión que describe la dinámica de un sistema compuesto por $n + N + 1$ especies. Supongamos que las distintas escalas temporales presentes pueden agruparse en dos tipos: rápidas y lentas. En la escala lenta, supondremos que ocurren tanto los procesos de difusión, como el posible intercambio de materia con el exterior. Consideremos, por otro lado, que existe un subconjunto de las reacciones que se desarrollan en la escala rápida. Por simplicidad, para el análisis general de esta sección, consideremos que este subgrupo contiene una sola reacción rápida, en la cual participan $n + 1$ especies, que llamaremos $S_1, ..., S_n$ y Q. Las N reacciones restantes ocurren en la escala lenta. La

[4] En el caso del péndulo, es interesante buscar la solución dependiente de tres escalas temporales en lugar de dos, ya que además de los cambios en la amplitud en la escala lenta, existen variaciones en la frecuencia, las que ocurren en una escala super-lenta en el sentido que estas variaciones se manifiestan a tiempos muy largos, del orden de ϵ^{-2}.

variación espacio-temporal de este sistema puede por lo tanto describirse a través de un conjunto de $n + N + 1$ ecuaciones de reacción difusión como:

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{f_i}{\epsilon} + g_{si} + D_{si}\nabla^2 s_i\,, \qquad 1 \leq i \leq n, \tag{2.1}$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{f_q}{\epsilon} + g_q + D_q\nabla^2 q\,, \tag{2.2}$$

$$\frac{\partial v_i}{\partial t} = g_{vi} + D_{vi}\nabla^2 v_i, \qquad 1 \leq i \leq N, \tag{2.3}$$

que deben ser resueltas sujetas a condiciones de contorno e iniciales para todas las especies $s_i(\mathbf{x},t)$, $q(\mathbf{x},t)$ y $v_i(\mathbf{x},t)$. En las ecuaciones (2.1)-(2.3), $s_i(\mathbf{x},t)$, $q(\mathbf{x},t)$ y $v_i(\mathbf{x},t)$, representan la concentración en el punto $\mathbf{x}$ a tiempo t de las $n + N + 1$ especies S_i $(1 \leq i \leq n)$, Q y V_i $(1 \leq i \leq N)$ respectivamente, mientras que D_{si}, D_q y D_{vi} son sus coeficientes de difusión. La especie Q es una cualquiera entre el conjunto que participa de la reacción rápida, con la condición de que su concentración varíe a consecuencia de la misma. En el caso de más de una reacción rápida es posible separar tantas especies Q_i como reacciones en la escala rápida hayan, siempre que esto sea posible (ver más adelante).

Las funciones que modelan la variación de las concentraciones debido a las reacciones químicas y a la presencia de fuentes o sumideros para algunas de las especies son $f_i = f_i(\{s_j\}, q)$, $f_q = f_q(\{s_j\}, q)$, $g_{si} = g_{si}(\{s_j\}, q, \{v_k\})$, $g_q = g_q(\{s_j\}, q, \{v_k\})$ con $j = 1, ..., n$ y $k = 1, ..., N$. Las funciones f incluyen sólo las reacciones rápidas, mientras que, tanto las reacciones que ocurren en la escala lenta como el agregado o remoción de reactivos se incluyen en las funciones g. Para hacer explícita la diferencia entre las escalas temporales de estos procesos, incluimos explícitamente en las ecuaciones un parámetro pequeño, ϵ, que es del orden del cociente entre las dos escalas temporales.

Para la reacción rápida consideramos el esquema general correspondiente a una reacción reversible, el cual viene dado por:

$$\sum_{i=1}^{n} \alpha_i S_i + \alpha_q Q \underset{k'/\epsilon}{\overset{k/\epsilon}{\rightleftharpoons}} \sum_{i=1}^{n} \beta_i S_i + \beta_q Q, \tag{2.4}$$

donde α_j y β_j representan a los coeficientes estequiométricos de los reactantes y los productos respectivamente. La existencia de dos escalas temporales es incluída explícitamente a través de la división por el parámetro pequeño ϵ en las tasas de las reacciones k y k'.

La descripción macroscópica de las reacciones químicas se hace usualmente por medio de la ley de acción de masas. Según esta ley [5], la tasa a la cual la reacción (2.4) ocurre hacia la derecha está dada por:

$$\frac{k}{\epsilon}\left(\prod_{j=1}^{n} s_j^{\alpha_j}\right) q^{\alpha_q}, \tag{2.5}$$

donde k es una constante que depende de la sección eficaz de colisión de las moléculas involucradas en esta reacción, por la probabilidad de que una dada colisión resulte efectivamente en una reacción química. De este modo, la expresión (2.5) es el número

[5] En rigor, más que una ley, es una regla aproximada.

de colisiones por unidad de tiempo y por unidad de volumen en la cual el número de moléculas de la especie j varía en la cantidad $\beta_j - \alpha_j$ [43, 164]. La ley de acción de masas se satisface cuando el sistema es *localmente homogéneo*, en el sentido de que podemos asignar un único valor de densidad de moléculas a cada pequeño volumen del espacio, y cuando las colisiones no-reactivas son suficientemente frecuentes como para suponer que la *distribución de velocidades de las moléculas es Maxwelliana.* Si esto último no se verificara, no sería cierto que la frecuencia de las colisiones fuera simplemente proporcional al producto de las concentraciones. También se supone que los grados de libertad internos de las moléculas están en equilibrio térmico a la misma temperatura que las velocidades. Si no, otros detalles de la distribución sobre los estados internos deberían considerarse, y no sería sólo las concentraciones quienes determinarían la frecuencia de las reacciones. Por último, la temperatura se asume constante a través del espacio y del tiempo, de modo que las tasas de reacción, que son en verdad funciones sensibles a los cambios de temperatura, puedan ser consideradas constantes [164].

De acuerdo a esta ley, los términos con f_i y f_q en las ecuaciones (2.1)-(2.2) se escriben entonces como:

$$\frac{f_i}{\epsilon}(s_1, ..., s_n, q) = (\beta_i - \alpha_i)\left(\frac{k}{\epsilon}\left(\prod_{j=1}^{n} s_j^{\alpha_j}\right) q^{\alpha_q} - \frac{k'}{\epsilon}\left(\prod_{j=1}^{n} s_j^{\beta_j}\right) q^{\beta_q}\right), \quad (2.6)$$

$$\frac{f_q}{\epsilon}(s_1, ..., s_n, q) = (\beta_q - \alpha_q)\left(\frac{k}{\epsilon}\left(\prod_{j=1}^{n} s_j^{\alpha_j}\right) q^{\alpha_q} - \frac{k'}{\epsilon}\left(\prod_{j=1}^{n} s_j^{\beta_j}\right) q^{\beta_q}\right). \quad (2.7)$$

De este modo, las funciones f_i y f_q están relacionadas por :

$$(\beta_q - \alpha_q) f_i = (\beta_i - \alpha_i) f_q. \quad (2.8)$$

Como hemos mencionado antes, la idea del reescaleo es obtener un conjunto de ecuaciones que describan la dinámica del sistema en la escala de tiempo lenta. Un subconjunto de las ecuaciones diferenciales son eliminadas como tales de la descripción, y son reemplazadas por relaciones algebraicas apropiadas entre las concentraciones. Si existe sólo una reacción rápida, podremos reducir el número de ecuaciones dinámicas a $n + N$, junto con una relación algebraica de la forma: $q = q(s_1, ..., s_n)$. En el caso general de ℓ reacciones rápidas, hasta un número de ℓ ecuaciones diferenciales podrán ser reemplazadas por ecuaciones algebraicas, siempre y cuando el número de especies involucradas en las reacciones rápidas sea mayor o igual a ℓ. En el caso de una sola reacción rápida, la condición mencionada anteriormente para Q, es equivalente a pedir que $\beta_q \neq \alpha_q$.

2.4. Haciendo la reducción por el método de las escalas múltiples

A continuación, veamos cómo procedemos en el caso de la reducción del sistema genérico de ecuaciones (2.1)-(2.2) bajo las hipótesis descriptas en la sección anterior. Introduzcamos en primer lugar dos variables temporales que tengan en cuenta la existencia de las dos escalas en el problema, la rápida $T \equiv \frac{t}{\epsilon}$ y la lenta $\tau \equiv t$. Consideremos que las variables involucradas en la reacción rápida dependen de las dos variables temporales, $s_i = s_i(\mathbf{x}, T, \tau)$, $q = q(\mathbf{x}, T, \tau)$, mientras que se supone

que las concentraciones de las especies que no participan de esta reacción dependen sólo de la escala de tiempo lenta, esto es: $v_i = v_i(\mathbf{x}, \tau)$ (en adelante, siempre que no se preste a confusión, suprimiremos en la notación la dependencia espacial de las concentraciones).

Las derivadas parciales con respecto al tiempo de las concentraciones s y q están dadas por:

$$\begin{aligned} \frac{\partial s_i}{\partial t} &= \frac{1}{\epsilon}\frac{\partial s_i}{\partial T} + \frac{\partial s_i}{\partial \tau}, \qquad 1 \leq i \leq n, \\ \frac{\partial q}{\partial t} &= \frac{1}{\epsilon}\frac{\partial q}{\partial T} + \frac{\partial q}{\partial \tau}. \end{aligned} \tag{2.9}$$

Expandiendo las concentraciones s y q en potencias de ϵ del siguiente modo:

$$\begin{aligned} s_i &= s_i^{(0)}(T,\tau) + \epsilon s_i^{(1)}(T,\tau) + \cdots, \\ q &= q^{(0)}(T,\tau) + \epsilon q^{(1)}(T,\tau) + \cdots, \end{aligned} \tag{2.10}$$

e insertando las ecuaciones (2.9) y (2.10) en (2.1)-(2.2) obtenemos, luego de igualar los términos elevados a la misma potencia de ϵ, las siguientes ecuaciones:

Al mayor orden ($\mathcal{O}(\epsilon^{-1})$):

$$\frac{\partial s_i^{(0)}}{\partial T} = f_i(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}), \qquad 1 \leq i \leq n, \tag{2.11}$$

$$\frac{\partial q^{(0)}}{\partial T} = f_q(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}); \tag{2.12}$$

Al orden siguiente ($\mathcal{O}(1)$):

$$\begin{aligned} \frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} + \frac{\partial s_i^{(0)}}{\partial \tau} &= \sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_i}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_i}{\partial q} q^{(1)} + g_{si}(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}, \{v_k\}) + D_{si}\nabla^2 s_i^{(0)}, \\ \frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} + \frac{\partial q^{(0)}}{\partial \tau} &= \sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)} + g_q(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}, \{v_k\}) + D_q\nabla^2 q^{(0)}, \\ 1 \leq i \leq n. \end{aligned} \tag{2.13}$$

Usando la relación (2.8) podemos entonces reescribir las ecuaciones (2.11)-(2.13) como:

$$\frac{\partial s_i^{(0)}}{\partial T} = \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q} f_q(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}), \tag{2.14}$$

$$\frac{\partial q^{(0)}}{\partial T} = f_q(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}), \tag{2.15}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} + \frac{\partial s_i^{(0)}}{\partial \tau} &= \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\left(\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)}\right) + g_{si}(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}, \{v_k\}) + D_{si}\nabla^2 s_i^{(0)}, \\ \frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} + \frac{\partial q^{(0)}}{\partial \tau} &= \sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)} + g_q(\{s_j^{(0)}\}, q^{(0)}, \{v_k\}) + D_q\nabla^2 q^{(0)}. \end{aligned} \tag{2.16}$$

Como mencionamos anteriormente, las concentraciones s_i $(1 \leq i \leq n)$ y q dependen de las dos escalas T y τ en forma simultánea. Sin embargo, dada la separación de escalas podemos integrar primero las ecuaciones en la escala rápida (T) tratando a la escala lenta (τ) como una variable independiente que es mantenida constante en la integración. Esta es la clave del método, que aunque pueda ser difícil de justificar rigurosamente, es intuitivamente correcta, tal como vimos en el caso del péndulo.

Procediendo de esta forma con las ecuaciones (2.14)-(2.15) que, por lo tanto, pueden ser tratadas como un conjunto de $n+1$ ecuaciones diferenciales ordinarias encontramos que las soluciones están dadas por:

$$s_i^{(0)} = \zeta_i(T,\tau) + \sigma_i(\tau), \qquad 1 \leq i \leq n \tag{2.17}$$

$$q^{(0)} = \zeta_q(T,\tau) + \theta(\tau), \tag{2.18}$$

donde $(\sigma_1(\tau), ..., \sigma_n(\tau), \theta(\tau))$ corresponde a un punto fijo del conjunto (2.14)-(2.15). En otras palabras, estas soluciones satisfacen la ecuación:

$$f_q(\sigma_1, ..., \sigma_n, \theta) = 0, \tag{2.19}$$

con $\sigma_i(\tau)$ $(1 \leq i \leq n)$ y $\theta(\tau)$ independientes de T. De la ecuación (2.19) es posible obtener una relación algebraica de la forma:

$$\theta = h(\sigma_1, ..., \sigma_n), \tag{2.20}$$

que define un conjunto n dimensional de puntos fijos en el espacio $n+1$-dimensional de las concentraciones $s_1^{(0)}, ..., s_n^{(0)}, q^{(0)}$.

La forma explícita de θ para una reacción reversible de la forma (2.4) es la siguiente:

$$\theta = \left(\frac{k'}{k}\right)^{\frac{1}{\alpha_q - \beta_q}} \prod_{j=1}^{n} \sigma_j^{\frac{\beta_j - \alpha_j}{\alpha_q - \beta_q}}. \tag{2.21}$$

Si por el contrario, la reacción fuese irreversible, $k' = 0$, la ecuación (2.19) implica que al menos una de las concentraciones σ_i se hace cero.

Discutiremos ahora en profundidad la reducción para el caso reversible, y luego notaremos las diferencias que surgen para el caso irreversible.

2.4.1. Caso reversible

Dado que en las ecuaciones (2.14)-(2.15) no hay términos de fuente o sumidero, el sistema dinámico representado por estas ecuaciones debe ser disipativo, razón por la cual es de esperar la existencia de estados atractores. Por otro lado, como veremos más adelante en la sección 2.4.3, la presencia de n constantes de movimiento hace que la única clase de atractores sean puntos fijos. En particular, asumimos que todos los puntos fijos definidos por (2.20) son estables. Por lo tanto, para tiempos largos en la escala rápida las funciones $\zeta_i(T,\tau)$ y $\zeta_q(T,\tau)$ serán despreciables frente a $\sigma_i(\tau)$ y $\theta(\tau)$, respectivamente. Dada una condición inicial, el sistema evolucionará rápidamente hacia el punto fijo de la escala rápida, el que se convierte así en la condición inicial para la evolución lenta sobre la variedad n-dimensional definida por (2.19). En otras palabras, en la escala de tiempo rápida, las concentraciones s_i y q se aproximan a las funciones que varían en la escala lenta $s_i(T,\tau) \simeq \sigma_i(\tau) + \mathcal{O}(\epsilon)$ y $q(T,\tau) \simeq \theta(\tau) + \mathcal{O}(\epsilon)$.

La relación algebraica (2.20) implica, por otro lado, que θ depende de τ y $\mathbf{x}$ a través de la dependencia en τ y $\mathbf{x}$ de $\sigma_1,...,\sigma_n$. Es esta conexión entre las concentraciones en la escala lenta la que permite en última instancia hacer la reducción en el número de variables dinámicas.

Reemplazando las soluciones (2.17)-(2.18) en las ecuaciones (2.16) y despreciando los términos ζ_i y ζ_q frente a σ_i y θ respectivamente, encontramos:

$$\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} - \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\left(\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)}\right) = -\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} + g_{si} + D_{si}\nabla^2\sigma_i, \quad (2.22)$$

$$\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} - \left(\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)}\right) = -\frac{\partial \theta}{\partial \tau} + g_q + D_q\nabla^2\theta, \quad (2.23)$$

donde $g_{si} = g_{si}(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\})$, y $g_q = g_q(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\})$. Las derivadas parciales $\frac{\partial f_q}{\partial s_j}$, $\frac{\partial f_q}{\partial s_j}$, $\frac{\partial f_q}{\partial q}$ y $\frac{\partial f_q}{\partial q}$ deben ser evaluadas en el punto fijo $(\sigma_1, ..., \sigma_n, \theta)$, y θ debe ser escrita como función de $\sigma_1, ..., \sigma_n$ usando la relación (2.20) ((2.21) en nuestro caso).

Hasta ahora no hemos mencionado las ecuaciones que rigen la evolución de las concentraciones v_i. Insertando las soluciones (2.17)-(2.18) en (2.3), y despreciando, al igual que antes, los términos ζ_i y ζ_q frente a σ_i y θ, la forma de las ecuaciones (2.3) no se modifica, excepto por el reemplazo de σ_i y θ en lugar de s_i y q, respectivamente. Esto es totalmente consistente con la hipótesis de que las concentraciones v_i varían solamente en la escala lenta, τ. De esta forma, todos los términos de la derecha en las ecuaciones (2.22)-(2.23) sólo dependen de τ, mientras que los de la izquierda dependen de las dos escalas, τ y T. Por lo tanto, estas ecuaciones pueden separarse en dos partes:

$$\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} - \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\left(\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)}\right) = K_i(\tau) \quad (2.24)$$

$$\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} - \left(\sum_{j=1}^{n} \frac{\partial f_q}{\partial s_j} s_j^{(1)} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)}\right) = K_q(\tau), \quad (2.25)$$

y

$$\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} = -K_i(\tau) + g_{si}(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\}) + D_{si}\nabla^2\sigma_i, \quad (2.26)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial \tau} = -K_q(\tau) + g_q(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\}) + D_q\nabla^2\theta, \quad (2.27)$$

con K_i y K_q funciones desconocidas de τ. A fin de proseguir con el desarrollo, es preferible liberarse de estas funciones desconocidas. Multiplicando la ecuación (2.22) por $(\beta_q - \alpha_q)$, la ecuación (2.23) por $(\beta_i - \alpha_i)$, y restando ambas, obtenemos n ecuaciones de la forma:

$$\begin{aligned}(\beta_q - \alpha_q)\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} - (\beta_i - \alpha_i)\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} &= -(\beta_q - \alpha_q)\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} + (\beta_i - \alpha_i)\frac{\partial \theta}{\partial \tau} \\ &+ (\beta_q - \alpha_q)\left(g_{si}(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\}) + D_{si}\nabla^2\sigma_i\right) \\ &- (\beta_i - \alpha_i)\left(g_q(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\}) + D_q\nabla^2\theta\right),\end{aligned} \quad (2.28)$$

las cuales, al igual que antes, pueden separarse en dos:

$$(\beta_q - \alpha_q)\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} - (\beta_i - \alpha_i)\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} = C_i(\tau), \tag{2.29}$$

$$\begin{aligned}(\beta_q - \alpha_q)\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} - (\beta_i - \alpha_i)\frac{\partial \theta}{\partial \tau} &= -C_i(\tau)\\ +(\beta_q - \alpha_q)\left(g_{si} + D_{si}\nabla^2\sigma_i\right) &- (\beta_i - \alpha_i)\left(g_q + D_q\nabla^2\theta\right),\end{aligned} \tag{2.30}$$

donde $C_i(\tau) = (\beta_q - \alpha_q)K_i(\tau) - (\beta_i - \alpha_i)K_q(\tau)$.

Como mencionamos al principio del capítulo, la esencia de nuestro desarrollo a partir del método de las escalas múltiples, consiste en tratar a este tipo de funciones de τ como si fueran constantes al resolver las ecuaciones (2.24)-(2.25). A partir de la ecuación (2.29) podemos ver que si $C_i(\tau)$ es distinta de cero, entonces $(\beta_q - \alpha_q)s_i^{(1)} - (\beta_i - \alpha_i)q^{(1)}$ será una función creciente (linealmente) en T. Si esto ocurriese, esta diferencia crecería lo suficiente como para arruinar la expansión asintótica (2.10), y la solución así hallada no se comportaría correctamente. La única forma de mantener la expansión bien comportada es fijar los valores que toman estas funciones desconocidas en cero: $C_i(\tau) = 0$ para todo $1 \leq i \leq n$ [6]. De esta forma garantizamos que las soluciones de (2.24)-(2.25), en la escala rápida, se aproximen a funciones que varían lentamente, y que permanecen acotadas para todos los instantes de tiempo, de forma que $|\epsilon s_i^{(1)}| \ll |s_i^{(0)}|$ y $|\epsilon q^{(1)}| \ll |q^{(0)}|$ se cumplan. Por lo tanto, podemos concluir que:

$$s_i \approx s_i^{(0)} \approx \sigma_i(\tau), \tag{2.31}$$

$$q \approx q^{(0)} \approx \theta(\tau). \tag{2.32}$$

Al fijar $C_i(\tau) = 0$ obtenemos un sistema cerrado de $n+N$ ecuaciones diferenciales para las concentraciones cuya variación ocurre en la escala lenta σ_i, $1 \leq i \leq n$ y v_i, $1 \leq i \leq N$. Insertando la relación algebraica (2.20) en (2.30), obtenemos n ecuaciones para $\sigma_1, ..., \sigma_n$ de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}(\beta_q - \alpha_q)\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} - (\beta_i - \alpha_i)\sum_{j=1}^{n}\frac{\partial \theta}{\partial \sigma_j}\frac{\partial \sigma_j}{\partial \tau} &=\\ (\beta_q - \alpha_q)\left(g_{si} + D_{si}\nabla^2\sigma_i\right) &- (\beta_i - \alpha_i)\left(g_q + D_q\nabla^2\theta\right),\end{aligned} \tag{2.33}$$

para $1 \leq i \leq n$, con θ dado por (2.21). En particular, de la ecuación (2.21) obtenemos:

$$\frac{\partial \theta}{\partial \sigma_j} = \frac{\beta_j - \alpha_j}{\alpha_q - \beta_q}\frac{\theta}{\sigma_j}. \tag{2.34}$$

Reemplazando (2.34) en (2.33) se llega a las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}\left(1 + \left(\frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\right)^2\frac{\theta}{\sigma_i}\right)\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} + \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\sum_{j\neq i}\frac{\beta_j - \alpha_j}{\beta_q - \alpha_q}\frac{\theta}{\sigma_j}\frac{\partial \sigma_j}{\partial \tau} &=\\ D_{si}\nabla^2\sigma_i + g_{si} - \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q}\left(g_q + D_q\nabla^2\theta\right),\end{aligned} \tag{2.35}$$

[6] Observar que el miembro derecho de las ecuaciones (2.24)-(2.25) corresponde a la linealización del sistema (2.11)-(2.12) en las cercanías del punto fijo dado por la ecuación (2.19). La matriz del sistema linealizado tiene autovalores iguales a cero. Pedir que $C_i = 0$ para todo i es equivalente a requerir que las soluciones $s_i^{(1)}$, $q^{(1)}$ no tengan componentes a lo largo de las direcciones asociadas con estos autovalores.

las cuales deben resolverse junto con las ecuaciones (2.3) con $g_{vi} = g_{vi}(\{\sigma_j\}, \theta, \{v_k\})$. Tal como veremos en la sección 2.4.3, dado un conjunto de condiciones iniciales para (2.1)-(2.3), es posible determinar unívocamente los valores para $\sigma_i(\tau = 0, \mathbf{x})$ $(1 \leq i \leq n)$ y $\theta(\tau = 0, \mathbf{x})$ que satisfagan la relación (2.20). Junto con $v_i(\tau = 0, \mathbf{x})$, constituyen las condiciones iniciales del sistema de ecuaciones reducidas.

2.4.2. Caso irreversible

El cálculo de la situación con una reacción rápida irreversible, es decir, cuando f_i y f_q tienen la forma (2.6)-(2.7) con $k' = 0$, se lleva a cabo de manera similar, si bien surgen algunas diferencias con respecto al caso anterior.

Al igual que antes, introducimos dos variables temporales, T y τ, junto con la expansión (2.10). Se obtienen así las ecuaciones (2.11)-(2.13). La diferencia surge al buscar el punto fijo del sistema en la escala rápida, dada por las ecuaciones (2.11)-(2.12). En este caso, existen $n+1$ conjuntos n-dimensionales de puntos fijos definidos por $s_i = 0$, para algún i con $1 \leq i \leq n$ o bien $q = 0$. Si la dinámica es disipativa, entonces la existencia de puntos fijos estables está garantizada al menos en alguno de estos conjuntos. Al igual que en la situación reversible descripta en la sección anterior, dada una condición inicial arbitraria, existe un único punto fijo estable al cual el sistema se aproxima eventualmente en el tiempo. Sin pérdida de generalidad, podemos llamar Q a la especie cuya concentración es cero en el punto fijo atractivo. Evidentemente, debe cumplirse que $\alpha_q - \beta_q > 0$ para que la concentración de Q decrezca en el tiempo desde un valor positivo inicial hasta cero.

Del mismo modo que antes, las soluciones de las ecuaciones (2.11)-(2.12) son de la forma (2.17)-(2.18), pero ahora $\theta = 0$. Esto implica que $\frac{\partial f_q}{\partial s_i} = 0$ en el punto fijo $s_i^{(0)} = \sigma_i$, $q^{(0)} = 0$, mientras que $\frac{\partial f_q}{\partial q} = 0$ en el punto fijo, a menos que $\alpha_q = 1$, en cuyo caso $\frac{\partial f_q}{\partial q} = (\alpha_q - \beta_q) \prod_{i=1}^{n} \sigma_i^{\alpha_i - \beta_i}$.

Por lo tanto, en lugar de las ecuaciones (2.22)-(2.23), en el caso irreversible obtenemos:

$$\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} - (\beta_i - \alpha_i) q^{(1)} \prod_{i=1}^{n} \sigma_i^{\alpha_i - \beta_i} = -\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} + g_{si}(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) + D_{si} \nabla^2 \sigma_i, \quad (2.36)$$

$$\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} - (\beta_q - \alpha_q) q^{(1)} \prod_{i=1}^{n} \sigma_i^{\alpha_i - \beta_i} = g_q(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}), \quad (2.37)$$

si $\alpha_q = 1$, y

$$\frac{\partial s_i^{(1)}}{\partial T} = -\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} + g_{si}(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) + D_{si} \nabla^2 \sigma_i, \quad (2.38)$$

$$\frac{\partial q^{(1)}}{\partial T} = g_q(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}), \quad (2.39)$$

si $\alpha_q > 1$. El caso $\alpha_q = 1$ puede ser tratado como antes, obteniéndose las ecuaciones reducidas:

$$\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} = g_{si}(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) - \frac{\beta_i - \alpha_i}{\beta_q - \alpha_q} g_q(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) + D_{si} \nabla^2 \sigma_i. \quad (2.40)$$

Por otro lado, en el caso $\alpha_q > 1$, si $g_q(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) \neq 0$, la ecuación (2.39) implica que $q^{(1)}$ varía linealmente con T lo cual rompe la expansión asintótica que estamos

asumiendo. Por lo tanto, podemos separar las dos escalas temporales para el ca: $k' = 0$, $\alpha_q > 1$ como lo hicimos antes, sólo si $g_q(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) = 0$, obteniendo l: siguientes ecuaciones reducidas:

$$\frac{\partial \sigma_i}{\partial \tau} = g_{si}(\{\sigma_j\}, 0, \{v_k\}) + D_{si}\nabla^2\sigma_i. \tag{2.4}$$

2.4.3. Obteniendo la condición inicial de las ecuaciones reducidas

En esta sección mostraremos cómo obtener las condiciones iniciales para el co junto de ecuaciones reducidas, dado el conjunto de condiciones iniciales para l ecuaciones originales. Supondremos que las condiciones iniciales pueden ser expr sadas a través de la expansión de las soluciones de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} s_i(t=0,\mathbf{x}) &= s_i^{(0)}(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) \\ &= \zeta_i(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) + \sigma_i(\tau=0,\mathbf{x}), \\ q(t=0,\mathbf{x}) &= q^{(0)}(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) \\ &= \zeta_q(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) + \theta(\tau=0,\mathbf{x}), \\ s_i^{(1)}(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) &= q^{(1)}(T=0,\tau=0,\mathbf{x}) = 0. \end{aligned} \tag{2.4}$$

Por lo tanto, los valores de $\sigma_i(\tau = 0, \mathbf{x})$ y $\theta(\tau = 0, \mathbf{x})$ corresponden al punto fi al cual el sistema dinámico (2.11)-(2.12) tiende partiendo de una condición inici particular $s_i^{(0)}(T = 0, \tau = 0, \mathbf{x})$, $q^{(0)}(T = 0, \tau = 0, \mathbf{x})$. Veamos en primer lugar qu dadas las relaciones (2.8), el sistema (2.11)-(2.12) tiene n constantes de movimien de la forma:

$$Z_i = (\beta_q - \alpha_q)s_i - (\beta_i - \alpha_i)q\,. \tag{2.4}$$

Por lo tanto, el sistema dinámico $n+1$-dimensional (2.11)-(2.12) posee n consta tes de movimiento. Cada conjunto de nivel (es decir, el conjunto de puntos en espacio de las concentraciones para los cuales cada una de las n constantes de m vimiento tiene un valor particular) es una curva unidimensional, la cual en forn genérica intersecta el conjunto n dimensional de puntos fijos (2.19) en puntos ai lados. Teniendo en cuenta que todas las constantes de movimiento son lineales (las concentraciones, resulta que los conjuntos de nivel son líneas rectas. Dada ui condición inicial arbitraria (que pertenece de este modo una cierta curva (recta) (nivel), el sistema evoluciona de acuerdo a las ecuaciones (2.11)-(2.12) sin salir jam de esta curva.

Dado que los conjuntos de nivel son objetos unidimensionales, los únicos atract res posibles son puntos fijos. Si cada curva de nivel intersecta el conjunto de punt fijos dado por la ecuación (2.19) sólo una vez (lo cual es consistente con la hipóte establecida previamente, de que todos los puntos fijos son atractivos), entonces punto fijo al cual cada condición inicial tiende está determinado en forma unív ca: es aquel definido por los mismos valores para las constantes de movimiento q aquellos que toma la condición inicial.

El sistema con $k' = 0$ tiene las mismas n constantes de movimiento que ant pero ahora cada conjunto de nivel puede intersectar el conjunto de puntos fijos (más de un punto. Por ejemplo, para $n = 2$, el conjunto de puntos fijos son los tr planos definidos por $s_1 = 0$, $s_2 = 0$ y $q = 0$. Una recta genérica en un espac

tridimensional, (s_1, s_2, q) intersecta a todos los planos. Por lo tanto no todos los puntos fijos pueden ser estables. Uno de los tres puntos fijos no tiene significado físico, ya que se debe cumplir siempre que $s_1, s_2, q \geq 0$, y cada conjunto de nivel puede contener a lo sumo dos de tales puntos, ya que se trata de una línea recta. La continuidad del flujo garantiza que uno de estos dos puntos debe ser estable. Por lo tanto, dada una condición inicial, también en el caso de una reacción rápida irreversible existe un único punto fijo estable del sistema dinámico (2.11)-(2.12) hacia el cual el sistema se aproxima en el tiempo. Este punto fijo es, de este modo, la condición inicial para la evolución de las ecuaciones reducidas.

2.5. Reobteniendo los resultados por otra vía: extensión de la hipótesis cuasi-estacionaria

En las secciones anteriores realizamos una expansión sistemática de las ecuaciones originales, haciendo uso de la existencia de dos escalas temporales. Obtuvimos de este modo un conjunto de ecuaciones reducidas junto con una ecuación algebraica de la forma (2.21).

En esta sección buscaremos una relación algebraica entre las concentraciones *desde el principio*, sin establecer en forma precisa la dependencia temporal de las variables que vamos a mantener en la descripción (las s_i de las secciones previas). Esta forma de abordar el problema es similar a la que se utiliza más frecuentemente en el estudio de las reacciones bioquímicas en sistemas homogéneos: la aproximación cuasi-estacionaria (quasi-steady-state approximation [140]). Esta sección es una extensión del método en el caso de un sistema de reacción-difusión relativamente general.

Dado un sistema particular, sólo un análisis sobre los rangos de variación de las diferentes especies involucradas, puede conducirnos a una selección de las escalas apropiadas para cada una de las variables y a la determinación de un parámetro pequeño ϵ. Ya que no se puede discutir este aspecto de manera general, no sabemos *a priori* cómo ϵ escalea con las variables involucradas. Sin embargo, lo que sí podemos es buscar una relación algebraica entre las variables originales, y chequear *a posteriori* la validez de la reducción. Como veremos, cuando esta forma de hacer la reducción funciona el resultado es exactamente el mismo que el que obtuvimos previamente.

Suponemos, al igual que antes, que existe sólo una reacción rápida, y que deseamos eliminar de la descripción dinámica a una de las especies que participan de esta reacción (cuya concentración denotamos por q). Para ello expandimos a la concentración de la siguiente manera:

$$q \approx q^{(0)}(s_1, ..., s_n) + \epsilon q^{(1)}(s_1, ..., s_n), \tag{2.46}$$

y reemplazamos esta expresión en la ecuación (2.2), encontrando la siguiente ecuación:

$$\sum_{i=1}^{n} \frac{\partial q^{(0)}}{\partial s_i} \frac{\partial s_i}{\partial t} + \epsilon \sum_{i=1}^{n} \frac{\partial q^{(1)}}{\partial s_i} \frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{f_q(q^{(0)}, s_1, ..., s_n)}{\epsilon} + \frac{\partial f_q}{\partial q} q^{(1)} + g_q + D_q \nabla^2 q^{(0)} + \mathcal{O}(\epsilon), \tag{2.47}$$

donde $g_q = g_q(q^{(0)}, s_1, ..., s_n, v_1, ..., v_N)$. Si introducimos dos variables temporales T y τ, entonces $\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{1}{\epsilon}\frac{\partial s_i}{\partial T} + \frac{\partial s_i}{\partial \tau}$. En la sección anterior habíamos sido capaces de

justificar que $s_i = \zeta_i(T,\tau) + \sigma_i(\tau)$ con $\zeta_i \ll \sigma_i$ para T suficientemente grande. Esta condición implica que $\frac{\partial s_i}{\partial t} \approx \frac{\partial s_i}{\partial \tau}$, y que por lo tanto $\frac{\partial s_i}{\partial t} \sim \mathcal{O}(1)$. Asumiendo la validez de esta expresión, e igualando los términos de iguales potencias en el parámetro ϵ en (2.47) obtenemos:

$$f_q \quad (q^{(0)}, s_1, ..., s_n) = 0, \tag{2.48}$$

$$q^{(1)} = \frac{1}{\frac{\partial f_q}{\partial q}} \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{\partial q^{(0)}}{\partial s_i} \frac{\partial s_i}{\partial t} - g_q - D_q \nabla^2 q^{(0)} \right), \tag{2.49}$$

siempre que $\frac{\partial f_q}{\partial q} \neq 0$. En la mayoría de los casos, a partir de (2.48) se obtiene la relación algebraica deseada $q^{(0)} = q^{(0)}(s_1, ..., s_n)$. Reemplazando esta relación en (2.49) es posible despejar $q^{(1)}$ como función de $s_1, ..., s_n$ y $v_1, ..., v_N$. Reemplazando estas funciones en la expansión (2.46) e insertándolas en las ecuaciones para las concentraciones s_i encontramos exactamente la misma ecuación (2.35) reemplazando (σ_i, θ) por $(s_i, q^{(0)})$.

Es importante notar que incluso si no es posible garantizar *a priori* que $\frac{\partial s_i}{\partial t} \approx \frac{\partial s_i}{\partial \tau}$, es posible hacer este cálculo y verificar posteriormente si resulta consistente, es decir si los valores $q^{(0)}$ y $q^{(1)}$ que se obtuvieron satisfacen la relación:

$$|\epsilon q^{(1)}| \ll |q^{(0)}|. \tag{2.50}$$

Si la variación rápida de algunos de los s_i es relevante, entonces $q^{(1)}$ puede ser de orden $1/\epsilon$, con lo cual la condición de consistencia (2.50) no se cumplirá. Este método es más directo y de mayor aplicabilidad que el anterior, ya que requiere menos hipótesis. A pesar de esto, en este caso la obtención de las condiciones iniciales no es tan clara como en el método de las escalas múltiples, tal como está discutido en [151], y como mencionamos anteriormente, su validez debe ser siempre verificada con posterioridad a los cálculos.

2.6. Aplicación del formalismo en algunos casos de interés

Podemos aplicar directamente el resultado en el caso particular de un sistema de reacción-difusión que posee una reacción rápida reversible del tipo:

$$\alpha_1 S_1 + \alpha_2 S_2 + \alpha_q Q \underset{k'/\epsilon}{\overset{k/\epsilon}{\rightleftharpoons}} \beta_1 S_1 + \beta_2 S_2 + \beta_q Q, \tag{2.51}$$

junto con otras reacciones lentas y un proceso difusivo. Por simplicidad, no escribiremos la dependencia explícita de g_{si} y g_q. La ecuación general (2.35) es en este caso:

$$A_{11} \frac{\partial \sigma_1}{\partial \tau} + A_{12} \frac{\partial \sigma_2}{\partial \tau} = D_{s1} \nabla^2 \sigma_1 + g_{s1} - \frac{\beta_1 - \alpha_1}{\beta_q - \alpha_q} \left(g_q + D_q \nabla^2 \theta \right), \tag{2.52}$$

$$A_{22} \frac{\partial \sigma_2}{\partial \tau} + A_{21} \frac{\partial \sigma_1}{\partial \tau} = D_{s2} \nabla^2 \sigma_2 + g_{s2} - \frac{\beta_2 - \alpha_2}{\beta_q - \alpha_q} \left(g_q + D_q \nabla^2 \theta \right), \tag{2.53}$$

donde definimos

$$A_{11} = 1 + \left(\frac{\beta_1 - \alpha_1}{\beta_q - \alpha_q} \right)^2 \frac{\theta}{\sigma_1}, \qquad A_{12} = \frac{(\beta_1 - \alpha_1)(\beta_2 - \alpha_2)}{(\beta_q - \alpha_q)^2} \frac{\theta}{\sigma_2}$$

$$A_{21} = \frac{(\beta_1 - \alpha_1)(\beta_2 - \alpha_2)}{(\beta_q - \alpha_q)^2} \frac{\theta}{\sigma_1}, \qquad A_{22} = 1 + \left(\frac{\beta_2 - \alpha_2}{\beta_q - \alpha_q} \right)^2 \frac{\theta}{\sigma_2}, \tag{2.54}$$

y θ, de acuerdo a (2.21), viene dado por:

$$\theta = \left(\frac{k'}{k}\right)^{\frac{1}{\alpha_q-\beta_q}} \sigma_1^{\frac{\beta_1-\alpha_1}{\alpha_q-\beta_q}} \sigma_2^{\frac{\beta_2-\alpha_2}{\alpha_q-\beta_q}}. \tag{2.55}$$

La ecuación para σ_1 es entonces:

$$\frac{\partial\sigma_1}{\partial\tau} = \frac{A_{22}}{\Delta}D_{s1}\nabla^2\sigma_1 + \frac{A_{22}}{\Delta}g_{s1} - \frac{A_{12}}{\Delta}g_{s2} + \frac{A_{12}(\beta_2-\alpha_2) - A_{22}(\beta_1-\alpha_1)}{\Delta(\beta_q-\alpha_q)}g_q, \tag{2.56}$$

donde $\Delta = A_{22}A_{11} - A_{21}A_{12}$. Para hacer la manipulación más sencilla, supongamos que $D_{s2} = D_q = 0$. Podemos definir un coeficiente de difusión reescaleado de la siguiente forma:

$$D'_{s1} = \frac{A_{22}}{\Delta}D_{s1} = \frac{(\beta_q-\alpha_q)^2\sigma_1\sigma_2 + (\beta_2-\alpha_2)^2\theta\sigma_1}{(\beta_q-\alpha_q)^2\sigma_1\sigma_2 + (\beta_1-\alpha_1)^2\theta\sigma_2 + (\beta_2-\alpha_2)^2\theta\sigma_1}D_{s1}. \tag{2.57}$$

En algunos casos existen cantidades conservadas durante la evolución del sistema, que permiten expresar ciertas concentraciones en función de otras. En este caso específico, es posible escribir a σ_2 como función de σ_1. En particular, esta es la situación para el caso más comúnmente analizado en la literatura, en el que la reacción rápida es de la forma: $S_1 + S_2 \underset{k'/\epsilon}{\overset{k/\epsilon}{\rightleftharpoons}} Q$ (es decir, $\alpha_1 = \alpha_2 = \beta_q = 1$, y $\alpha_q = \beta_1 = \beta_2 = 0$). Por lo tanto, el conjunto original de ecuaciones (2.1)–(2.3) se escribe:

$$\frac{\partial s_1}{\partial t} = -\frac{k}{\epsilon}s_1s_2 + \frac{k'}{\epsilon}q + D_{s1}\nabla^2 s_1 + g_{s1}, \tag{2.58}$$

$$\frac{\partial s_2}{\partial t} = -\frac{k}{\epsilon}s_1s_2 + \frac{k'}{\epsilon}q, \tag{2.59}$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{k}{\epsilon}s_1s_2 - \frac{k'}{\epsilon}q, \tag{2.60}$$

y por consiguiente, la cantidad s_2+q permanece constante durante toda la evolución. Por lo tanto concluimos que $\sigma_2+\theta$ también permanece invariable. Si definimos $H \equiv \sigma_2 + \theta$ y utilizamos la ecuación (2.55), que en este caso es simplemente $\theta = \frac{k}{k'}\sigma_1\sigma_2$, obtenemos $\sigma_2 = H/(1+\frac{k}{k'}\sigma_1)$. Esto implica que el coeficiente de difusión reescaleado puede escribirse como:

$$D'_{s1} = \frac{\left(1+\frac{k}{k'}\sigma_1\right)^2}{\left(1+\frac{k}{k'}\sigma_1\right)^2 + \frac{k}{k'}H}D_{s1}. \tag{2.61}$$

Intuitivamente se espera que el reescaleo de la difusión sea más débil cuanto mayor sea la concentración σ_1, ya que serán entonces relativamente pocas las partículas de la especie S_1 que se encuentren formando el complejo inmóvil Q. En efecto, al hacer $\sigma_1 \to \infty$, el coeficiente de difusividad efectivo D'_{s1} coincide con la difusividad libre D_{s1}. La forma funcional de la dependencia de la difusividad efectiva con la concentración del sustrato representada en la ecuación (2.61) es, por otro lado, compatible con las mediciones experimentales de la difusión efectiva del calcio en presencia de bufers [2]. Un caso de interés, en el cual aparece esta clase dependencia de la difusividad en la concentración, y en el cual, el mero conocimiento de la difusividad efectiva nos permitirá extraer conclusiones relevantes, es en la propagación

de ondas de calcio intracelular (en forma de ondas viajeras) en presencia de buffers (sección 1.3.3 y capítulo 6). A partir de la linealización (por trozos) del modelo biestable propuesto por Dupont y Goldbeter [39], es posible mostrar cómo se deformará el frente de onda, como resultado de la dependencia en la concentración de la difusividad efectiva [83, 148].

Resulta interesante analizar también el caso límite opuesto, en el cual la concentración σ_1 es despreciable frente a la constante de disociación $k_d = \frac{k'}{k}$, y $\sigma_1 \ll H$. En este caso, la difusividad efectiva coincide con la hallada previamente en otros trabajos [30, 128], la cual resulta:

$$D'_{s1} = \frac{k_d}{k_d + H} D_{s1} \,, \tag{2.62}$$

que es independiente de σ_1, y por lo tanto, una constante. La ecuación (2.62), tiene una interpretación microscópica directa en término de la dinámica microscópica subyacente (ver la sección 3.2). El factor que reescalea la difusividad libre, representa la cantidad promedio en que el tiempo de movimiento difusivo libre (el que surge de las colisiones no reactivas con el solvente) es reducido por la interacción con las moléculas de la especie inmóvil (S_2 en este caso). Sin embargo, en el caso general, la interpretación de las difusividades dependientes de las concentraciones, y de los términos de difusión cruzados negativos no es en absoluto evidente. Comprender el origen de estos términos desde un punto de vista microscópico es el tema del siguiente capítulo.

3. El problema de la reducción desde un punto de vista microscópico

Al principio, parece asombroso a todo el mundo que la más pequeña cantidad no pueda ser medida por la más ínfima unidad. Pues bien, nosotros (los hombres de ciencia) debemos terminar por un asombro contrario, ... desde el momento en que conocemos la causa. En efecto, nada asombraría tanto a un geómetra como ver la diagonal de un cuadrado convertirse en conmensurable.
Aristóteles [4].

3.1. Resumen

En el capítulo anterior mostramos cómo hacer la reducción para un conjunto de ecuaciones de reacción-difusión cuando es posible agrupar los distintos procesos en dos escalas de tiempo suficientemente diferenciadas. Las ecuaciones resultantes de la reducción, en general no conforman un sistema de reacción-difusión del mismo tipo que el original, sino que, como vimos anteriormente, aparecen difusividades dependientes de la concentración y términos de difusión cruzados. Excepto en situaciones límites, el significado de estos términos de transporte no resulta fácil de interpretar. Dado que la dinámica lenta es la relevante desde el punto de vista experimental, resulta importante comprender el origen de las formas funcionales que emergen en esta escala, y que son, por lo tanto, las accesibles en las observaciones.

Este capítulo es un resumen del trabajo [152] cuyo objetivo fue proveer una interpretación física del significado de estos términos, junto con una derivación alternativa que pone el énfasis en los procesos microscópicos subyacentes de los sistemas de reacción difusión. Dado que una descripción detallada a este nivel es muy compleja, a diferencia del estudio del capítulo anterior, en éste focalizaremos nuestro trabajo casi exclusivamente en el ejemplo paradigmático de una reacción rápida con un buffer de la forma:

$$\mathcal{A} + \mathcal{B} \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}} \mathcal{C} \tag{3.1}$$

donde $\mathcal{A}$ es una de las especies de interés (por ejemplo un ión de calcio), $\mathcal{B}$ es el buffer (por ejemplo, una proteína) libre, y $\mathcal{C}$ es el complejo formado a partir de $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$. En este capítulo, estudiamos la evolución de la reacción rápida (3.1) acoplada a un proceso lento de transporte difusivo a través de un "lattice gas" [14], es decir, proponiendo un operador de evolución que mapee los números de ocupación de cada una de las especies en los sitios de una red espacial regular, a intervalos de tiempo discretos. Como veremos, ciertas aproximaciones usuales que permiten los estudios analíticos dentro de la teoría de los lattice gases [1] no se verifican en nuestro sistema (esencialmente la hipótesis de caos molecular). Sin embargo, la existencia de dos escalas temporales permite introducir una nueva hipótesis sobre el efecto de las reacciones en la escala rápida: cada aplicación del operador de evolución (que en nuestro

[1] Básicamente, la demostración de la equivalencia con la descripción macroscópica promediada provista por las ecuaciones de reacción difusión.

esquema avanza el tiempo en una unidad de la escala lenta) proyecta los valores de ocupación hacia el equilibrio químico local. Esto hace posible estudiar analíticamente el lattice gas, reobteniendo el mismo conjunto de ecuaciones reducidas que hallamos en el capítulo previo. Sin embargo, en la derivación microscópica queda claro que los términos "extra" que deseábamos explicar no representan términos de transporte genuinos, sino que surgen como consecuencia de las correlaciones locales entre las concentraciones debidas a las reacciones rápidas (ver 3.4). En efecto, el aspecto difusivo de estos términos se debe a que *son las diferencias entre las concentraciones de los sitios vecinos quienes regulan las tasas de las reacciones rápidas.*

Tanto la validez de las hipótesis introducidas en la elección del operador de evolución, como la precisión de la descripción reducida, fueron estudiadas a través de simulaciones numéricas del sistema (3.1) (ver sección 3.5). Por otro lado, las simulaciones numéricas de sistemas de reacción difusión más complicados (modelo de Schnackenberg), sirvieron para mostrar que las conclusiones que se desprenden del sistema (3.1) pueden extenderse en forma directa a otras situaciones, ya que la naturaleza de los términos que encontramos en los sistemas más genéricos del capítulo 2 es exactamente la misma que la de los casos más sencillos, tal como el que estudiamos en detalle a lo largo de este apartado.

3.2. Interpretación microscópica en un caso límite

En las aplicaciones del capítulo anterior analizamos la reacción (2.51). En este capítulo estudiamos un caso particular en el cual el sistema es cerrado, es decir [2] $g_{si} = g_q = 0$, e identificamos a las especies de la siguiente forma: $\mathcal{S}_1 = \mathcal{A}$, $\mathcal{S}_2 = \mathcal{B}$, y $\mathcal{Q} = \mathcal{C}$. Los coeficientes estequiométricos son por consiguiente $\alpha_1 = \alpha_2 = \beta_q = 1$, y $\alpha_q = \beta_1 = \beta_2 = 0$. Reordenando los términos de las ecuaciones (2.52) y (2.53), el sistema reducido queda entonces:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial A}{\partial t} &= (1-\Gamma_{BA})D_A\nabla^2 A - \Gamma_{AB}D_B\nabla^2 B \qquad (3.2)\\
&+ (1-\Gamma_{AB}-\Gamma_{BA})\frac{D_C}{k_d}\left(B\nabla^2 A + A\nabla^2 B + 2\nabla B\cdot\nabla A\right),\\
\frac{\partial B}{\partial t} &= (1-\Gamma_{AB})D_B\nabla^2 B - \Gamma_{BA}D_A\nabla^2 A \qquad (3.3)\\
&+ (1-\Gamma_{AB}-\Gamma_{BA})\frac{D_C}{k_d}\left(B\nabla^2 A + A\nabla^2 B + 2\nabla B\cdot\nabla A\right),\\
k_d C &= AB. \qquad (3.4)
\end{aligned}$$

donde

$$\Gamma_{AB} = \frac{A}{k_d + A + B} \qquad \Gamma_{BA} = \frac{B}{k_d + A + B} \qquad k_d \equiv \frac{k_-}{k_+} \qquad (3.5)$$

y donde $A(\mathbf{x},t)$, $B(\mathbf{x},t)$, y $C(\mathbf{x},t)$ denotan la concentración en la posición $\mathbf{x}$ a tiempo t de las especies $\mathcal{A}$, $\mathcal{B}$, y $\mathcal{C}$ respectivamente. En general los buffers ($\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$) son moléculas muy masivas frente a las del tipo $\mathcal{A}$, y por lo tanto es natural suponer que su difusividad es despreciable frente a éstas. Esto ocurre, por ejemplo, si el buffer es un canal de membrana ligando dependiente, y $\mathcal{A}$ es la especie que activa el canal.

[2] Suponemos, al igual que antes, que si el sistema es abierto, los procesos de intercambio de materia con el exterior ocurren en una escala lenta comparada con la de las reacciones rápidas, y por lo tanto se incluyen exclusivamente dentro de las funciones g_{si} y g_q.

En otras circunstancias, aún cuando no sea posible despreciar la difusividad de los buffers, resulta válido suponer que su difusividad no se ve mayormente alterada por la unión con el sustrato $\mathcal{A}$. Un ejemplo lo constituyen los buffers de calcio: si bien el coeficiente de difusión de algunos de ellos no es despreciable frente al del calcio, el buffer libre y el complejo del buffer con el calcio difunden con tasas muy similares. Por lo tanto, en lo que sigue supondremos que $D_B = D_C$. Esto implica que si inicialmente la concentración de buffer en cualquiera de sus dos estados $B_T = B + C$ es uniforme en el espacio, lo seguirá siendo en cualquier instante posterior de la evolución. Aplicando esta ecuación de conservación en (3.2)-(3.4), el sistema reducido consiste de una única ecuación dinámica para la concentración de $\mathcal{A}$, junto con la ecuación algebraica (3.4) y la ecuación $B = k_d B_T/(k_d + A)$. Incluso en el caso más sencillo en el que las difusividades de la enzima y el complejo sean despreciables frente a la del sustrato (formalmente, $D_B = D_C = 0$) donde la mayor parte de los términos de la ecuación para $\mathcal{A}$ se anulan, la ecuación resultante tiene una difusividad efectiva dependiente de la concentración de la forma:

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \left(1 + \frac{k_d B_T}{(k_d + A)^2}\right)^{-1} D_A \nabla^2 A \tag{3.6}$$

Analicemos a continuación algunos casos límites. En primer lugar supongamos que $A \gg k_d$, con lo cual en equilibrio se satisface $C \gg B$. Entonces el coeficiente de difusión efectiva es

$$D_{ef} = \frac{A^2 D_A}{A^2 + k_d B_T}. \tag{3.7}$$

Si además se cumple que $A^2 \gg k_d B_T$, o equivalentemente $A \gg B$ (utilizando el hecho de que en este caso $C \simeq B_T$), vemos que $D_{ef} = D_A$, un resultado que ya vimos antes y que simplemente refleja que la fracción de partículas $\mathcal{A}$ que son inmovilizadas por la reacción con el buffer es despreciable, y por consiguiente, la difusividad efectiva coincide con la de las partículas libres. Un caso más interesante para estudiar ocurre en el límite opuesto, cuando $A \ll k_d$ (o equivalentemente $C \ll B$). Entonces se obtiene una difusividad efectiva constante dada por:

$$D_{ef} = \frac{k_d D_A}{k_d + B_T}, \tag{3.8}$$

la cual tiene una interpretación microscópica clara en término de cómo se reduce la varianza de la posición de una partícula de la especie $\mathcal{A}$ por el efecto de las reacciones que experimenta con $\mathcal{B}$ [152]. La distancia cuadrática media L^2 que recorre una molécula de la especie $\mathcal{A}$ durante un lapso de tiempo T es proporcional al tiempo T_f durante el cual se encuentra libre (ya que suponemos que el complejo no difunde) es decir, $L^2 \sim T_f D_A$ [3]. Si llamamos T_s al tiempo medio que una molécula de $\mathcal{A}$ permanece inmovilizada formando el complejo $\mathcal{C}$, podemos escribir el tiempo $T_f = T - k_+ B T_f T_s$, ya que $k_+ B T_f$ es el número medio de colisiones reactivas que una molécula de $\mathcal{A}$ experimenta durante el lapso de tiempo en que se encuentra libre, y por lo tanto $k_+ B T_f T_s$ es el tiempo promedio que permanece ligada a alguna partícula $\mathcal{B}$, durante un intervalo T. Como supusimos que $C \ll B$, entonces $B \simeq B_T$, con lo

[3] Es estrictamente válida siempre y cuando las colisiones no reactivas con las moléculas $\mathcal{B}$ sean mucho menos frecuentes que con las del solvente. Pero esta hipótesis es la única compatible con la descripción macroscópica de las ecuaciones de reacción difusión, de modo que no estamos introduciendo nada adicional al considerar que el mismo coeficiente de autodifusión D_A sigue siendo válido en presencia de $\mathcal{B}$.

cual, teniendo en cuenta que $T_s \simeq \frac{1}{k_-}$ [4], podemos despejar el tiempo durante el cual una molécula de $\mathcal{A}$ está libre como $T_f = \frac{k_d T}{k_d + B_T}$. Entonces, $L^2 \sim T \frac{k_d D_A}{k_d + B_T} = T D_{ef}$ donde D_{ef} coincide exactamente con la definición previa (ecuación 3.8).

3.3. Interpretación en el caso general

Para estudiar el caso general, fuera de estas situaciones límites, proponemos analizar el comportamiento de un lattice gas [5] que capture no sólo el hecho de que las moléculas difunden y reaccionan, sino que lo hacen con tiempos característicos muy disímiles. En un lattice gas, cada especie es descripta por el número de partículas que, con una dada velocidad, ocupan los distintos nodos de una red regular. La evolución del sistema ocurre a tiempos discretos, durante los cuales cada partícula experimenta un *paseo al azar* debido a las colisiones no reactivas con moléculas de un solvente (este proceso ocurre en una escala que no se incluye en el modelo). En el límite continuo, el paseo aleatorio da lugar a los términos usuales de transporte difusivo. Por otro lado, cuando cierto número de partículas de las distintas especies -según el esquema de la reacción- se encuentran en un nodo de la red, con alguna probabilidad preestablecida ocurre una colisión reactiva.

La mayoría de los lattice gases suponen un principio de exclusión [6], que es introducido fundamentalmente por razones numéricas, dado que posibilita la ejecución en paralelo de la simulación. Al margen de esta ventaja, trabajar con el principio de exclusión es difícil de justificar físicamente, teniendo en cuenta que cada nodo de la red representa una vecindad ocupada por un gran número de partículas. Por otro lado, el principio de exclusión limita artificialmente las densidades posibles en un nodo, y restringe el tipo de reacción que es posible describir con el lattice gas [7]. En nuestro trabajo no impondremos esta restricción, ya que pretendemos obtener nuestras conclusiones en forma analítica. Como consecuencia se torna innecesario incluir explícitamente en el análisis a las velocidades de las partículas, las cuales pueden considerarse elegidas al azar en cada paso de tiempo sin importar el valor que hayan tomado en un intervalo de tiempo anterior (en el apéndice del trabajo [152] se demuestra la validez de esta suposición). Así, el tipo de descripción que obtendremos tendrá sentido únicamente en escalas de tiempo mayores que el tiempo medio en el cual se puede despreciar la autocorrelación en la velocidad de las partículas (tiempo de relajación de la velocidad), y en escalas de longitud mayores que el libre camino medio [8]. Dado que estaremos interesados en la derivación de las ecuaciones macroscópicas a partir de las microscópicas, gran parte del análisis teórico de las

[4] Si llamamos X_t al número de moléculas de la especie C que decayeron durante el intervalo $[0, t)$ en una partícula de $\mathcal{A}$ y una de $\mathcal{B}$, la probabilidad de que $X_t = 0$ es $P(t) = e^{-\lambda t}$, ya que X_t tiene una distribución de Poisson. Es fácil ver que $\lambda = k_-$, dado que la solución de $\frac{dC}{dt} = -k_- C$ es $C(t) = C(0)e^{-k_- t}$, y $P(t)$ no es otra cosa que $C(t)/C(0)$.

[5] Más exactamente deberíamos utilizar el modificador *reactivo* para describir a este tipo de lattice gases, para diferenciarlo de los lattice gases que se utilizan para modelar, por ejemplo, la ecuación de Navier-Stokes. En nuestro caso no es necesario imponer la conservación del momento de las partículas, ni preocuparse por leyes de conservación espúreas asociadas a la geometría de la red.

[6] Restricción en el número de partículas de una misma especie con una misma velocidad en cualquier nodo de la red.

[7] Además, hace que las partículas obedezcan una estadística de Fermi-Dirac, la cual resulta artificial en este contexto. Lattice gases sin principio de exclusión han sido analizados en la literatura. Por ejemplo en [78, 183].

[8] El lattice gas, evidentemente no nos dará información alguna acerca de las inhomogeneidades que ocurran en escalas espaciales menores que la distancia entre los nodos de la red.

secciones subsiguientes se realiza directamente en términos de promedios sobre ensambles. A este nivel de descripción, el esquema es similar a un lattice de Boltzmann, el cual está en cierta forma a mitad de camino entre los lattice gases reactivos y los métodos de diferencias finitas [31, 99]. En este sentido, parte del análisis de este capítulo se realiza en una escala mesoscópica.

3.3.1. Un lattice gas con dos escalas temporales

Como la idea es describir la dinámica en la escala lenta, supondremos que $\mathcal{E}_s$ (el operador de evolución para la especie s) mapea los números de ocupación cada intervalos relativamente largos de tiempo τ. Podemos pensar que la evolución desde un tiempo arbitrario t hasta $t+\tau$ puede dividirse en dos etapas. En la primera, ocurre una aplicación del operador de transporte $\mathcal{T}_s$, que acopla difusivamente los números de ocupación de la especie s en los nodos de cierta vecindad, y hace evolucionar el tiempo desde t hasta $t+\tau/2$. En la segunda etapa se aplica el operador de las reacciones $\mathcal{R}_s$, que acopla la ocupación de las distintas especies que reaccionan con s en un mismo nodo (operador local), y hace evolucionar el sistema hasta $t+\tau$. Por lo tanto, el operador de evolución es la composición de ambos operadores, $\mathcal{E}_s = \mathcal{R}_s \, o \, \mathcal{T}_s$. Es importante enfatizar que esta separación no implica que durante la aplicación de las reacciones no hay difusión, ya que esto no tendría sentido (dado que las reacciones ocurren por los choques entre las moléculas, y si éstas no difundieran durante la aplicación de $\mathcal{R}_s$, no podría haber reacciones entre ellas). Lo que este esquema implica es que podemos separar las reacciones del acoplamiento difusivo entre los nodos, lo cual será válido siempre y cuando las partículas que abandonen un nodo en un intervalo τ sean relativamente escasas. La manera que proponemos para expresar el hecho de que las reacciones ocurren en una escala de tiempo rápida, es suponer que el operador $\mathcal{R}_s$ representa a su vez, la composición, repetida un número grande de veces, de un nuevo operador $\mathcal{R}_s^T$ que actúa en una escala de tiempo mucho más corta, T, de la siguiente forma [9]:

$$\mathcal{R}_s = \underbrace{\mathcal{R}_s^T \, o \, \mathcal{R}_s^T \, o \cdots o \, \mathcal{R}_s^T}_{l \text{ veces}} \quad , \tag{3.9}$$

donde $l \equiv \tau/2T$ [10], y T/τ representa el cociente entre las escalas de tiempo en la que ocurre el proceso rápido (en el caso que analizaremos en este capítulo, la única reacción química) y el lento (el transporte difusivo). Esta separación artificial en dos etapas es conveniente para la resolución analítica. Lo único que se pretende capturar es el hecho de que durante un intervalo de tiempo τ, la probabilidad de que una dada molécula experimente una transformación química es mucho mayor que la probabilidad de que cambie su posición a un nodo vecino [11].

Si llamamos $\mathcal{N}_s(\vec{r}, t)$ a la variable aleatoria que representa el número de partículas de la especie s que ocupa el nodo de la red ubicado en la posición $\vec{r}$, a tiempo t, la

[9] El esquema presentado aquí es una variación, convenientemente adaptada para el caso de dos escalas temporales, del operador de evolución publicado en [77]. Allí, si bien todos lo operadores actúan en la misma escala, se introduce una composición de operadores de transporte con el propósito de simplificar la implementación numérica del lattice gas, dado que la relación deseada entre los coeficientes de difusión de las distintas especies puede escribirse en forma sucinta.

[10] Estrictamente, l es la parte entera de $\tau/2T$. Una hipótesis más realista sería suponer que l es una variable aleatoria con una distribución simétrica distribuida alrededor de $\tau/2T$. En la sección 3.5 se muestra en qué sentido las dos hipótesis son equivalentes.

[11] La validez de esta suposición es comprobada luego en la sección 3.5 de los resultados numéricos.

evolución se escribe entonces como:

$$\mathcal{N}_s(\vec{r}, t+\tau) = \mathcal{E}_s \mathcal{N}_s(\vec{r}, t)\,. \tag{3.10}$$

Con el propósito de conectar la descripción microscópica con la macroscópica (continua), es necesario formular una serie de hipótesis usuales. En primer lugar, se supone que los números de ocupación de cada especie varían en forma suave entre nodos vecinos (separados por una distancia λ), y en un mismo nodo en tiempos sucesivos (separados por una distancia τ). De esta forma se asegura que, al tomar el límite continuo, sea correcta la aproximación de las derivadas espaciales y temporales como el cambio en la ocupación de nodos vecinos (dividido por λ) o el cambio en la ocupación de un mismo nodo en dos instantes sucesivos (dividido por τ) respectivamente. En segundo lugar, se asume que el transporte difusivo es eficiente para mezclar las partículas, de forma tal que las correlaciones locales introducidas por las reacciones sean despreciables [12]. De este modo, el promedio del producto de los números de ocupación de las distintas especies en un dado instante de tiempo (tomado sobre un conjunto de réplicas idénticas del sistema) será equivalente al producto de los promedios de los números de ocupación de cada especie por separado (conocida como la hipótesis de *caos molecular*). Es importante notar que en nuestro caso, dada la lentitud relativa del proceso difusivo, no es claro que esta hipótesis sea aplicable. Sin embargo, al menos para el caso sencillo analizado en este capítulo, puede probarse que si la ocupación de cada nodo es suficientemente grande, la separación de escalas temporales hace que la covarianza entre los números de ocupación sea despreciable frente al producto de los promedios de los mismos, con lo cual es posible reobtener el mismo resultado que en el caso en que es aplicable la hipótesis de caos molecular, sin hacer uso de ella (ver Apéndice B).

Como veremos, si l es suficientemente grande ($T \ll \tau$) es válido suponer que los números de ocupación promedio [13] de los distintos reactivos alcanzarán valores de equilibrio locales luego de la aplicación de $\mathcal{R}_s$. Los valores de equilibrio serán en general distintos en diferentes nodos de la red, y dependerán sólo de la ocupación de cada especie previa a la aplicación de $\mathcal{R}_s$. Esta hipótesis está justificada por el hecho de que en la escala rápida cada nodo representa un sistema cerrado, e independientemente de cuál sea el conjunto de reacciones químicas, si estas ocurren en un sistema cerrado (y aislado) se alcanzará indefectiblemente una situación de equilibrio en la cual los números de ocupación fluctuarán alrededor de valores promedios [164]. Aun cuando no se satisfaga el caos molecular, si tanto l como los números de ocupación promedios son grandes, éstos últimos cumplirán, por otra parte, con la relación de equilibrio macroscópica usual entre las concentraciones de los reactivos.

Para entender por qué la hipótesis de equilibrio local es apropiada, pensemos al sistema subdividido en celdas de longitud λ, centradas alrededor de cada nodo de la red. Para poder modelar el transporte de partículas entre las celdas como un proceso difusivo en la escala de tiempo τ, es necesario que cada partícula colisione un gran número de veces con las moléculas del solvente (proceso que no se incorpora explícitamente en la descripción). Esto implica que el camino libre medio, λ_F, y

[12] Es decir, si un dado complejo molecular se disocia en un cierto número de productos, la difusión debe ser lo suficientemente rápida como para mezclar a estos últimos de forma tal que la reacción inversa (la formación del complejo) no se vea favorecida por la cercanía de los productos luego de la disociación.

[13] Básicamente, el promedio de $\mathcal{N}_s$ tomado sobre un ensamble de realizaciones independientes (ver 3.5).

la frecuencia media de colisiones no-reactivas, ν_C satisfacen: $\lambda_F \ll \lambda$, $\nu_C \tau \gg 1$. Sin embargo, λ y τ^{-1} no pueden ser elegidos arbitrariamente pequeños, porque es necesario suponer que los números de ocupación no varían demasiado durante un intervalo de tiempo τ. Esto implica que pocas partículas deben dejar cada celda con la aplicación de $\mathcal{E}_s$. Esto se satisface si $D\tau \ll \lambda^2$, que no es más que asumir que cada celda individual se comporta aproximadamente como un sistema cerrado en la escala rápida (es decir, durante los intervalos de tiempo T, donde $T \ll \tau$).

Dado que no hay acoplamiento difusivo entre los nodos en la escala rápida, puede probarse de modo completamente general que las reacciones que tienen lugar en cada nodo alcanzarán un estado de equilibrio, utilizando el hecho de que la evolución de un conjunto arbitrario de reacciones químicas puede ser descripto como un proceso markoviano [14] [164]. El estado de cada nodo aislado, en cada instante, se describe por medio de un vector $\mathcal{N}$, cuyos elementos son los números de ocupación de todas las especies a un tiempo t. La evolución de la distribución de probabilidad sobre todos los estados está gobernada por una matriz de transición que da la probabilidad por unidad de tiempo de que ocurra una reacción que transforme el estado $\mathcal{N}$ en un nuevo estado $\mathcal{N}'$, durante el intervalo Δt. Si el sistema es cerrado (y aislado, ya que suponemos que no intercambia energía con el exterior) puede probarse que dada una condición inicial, existe una única distribución de equilibrio que se alcanza para tiempos suficientemente largos [164]. Por ende, si $\tau \gg T_{eq}$, donde T_{eq} es el tiempo promedio que tarda la reacción en equilibrarse, el operador $\mathcal{R}_s$ puede pensarse como un proyector hacia los valores de equilibrio para los números de ocupación $\mathcal{N}_s$ en cualquiera de los nodos. Teniendo en cuenta la discusión del párrafo precedente, esto implica que se debe satisfacer $\lambda \gg \sqrt{D\,T_{eq}}$, o sea que la distancia media que recorre una partícula durante el tiempo que le lleva a las reacciones alcanzar el equilibrio, debe ser mucho menor que el tamaño de una celda.

Si inicialmente la ocupación de los nodos para la especie s es $\mathcal{N}_s(\vec{r},0)$, podemos esquematizar la evolución posterior como:

$$\mathcal{N}_s(\vec{r},0) \xrightarrow{\mathcal{T}_s} \mathcal{N}_s(\vec{r},\tau/2) \xrightarrow{\mathcal{R}_s} \mathcal{N}_s(\vec{r},\tau) \xrightarrow{\mathcal{T}_s} \mathcal{N}_s(\vec{r},3\tau/2) \xrightarrow{\mathcal{R}_s} \mathcal{N}_s(\vec{r},2\tau) \xrightarrow{\mathcal{T}_s} \ldots, \qquad (3.11)$$

Luego de un intervalo de tiempo θ posterior a la aplicación de $\mathcal{T}_s$, donde θ verifica $T_{eq} \leq \theta \leq \tau/2$, las variables aleatorias $\mathcal{N}_s(\vec{r},\tau(k+1/2)+\theta)$, $(k \in \mathbf{N})$ cumplen con la siguiente propiedad:

$$\langle \mathcal{R}_s^T \mathcal{N}_s(\vec{r},\tau(k+1/2)+\theta)\rangle = \langle \mathcal{N}_s(\vec{r},\tau(k+1/2)+\theta)\rangle \equiv N_s^{eq}(\vec{r},(k+1)\tau)\,, \qquad (3.12)$$

donde $\langle . \rangle$ representa el valor esperado tomado sobre un conjunto de réplicas del sistema. El esquema (3.11) enfatiza dos cosas: la primera, es que dada la enorme diferencia entre las escalas temporales de la reacción y la difusión, esta última actúa esencialmente sobre valores de equilibrio locales, los cuales son determinados únicamente por la abundancia relativa de las moléculas de las distintas especies presentes antes de la aplicación del operador de reacción $\mathcal{R}_s$. La segunda, es que la forma particular de $\mathcal{R}_s$ no es importante para nuestros propósitos, ya que en un sistema

[14] Un proceso markoviano es una tipo proceso estocástico particularmente relevante en física y química. Se define como la subclase de los procesos estocásticos que cumplen la siguiente condición (condición de Markov): si llamamos $\mathbf{N}_j$ al vector aleatorio en el instante t_j (en nuestro caso sus elementos corresponderían a los números de partículas de cada especie a tiempo t_j en el nodo en consideración), y tomamos un conjunto arbitrario de k tiempos sucesivos ($t_1 < t_2 < \ldots < t_k$), la probabilidad condicional $P(\mathbf{n}_k, t_k|\mathbf{n}_1, t_1; \mathbf{n}_2, t_2; \ldots; \mathbf{n}_{k-1}, t_{k-1}) = P(\mathbf{n}_k, t_k|\mathbf{n}_{k-1}, t_{k-1})$, donde $\mathbf{n}_j$ representa el valor tomado por el vector aleatorio $\mathbf{N}_j$ a tiempo t_j.

cerrado cualquier propuesta físicamente plausible del operador de reacción tiene que proyectar los números de ocupación hacia valores de equilibrio, luego de un intervalo de tiempo suficientemente grande.

Como mencionamos anteriormente, asumimos que el transporte es debido únicamente a las colisiones elásticas con las moléculas de un solvente. En las escalas de tiempo que proponemos resolver, las velocidades de las partículas no están correlacionadas, y sus trayectorias pueden ser vistas como paseos al azar. Si el medio es isotrópico, la acción del operador de transporte $\mathcal{T}_s$ es hacer que cada partícula se mueva con cierta probabilidad hacia uno de los ξ sitios vecinos de la red con igual probabilidad p_s (diferente en general para las distintas especies), o dejarla en el mismo nodo con una probabilidad $1 - \xi p_s$. Por simplicidad en la exposición consideraremos en esta discusión una red unidimensional ($\xi = 2$), cuya coordenada espacial denotamos por x. Redes de mayores dimensiones pueden ser tratadas en forma equivalente. Una forma de escribir en forma sucinta el operador de transporte para un lattice gas sin principio de exclusión es la siguiente [78]:

$$\mathcal{N}_s(x, t + \tau/2) = \mathcal{T}_s \mathcal{N}_s(x, t) = \sum_{i=-1}^{i=1} \sum_{\mu=1}^{\infty} \eta^{(i)}_{x+\lambda i, \mu} \mathcal{H}(\mathcal{N}_s(x + \lambda i, t) - \mu), \tag{3.13}$$

donde la primera suma es sobre las componentes de un triplete de variables aleatorias booleanas $\vec{\eta}_{x,i}$ las que toman uno de los valores $(1,0,0)$, $(0,1,0)$ o $(0,0,1)$ con probabilidad p_s, $1 - 2p_s$ o p_s respectivamente, y $\mathcal{H}$ es la función de Heaviside (escalón), definida como $\mathcal{H}(y) = 1$ si $y \geq 0$, y $\mathcal{H}(y) = 0$ en otro caso. Notemos que, en promedio, este operador moverá una fracción constante de partículas igual a p_s, hacia cada uno de los sitios vecinos de la red, tal como suponemos que ocurre en la práctica.

3.4. Aplicación a un caso simple

En esta sección aplicamos las ideas descriptas en los párrafos anteriores para estudiar la reacción:

$$\mathcal{A} + \mathcal{B} \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}} \mathcal{C}. \tag{3.14}$$

En primer lugar debemos notar que, dado que no se incluyen en el sistema ninguna clase de fuentes ni sumideros para las especies involucradas, el sistema completo es cerrado. Además es aislado, ya que suponemos que no hay flujos de energía hacia o desde el exterior. Como vimos anteriormente, el sistema, globalmente deberá tender a una situación de equilibrio [164]. Por otro lado, algunas cantidades se conservarán a lo largo de la evolución. La suma sobre todos los nodos de las moléculas de las especies $\mathcal{A}$ y $\mathcal{C}$ es claramente una cantidad conservada (al igual que la suma de $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$), ya que la creación de un tipo está directamente asociada a la desaparición del otro. Otra ley de conservación aparece porque cada reacción (en cualquiera de los dos sentidos) deja inalterada la diferencia entre el número total de moléculas de las especies $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$, ya que éstas aparecen o desaparecen de a pares. Sin embargo, estas leyes de conservación son globales, y no son válidas en cada nodo por separado, ya que la difusión puede aumentar o disminuir el número de partículas de una especie en un dado nodo independientemente de lo que suceda con el resto. Sin embargo, teniendo en cuenta el esquema (3.11), luego de la aplicación

del transporte cada nodo se comporta como un sistema cerrado y por lo tanto, las leyes de conservación globales que mencionamos arriba, son válidas en cada nodo durante el lapso en el que sólo actúan las reacciones. Esto es:

$$
\begin{aligned}
\mathcal{N}_A(x,t+\tau/2) - \mathcal{N}_B(x,t+\tau/2) &= \mathcal{N}_A(x,t+jT+\tau/2) - \mathcal{N}_B(x,t+jT+\tau/2) \\
\mathcal{N}_A(x,t+\tau/2) + \mathcal{N}_C(x,t+\tau/2) &= \mathcal{N}_A(x,t+jT+\tau/2) + \mathcal{N}_C(x,t+jT+\tau/2) \\
\mathcal{N}_B(x,t+\tau/2) + \mathcal{N}_C(x,t+\tau/2) &= \mathcal{N}_B(x,t+jT+\tau/2) + \mathcal{N}_C(x,t+jT+\tau/2)
\end{aligned}
\tag{3.15}
$$

donde $t = n\tau$, $n \in \mathbf{N}$ (es decir en los miembros izquierdos están los números de ocupación luego del paso difusivo), y $j \in 1, 2, \ldots, l$. Notamos que las leyes de conservación (3.15), no son todas independientes. Para abreviar la notación en los cálculos que siguen, llamaremos momentáneamente $\mathcal{N}_s(x,j) = \mathcal{N}_s(x,t+jT+\tau/2)$. Puede demostrarse (ver el Apéndice B) que en cada paso de tiempo ($\forall j$) las varianzas de todos los números de ocupación son idénticas: $Var(\mathcal{N}_A(x,j)) = Var(\mathcal{N}_B(x,j)) = Var(\mathcal{N}_C(x,j))$ y que las siguientes relaciones se verifican:

$$
\begin{aligned}
\langle \mathcal{N}_A(x,j)\mathcal{N}_B(x,j)\rangle &= \langle \mathcal{N}_A(x,j)\rangle\langle \mathcal{N}_B(x,j)\rangle + Var(\mathcal{N}_A(x,j)) \\
\langle \mathcal{N}_A(x,j)\mathcal{N}_C(x,j)\rangle &= \langle \mathcal{N}_A(x,j)\rangle\langle \mathcal{N}_C(x,j)\rangle + Var(\mathcal{N}_A(x,j))
\end{aligned}
\tag{3.16}
$$

El resultado que las varianzas de todos los números de ocupación coincidan es razonable, ya que en la escala rápida (es decir, en ausencia de acoplamiento difusivo entre nodos), las especies en cada una de las celdas experimentan exactamente las mismas fluctuaciones en sus números de ocupación. Si el número de partículas en cada nodo es suficientemente grande, y la probabilidad de que cada partícula experimente una reacción durante el lapso T es pequeña, la varianza de los números de ocupación se vuelve despreciable frente al producto de los promedios (ver Apéndice B). Por lo tanto, si -al igual que antes- denotamos por $N_s^{eq}(x,j) \equiv \langle \mathcal{N}_s(x,j)\rangle$ a los promedios sobre los números de ocupación en el ensamble una vez alcanzado el equilibrio, es decir tomando un j es tal que $jT \geq T_{eq}$, se cumplirá:

$$
\begin{aligned}
\langle \mathcal{N}_A(x,j)\mathcal{N}_B(x,j)\rangle &= \langle \mathcal{N}_A(x,j)\rangle\langle \mathcal{N}_B(x,j)\rangle = N_A^{eq}(x,j)\, N_B^{eq}(x,j) \\
\langle \mathcal{N}_A(x,j)\mathcal{N}_C(x,j)\rangle &= \langle \mathcal{N}_A(x,j)\rangle\langle \mathcal{N}_C(x,j)\rangle = N_A^{eq}(x,j)\, N_C^{eq}(x,j).
\end{aligned}
\tag{3.17}
$$

Puede probarse que los mismos cumplen con la relación algebraica usual, esto es (especializando en $j = l$):

$$
N_A^{eq}(x,t+\tau)N_B^{eq}(x,t+\tau) = \bar{k}_d N_C^{eq}(x,t+\tau)\,, \tag{3.18}
$$

donde $\bar{k}_d = k_d\lambda$ y k_d es la constante de disociación de la reacción (ver el Apéndice B). Además, tomando promedios sobre las ecuaciones (3.16), es inmediato demostrar que se verifica:

$$
N_A(x,t+\tau/2) - N_B(x,t+\tau/2) = N_A^{eq}(x,t+\tau) - N_B^{eq}(x,t+\tau), \tag{3.19}
$$

$$
N_A(x,t+\tau/2) + N_C(x,t+\tau/2) = N_A^{eq}(x,t+\tau) + N_C^{eq}(x,t+\tau), \tag{3.20}
$$

$$
N_B(x,t+\tau/2) + N_C(x,t+\tau/2) = N_B^{eq}(x,t+\tau) + N_C^{eq}(x,t+\tau), \tag{3.21}
$$

donde $t = n\tau$. Podemos utilizar estas ecuaciones para calcular los valores locales de equilibrio en función de los valores promedio iniciales (antes de la aplicación de las reacciones). Resolviendo las ecuaciones (3.19), (3.20) junto con la (3.18),

encontramos que las raíces no negativas son:

$$
\begin{aligned}
N_A^{eq}(x,t+\tau) &= \frac{1}{2}\Big[N_A(x,t+\tau/2) - N_B(x,t+\tau/2) - \bar{k}_d + h(x,t+\tau/2)\Big], \\
N_B^{eq}(x,t+\tau) &= \frac{1}{2}\Big[N_B(x,t+\tau/2) - N_A(x,t+\tau/2) - \bar{k}_d + h(x,t+\tau/2)\Big], \\
N_C^{eq}(x,t+\tau) &= \frac{1}{2}\Big[N_A(x,t+\tau/2) + N_B(x,t+\tau/2) + 2\,N_C(x,t+\tau/2) + \\
&\qquad \bar{k}_d - h(x,t+\tau/2)\Big],
\end{aligned}
\tag{3.22}
$$

donde definimos la función $h(x,t)$ como:

$$
h(x,t) = \Big[\big(\bar{k}_d - N_A(x,t) + N_B(x,t)\big)^2 + 4\bar{k}_d\,(N_A(x,t) + N_C(x,t))\Big]^{\frac{1}{2}}. \tag{3.23}
$$

A partir de la ecuación (3.13), la evolución de los promedios de los números de ocupación viene dada simplemente por:

$$
N_s(x,t+\tau/2) = N_s^{eq}(x,t) + p_s\Big(N_s^{eq}(x+\lambda,t) + N_s^{eq}(x-\lambda,t) - 2N_s^{eq}(x,t)\Big). \tag{3.24}
$$

A partir de las ecuaciones (3.19) y (3.24), encontramos que:

$$
\Delta N_A - \Delta N_B = p_A\mathcal{D}_A - p_B\mathcal{D}_B, \tag{3.25}
$$

donde introdujimos la notación abreviada:

$$
\begin{aligned}
\Delta N_s &\equiv N_s^{eq}(x,t+\tau) - N_s^{eq}(x,t), \\
\mathcal{D}_s &\equiv N_s^{eq}(x+\lambda,t) + N_s^{eq}(x-\lambda,t) - 2N_s^{eq}(x,t).
\end{aligned}
\tag{3.26}
$$

La ecuación (3.25) enfatiza que la única fuente para la diferencia entre el número relativo de partículas $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$ en cualquier nodo de la red, durante un intervalo de tiempo τ es debida a la acción del operador de transporte actuando sobre cada especie por separado.

Por simplicidad, supongamos que $p_C = 0$ (*i.e.*, $\mathcal{C}$ no difunde) [15]. Utilizando las ecuaciones (3.20) y (3.24) encontramos:

$$
\Delta N_A + \Delta N_C = p_A\mathcal{D}_A. \tag{3.27}
$$

Dado que las diferencias ΔN_s, están evaluadas en el equilibrio, podemos utilizar la ecuación (3.18). Entonces [16] hallamos:

$$
\bar{k}_d\Delta N_C = N_A^{eq}\Delta N_B + N_B^{eq}\Delta N_A + \Delta N_A\Delta N_B \simeq N_A^{eq}\Delta N_B + N_B^{eq}\Delta N_A\ , \tag{3.28}
$$

donde utilizamos la hipótesis de que los números de ocupación de cualquier especie en un mismo nodo pueden variar sólo en pequeñas cantidades en cada paso de tiempo. Podemos resolver finalmente para la variación de N_A^{eq} como:

$$
\Delta N_A\left[1 + \frac{1}{\bar{k}_d}(N_A^{eq} + N_B^{eq})\right] = p_A\mathcal{D}_A - \frac{N_A^{eq}}{\bar{k}_d}(p_B\mathcal{D}_B - p_A\mathcal{D}_A). \tag{3.29}
$$

[15] El caso en que difunde se trata de forma muy similar [152].

[16] Suprimimos la notación explícita para la posición y el tiempo en los promedios en equilibrio.

De la misma forma hallamos:

$$\Delta N_B\left[1+\frac{1}{\bar{k}_d}(N_A^{eq}+N_B^{eq})\right]=p_B\mathcal{D}_B-\frac{N_B^{eq}}{\bar{k}_d}(p_A\mathcal{D}_A-p_B\mathcal{D}_B)\,. \tag{3.30}$$

Notemos que a partir de estas ecuaciones es inmediato obtener el límite continuo. Como es usual, a partir de la dinámica promediada hacemos $\tau \to 0$ y $\lambda \to 0$, manteniendo el cociente λ^2/τ finito. Pasando los números de ocupación promedios a concentraciones ($S(x,t) = N_s(x,t)/\lambda$), multiplicando (3.29) y (3.30) por $1/\tau$, y definiendo $D_A = p_A\lambda^2/\tau$ y $D_B = p_B\lambda^2/\tau$, se obtienen las ecuaciones (3.2) y (3.3) con $D_C = 0$.

Para interpretar más claramente el significado microscópico de los términos de (3.29) y (3.30) es mejor escribirlas en forma levemente diferente. Para la ecuación 3.29 obtenemos:

$$\Delta N_A = p_A\mathcal{D}_A - \frac{1}{\bar{k}_d + N_A^{eq} + N_B^{eq}}\left(N_A^{eq}p_B\mathcal{D}_B + N_B^{eq}p_A\mathcal{D}_A\right)\,. \tag{3.31}$$

El miembro derecho de esta ecuación (una ecuación análoga vale para ΔN_B) separa las dos componentes responsables de la variación temporal de N_A^{eq} en un dado nodo de la red x. El primer término tiene en cuenta simplemente el transporte difusivo de partículas desde y hacia x. El segundo término es el más interesante de estudiar ya que es el que da origen a los términos de difusión cruzados y a la dependencia en la densidad de las difusividades. Teniendo en cuenta que $p_s\mathcal{D}_s$ es la cantidad de partículas promedio de la especie s que ingresó en la celda ubicada en x durante el paso difusivo, vemos que la suma de los productos $N_A^{eq}p_B\mathcal{D}_B$ y $N_B^{eq}p_A\mathcal{D}_A$ son proporcionales a la cantidad de partículas de $\mathcal{A}$ y de $\mathcal{B}$ que desaparecerán durante el intervalo de tiempo τ *debido a las reacciones químicas* (rápidas). Si ingresan n_B partículas de $\mathcal{B}$ y ninguna de $\mathcal{A}$, esto es, si $p_B\mathcal{D}_B = n_B$ y $p_A\mathcal{D}_A = 0$, el cambio neto debido a las reacciones es proporcional a $n_B N_A^{eq}$ ya que N_A^{eq} y N_B^{eq} estaban en equilibrio. Es de esperar que el efecto de este término disminuya al aumentar $\bar{k}_d$, ya que en este caso la desaparición de $\mathcal{A}$ y de $\mathcal{B}$ será más improbable. Esto es exactamente lo que se evidencia en el prefactor que multiplica la suma. Si por el contrario $\bar{k}_d \ll N_A^{eq} + N_B^{eq}$, puede verse que este término no es más que un promedio pesado (con factor de peso $N_A^{eq}/(N_A^{eq}+N_B^{eq})$) sobre la cantidad de partículas de $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$ que ingresaron al nodo y reaccionaron con las que estaban en equilibrio antes de la aplicación de la difusión. Cada vez que ingresen (o egresen) moléculas al nodo este término dará una contribución no nula, excepto cuando a pesar de haber un ingreso neto de una especie, hay un egreso neto de la otra, y esto ocurre de tal manera que el promedio pesado se anula.

Vemos por lo tanto que detrás de la forma difusiva de algunos de los términos que hallamos en la derivación continua, como por ejemplo, los términos de difusión cruzados, o las difusividades dependientes de la densidad, hay un origen químico común. La razón por la que estos términos puedan expresarse en forma de laplacianos es porque las diferencias entre las concentraciones en sitios vecinos son las que –en el caso de difusión lenta– regulan las tasas de las reacciones, y no porque representen un transporte genuino de partículas.

3.5. Simulaciones numéricas

En esta sección comentaremos los resultados de las simulaciones numéricas con las que chequeamos la validez de la descripción reducida y la interpretación física del origen microscópico de los términos de transporte, así como también mostramos que las conclusiones obtenidas para el caso sencillo analizado en las secciones anteriores pueden ser extendidas sin dificultad a situaciones donde las reacciones son a la vez más numerosas y complejas. En todas las simulaciones, el operador de evolución $\mathcal{E}$ actúa sobre una red de tamaño L (lineal o cuadrada) en la que se imponen condiciones periódicas en los bordes. Como mencionamos antes, en ninguna de las implementaciones imponemos el principio de exclusión.

Las simulaciones numéricas están focalizadas en dos sistemas. El primero, es el que hemos analizado analíticamente en las secciones anteriores, es decir, tres especies $\mathcal{A}$, $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$ en un recipiente cerrado y aislado reaccionando en una escala rápida de acuerdo a (3.1) y difundiendo en una escala comparativamente lenta. Inicialmente, $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$ están distribuidos en forma homogénea a lo largo de una red cuadrada en la cual hay una acumulación local de moléculas de la especie $\mathcal{A}$ en el centro. El proceso difusivo tiende a homogeneizar la densidad de $\mathcal{A}$ a lo largo de la red. En este caso el reescaleo no-lineal de la difusividad es sólo un efecto pasajero, dado que el sistema no es capaz de mantener una estructura inhomogénea.

La segunda situación que simulamos es una en la cual el sistema macroscópico es capaz de soportar patrones de Turing, es decir, estructuras inhomogéneas estacionarias (ver capítulo 4) [17]. El ejemplo que elegimos es el de un sistema abierto con seis especies, $\mathcal{A}$, $\mathcal{S}_2$, $\mathcal{X}$, $\mathcal{Y}$, $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$, que reaccionan de acuerdo al siguiente esquema:

$$\mathcal{A} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} \mathcal{X}, \qquad \mathcal{Y} \overset{k_2}{\rightarrow} \mathcal{S}_2, \qquad 2\,\mathcal{A} + \mathcal{S}_2 \overset{k_3}{\rightarrow} 3\,\mathcal{A},$$
$$\mathcal{A} + \mathcal{B} \underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} \mathcal{C}. \tag{3.32}$$

El conjunto de las reacciones en la primera fila de la ecuación (3.32), constituye el modelo de Schnackenberg [138]. Manteniendo la concentración de $\mathcal{X}$ e $\mathcal{Y}$ en ciertos valores de no-equilibrio, es posible mostrar que este sistema es capaz de auto-organizarse temporalmente, apareciendo espontáneamente oscilaciones en las concentraciones de $\mathcal{A}$ y $\mathcal{S}_2$. Además, si el cociente entre los coeficientes de difusividad $d = D_{S_2}/D_A$ es mayor que un cierto valor umbral, también este sistema es capaz de formar estructuras de Turing [107]. Una motivación importante para estudiar este modelo es que se cree que un mecanismo similar controla ciertas características de la *Acetabularia* (un alga unicelular), en particular la formación de una estructura, cuya fenomenología está ligada a la de los patrones de Turing. La evidencia experimental sugiere que las especies químicas relevantes en la formación del patrón en este organismo son iones de calcio ($\mathcal{A} = Ca^{2+}$) y AMP-cíclico ($\mathcal{S}_2 = cAMP$) [62, 107].

Sin embargo, al proponer este modelo como explicación de los experimentos surge un inconveniente: el cociente entre las difusividades libres del Ca^{2+} y del $cAMP$ está por debajo del valor umbral de la inestabilidad de Turing. Sin embargo, teniendo en cuenta que en las células *in vivo*, el Ca^{2+} interactúa rápidamente con ciertas

[17] En el lattice gas, esta característica se manifiesta tomando el promedio temporal de un número suficientemente grande de estados sucesivos, lo cual, una vez alcanzada la situación estacionaria de no-equilibrio resulta equivalente al promedio sobre un ensamble [24].

moléculas (buffers), es interesante extender el modelo de Schnackenberg de modo de tener en cuenta esta reacción. Bajo ciertas condiciones (las cuales son estudiadas exhaustivamente en el capítulo 4 para un sistema tipo activador-inhibidor genérico, y luego aplicadas al caso de Schnackenberg a modo de ejemplo), la interacción con un buffer puede estabilizar los patrones en regiones donde no sería *a priori* posible observarlos, ya que no cumplen con el requisito del cociente de las difusividades. Para tener en cuenta la interacción rápida del calcio con un buffer proponemos la reacción de la segunda fila de la ecuación (3.32), que es la usual entre un buffer y un ión, donde $\mathcal{B}$ es el buffer y $\mathcal{C}$ es el complejo formado por el calcio y el buffer [18].

Además de chequear la validez de la reducción en un sistema más complicado, este segundo conjunto de simulaciones sirvió para estudiar los límites de aplicabilidad de la misma. En particular, analizamos las regiones con grandes gradientes de concentración, donde es de esperar que sea máximo el apartamiento de la descripción reducida con respecto a la solución exacta. Por último, uno de los objetivos de estas simulaciones fue la de tener un sistema que simule las características de los experimentos de laboratorio en los cuales se han observado patrones de Turing. Esto es, observar numéricamente cómo la interacción selectiva con una especie inmóvil puede cambiar la forma del espacio de Turing de modo tal que estos patrones aparezcan en una región realista del conjunto de parámetros. En el capítulo 4 hallamos la parametrización de las curvas que limitan el espacio de Turing, dando una caracterización más profunda de este fenómeno.

3.5.1. Algoritmos numéricos

Incluimos en esta sección una breve descripción de los algoritmos utilizados. En el sistema de reacción difusión definido por el esquema de reacción (3.1) el operador de evolución es dividido en dos partes. Durante la mitad del tiempo τ el operador de reacción $\mathcal{R}_s^T$ es aplicado l veces, cada una de las cuales a un nuevo conjunto de partículas elegidas al azar, dentro de cada celda. Que la reacción efectivamente ocurra o no, es decidido al azar con una cierta probabilidad preestablecida. Durante la otra mitad de la evolución, el operador de transporte, $\mathcal{T}^\tau$, es aplicado sobre un conjunto de partículas elegidas al azar, de forma tal que, en promedio, cada partícula tenga una chance de moverse hacia un sitio vecino de la red. Por comparación, implementamos dos versiones de la separación del operador de evolución, que difieren sobre el modo en el que l es elegido en cada paso de tiempo τ. Mientras que en la primera, se elige siempre el mismo valor de $l = \tau/2T$, en la segunda (menos artificial) el valor de l es elegido al azar de una distribución gaussiana con valor medio $\tau/2T$ y desviación estándar $\tau/9T$ (elegida para asegurar que la probabilidad de que el valor de l sorteado en alguna etapa sea mayor o igual a τ/T sea despreciable). La comparación de estas implementaciones indica que la hipótesis simplificadora de tomar un l fijo en los cálculos analíticos es justificada, ya que no introduce diferencias importantes. La mayoría de las simulaciones que mostramos consideran el valor de l fijo.

El operador de transporte ($\mathcal{T}$) mueve cada partícula de la especie s a cualquiera

[18] Para los propósitos de este capítulo, no es necesario especificar un buffer en particular. Lo único que requerimos en este capítulo (no así en el análisis más general del próximo) es que la difusividad del buffer sea despreciable, lo que es válido para muchos de los buffers endógenos (como por ejemplo la troponina-C [42]) que interactúan con el calcio *in vivo*.

de sus sitios vecinos con igual probabilidad p_s, o la deja en el mismo nodo con probabilidad $1 - 4p_s$. En todas las simulaciones asumimos que p_s era mayor para $\mathcal{A}$ que para $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$. Esto implica que el coeficiente de difusividad de $\mathcal{A}$ es mayor que los de $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$. En cuanto a las reacciones, seguimos esencialmente la propuesta de [78]. El esquema básicamente es el siguiente: si en un nodo los números de ocupación son $\mathcal{N}_A$ y $\mathcal{N}_B$, la reacción remueve una partícula de $\mathcal{A}$ y una de $\mathcal{B}$ y agrega una de $\mathcal{C}$ en el mismo sitio con probabilidad $P_{AB}\mathcal{N}_A\mathcal{N}_B$. Del mismo modo, si hay $\mathcal{N}_C$ partículas, una de ellas es reemplazada por una $\mathcal{A}$ y una $\mathcal{B}$ con probabilidad $P_C\mathcal{N}_C$. Los valores de las constantes P_{AB} y P_C garantizan que en ningún instante de tiempo las probabilidades de reacción excedan la unidad [78]. El paso de tiempo corto T, es elegido de tal manera de asegurar que ambas probabilidades permanezcan acotadas por debajo de uno durante toda la evolución. En todas las simulaciones utilizamos $k_d = k_-/k_+ = 1$, donde k_- y k_+ son las tasas de reacción macroscópicas que se calculan a partir de P_C y P_{AB} respectivamente [78].

En cuanto al esquema (3.32) algunos pequeños cambios fueron introducidos en el operador de reacciones. En este caso encontramos más directa la propuesta de [24]. Por ejemplo, en la reacción $\mathcal{A} \rightarrow \mathcal{X}$, se elige un número aleatorio para cada partícula $\mathcal{A}$ con el objeto de decidir, de acuerdo a una cierta probabilidad (que denotamos $P_{\mathcal{A}\rightarrow\mathcal{X}}$), si se transforma o no en una molécula $\mathcal{X}$. Para la reacción trimolecular, la situación es levemente más complicada: para cada nodo, todos los posibles tripletes formados por 2 partículas de $\mathcal{A}$ y una de $\mathcal{S}_2$ son colocados en una lista, y un número aleatorio es sorteado secuencialmente para decidir si un dado triplete reacciona, transformándose en 3 $\mathcal{A}$. Si la reacción ocurre, todos los tripletes que contenían las 2 moléculas de $\mathcal{X}$ que participaron de la reacción son removidos de la lista. La secuencia se detiene cuando se ha sorteado un número aleatorio para todos los tripletes que han quedado en la lista, durante el intervalo de tiempo en consideración. Es un ejercicio muy sencillo demostrar que esta regla para las reacciones es compatible con la descripción provista por la ley de acción de masas en el límite de baja probabilidad de reacción y números grandes de partículas por nodo.

3.5.2. Simulaciones para el caso simple

La figura 3.1 muestra la evolución temporal en la escala lenta del promedio de los desplazamientos cuadráticos netos de todas las partículas de la especie $\mathcal{A}$, *i.e.*, $< (\vec{r}(t) - \vec{r}(0))^2 >$ sujetas a la reacción (3.1). Las especies $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$ fueron distribuidas inicialmente en forma aleatoria a lo largo de la red (distribución uniforme), mientras que las moléculas de $\mathcal{A}$ fueron concentradas dentro de un rectángulo de 3×3 ubicado en el centro de la red cuadrada de lado $L = 50$. En todas las simulaciones el coeficiente de difusión libre de $\mathcal{A}$ fue 3,5 veces mayor que el correspondiente a $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$ ($p_A = 0{,}175$, $p_B = p_C = 0{,}05$). Las distintos símbolos corresponden a simulaciones con un número relativo diferente de partículas de cada especie. El valor de l fue fijado en 10^4 para todas ellas. Incluimos como referencia dos rectas (líneas de segmentos y puntos) correspondientes al caso de difusión pura con $p_A = 0{,}175$ (la de mayor pendiente) y con $p_A = 0{,}05$ (la de menor pendiente). Encontramos que cuando el número de partículas de $\mathcal{A}$ agrupadas en el centro excede ampliamente la cantidad de $\mathcal{B}$, el comportamiento es básicamente difusivo (lineal), con un coeficiente de difusión igual al caso de difusión libre de $\mathcal{A}$ (la curva de círculos vacíos). Esto es intuitivamente claro ya que en este caso, la gran mayoría de las partículas de $\mathcal{A}$ no experimentan reacciones, y por lo tanto su movilidad no se ve afectada por la pre-

sencia de $\mathcal{B}$. Cuando la cantidad de $\mathcal{B}$ aumenta, el comportamiento del promedio de los desplazamientos cuadráticos netos deja de ser lineal, indicando que el transporte en este caso no es una difusión simple (curva con los cuadrados vacíos). En esta situación es evidente del gráfico que el efecto de la reacción no es el de introducir un factor de reescaleo constante, sino más bien, la dependencia temporal de la difusividad se debe a la dependencia no-lineal en la concentración de la difusividad de $\mathcal{A}$, y a la forma particular tipo función delta que elegimos como condición inicial para estas moléculas. Para tiempos cortos, sin embargo, incluso cuando las cantidades de todas las especies en la red sean comparables, la superabundancia relativa de $\mathcal{A}$ en la región central, hace que inicialmente la evolución sea similar a la del caso anterior (la derivada a tiempos cortos es cercana a 0,7). Sin embargo, al transcurrir el tiempo las partículas de $\mathcal{A}$ penetran en la región en la que su densidad es baja, y con una alta probabilidad reaccionan formando un complejo de menor movilidad. Consecuentemente, al ser medido su desplazamiento efectivo (una vez disuelto el complejo) su movilidad efectiva se habrá reducido. A medida que la inhomogeneidad inicial desaparece (lo cual es irremediable en este tipo de sistemas cerrados), los coeficientes de difusión se acercan a valores asintóticos constantes, los cuales dependen únicamente de las densidades iniciales y de la constante de disociación. La curva con diamantes muestra el caso opuesto, en el que $\mathcal{B}$ está en exceso con respecto a $\mathcal{A}$. El comportamiento es de nuevo básicamente difusivo, con un coeficiente de difusión igual al del complejo $\mathcal{C}$. En [152] se comparan asimismo los desplazamientos cuadráticos del lattice gas con los de la integración de las ecuaciones reducidas (3.2)-(3.4) para parámetros y condiciones iniciales equivalentes, encontrándose que ambas evoluciones resultan compatibles.

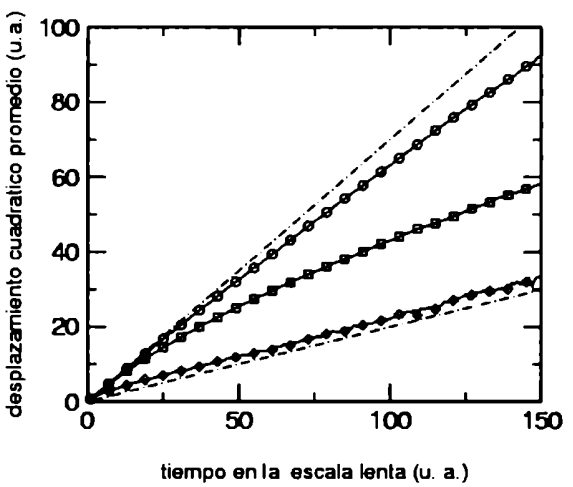

Figura 3.1: Desplazamiento cuadrático promedio de las partículas $\mathcal{A}$ como función del tiempo medido en la escala lenta, en una red cuadrada de lado $L = 50$. Los círculos corresponden a ($n_A = 75000$, $n_B = n_C = 5000$), los cuadrados a ($n_A = n_B = n_C = 75000$) y los diamantes a ($n_A = 5000$, $n_B = n_C = 75000$), donde n_s es el número total de partículas colocadas inicialmente en la red pertenecientes a la especie s. En los tres casos, la condición inicial para $\mathcal{A}$ fue tipo delta de Dirac, mientras que para $\mathcal{B}$ y $\mathcal{C}$ la distribución inicial fue aleatoria. Las líneas de segmentos rectas corresponden al caso de difusión pura con $p_A = 0{,}175$ (la de pendiente más pronunciada) y $p_A = 0{,}05$.

La figura 3.2 muestra la evolución de una realización del lattice gas a través del promedio de $\mathcal{N}_A$ sobre una vecindad de 3×3 ubicada a 10 sitios de distancia del centro. Asimismo, se muestra la evolución de los valores de equilibrio como función del tiempo. La distribución inicial de las partículas es la misma que en el gráfico anterior. Los distintos gráficos corresponden a valores diferentes de l. Para valores de l grandes ((d), $l = 3{,}10^5$ y (c), $l = 5{,}10^4$), la reacción rápidamente lleva al sistema al equilibrio y por lo tanto, como era de esperar de la ecuación (3.11), la difusión actúa esencialmente sobre los valores de equilibrio determinados por la abundancia relativa de las diferentes especies. Es en estas circunstancias en las que las ecuaciones reducidas obtenidas en el continuo (3.2) y (3.3) resultan válidas. A medida que l toma valores menores, en cada nodo no se llega a alcanzar el equilibrio, y por lo tanto surgen diferencias entre la trayectoria real y la obtenida a partir de la descripción reducida, tal como se muestra en la figura 3.2 ((b), $l = 10^4$ y (a), $l = 10^3$). Teniendo en cuenta la condición inicial, el número de partículas que llega al punto exploratorio está por encima del valor de equilibrio. Sin embargo, dado que el sistema eventualmente se aproxima a una situación homogénea, el apartamiento de ambas curvas es, en este caso, sólo un efecto transitorio.

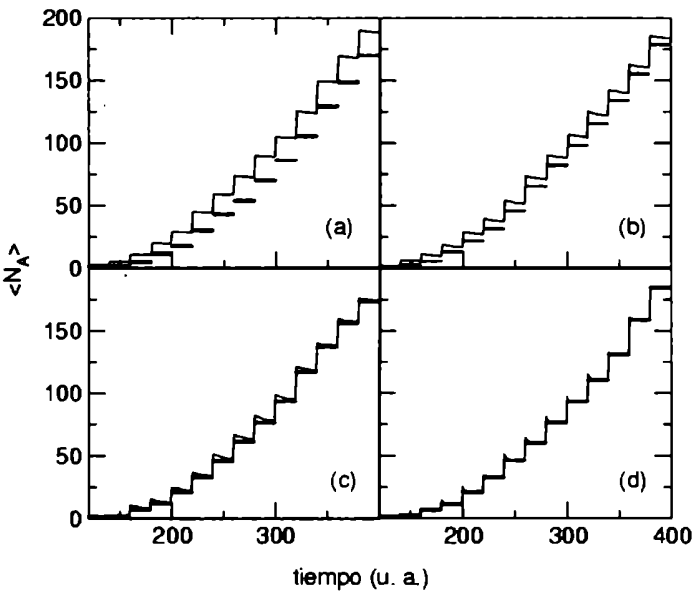

Figura 3.2: Evolución en la escala rápida de una realización de $\mathcal{N}_A$ y N_A^{eq}, promediada sobre una vecindad de 3×3 alrededor de un punto exploratorio ubicado 10 sitios alejados del centro. La condición inicial es la misma que en la figura 3.1, con $n_A = 250000$ y $n_B = n_C = 100000$. Las líneas de trazo grueso corresponden a los valores de equilibrio de $\mathcal{N}_A$, y las curvas finas a la evolución real del promedio de los números de ocupación en la vecindad. Utilizamos $l = 10^3$, $l = 10^4$, $l = 5{,}10^4$, y $l = 3{,}10^5$ en las figuras (a), (b), (c), y (d), respectivamente.

En la figura 3.3 graficamos la misma evolución que en la figura 3.2 (b), pero en este caso, el valor de l es elegido aleatoriamente a partir de una distribución gaussiana, tal como explicamos anteriormente. La línea sólida corresponde a una realización, y la línea segmentada al promedio de 80 realizaciones independientes. Como era de esperar, la forma artificialmente escalonada de cada realización individual se borra

al tomar el promedio sobre el ensamble. De esta forma, el acercamiento local hacia el equilibrio, que puede parecer artificial en la figura 3.2 o en una realización individual de la figura 3.3, es el que subyace en la solución promedio. Al aumentar el número de réplicas, el sistema colapsará a una sola curva suave, correspondiente a la solución de la ecuación en derivadas parciales.

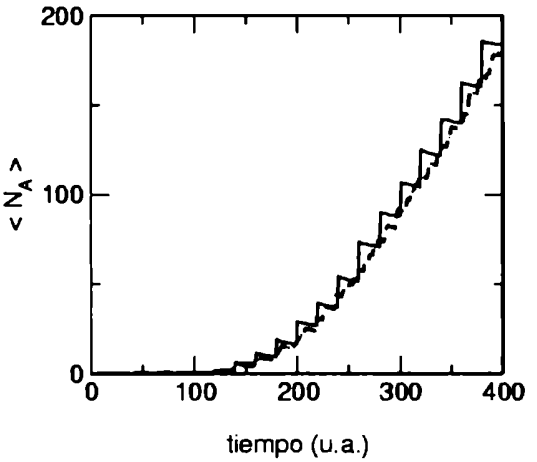

Figura 3.3: Similar a la figura 3.2, pero considerando l como una variable aleatoria. Las líneas llenas corresponden a una sola realización del lattice, mientras que la segmentada es el promedio sobre 80 realizaciones independientes.

3.5.3. Simulaciones para un caso más complicado

Discutimos en esta sección los resultados obtenidos para el sistema de seis especies reaccionando de acuerdo al esquema (3.32). En la figura 3.4, mostramos los resultados de una simulación en una dimensión. Inicialmente todas las partículas son dispuestas aleatoriamente en los nodos de la red, a la cual le imponemos condiciones periódicas en los bordes. Dividimos la red, de longitud $L = 10\mu m$ en 350 celdas, y tomamos como paso de tiempo un intervalo de $2 \times 10^{-7}s$. Los coeficientes de difusión de $\mathcal{A}$ e $\mathcal{S}_2$ fueron fijados en $D_A = 40\mu m^2/s$ y $D_{S_2} = 160\mu m^2/s$. Inicialmente, colocamos $n_A = 700$, $n_{S_2} = 3100$, $n_X = 780$, $n_Y = 630$, $n_B = 17000$ y $n_C = 2450$. Las probabilidades de reacción microscópicas por unidad de tiempo fueron fijadas en $P_{\mathcal{X}\to\mathcal{A}} = 0{,}00002$, $P_{\mathcal{A}\to\mathcal{X}} = 0{,}0002$, $P_{\mathcal{Y}\to\mathcal{S}_2} = 0{,}0002$, $P_{\mathcal{S}_2\to\mathcal{A}} = 0{,}00002$, $P_{\mathcal{B}\to\mathcal{C}} = 0{,}02$ y $P_{\mathcal{C}\to\mathcal{B}} = 0{,}2$, medidas en s^{-1}. Como mencionamos anteriormente, si la reacción con el buffer no fuese incluida, este sistema no sería capaz de soportar estructuras inhomogéneas estacionarias para ningún juego de constantes de la reacción (en este caso, las probabilidades por unidad de tiempo), ya que el cociente entre las difusividades que impusimos está por debajo del valor crítico $d < d_c \simeq 6$ [107]. Sin embargo, dada la interacción presente con un buffer inmóvil, $\mathcal{B}$, la simetría de la condición inicial se rompe, dando lugar a un patrón de Turing, tal como mostramos en la figura 3.4. Esta figura corresponde a un promedio temporal de los números de ocupación –divididos por λ– de $\mathcal{A}$ (círculos llenos) y $\mathcal{C}$ (cuadrados vacíos) durante un intervalo de tiempo de $0{,}05s$, tomado luego de los primeros $0{,}5s$ de evolución, en los cuales el sistema llega a una situación en la cual los promedios son aproximadamente estacionarios. A pesar de que los sucesivos estados microscópicos varían incesantemente, luego de un

transitorio las fluctuaciones ocurren alrededor de un promedio bien definido, que es el que mostramos en esta figura. Dado que las autocorrelaciones entre estados sucesivos desaparecen rápidamente, tomar el promedio temporal es equivalente a tomar el promedio sobre el ensamble, y por consiguiente, el comportamiento observado en la figura 3.4 debería corresponder con la descripción macroscópica. Esta afirmación fue chequeada comparando el resultado del lattice gas con el de la integración numérica de las ecuaciones de movimiento macroscópicas, *i.e.* el conjunto de 4 ecuaciones de reacción difusión que gobiernan el sistema (3.32) (encontramos resultados similares integrando las ecuaciones reducidas, obtenidas de acuerdo al esquema propuesto en [150]). La línea sólida y la de segmentos corresponde a los perfiles de concentración estacionarios para las especies $\mathcal{A}$ y $\mathcal{C}$ respectivamente. Como puede verse, el acuerdo entre los resultados de los dos métodos independientes es muy bueno.

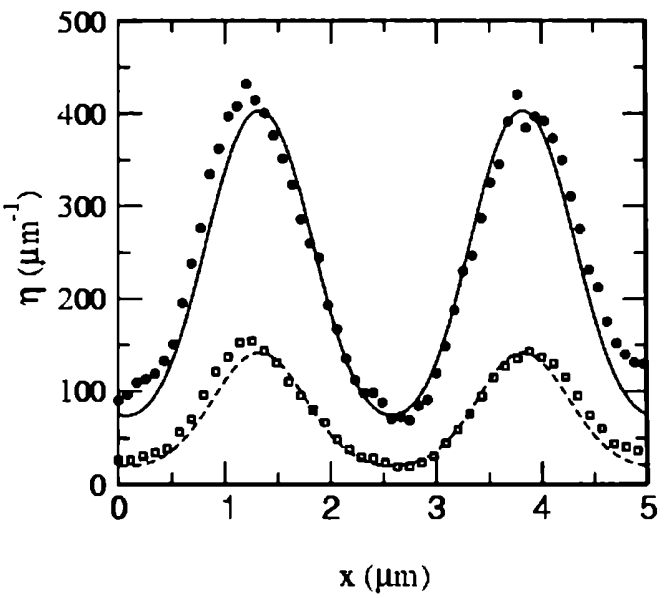

Figura 3.4: Patrón de Turing obtenido para tiempos largos a partir del modelo de Schnackenberg modificado, con cociente de difusividades $d = 4$, por debajo del valor umbral del modelo original sin buffers. El eje y corresponde a $\eta_s \equiv \mathcal{N}_s/\lambda$ ($s = A, C$), promediado sobre $2{,}5 \cdot 10^5$ estados sucesivos del lattice gas, una vez alcanzado el estacionario. Los círculos llenos (cuadrados vacíos) corresponden a partículas de la especie $\mathcal{C}$ ($\mathcal{A}$). La curva continua (segmentada) corresponde a la solución estacionaria de la concentración de $\mathcal{C}$ ($\mathcal{A}$) hallada por medio de la integración numérica del conjunto de ecuaciones de reacción difusión. Dado que lo que deseamos enfatizar aquí es únicamente la validez de la reducción en un caso más complejo, los valores utilizados para las difusividades o para las probabilidades de reacción son arbitrarios (ver el texto).

Finalmente chequeamos si las concentraciones satisfacen la condición de equilibrio local (Eq. (3.18) con $k_d = k_{-4}/k_4$), ya que la validez de esta condición es la hipótesis fundamental de la descripción reducida [150]. Es importante notar que, cuando se alcanza la situación estacionaria, la condición de equilibrio se debe satisfacer. Sin embargo, pueden ocurrir apartamientos locales durante la evolución, los que se manifestarán fundamentalmente en las regiones en las cuales sean mayores

los gradientes de concentración, ya que en estas zonas la difusión no será tan lenta comparada con las reacciones como en las regiones en las que la concentración varía suavemente. En la figura 3.5 se muestra el perfil de concentración de C (línea continua) a tiempos largos ($t = 0{,}03s$), cuando la concentración está cerca del valor estacionario en todo el espacio. Por otro lado, se muestra (con línea segmentada) la diferencia entre esta concentración y la obtenida a partir de la ecuación (3.18). Es evidente del gráfico que la hipótesis se verifica perfectamente en este caso, ya que el error se hace menor a medida que pasa el tiempo (por ejemplo, en el gráfico (b) el tiempo es $t = 0{,}038s$) y en ningún momento excede 10^{-4}.

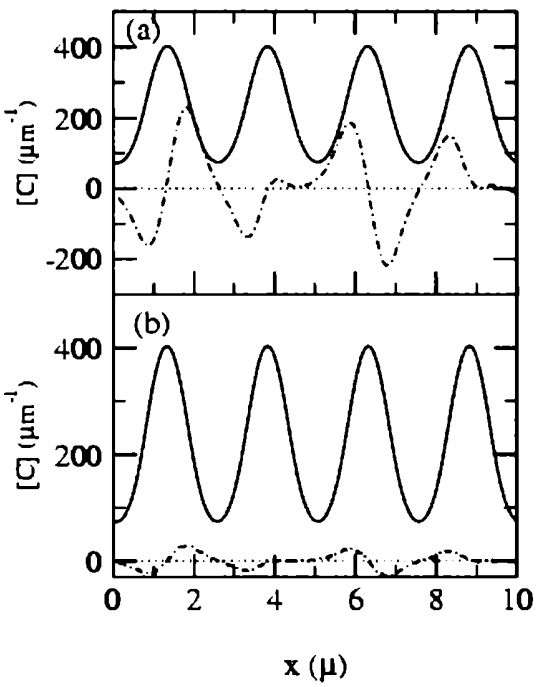

Figura 3.5: Perfil de concentración de C (línea continua) y diferencia entre esta concentración y la obtenida mediante la ecuación (3.18) multiplicada por un factor de 10^6 (línea segmentada) en tiempos $t = 0{,}03s$ (a) y $t = 0{,}038s$ (b).

4. Patrones de Turing en sistemas con buffers: análisis general

La ciencia es una ecuación diferencial. La religión es una condición de contorno.
Alan Turing.

4.1. Resumen

En este capítulo estudiamos un sistema genérico de reacción difusión dentro de la clase de modelos del tipo activador-inhibidor, en el cual los patrones de Turing son estabilizados por medio de reacciones rápidas con buffers. El objetivo del presente capítulo es proveer una explicación cuantitativa acerca del modo en el que las interacciones con buffers pueden cambiar la forma del espacio de Turing (esto es, el espacio de los parámetros en los cuales los patrones existen y son estables). Veremos cómo en algunas circunstancias, los buffers son capaces de estabilizar estructuras inhomogéneas en regiones donde los coeficientes de difusión del activador y del inhibidor tienen valores similares o incluso iguales, que es la situación característica en medios acuosos. Nuestro tratamiento analítico del problema, da como resultado una serie de relaciones matemáticas que definen unívocamente el espacio de Turing. En este sentido pueden ser utilizadas por aquellos que diseñan experimentos en los cuales se espera la aparición de esta clase de estructuras. Finalmente, a modo de ilustración de la aplicabilidad de estos resultados, mostramos un ejemplo de interés biológico en el cual la evidencia experimental sugiere que un proceso de auto-organización de tipo Turing explica ciertos fenómenos morfogenéticos observados en un alga. El presente capítulo está en conexión con el trabajo [34, 153].

4.2. Patrones de Turing y su relevancia en biología

La morfogénesis es el proceso de desarrollo de las formas y las estructuras en un embrión en crecimiento. Exactamente cómo es llevado a cabo el plan de desarrollo y diferenciación celular, es aún materia de investigación. En el proceso de diferenciación del conjunto inicial de idénticas células embrionarias, es claro que además de la información codificada a nivel genético intervienen otro tipo de factores los cuales determinan el patrón de encendido selectivo de genes en las distintas células (ver la Introducción). Este encendido selectivo de genes puede originarse –entre otras cosas– por la presencia de gradientes químicos de ciertas sustancias (morfógenos) a lo largo del embrión [63, 97, 161, 181]. Esta posibilidad fue analizada por Alan Turing [161], encontrando que un sistema de reacción difusión con dos reactivos es, bajo ciertas condiciones, capaz de auto-organizarse espontáneamente, desestabilizando un medio en el que los reactivos se encuentran distribuidos de manera uniforme, para dar lugar a la formación de una estructura periódica, estacionaria, e inhomogénea, cuya longitud de onda es intrínseca al mecanismo de reacción difusión. Esto es, el número de estructuras (digamos, de máximos de concentración) *no* es un invariante de escala. Por ejemplo, si tenemos un patrón en un dado dominio unidimensional,

con un cierto número de longitudes de onda, un dominio cuyo tamaño sea el doble que el anterior contendrá exactamente el doble de las mismas estructuras. Siempre y cuando la longitud del sistema exceda a la del patrón en algunas longitudes de onda, podremos ver la estructura. Esta propiedad que tiene la inestabilidad de Turing es una característica común en los seres vivientes [107]. Vale aclarar que, a diferencia de otros mecanismos de generación espontánea de patrones, el de Turing no involucra transporte convectivo de materia, ni se origina por efecto de los contornos del sistema, tal como ocurre en la mayoría de las inestabilidades hidrodinámicas.

La formación de estas estructuras, conocidas como *patrones de Turing*, es posible si uno de los reactivos es creado autocatalíticamente (el activador) [1], mientras que el otro, directa o indirectamente inhibe la retroalimentación positiva anterior (el inhibidor). Además es necesario que el inhibidor difunda más rápidamente que el activador. La cantidad mínima en la que la constante de difusión del inhibidor debe sobrepasar a la del activador, es función del conjunto de las constantes de reacción, así como de las concentraciones de las fuentes y sumideros que permanecen en contacto con el sistema, manteniéndolo alejado continuamente del equilibrio. Por lo general, el cociente crítico está lejos de la unidad. Cuando estas condiciones se verifican, el acoplamiento entre los procesos difusivos y reactivos es capaz de hacer crecer una perturbación espacial a partir de un estado estacionario estable ante perturbaciones homogéneas [2].

Si bien aún se desconoce si el mecanismo de Turing opera realmente en un embrión, existen numerosas evidencias de que esta clase de mecanismo de autoorganización se manifiesta en otra clase de sistemas biológicos. En la figura 4.1 se muestra el ejemplo de un patrón tipo Turing en la piel de un pez (*Pomacanthus*). Es notable que un modelo extremadamente sencillo de dos ecuaciones del tipo activador-inhibidor, sea capaz de describir un fenómeno complejo como la aparición de las manchas rayadas sobre la piel del pez. No sólo es posible reproducir la formación del patrón, sino también predecir el reordenamiento de las rayas a medida que el pez aumenta su tamaño durante 90 días sucesivos [86]. A pesar de la espectacularidad de este tipo de resultados, es en cierta medida razonable la resistencia que aún genera la aceptación de esta clase de mecanismos en biología. Tanto desde el punto de vista experimental como teórico, la identificación de las especies químicas que actúan como morfógenos ha sido en la gran mayoría de los casos, infructuosa. Por ejemplo, los autores de [86], no proveen siquiera una pista acerca de la identidad de estas especies. A pesar de esto, en la simulación numérica fue necesario que la hipotética sustancia que jugó el rol del inhibidor difundiera a una tasa 15 veces mayor que la del activador.

En la figura 4.2, se muestra el patrón de colores en la piel de una jirafa (y su cría). En [108] se muestra cómo, utilizando el modelo de Thomas (con el inhibidor difundiendo a una tasa 10 veces mayor que la del activador), es posible generar numéricamente el tipo de correcto de patrones de la piel de las jirafas, a través de la inestabilidad de Turing. Al igual que antes, a pesar de que la evidencia es indirecta, y que además, en la mayoría de los casos la identificación de los morfógenos no se ha podido realizar, se cree que el mismo mecanismo subyace a estas estructuras en todos los mamíferos [107, 108] [3]. Si bien para los mamíferos la formación del patrón

[1] O sea que participa en una reacción que produce más cantidad de sí mismo.

[2] Consultar el libro *Mathematical Biology* de J. D. Murray [107] para una explicación intuitiva del fenómeno (pág. 375). También es interesante al respecto el libro de H. Meinhardt [103].

[3] En [109] se desarrolla otra clase de modelos en los que no sólo intervienen mecanismos de

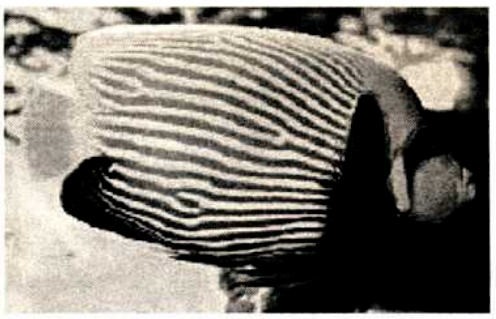

Figura 4.1: Patrón de rayas en la piel de un pez (*Pomacanthus*).

en el pelaje (*manchas*) ocurre cerca del alumbramiento, se cree que el mismo refleja la presencia de un prepatrón de morfógenos, que aparece en las primeras semanas de gestación. En el caso de una cebra, por ejemplo, se estima que el prepatrón se forma en la 3 o 4 semana de gestación, sobre un período total de 52 semanas. Para crear el patrón de colores, cierto tipo de células genéticamente preparadas, llamadas *melanoblastos*, migran hacia la superficie del embrión y se convierten en *melanocitos* (células pigmentarias). El color del pelo se origina en la melanina que generan los melanocitos dentro de los folículos capilares, la cual es transmitida al pelo. Los experimentos sugieren que un cierto melanocito producirá o no melanina dependiendo de la presencia de ciertas sustancias químicas que aun no se han podido identificar completamente. El patrón de color refleja entonces un patrón químico subyacente, al cual los melanocitos reaccionan creando o no melanina. De acuerdo a los modelos de reacción-difusión, dentro de una misma especie se puede generar variabilidad en el patrón de pigmentación simplemente cambiando el momento en el desarrollo embrionario en el que el patrón subyacente de morfógeno es formado, o modificando levemente el umbral necesario de morfógeno para activar la generación de melanina. Esta clase de modelos sencillos predicen, entre varias cuestiones observables, tanto la forma de los patrones, como el hecho de que sólo en un rango de tamaños intermedios de mamíferos es de esperar que se presenten las manchas [107].

En la figura 4.3 se muestra el patrón de filamentos (pelos) observado en el tallo del alga marina unicelular *Acetabularia*. La particularidad de este sistema, es que en este caso existe abundante evidencia experimental en favor de que los iones de calcio Ca^{2+} y –en menor medida– el $cAMP$ son los morfógenos responsables de este patrón [62, 107]. Utilizando el modelo de Schnackenberg, además de reproducir numéricamente la forma del patrón que se observa en el alga (el espaciado entre los filamentos), es posible predecir una serie de mediciones experimentales acerca del efecto de la concentración externa de calcio en la regeneración del tallo y en la generación posterior del patrón. Por otro lado, la dependencia hallada experimentalmente entre el espaciado de los filamentos y la concentración externa de Ca^{2+} es consistente con la hipótesis de este último como morfógeno. A pesar del acuerdo con los experimentos, es importante notar que el punto débil del modelo como explicación del patrón en el alga, es que el requerimiento sobre el valor del cociente entre las difusividades de los morfógenos (d) no se cumple (según el modelo, el valor umbral para d es $d_c \sim 6$, mientras que un valor consistente con la identidad de los morfógenos sería $d \leq 1$) [107]. En este capítulo volveremos sobre este ejemplo (en

reacción difusión, sino también otros de carácter mecánico.

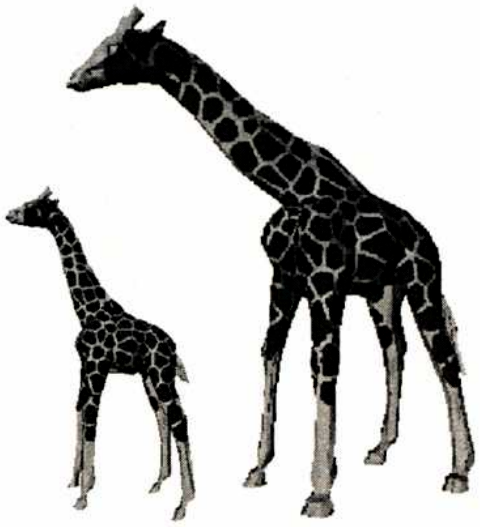

Figura 4.2: Una jirafa y su cría generadas a partir de una simulación numérica basada en un mecanismo de reacción-difusión, y en los patrones de crecimiento propios de las jirafas, así como también en sus características morfológicas [171].

la sección 4.5), y mostraremos de qué modo la interacción del calcio con buffers específicos puede explicar esta discrepancia.

Figura 4.3: Fotografía del alga unicelular *Acetabularia*. La distribución de los pelos se explica como un patrón de Turing [107].

Finalmente podemos mencionar la evidencia de una rotura espontánea de simetría en un conjunto de células confinadas de *Dictyostelium Discoideum*. Experimentos controlados muestran que, bajo ciertas condiciones una masa homogénea de estas células comienza a diferenciarse, de acuerdo a las cantidades citosólicas de iones de calcio y al pH. La estructura generada es compatible con un mecanismo de reacción-difusión [137].

Basados en el hecho de que estos patrones son en alguna medida genéricos, esto es, en cierto grado de independencia en el resultado con respecto al mecanismo particular de activador-inhibidor que se proponga [32], para las aplicaciones se ha

optado por el modelo de Thomas [4] y el de Schnackenberg [138], dada la relativa simplicidad de ambos.

A pesar de estos (y otros) ejemplos, la única evidencia concluyente de la existencia de patrones de Turing es, hasta la fecha, la que proviene de los experimentos de laboratorio en reactores químicos artificiales. Lograr patrones de Turing en reactores artificiales demandó casi 4 décadas de infructuosas pruebas, hasta que finalmente, en 1990 el grupo de P. DeKepper halló la manera de generarlos a partir de la reacción CIMA (chlorite-iodide-malonic-acid reaction) en un reactor permanentemente alimentado con nuevos reactantes [21, 35, 122, 123]. Una de las claves para lograr su aparición, fue que, a diferencia de los medios acuosos que se habían empleado anteriormente, las reacciones se llevaron a cabo en un gel cargado de moléculas de almidón (un complejo molecular de gran tamaño). Originalmente el gel fue introducido en los experimentos para evitar mecanismos de transporte no-difusivo, y el almidón para propósitos de visualización. A partir de un cuidadoso análisis de estos experimentos, I. Lengyel y I. Epstein [96] llegaron a la conclusión de que tanto el gel como las moléculas de almidón resultaron fundamentales en la aparición del patrón, dado que ambos interactúan selectivamente con los iones de iodo (atrapándolos en el almidón) [5]. El argumento cualitativo de [96] es que esta interacción selectiva es la responsable de reescalear (reducir) apropiadamente la difusividad efectiva del iodo permitiendo que se alcance el cociente necesario entre las difusividades efectivas del activador y del inhibidor. En las soluciones acuosas, vale aclarar, los iones difunden prácticamente a la misma tasa.

Sin embargo, en estos trabajos no se menciona el hecho de que la misma interacción que reduce la difusividad efectiva *reescalea la cinética de las reacciones*. Los dos efectos están ligados, tal como vimos en los capítulos anteriores. En este sentido, el argumento cualitativo de I. Lengyel y I. Epstein es insuficiente, ya que para analizar si una dada interacción con un buffer (en este caso el almidón) facilita o no la aparición de un patrón de Turing, los dos efectos simultáneos deben ser tenidos en consideración.

A pesar de que la observación experimental de los patrones de Turing en reactores controlados ha aumentado la comprensión del fenómeno, e incluso abierto la puerta a aplicaciones tecnológicas [6], la pregunta que trató de responder Turing sobre el rol en la morfogénesis sigue abierta y la relevancia de los patrones de Turing en este contexto es, como mencionamos antes, todavía incierta. Sin embargo, dado que las reacciones autocatalíticas, la inhibición por sustrato y/o producto abundan en la bioquímica celular, y por lo tanto las condiciones sobre la cinética probablemente se cumplan para un sinnúmero de reacciones intracelulares, el problema es hallar mecanismos reales operando en las células que sean capaces de variar las difusividades efectivas de los morfógenos. Se ha propuesto que tanto la presencia de buffers

[4] Un modelo empírico con inhibición por sustrato, en el cual dos sustratos (oxígeno y ácido úrico) reaccionan en presencia de una enzima (uricasa). La ventaja del modelo de Thomas es que los parámetros de la cinética se conocen con relativa precisión [107].

[5] Hipótesis confirmada posteriormente por el grupo de P. DeKepper (ver [38, 165]).

[6] Gran parte de los desarrollos propuestos para las próximas décadas en ciencia de materiales se orientan hacia la fabricación de maquinarias complejas de tamaño microscópico a nanoscópico. Una de las posibilidades que se están estudiando, es la utilización de materiales que se auto-organicen, es decir, capaces de ensamblar sus partes en forma espontánea de acuerdo a un programa prescripto. La forma más interesante para producir el ensamblado -conocida como "coded self-assembly"- procura imitar el proceso de morfogénesis, a través de materiales con un conjunto de instrucciones incluída dentro de ellos mismos [174].

endógenos [2, 168], como la interacción con moléculas fijas a las membranas intracelulares [69], o la permeabilidad selectiva de la membrana celular al paso de los morfógenos [23], pueden proveer los ingredientes necesarios para un reescaleo de los coeficientes de difusión en sistemas *in vivo*, del mismo modo que el gel y el almidón lo hacen en los experimentos de laboratorio [96, 150]. Cabe mencionar que la posibilidad de que exista una reacción común dentro de la bioquímica celular, que sea a la vez un mecanismo promotor de inhomogeneidades intra y/o intercelulares, resulta sumamente interesante, ya que daría a las células la capacidad de crear dominios relativamente estables con alta concentración de ciertas moléculas [7]. Estos dominios, a pesar de no estar físicamente delimitados (no hay una membrana), actuarían de modo análogo a las vesículas, es decir, dentro de esas zonas, ciertas reacciones o procesos podrían llevarse a cabo de modo muy eficiente dada la alta concentración local de los insumos.

Nuestro objetivo en este capítulo es formalizar los argumentos referidos a la aparición de patrones de Turing en sistemas genéricos de activación inhibición. Basados en la evidencia de los experimentos donde se han observado estas estructuras, y en las características de los sistemas biológicos en los que la presencia de un mecanismo subyacente de Turing ha sido propuesta, supondremos que los morfógenos interactúan con algún complejo químico al que nos referiremos en adelante como el *buffer*, el cual, según el contexto, puede tratarse de una enzima, un canal transmembrana, una molécula exógena agregada con el propósito de visualizar las estructuras, etc. Supondremos que la reacción con el buffer es rápida, esto es, ocurre en una escala temporal pequeña comparada con el resto de las reacciones, la difusión de los reactivos. Tal como vimos en los capítulos anteriores 2 y 3 [152] y como veremos en el capítulo 6 [155], esta hipótesis es verificada en diversas situaciones de interés. El análisis de este capítulo permite estudiar cómo se deforma el espacio de Turing al considerar la interacción con los buffers, haciendo posible que los patrones aparezcan aun cuando los coeficientes de difusión de los morfógenos sean iguales. A partir del tratamiento analítico que desarrollamos aquí, obtenemos una serie de relaciones matemáticas, junto con un procedimiento general que permite discernir si es esperable o no que esta clase de estructuras aparezcan en un dado sistema. Veremos que si los buffers son apropiados en tipo y cantidad, es incluso posible que la difusividad libre del inhibidor sea menor que la del activador.

Consideramos que contar con una herramienta analítica para estudiar la influencia de los buffers en la formación de los patrones de Turing, resultará importante para aquellos que traten de visualizar estos patrones en células, ya que para lograrlo probablemente deberán introducir buffers exógenos, los cuales -al igual que en los experimentos de laboratorio- alterarán de un modo no trivial lo que se está tratando de medir. Y para saber si efectivamente ocurren *in vivo* será necesario tener una manera de "sustraer" el efecto artificial de estas sustancias.

En resumen, desde el trabajo de Lengyel y Epstein [96], se ha utilizado la presencia ubicua de mecanismos de reescaleo de los coeficientes de difusión, como argumento para ajustar convenientemente [8] el cociente entre las difusividades del activador

[7] A partir de un estudio de la glucólisis, se ha propuesto que el ATP [69] podría formar dominios de tamaño micrométrico. Sin embargo, nuevamente en este caso, para observar el patrón de Turing fue necesario suponer difusividades muy diferentes para el ATP y el ADP, lo cual le quita sustento al resultado.

[8] Con *convenientemente* queremos decir que, sin justificativos, un parámetro fijo es variado hasta que un patrón de Turing es observado.

y el inhibidor. De esta manera, muchos patrones fueron predichos teóricamente u observados en experimentos numéricos [69, 107]. A pesar de la corrección del modelo teórico para la reacción CIMA, y de que el conocimiento detallado de los mecanismos de la reacción hacen, en este caso particular, la justificación del reescaleo aceptable, la línea de razonamiento tiene importantes fallas. La primera es que la explicación que justifica el reescaleo del cociente es provista sólo a un nivel *cualitativo*, y por lo tanto no resulta útil para sacar conclusiones acerca de cómo los buffers afectan la formación de los patrones de Turing en situaciones diferentes. En segundo lugar, es incompleta, dado que el mismo mecanismo propuesto para el reescaleo selectivo de las difusividades, afecta en forma simultánea y selectiva a la cinética de las reacciones. En este sentido, cualquier análisis cuantitativo acerca de la influencia de las reacciones con buffers en la presencia de estas estructuras debe tener en cuenta su efecto global. Este es el propósito de esta sección, es decir, obtener condiciones explícitas que definan la forma del espacio de Turing. Al mismo tiempo, estas condiciones proveen los grados de libertad que son accesibles al experimentador (por ejemplo, le indican cuáles deben ser las concentraciones de los buffers exógenos, o qué le conviene utilizar, de acuerdo a sus constantes de disociación), y que le permiten llevar a un dado sistema hacia la región del espacio de los parámetros donde esta clase de patrones pueden existir.

En la sección 4.3 describimos brevemente las condiciones necesarias y suficientes para la emergencia de los patrones de Turing en un modelo genérico de activador-inhibidor sin buffers, siguiendo los lineamientos de [107]. En la sección 4.4 obtenemos, utilizando los resultados de los capítulos anteriores, el conjunto de ecuaciones de reacción-difusión reducidas. El análisis de estabilidad lineal sobre estas ecuaciones se analiza en 4.4.1. El resultado más importante del capítulo, esto es las nuevas condiciones para la inestabilidad en presencia de buffers es derivado en esta sección. Posteriormente, en 4.5, estudiamos un ejemplo de interés biológico, el cual es además útil para ilustrar los resultados.

4.3. Condiciones para los patrones en sistemas sin buffers

La forma general de un sistema de reacción difusión con dos especies químicas es:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= f(u,v) + D_u \nabla^2 u \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= g(u,v) + D_v \nabla^2 v \ , \end{aligned} \tag{4.1}$$

donde u y v denotan las concentraciones de las especies $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$ respectivamente (ver 1.4). Estas ecuaciones reflejan que en un sistema de reacción difusión la concentración de una dada especie puede variar como resultado de las reacciones químicas (usualmente descriptas mediante la ley de acción de masas dentro de las funciones $f(u,v)$ y $g(u,v)$), y a un proceso de transporte de materia, tenido en cuenta dentro del término difusivo proporcional a los coeficientes de difusión D_u y D_v.

En este capítulo supondremos que existe un punto fijo del sistema homogéneo (ver apéndice A), es decir, que las curvas definidas por $f(u,v) = 0$ y $g(u,v) = 0$ en el plano $u - v$ (las nullclinas), se cortan en el punto (u_0, v_0). Como veremos adelante, los signos de los coeficientes del sistema dinámico linealizado alrededor del punto fijo, contienen información relevante sobre los mecanismos de desestabilización de

la solución homogénea. Puede demostrarse que cuando los signos de la matriz de estabilidad [9] están dados por:

$$\mathcal{A} \equiv \begin{pmatrix} f_u & f_v \\ g_u & g_v \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} + & + \\ - & - \end{pmatrix} \; o \; \begin{pmatrix} + & - \\ + & - \end{pmatrix}$$

es posible encontrar una inestabilidad de Turing siempre que las tasas de reacción y los coeficientes de difusión satisfagan ciertos requerimientos [170]. Básicamente, lo que se debe cumplir es que el punto fijo (u_0, v_0) debe ser estable ante pequeñas perturbaciones homogéneas, y capaz de volverse inestable ante perturbaciones inhomogéneas. Matemáticamente estas condiciones pueden sintetizarse a través de 4 desigualdades (ver [107]):

$$f_u + g_v < 0 \tag{4.2}$$

$$f_u g_v - f_v g_u > 0 \tag{4.3}$$

$$d f_u + g_v > 0 \tag{4.4}$$

$$(d f_u + g_v)^2 \geq 4d \, (f_u g_v - f_v g_u) \, . \tag{4.5}$$

donde, siguiendo la notación de [107], hemos definido el cociente adimensional entre las difusividades, d, como sigue: $d = D_v/D_u$. Estas desigualdades se sustentan en el análisis de estabilidad lineal, o sea, a partir del estudio de los autovalores (λ) de la dinámica linealizada. Los autovalores se obtienen a partir de una ecuación de dispersión que tiene la siguiente forma (ver apéndice C):

$$\lambda^2 - \lambda \left(f_u + g_v - k^2(D_u + D_v)\right) + H(k^2) = 0 \, , \tag{4.6}$$

donde $H(k^2)$ está dado por:

$$H(k^2) = k^4 D_u D_v - k^2 \left(f_u D_v - g_v D_u\right) + f_u g_v - f_v g_u. \tag{4.7}$$

Dado que el punto fijo debe ser estable en el caso homogéneo, las raíces de la ecuación (4.6) deben tener parte real negativa ($Re(\lambda) < 0$) siempre que $k = 0$. Esto está garantizado siempre y cuando la traza de la matriz de estabilidad sea negativa y su determinante positivo [156]. Este es el requerimiento que capturan las primeras dos desigualdades (ecuaciones (4.2) y (4.3)).

Para que el estado estacionario sea inestable ante perturbaciones de longitud de onda finita ($k \neq 0$), pedimos que para alguna longitud o rango de longitudes de la perturbación, la misma crezca en el tiempo, o sea que exista un autovalor que verifique: $Re(\lambda) > 0$ para algún $k \neq 0$. Esto puede ocurrir sólo si la función $H(k^2)$ se vuelve negativa (ver apéndice C), para lo cual debe cumplirse necesariamente (4.4). Es interesante notar que para que se satisfagan simultáneamente las condiciones (4.2) y (4.4), necesariamente se debe cumplir que $D_u < D_v$ (o equivalentemente, $d > 1$) [10]. La condición suficiente (4.5) garantiza que el signo del polinomio $H(k^2)$ en el k donde se alcanza el valor mínimo, sea negativo. El cociente crítico entre las difusividades, d_c, donde ocurre la bifurcación de Turing es aquel que hace que se satisfaga la ecuación (4.5) como una igualdad. Por debajo del valor crítico, no existe combinación alguna entre los parámetros del modelo que de lugar a la formación de un patrón de

[9] Las filas de la matriz de estabilidad son los gradientes de f y g evaluados en el punto fijo. Los subíndices externos denotan las derivadas parciales: $l_m \equiv \frac{\partial l}{\partial m}$, con $l = f, g$, y $m = u, v$.

[10] Notar que para llegar a esta conclusión utilizamos el hecho que la matriz de estabilidad tiene alguno de los signos definidos en la sección 4.3.

Turing. En otras palabras, cuando $d < d_c$ el espacio de Turing es vacío. El problema es, como hemos mencionado antes, que mientras en la mayoría de las circunstancias experimentales el valor real de $d \sim 1$, el valor crítico correspondiente es mucho mayor que la unidad.

En la próxima sección, basados en [23, 96, 83, 143, 168], agregaremos un conjunto de reacciones rápidas que reflejen la interacción del activador e inhibidor con sustancias buffers. La inclusión de los buffers está plenamente justificada en las circunstancias en las que conocemos exactamente la identidad de los mismos (como ocurre en la reacción CIMA, o en numerosas reacciones de la bioquímica celular en las que es conocida la presencia de buffers endógenos, o en las que con propósitos experimentales se les agregan buffers exógenos), En estas situaciones, el procedimiento que describiremos en las secciones subsiguientes permite establecer si la interacción con los buffers posibilita o no la aparición de esta clase de estructuras estacionarias. En los casos donde no se tenga disponible una información tan precisa acerca de las reacciones con los buffers, pero en las que la presencia de los mismos pueda ser postulada (tal como ocurre en numerosas reacciones de la química celular), la inclusión de las reacciones con buffers hipotéticos puede ser utilizada para derivar condiciones (estimaciones) sobre las tasas de disociación con esas moléculas desconocidas, y sobre las concentraciones necesarias para que sea esperable o no observar esta inestabilidad.

4.4. Agregando los buffers

Existen dos formas de incluir las interacciones selectivas con los buffers. En la primera, tanto el activador como el inhibidor reaccionan (en principio con distintas afinidades) con un mismo buffer, situación que aparece en numerosas ocasiones en bioquímica donde, como parte de la regulación de una ruta metabólica, una misma enzima liga, en distintas etapas del ciclo, al activador y al inhibidor de la reacción que cataliza [83]. En la segunda circunstancia, consideramos que cada especie experimenta una reacción con un buffer distinto, tal como ocurre cuando dos (o más) enzimas están presentes en una misma ruta metabólica, interactuando selectivamente con el activador y el inhibidor de las reacciones, o como vimos antes, en la reacción CIMA, donde el almidón interactúa sólo con el iodo [96]. Si bien ambos casos son interesantes de analizar, el primero introduce una nueva fuente de acoplamiento entre las especies $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$, que lleva a la presencia de términos cruzados en las ecuaciones reescaleadas [150, 152]. Por el contrario, en el segundo caso, el reescaleo de las ecuaciones para $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$ está desacoplado, haciendo que el análisis posterior sea más sencillo. Por este motivo, focalizaremos en adelante sólo en este segundo caso. Para ello, proponemos que tanto la interacción del activador con su buffer, como la del inhibidor con el propio tenga la siguiente forma simple (y estándar en la literatura):

$$\mathcal{S} + \mathcal{B}_{\mathcal{S}} \underset{k_{\mathcal{S}}^{-}}{\overset{k_{\mathcal{S}}^{+}}{\rightleftharpoons}} \mathcal{C}_{\mathcal{S}}, \tag{4.8}$$

donde para evitar duplicar las ecuaciones, $\mathcal{S}$ puede representar tanto a $\mathcal{U}$ como a $\mathcal{V}$, y $\mathcal{B}_{\mathcal{S}}$ representa el buffer que reacciona con $\mathcal{S}$, y $\mathcal{C}_{\mathcal{S}}$ el complejo formado por una molécula de $\mathcal{S}$ y una de $\mathcal{B}_{\mathcal{S}}$. A pesar que en diversas circunstancias reales la movilidad de los buffers es pequeña frente a la de $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$, y puede ser despreciada sin problemas, en otros casos su movilidad no puede ignorarse ya que es la causa

de diferencias cualitativas en los resultados de experimentos y modelos teóricos. Por ejemplo, mientras la movilidad de las moléculas de almidón cargadas en el gel de un reactor puede ser despreciada, en experimentos donde se agregan buffers de calcio exógenos en el citoplasma de ciertas células para observar la propagación de ondas, la diferencia en la organización espacio-temporal de acuerdo a la movilidad del buffer es dramática: una onda viajera (continua) de calcio puede detenerse, y los clusters de canales de calcio que para ciertos buffers móviles funcionan de manera sincrónica, quedan desconectados para otros con movilidades diferentes. Por lo tanto, a pesar de que introduce un grado mayor de complejidad, permitiremos a los buffers transportarse difusivamente. Además de suponer que las reacciones con estos buffers son el proceso más rápido de los que estamos considerando, asumiremos que su movilidad no se ve afectada por la unión de una molécula de $\mathcal{S}$. Llamando b_s y c_s a las concentraciones de $\mathcal{B}_\mathcal{S}$ y $\mathcal{C}_\mathcal{S}$ respectivamente, y $b_s^T = b_s + c_s$ a la cantidad total de buffer, el modelo de reacción difusión que describe el sistema es:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f(u,v) + r_u(u,b_u) + D_u\nabla^2 u\,, \tag{4.9}$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = g(u,v) + r_v(v,b_v) + D_v\nabla^2 v\,, \tag{4.10}$$

$$\frac{\partial b_s}{\partial t} = r_s(s,b_s) + D_{b_s}\nabla^2 b_s\,, \tag{4.11}$$

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = -r_s(s,b_s) + D_{b_s}\nabla^2 c_s\,, \tag{4.12}$$

donde, como antes, el subíndice s puede representar tanto a u como a v. La reacción rápida con los buffers está descripta, de acuerdo a la ley de acción de masas por:

$$\epsilon\, r_s(s,b_s) = -k_s^+\, s\, b_s + k_s^- c_s. \tag{4.13}$$

Teniendo en cuenta la ausencia de términos de fuente o sumidero para los buffers, su cantidad total permanece constante en el tiempo. Además, si suponemos que inicialmente el buffer total está distribuido uniformemente en el espacio, b_s^T será una constante a lo largo de toda la evolución. Teniendo en cuenta la diferencia de escalas temporales, las ecuaciones reducidas obtenidas a partir del sistema original de 6 ecuaciones de reacción difusión es (4.9)- (4.12) [11]:

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= \frac{f(u,v)}{1+A_u(u)} + d_u(u)\nabla^2 u - H_u(u)\vec{\nabla}u\cdot\vec{\nabla}u \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= \frac{g(u,v)}{1+A_v(v)} + d_v(v)\nabla^2 v - H_v(v)\vec{\nabla}v\cdot\vec{\nabla}v\end{aligned} \tag{4.14}$$

donde hemos definido

$$\begin{aligned} d_s(s) &= \frac{D_s + A_s(s)D_{b_s}}{1+A_s(s)}\,, \\ H_s(s) &= \frac{2D_{b_s}A_s(s)}{(k_s^d+s)(1+A_s(s))}\,, \\ A_s(s) &= \frac{k_s^d b_u^T}{(k_s^d+s)^2}\,. \end{aligned} \tag{4.15}$$

y $k_s^d = k_s^-/k_s^+$ es la constante de disociación del buffer $\mathcal{B}_\mathcal{S}$. Es importante notar que, tal como vimos en los capítulos precedentes, el sistema de ecuaciones (4.14) ya no

[11] Ver el capítulo 2.

es del tipo de reacción-difusión, excepto para algunos casos límites. Por simplicidad consideraremos en adelante el caso de una sola dimensión espacial. El pasaje a más dimensiones no introduce mayores dificultades.

Con el fin de deshacerse de los términos no lineales en las derivadas espaciales, buscaremos una transformación nolineal. Siguiendo la transformación propuesta por Sneyd *et.al.* [146] planteamos:

$$u = \psi(U), \qquad v = \theta(V), \tag{4.16}$$

donde ψ y θ son funciones monótonas crecientes y -al menos- C^2 [12], a determinar de manera conveniente. Los grados de libertad para elegir estas funciones pueden reducirse requiriendo que en la ausencia de buffers, o cuando éstos son inmóviles, las transformaciones buscadas coincidan con la identidad (ver la ecuación (4.17) abajo). El conjunto de ecuaciones (4.14) puede ser escrito en término de las nuevas variables como:

$$\psi'\frac{\partial U}{\partial t} = \frac{f(\psi,\theta)}{1+A_u(\psi)} + d_u(\psi)\left(\psi''\left(\frac{\partial U}{\partial x}\right)^2 + \psi'\frac{\partial^2 U}{\partial x^2}\right) - H_u(\psi)\psi'^{\,2}\left(\frac{\partial U}{\partial x}\right)^2 \tag{4.17}$$

donde x denota la coordenada espacial, ψ' y ψ'' son respectivamente la primer y segunda derivada de ψ respecto de U. La misma ecuación vale para v, reemplazando: $\psi \to \theta$ y $U \to V$.

Si la función desconocida ψ satisface la siguiente ecuación diferencial [146]:

$$d_u(\psi)\psi'' = H_u(\psi)\psi'^{\,2}, \tag{4.18}$$

entonces el término que proviene del gradiente al cuadrado de u desaparece automáticamente. La integración de la ecuación (4.18) da como resultado:

$$\psi D_u - \frac{b_u^T k_u^d D_{b_u}}{k_u^d + \psi} = \alpha U + \alpha' \tag{4.19}$$

donde las constantes de integración α y α' pueden ser determinadas a partir de las restricciones impuestas para la transformación, esto es:

$$\alpha = D_u \quad \alpha' = 0. \tag{4.20}$$

Por lo tanto, finalmente obtenemos las siguientes ecuaciones para U y V:

$$\begin{aligned} \frac{\partial U}{\partial t} &= F(U,V) + d_u(\psi(U))\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \\ \frac{\partial V}{\partial t} &= G(U,V) + d_v(\theta(V))\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \end{aligned} \tag{4.21}$$

donde

$$F(U,V) = \frac{1}{\psi'}\frac{f(\psi,\theta)}{1+A_u(\psi)} = d_u(\psi)f(\psi,\theta)/D_u \tag{4.22}$$

$$G(U,V) = \frac{1}{\theta'}\frac{g(\psi,\theta)}{1+A_v(\theta)} = d_v(\theta)g(\psi,\theta)/D_v \tag{4.23}$$

Es importante enfatizar aquí algunos aspectos de estas últimas ecuaciones. En primer lugar, como puede apreciarse en la propia definición de $d_s(s)$ (ver (4.15)), estas

[12] Hasta la derivada segunda de estas funciones es una función continua.

funciones, que juegan el rol de las difusividades para la evolución de U y V, representan un promedio ponderado entre el coeficiente de difusión libre de las moléculas de la especie S y el del buffer con el cual S reacciona. Si el buffer difundiera a la misma tasa que S, entonces $d_s(s) = D_s$, lo cual es del todo razonable ya que en esta situación la movilidad no se vería afectada por el hecho de haberse ligado o no durante un cierto lapso de tiempo a un buffer. Si por el contrario, el buffer es inmóvil, entonces el coeficiente de difusividad efectivo es la difusividad libre dividida por el mismo factor de reescaleo de las reacciones, cuya interpretación ha sido analizada en el capítulo 3 a partir de un análisis microscópico. Este resultado está de acuerdo con derivaciones anteriores que demostraron la imposibilidad de tener patrones de Turing en un sistema en donde todos los reactivos difunden a la misma tasa [129]. El segundo punto importante de resaltar, es que los puntos fijos homogéneos son invariantes ante nuestro reescaleo, tal como se observa en las definiciones (4.23) y (4.23). Por último, dado que la transformaciones son monótonas, la presencia o ausencia de patrones está unívocamente mapeada desde el espacio $U - V$ al espacio original $u - v$.

Por completitud, escribimos la forma explícita de la transformación desde la concentración $u(x,t)$ a la función $U(x,t)$ y su transformación inversa (lo mismo vale para $v \leftrightarrow V$):

$$\begin{aligned} U &= \psi^{-1}(u) = u - \frac{k_d b_u^T D_{b_u}}{d_u(k_d + u)} \\ u &= \psi(U) = \frac{U - k_d}{2} + \frac{1}{2}\sqrt{(U + k_d)^2 + 4k_d b_u^T D_{b_u}/D_u} \end{aligned} \tag{4.24}$$

Dado que $f(\psi(U_0), \theta(V_0)) = 0$ y $g(\psi(U_0), \theta(V_0)) = 0$, donde $U_0 = \psi^{-1}(u_0)$ y $V_0 = \theta^{-1}(v_0)$, en el estado estacionario debe satisfacerse:

$$\begin{aligned} F_U &= \frac{d_u(u_0)}{D_u} f_u \, \psi'(U_0) > 0 \\ F_V &= \frac{d_u(u_0)}{D_u} f_v \, \theta'(V_0) > 0 \\ G_U &= \frac{d_v(v_0)}{D_v} g_u \, \psi'(U_0) < 0 \\ G_V &= \frac{d_v(v_0)}{D_v} g_v \, \theta'(V_0) < 0 \end{aligned} \tag{4.25}$$

Concluimos entonces que la matriz de estabilidad formada a partir de la cinética transformada preserva la misma estructura de signos que la matriz original (sin considerar los buffers).

4.4.1. Análisis de estabilidad lineal para el sistema con buffers

El objetivo de esta sección es obtener las condiciones para la aparición de un patrón de Turing en el sistema con buffers, a partir de un análisis de la estabilidad lineal en la vecindad del punto fijo homogéneo de las ecuaciones (4.21). Teniendo en cuenta las relaciones (4.25), las primeras dos condiciones respecto de la estabilidad del punto fijo ante perturbaciones de longitud de onda infinita son ahora:

$$F_U + G_V < 0 \longrightarrow R f_u + g_v < 0 \tag{4.26}$$

$$F_U G_V - F_V G_U > 0 \longrightarrow \frac{d_u(u_0) d_v(v_0) \psi' \theta'}{D_u D_v}(f_u g_v - f_v g_u) > 0. \tag{4.27}$$

donde hemos definido el cociente adimensional $\mathcal{D} \equiv d\,\psi'/\theta'$, y $R \equiv \left(\frac{d_u(u_0)}{d_v(v_0)}\mathcal{D}\right)$. Mientras que el prefactor que aparece en la ecuación (4.27) no tiene efecto en cuanto a la estabilidad de la solución homogénea [13], el efecto de la reacción con el buffer se manifiesta a través del factor positivo, R, que multiplica a f_u en la ecuación (4.26). Como veremos más abajo, este factor puede introducir cambios importantes en cuanto a la estructura del espacio de Turing. Las condiciones necesarias y suficientes para la aparición del patrón son ahora:

$$F_U d_v(v_0) + G_V d_u(u_0) > 0 \longrightarrow \mathcal{D} f_u + g_v > 0 \tag{4.28}$$

$$(F_U d_v(v_0) + G_V d_u(u_0))^2 \geq 4 d_u(u_0)\, d_v(v_0)\, (F_U G_V - F_V G_U) \tag{4.29}$$

$$\longrightarrow (\mathcal{D} f_u + g_v)^2 \geq 4\mathcal{D}\,(f_u g_v - f_v g_u).$$

La siguiente tabla resume los cambios en las condiciones necesarias y suficientes que introducen las reacciones con los buffers.

SIN BUFFERS [107]	CON BUFFERS [153]
$f_u + g_v < 0$	$R f_u + g_v < 0$
$f_u g_v - f_v g_u > 0$	$f_u g_v - f_v g_u > 0$
$d\, f_u + g_v > 0$	$\mathcal{D} f_u + g_v > 0$
$(d\, f_u + g_v)^2 \geq 4d\,(f_u g_v - f_v g_u)$	$(\mathcal{D} f_u + g_v)^2 \geq 4\mathcal{D}\,(f_u g_v - f_v g_u)$

Independientemente de la complejidad de la cinética de las reacciones, del promedio ponderado de las difusividades (dependiente de las concentraciones), o de las complejidades de las transformaciones ψ y θ, es ahora un simple ejercicio numérico computar el espacio de Turing: basta con grillar el espacio de parámetros y probar para cada punto (vector de parámetros) si se satisfacen simultáneamente todas las desigualdades.

Para que las desigualdades (4.26) y (4.28) se satisfagan simultáneamente es necesario que $d_v(v_0) > d_u(u_0)$. Esta condición necesaria representa la extensión al caso con buffers de la que habíamos obtenido al principio: $D_v > D_u$. Notemos que ahora no es más necesario que el inhibidor difunda a una tasa mayor que el activador. A pesar de que la similitud entre las ecuaciones (4.2-4.5) y (4.26-4.29), existe una diferencia clave entre ellas. Dado que el valor del cociente entre las difusividades libres d está fijo y es cercano a uno en la gran mayoría de los casos, la condición $d > d_c$ es difícil de satisfacerse en ausencia de buffers. Sin embargo, $\mathcal{D}$ puede ser llevada por encima del umbral que se obtiene a partir de la ecuación (4.29), dada su dependencia en parámetros que son verdaderamente manipulables.

Como una ilustración sencilla de estos resultados, consideremos el sistema de reacción-difusión (4.9)-(4.12) con $D_{b_u} = D_{b_v} = 0$. En este caso, las transformaciones ψ y θ son la identidad, de modo que $\psi' = \theta' = 1$, $\mathcal{D} = d$ y $R = R(u_0, v_0) = \frac{1+A_v(v_0)}{1+A_u(u_0)}$. Las condiciones son ahora:

$$R\, f_u + g_v < 0 \tag{4.30}$$

$$f_u g_v - f_v g_u > 0 \tag{4.31}$$

$$d\, f_u + g_v > 0 \tag{4.32}$$

$$(d\, f_u + g_v)^2 \geq 4d\,(f_u g_v - f_v g_u)\,. \tag{4.33}$$

[13] El determinante de la matriz de estabilidad original es positivo, y el prefactor es siempre positivo.

Excepto por la primera, estas restricciones son similares a las obtenidas por [107]. Lo que queremos ver aquí es que, dada la presencia del prefactor R, la restricción $d > 1$ deja de ser necesaria. Por ejemplo, las moléculas de almidón utilizadas para visualizar los patrones de Turing en la reacción CIMA, son fundamentales para la emergencia de los patrones ya que fijan la constante R en un valor suficientemente bajo como para cumplir con las restricciones (4.30)-(4.33) aun siendo $d \sim 1$. Y, a pesar de que el cociente entre las difusividades no pueda variarse libremente, es posible manipular el valor de R cambiando la concentración del almidón.

El rol de los buffers inmóviles puede entenderse también en forma más abstracta. Notemos en primer lugar que el reescaleo en las ecuaciones para u y v entra en este caso a través de un factor multiplicativo constante, en el miembro derecho de las ecuaciones (4.14). Entonces, es claro que las soluciones estacionarias no pueden diferir por la presencia o no del buffer. Por lo tanto, dado que la bifurcación de Turing involucra sólo soluciones estacionarias, el punto en el espacio de los parámetros en el que la bifurcación ocurre permanece invariante con el agregado de los buffers. Esto puede verse directamente de la ecuación (4.27), porque el punto en el espacio de los parámetros donde el determinante de la matriz de estabilidad es cero (*i.e.* donde la bifurcación de Turing ocurre a través de una bifurcación tridente o transcrítica [65, 147, 156, 175]) no varía por la presencia de los buffers. Sin embargo, lo que los buffers inmóviles hacen es *cambiar el lugar en donde ocurre la bifurcación de Hopf* [65, 147, 156, 175] (para $k = 0$), al modificar el signo de la traza de la matriz de estabilidad $\mathcal{A}$. De esta manera, una traza negativa (un punto fijo inestable rodeado de una órbita periódica estable), puede volverse positiva (estabilizando el punto fijo homogéneo) por la acción de los buffers. Y luego, cuando este punto fijo homogéneo bifurque en la solución estacionaria inhomogénea, esta última heredará su estabilidad. Si lo buffers son móviles, en principio ya no es posible asegurar que no se creen nuevas soluciones estacionarias debido a la interacción con los buffers. En este caso la situación se torna excesivamente compleja y su análisis escapa los alcances de este trabajo.

4.5. Aplicación al modelo de Schnackenberg

Para proseguir con el análisis del ejemplo anterior es necesario restringirse a un caso particular. En esta sección analizaremos una extensión del modelo de Schnackenberg, la cual fue introducida en el capítulo 3. El modelo de Schnackenberg tiene varias ventajas: en primer lugar es suficientemente simple como para obtener resultados en forma analítica. De hecho seremos capaces de obtener una parametrización de las curvas que delimitan el espacio de Turing, volviendo explícito y cuantitativo el efecto de los buffers en las dimensiones del mismo. No menos importante es la segunda motivación, como explicación plausible de los patrones tipo Turing observados en organismos vivos. En particular, como hemos visto en la sección 4.2, este esquema de reacciones se utiliza para explicar ciertas características morfogenéticas del alga marina unicelular *Acetabularia* [107, 62]. A pesar de que la evidencia experimental sugiere que los morfógenos son el Ca^{2+} y el $cAMP$, el cociente entre las difusividades de ambos no se condice con la condición teórica para que ocurra la bifurcación. Sin embargo, teniendo en cuenta que ambas especies son segundos mensajeros intracelulares, que transmiten su señal cambiando el comportamiento de ciertas moléculas (tanto el $cAMP$ como el Ca^{++} activan proteínas (buffers) específicas, formando complejos con las subunidades regulatorias de las mismas [1]), y que, al menos en el caso del calcio, su concentración como ión libre es reducida por

la presencia de complejos que los atrapan [14], es razonable suponer que la dinámica de estas especies se encuentre reescaleada por la interacción con los buffers, de un modo análogo al que hemos propuesto en la sección anterior. Sin entrar en los detalles del modelo que no son de interés desarrollar aquí, notamos que las funciones $f(u,v)$ y $g(u,v)$ tienen (luego de la adimensionalización) la siguiente forma [15]: $f(u,v) = a - u + u^2 v$ y $g(u,v) = b - u^2 v$, con $a, b > 0$. Se supone que $b > a$ para que la matriz de estabilidad pertenezca a alguno (cualquiera) de los dos casos expuestos en la sección 4.3. Por otro lado, $a+b > 0$ para que exista un punto fijo, el cual puede escribirse en términos de a y b como: $u_0 = a + b$ y $v_0 = b/a + b$. Los parámetros adimensionales a y b representan cocientes apropiadamente elegidos de las tasas de reacción, las concentraciones constantes de las fuentes en contacto con el sistema, que introducen permanentemente nuevas moléculas de $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$ [16]

Reemplazando estas funciones en las condiciones ((4.30)-(4.33)), junto con la forma particular de R que se deduce de la interacción de los morfógenos con los buffers, se obtienen las relaciones explícitas a partir de las cuales el espacio de Turing puede ser unívocamente determinado. En algunos casos particulares, las fronteras del espacio de Turing pueden ser halladas en forma analítica. Sin embargo, en general las relaciones exactas ((4.30)-(4.33)) son demasiado complicadas como para pretender ese objetivo, y se debe recurrir a un algoritmo de búsqueda numérico.

Analizaremos en lo que sigue una de las situaciones donde es posible obtener un resultado cerrado. Supondremos para ello que las concentraciones de $\mathcal{U}$ y $\mathcal{V}$ son mucho menores que k_u^d y k_v^d respectivamente. En este caso, la dependencia de R en las concentraciones del punto fijo se torna despreciable, y podemos escribir $R \simeq \left(1 + \frac{b_u^T}{k_v^d}\right)\left(1 + \frac{b_u^T}{k_u^d}\right)^{-1}$. El espacio de los parámetros donde el punto fijo (estable) puede inestabilizarse por la presencia de la difusión, es decir, el espacio de Turing, está formado por todos los puntos (a, b, R) que satisfacen las condiciones ((4.30)-(4.33)) en forma simultánea. Para un valor fijo de R, el espacio de Turing se encuentra limitado por dos curvas en el plano (a, b) cuya representación paramétrica es la siguiente:

$$(a_1(t), b_1(t)) = \left(\frac{t(R-t^2)}{2R}, \frac{t(R+t^2)}{2R}\right) \tag{4.34}$$

$$(a_2(t), b_2(t)) = \left(\frac{t}{2}\left(1 - \frac{2t}{\sqrt{d}} - \frac{t^2}{d}\right), \frac{t}{2}\left(1 + \frac{2t}{\sqrt{d}} + \frac{t^2}{d}\right)\right). \tag{4.35}$$

En la figura 4.4 mostramos cómo cambia el espacio de Turing a medida que variamos el parámetro R, para un valor fijo de $d = 2$ (por debajo del valor umbral sin los buffers). Dependiendo del valor de R, el espacio de Turing puede ser aumentado o disminuido. Dado que el valor de d debe considerarse fijo, existe un valor umbral para el parámetro R por debajo del cual el espacio de Turing es no-vacío. La forma explícita del umbral R_c puede obtenerse de modo similar al valor del d_c analizado en [107], esto es, buscando un valor de R tal que $a_i(t) = 0$ cuando $b_i(t) = 1$,

[14] En la literatura biológica, sólo a estos últimos se los llama buffers (por ejemplo, Calbindina, Bapta, Troponina, etc...). La definición de buffers que utilizamos en este trabajo se extiende también a otra clase de moléculas, como las mencionadas anteriormente.

[15] Para evitar introducir nueva notación, estamos llamando con el mismo símbolo $-u$ y $v-$ a las nuevas variables adimensionales.

[16] Aquellos interesados en conocer la dependencia explícita de a y b en los parámetros físicos del sistema, deben consultar el libro de J. D. Murray [107].

simultáneamente para ambas curvas ($i = 1, 2$). Es simple demostrar que esto ocurre cuando $R = d(3 + 2\sqrt{2})^{-1} \equiv R_c$.

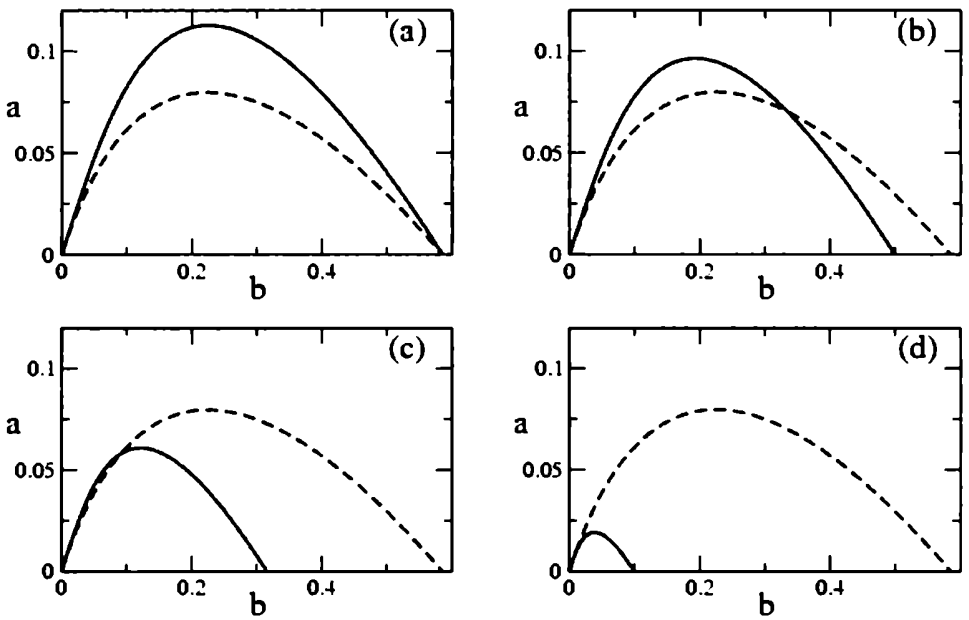

Figura 4.4: El espacio de Turing es el área comprendida por encima de la curva continua y por debajo de la curva segmentada. Las diferentes figuras corresponden a distintos valores de R: (a) $R = R_c \simeq 0{,}34$, (b) $R = 0{,}25$, (c) $R = 0{,}1$, (d) $R = 0{,}01$.

En la figura 4.5 mostramos el patrón estacionario que resulta de la integración numérica de la versión modificada del modelo de Schanckenberg, para tiempos largos. Los parámetros utilizados son: $a = 0{,}02$, $b = 0{,}3$, $\frac{b_u^T}{k_u^d} = 10$ y $b_v^T = 0$. El valor del cociente entre las difusividades del activador y del inhibidor es $d = 1$. La condición inicial para ambas especies es una perturbación aleatoria con media cero, alrededor del valor del punto fijo homogéneo. Para los mismos parámetros y condición inicial que en la figura anterior, en la figura 4.6 se observa la evolución temporal del patrón de Turing para la concentración v. Una propiedad interesante es que la longitud de onda de los patrones no depende de la presencia del buffer [17]. Puede mostrarse que la longitud de onda predicha para un sistema infinito es aproximadamente igual a 0,5, cercana al valor observado en el sistema finito de la simulación.

Desde el punto de vista experimental, las relaciones matemáticas que obtuvimos en este capítulo (4.26)-(4.29) puede utilizarse como herramientas para optar entre distintos tipos de buffers con movilidades, constantes de disociación y/o concentraciones diferentes, de forma tal de observar patrones de Turing. En lugar de proponer variar (ilícitamente) un parámetro que no es de ningún modo ajustable (d), en este capítulo hallamos el parámetro R cuyo valor es posible ajustar para el experimentador, dada su dependencia en un conjunto de variables accesibles. Si se demostrara

[17] Esto puede verse explícitamente comparando el número de onda crítico k_c (ver la ecuación C.10 del apéndice C) para las situaciones con o sin buffer, o directamente, de la explicación sobre el rol de los buffers inmóviles dada al final de la sección anterior.

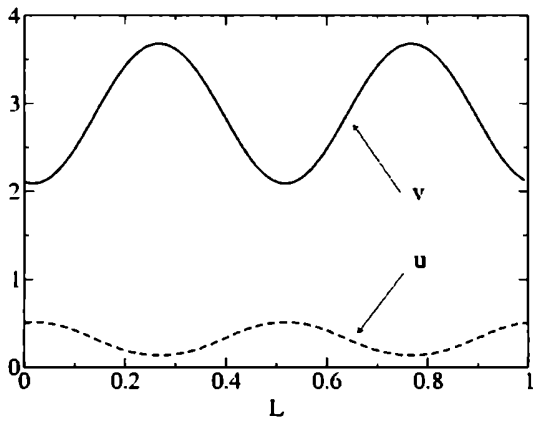

Figura 4.5: Patrón de Turing en el modelo de Schnackenberg modificado, con igual difusividad del activador y del inhibidor ($d = 1$). El resto de los parámetros está en el texto.

que, tal como sugieren ciertos experimentos, los patrones de Turing fuesen efectivamente relevantes en el funcionamiento de células o grupos de ellas durante ciertos períodos del desarrollo, las relaciones matemáticas que hallamos podrían servir para entender cómo las células encienden o apagan estas estructuras: pequeñas diferencias en la división de reactivos entre células madres e hijas, o cambios en la tasa de producción (degradación) de ciertas proteínas, podrían generar la aparición o desaparición espontánea de una estructura inhomogénea.

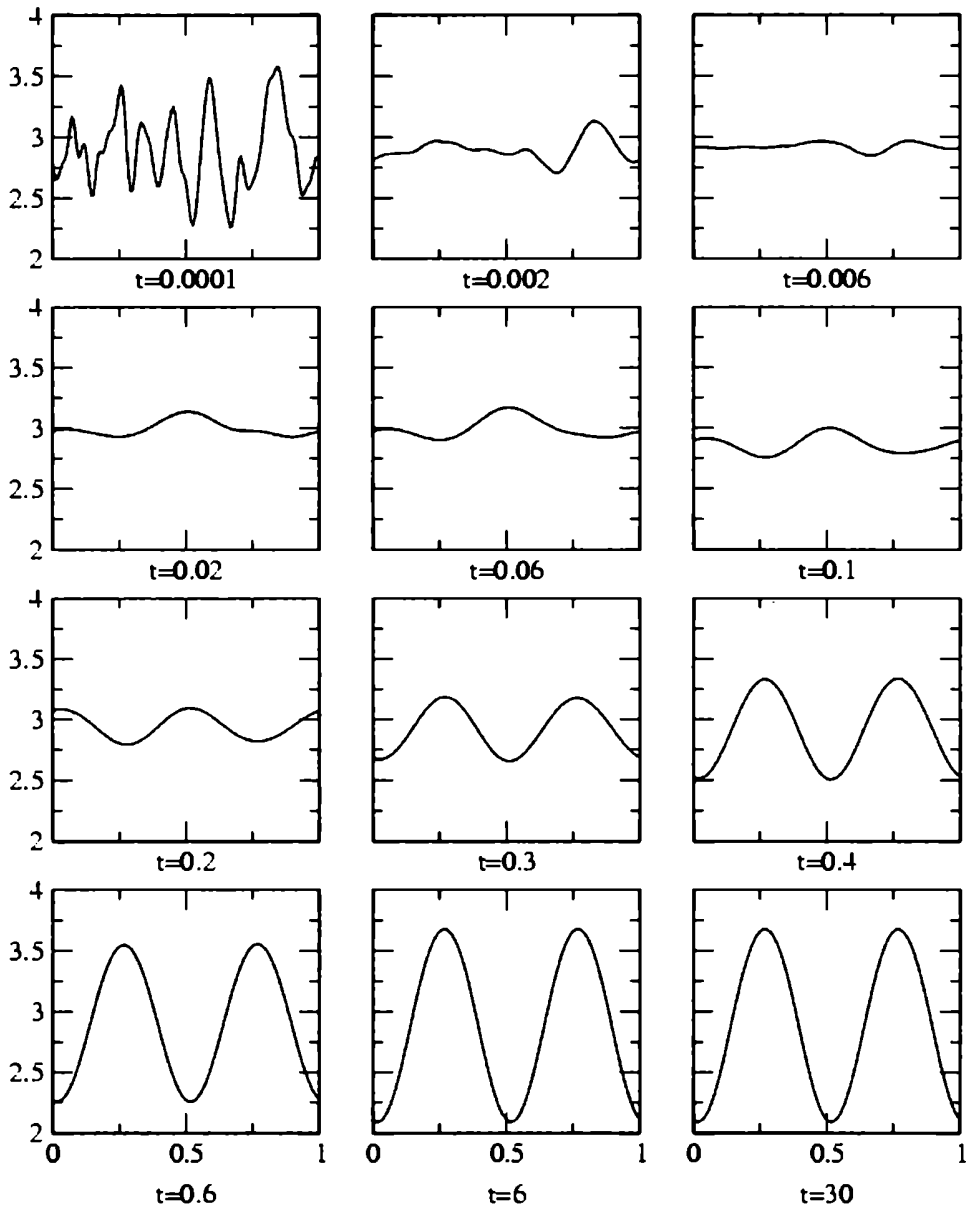

Figura 4.6: Desarrollo de un patrón de Turing a partir de una condición inicial ruidosa alrededor del estado estable homogéneo. El cociente entre las difusividades del activador y del inhibidor es 1.

5. Patrones de Turing en la glucólisis

We live in a world of marvelous complexity and variety, a world where events never repeat exactly... But even though events are never exactly the same, they are also not completely different. There is a thread of continuity, similarity, and predictability that allows us to generalize, often correctly, from past experience to future events.
J. A. Anderson [87].

5.1. Resumen

Tal como fue analizada originalmente por Murray [107], la explicación del patrón observado en el alga marina Acetabularia en términos de un mecanismo de Turing, tiene ciertos inconvenientes. En primer lugar, los parámetros utilizados para observar los patrones no se condicen con las hipótesis sobre la identidad de los morfógenos (hecho reconocido por el propio Murray). En segundo lugar, falta una justificación clara para la elección del modelo de Schnackenberg. Evidentemente estos hechos generan dudas en cuanto a que las estructuras observadas se originen en el mecanismo propuesto. El problema de la elección del modelo puede justificarse notando que, aunque no se conozca el detalle de las reacciones, el tipo de estructura observada es *compatible* con toda una clase de modelos de reacción-difusión, dentro del cual estaría tanto el de Schnackenberg como el que opera verdaderamente en el alga [1]. El valor de estos modelos reside justamente en la *posibilidad de hacer predicciones correctas aun desconociendo el detalle de las reacciones químicas reales.* El problema de la inconsistencia en los parámetros es de una naturaleza diferente. Si un modelo pretende explicar las observaciones de un sistema real, deben considerarse parámetros consistentes con los verdaderos. La inclusión de las reacciones con los buffers para el Ca^{2+} y el $cAMP$ propuesta en [34, 153] resuelve en cierta medida este aspecto, ya que, incorporando un ingrediente válido (la presencia de buffers), muestra que es posible la aparición de estructuras sin necesidad de introducir parámetros claramente falsos. Con respecto al resto de los ejemplos actuales sobre el rol de los mecanismos de Turing en la aparición de patrones en sistemas biológicos (ver capítulo 4), es importante enfatizar que ninguno está basado en un conjunto de reacciones concretas y reales del esquema celular.

Evidentemente, la situación ideal para juzgar si las ideas de Turing en cuanto al rol de los mecanismos de reacción-difusión en los fenómenos de rotura espontánea de simetría, operan verdaderamente en los seres vivos, sería contar con un sistema biológico cuyos detalles en cuanto a la bioquímica estén completamente dilucidados, para el cual se observe alguna estructura inhomogénea estable, cuyas características sean compatibles con un patrón de Turing. Si se sospecha que un cierto subconjunto de las reacciones (por ejemplo, una ruta metabólica) es la responsable de la aparición

[1] Uno de los problemas más interesantes desde el punto de vista teórico, es desarrollar una taxonomía para los sistemas de reacción-difusión, con el mismo espíritu que la que se desprende de las formas normales en el caso de las ODEs [32].

del patrón, bastaría con integrar numéricamente las ecuaciones de reacción-difusión correspondientes (con parámetros reales) o, de ser posible, estudiar analíticamente ese conjunto, pasándolo por el tamiz de las condiciones algebraicas que garantizan la existencia de esta clase de inestabilidad, y demostrando que los parámetros razonables desde el punto de vista fisiológico, pertenecen al espacio en el que las condiciones se verifican. Si alguno de estos procedimientos tiene éxito, estaríamos frente al primer caso verdaderamente fundado de un patrón de Turing en un sistema biológico. Tal situación aún no ha ocurrido.

En este capítulo [2], nuestro propósito es acercarnos lo más posible a esta situación ideal, analizando una ruta metabólica esencial para la mayoría de los organismos, como lo es la glucólisis (ver la introducción, sección 1.3.2). La motivación fundamental para elegir a la glucólisis no se basa en la sospecha de que la glucólisis sea el promotor de un cierto patrón espacial observado en las células, o en conjuntos de células. Si bien no podemos negar *a priori* esta posibilidad, la motivación más fuerte es que la glucólisis ha sido largamente estudiada, y la mayor parte de sus detalles dilucidados. Además, se han construido modelos matemáticos que capturan la esencia del proceso. Uno de estos modelos es el que propuso Selkov [141] para explicar la aparición de oscilaciones temporales en las concentraciones de los metabolitos. A pesar de ser relativamente sencillo [3], el modelo de Selkov reproduce varias de las observaciones experimentales. Modelos más completos, como el propuesto por Goldbeter y Lefever [61] incorporan otros elementos adicionales, proporcionando una descripción más ajustada del fenómeno, (en particular, la observación de la presencia de dos bifurcaciones de Hopf, en lugar de la única que captura el modelo de Selkov). Sin embargo, dado que nuestro enfoque es analítico, optamos por describir la glucólisis a través del modelo de Selkov. Utilizando los métodos de reducción desarrollados en el capítulo 2 para sistemas de reacción-difusión, obtenemos las ecuaciones que rigen la dinámica espacio-temporal en la glucólisis en la escala lenta. A partir del análisis de la estabilidad lineal del punto fijo del sistema homogéneo (ver apéndice C), encontramos una zona de parámetros compatible con la que es aceptada en la literatura [141, 83], en la cual, incluso considerando la similitud entre las difusividades libres del ATP y ADP, es de esperar la emergencia de un patrón de Turing en las concentraciones de estas especies. Posteriormente confirmamos este resultado resolviendo numéricamente el sistema.

5.2. El modelo de Selkov

Para ser precisos, ni el modelo de Selkov ni el de Goldbeter y Lefever describen toda la ruta metabólica de la glucólisis (ver figura 1.10). Sólo describen el paso catalizado por la fosfofructokinasa (PFK). Es posible separar el modelado de este paso del resto de la ruta, dadas las escalas de tiempo involucradas en la mayoría de los demás pasos enzimáticos y debido a otras evidencias que surgen de los experimentos. En efecto, de los 10 pasos de la glucólisis catalizados por enzimas, sólo los correspondientes a la hexokinasa, a la piruvato kinasa y a la fosfofructokinasa involucran cambios negativos importantes en la energía libre (G), bajo condiciones fisiológicas ($\Delta G = -27KJ/mol, -14KJ/mol, -26KJ/mol$ respectivamente [166]).

[2] Este capítulo es una síntesis del trabajo [154].

[3] Selkov demostró que la dinámica temporal del sistema original de 5 ecuaciones diferenciales ordinarias, colapsa en la escala lenta a un sistema de sólo 2 ecuaciones similares a las de Lotka-Volterra, para las concentraciones de ATP y ADP [141]

Estas reacciones son, por lo tanto, los candidatos para convertirse en los reguladores de la velocidad de la glucólisis. El resto de las reacciones involucradas son mucho más rápidas (en promedio, $\Delta G \sim -2KJ/mol$), con lo cual se equilibran de manera prácticamente instantánea ante cualquier cambio en el flujo generado en los pasos lentos [4]. Los experimentos indican que de los 3 candidatos posibles para controlar el flujo en la glucólisis, la *PFK* es la que juega el rol central [83, 166], tal como propuso Selkov en su trabajo original, basado en los experimentos de Pye [131] y Hess [72]. En muchos organismos, la actividad de la *PFK* es aumentada alostéricamente por diversas sustancias, incluida el *AMP* (e indirectamente por el *ADP*), e inhibida alostéricamente por *ATP* y citrato [166]. Además de jugar el papel de inhibidor, el *ATP* es el sustrato, cuando se liga en el sitio catalítico de la enzima. Si bien las propiedades regulatorias de la *PFK* son sumamente complejas [5] ("exquisitas" según los enzimólogos), en el modelo de Selkov se las tiene en cuenta de una forma muy cruda [6]. En el modelo de Selkov la *PFK* es inactiva, a menos que tenga ligadas cierta cantidad de moléculas de *ADP* [7]. En el estado activo, la enzima cataliza la producción de *ADP* a partir de *ATP*, a medida que la fructosa-6-P es fosforilada. El modelo propuesto por Selkov para el esquema de las reacciones es el siguiente: la enzima libre *PFK* (denotada por $\mathcal{E}$) es activada o desactivada por la unión o disociación de γ moléculas de *ADP* (denotada por $\mathcal{S}_2$) a través de la siguiente reacción:

$$\gamma \mathcal{S}_2 + \mathcal{E} \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} \mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma}. \tag{5.1}$$

Por otro lado, las moléculas de *ATP* ($\mathcal{S}_1$) pueden reaccionar con la forma activada de la enzima para producir una molécula de *ADP* ($\mathcal{S}_2$). Esto es:

$$\mathcal{S}_1 + \mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} \mathcal{S}_1\mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma} \overset{k_{+2}}{\rightarrow} \mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma} + \mathcal{S}_2. \tag{5.2}$$

Finalmente, se supone que el sustrato $\mathcal{S}_1$ es suministrado a esta etapa de la ruta a una tasa constante ν_1 (la cual, vale aclarar, es uno de los parámetros que se controlan en los experimentos con extractos celulares), mientras que el producto $\mathcal{S}_2$ es irreversiblemente removido a través de una reacción de primer orden (esto es, una reacción cuya velocidad es simplemente proporcional a la concentración del propio producto). Esquemáticamente:

---

[4] Según la teoría de la cinética química, el logaritmo de la tasa de reacción k se escribe: $\ln(k) = \ln(k_B T/h) - \Delta G/RT$, siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, h la constante de Planck, y R la constante universal de los gases. Por lo tanto, para una dada temperatura, la tasa de las reacciones decrece a medida que la energía libre de activación aumenta.

[5] Por ejemplo, la propiedad inhibitoria del *ATP* es reducida fuertemente por la presencia de *AMP*.

[6] Allí reside justamente la mejora introducida por Goldbeter y Lefever, basándose en un modelo del tipo propuesto por Monod-Wyman-Changeux [106]. En este modelo se supone que la proteína está compuesta por un cierto número de protómeros equivalentes (cada uno con un sitio de unión para el ligando), pudiendo encontrarse en dos estados conformacionales con diferentes afinidades.

[7] A pesar que en verdad es el *AMP* quien activa a la enzima, como generalmente hay poco *AMP* en la célula, es el *ADP*, a través de la reacción $2ADP \rightleftharpoons AMP + ATP$, el que efectivamente regula a la *PFK*.

$$\xrightarrow{\nu_1} \mathcal{S}_1 \ , \tag{5.3}$$

$$\mathcal{S}_2 \xrightarrow{\nu_2} . \tag{5.4}$$

Es importante notar que el mecanismo propuesto por Selkov es suficientemente genérico, como para servir de base para el estudio de otras reacciones diferentes a la glucólisis. En efecto, el modelo simplemente representa una reacción monosustrato y monoproducto *abierta*, catalizada por una enzima alostérica, cuyas propiedades se tienen en cuenta simplemente a través del factor γ, que representa simultáneamente el grado de activación por producto y el de inhibición por sustrato [141]. Las particularidades de la glucólisis entran en el modelo a través de los valores de los parámetros.

5.2.1. Reducción de las ecuaciones

Aplicando la ley de acción de masas en las ecuaciones (5.1)-(5.3), y suponiendo que podemos despreciar la difusividad de la enzima y los complejos, frente a la de $\mathcal{S}_1$ y $\mathcal{S}_2$, el sistema de reacción-difusión resultante tiene la siguiente forma [8]

$$\frac{\partial s_1}{\partial t} = \nu_1 - k_{+1}s_1x_1 + k_{-1}x_2 + D_1\nabla^2 s_1 \ , \tag{5.5}$$

$$\frac{\partial s_2}{\partial t} = k_{+2}x_2 - \gamma k_{+3}s_2^{\gamma}e + k_{-3}x_1 - \nu_2 s_2 + D_2\nabla^2 s_2 \ , \tag{5.6}$$

$$\frac{dx_1}{dt} = -k_{+1}s_1x_1 + k_{-1}x_2 + k_{+3}s_2^{\gamma}e - k_{-3}x_1 + k_{+2}x_2 \ , \tag{5.7}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_{+1}s_1x_1 - k_{-1}x_2 - k_{+2}x_2 \ , \tag{5.8}$$

$$\frac{de}{dt} = -\frac{d(x_1 + x_2)}{dt} \ , \tag{5.9}$$

donde $s_1 = [\mathcal{S}_1]$, $s_2 = [\mathcal{S}_2]$, $x_1 = [\mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma}]$, $x_2 = [\mathcal{S}_1\mathcal{E}\mathcal{S}_2^{\gamma}]$, y $e = [\mathcal{E}]$. La ecuación (5.9) implica que existe una cantidad conservada en la evolución, que corresponde a la cantidad total de enzima en cualquiera de sus formas. En otras palabras, la concentración $e_0 \equiv x_1 + x_2 + e$ es una constante de movimiento del sistema dinámico (5.5)-(5.9), y por lo tanto, una cualquiera de las variables que corresponden a la concentración de la enzima o los complejos enzimáticos puede ser eliminada de la descripción. Siguiendo la adimensionalización de la ecuaciones diferenciales ordinarias propuesta por Selkov en su trabajo original, y en nuestro caso, adimensionalizando también el espacio, considerando la existencia de una longitud característica L (por ejemplo, el

[8] Curiosamente existe un pequeño error en la escritura de una de las ecuaciones en el paper de Selkov (falta un γ en la ecuación (5.6)), que se propagó posteriormente en todos los trabajos donde se cita este artículo, incluido uno tan reciente como [83].

tamaño de una célula), definimos:

$$\sigma_1 \equiv \frac{k_{+1}s_1}{k_{+2}+k_{-1}} \quad ; \quad \sigma_2 \equiv \left(\frac{k_{+3}}{k_{-3}}\right)^{\frac{1}{\gamma}} s_2 \quad ; \quad u_1 \equiv \frac{x_1}{e_0} \quad ; \quad u_2 \equiv \frac{x_2}{e_0} \tag{5.10}$$

$$\nu \equiv \frac{\nu_1}{k_{+2}e_0} \quad ; \quad \eta \equiv T\nu_2 \quad ; \quad \alpha \equiv \frac{k_{+2}+k_{-1}}{k_{+1}}\left(\frac{k_{+3}}{k_{-3}}\right)^{\frac{1}{\gamma}}$$

$$d_1 \equiv \frac{TD_1}{L^2} \quad ; \quad d_2 \equiv \frac{TD_2}{L^2} \quad ; \quad T \equiv \frac{k_{+2}+k_{-1}}{e_0 k_{+1}k_{+2}}$$

$$K_1 \equiv \frac{k_{-1}}{k_{+2}} \quad ; \quad K_3 \equiv \frac{k_{-3}}{k_{+2}} \quad ; \quad \epsilon \equiv (T(k_{+2}+k_{-1}))^{-1}$$

$$t \equiv T\tau \quad ; \quad r \equiv Lr^*$$

En término de estas nuevas variables adimensionales, el sistema de reacción-difusión resultante está dado por:

$$\frac{\partial \sigma_1}{\partial \tau} = \nu - (1+K_1)\sigma_1 u_1 + K_1 u_2 + d_1 \frac{\partial^2 \sigma_1}{\partial x^2}, \tag{5.11}$$

$$\frac{\partial \sigma_2}{\partial \tau} = \alpha\left[u_2 - \gamma K_3 \sigma_2^\gamma (1-u_1-u_2) + K_3 u_1\right] - \eta\sigma_2 + d_2 \frac{\partial^2 \sigma_2}{\partial x^2}, \tag{5.12}$$

$$\epsilon \frac{du_1}{d\tau} = u_2 - \sigma_1 u_1 + \frac{K_3}{1+K_1}\left[\sigma_2^\gamma (1-u_1-u_2) - u_1\right] \tag{5.13}$$

$$\epsilon \frac{du_2}{d\tau} = \sigma_1 u_1 - u_2, \tag{5.14}$$

donde, por simplicidad, consideramos el caso unidimensional, y omitimos el asterisco para la variable espacial adimensional, x. Teniendo en cuenta que, típicamente las concentraciones de las enzimas son bajas, se asume que los valores que toma ϵ son pequeños, con lo cual, las variables u_1 y u_2 son rápidas. Por lo tanto, la dinámica en la escala lenta estará regida por σ_1 y σ_2. Las concentraciones de la enzima y los complejos se ajustarán rápidamente a los valores de las variables lentas. Dado que en este caso existe una relación unívoca entre las variables y las escalas temporales, utilizaremos el segundo de los métodos propuestos en el capítulo 2 (el que es una extensión de la hipótesis cuasi-estacionaria para sistemas de reacción-difusión), ya que es más directo y permite operar sin mayores inconvenientes en casos en los que, como éste, hay más de una reacción rápida y se pretende eliminar más de una variable rápida (u_1 y u_2).

Insertando en (5.13) y (5.14) la siguiente expansión en potencias del parámetro ϵ (ver capítulo 2):

$$\begin{aligned} u_1 &= u_1^{(0)} + \epsilon u_1^{(1)} + \dots, \\ u_2 &= u_2^{(0)} + \epsilon u_2^{(1)} + \dots, \end{aligned} \tag{5.15}$$

encontramos a orden 1:

$$\begin{aligned} u_1^{(0)} &= \sigma_2^\gamma (1 - u_1^{(0)} - u_2^{(0)}) \\ u_2^{(0)} &= \sigma_1 u_1^{(0)} \end{aligned} \tag{5.16}$$

con lo cual,

$$
\begin{aligned}
u_1^{(0)} &= f(\sigma_1,\sigma_2)/\sigma_1 \\
u_2^{(0)} &= f(\sigma_1,\sigma_2) \\
f(\sigma_1,\sigma_2) &= \frac{\sigma_1\sigma_2^\gamma}{1+\sigma_2^\gamma(1+\sigma_1)}
\end{aligned}
\tag{5.17}
$$

Del mismo modo, a orden ϵ encontramos:

$$
\begin{aligned}
\frac{du_1^{(0)}}{d\tau} &= u_2^{(1)} - \sigma_1 u_1^{(1)} - \frac{K_3}{1+K_1}\left[\sigma_2^\gamma(u_1^{(1)}+u_2^{(1)}) + u_1^{(1)}\right] \\
\frac{du_2^{(0)}}{d\tau} &= \sigma_1 u_1^{(1)} - u_2^{(1)}
\end{aligned}
\tag{5.18}
$$

En las proximidades del punto fijo del sistema (5.11)-(5.14), $\sigma_2^\gamma \ll 1$, entonces $f(\sigma_1,\sigma_2) \simeq \sigma_1\sigma_2^\gamma$. Por lo tanto,

$$
\begin{aligned}
\frac{du_1^{(0)}}{d\tau} &= \gamma\sigma_2^{\gamma-1}\frac{\partial\sigma_2}{\partial\tau} \\
\frac{du_2^{(0)}}{d\tau} &= \sigma_2^\gamma\frac{\partial\sigma_1}{\partial\tau} + \gamma\sigma_1\sigma_2^{\gamma-1}\frac{\partial\sigma_2}{\partial\tau}\,.
\end{aligned}
\tag{5.19}
$$

Despejando $u_1^{(1)}$ y $u_1^{(2)}$ de las ecuaciones (5.18) y teniendo en cuenta las ecuaciones (5.19), obtenemos un sistema cerrado para las variables lentas σ_1 y σ_2. Estas ecuaciones tienen la siguiente forma:

$$
\begin{aligned}
\frac{\partial\sigma_1}{\partial\tau} &= \nu - \sigma_1\sigma_2^\gamma\left(1+\frac{\epsilon\gamma\eta(1+\sigma_1-K_1)}{1+\Sigma(\sigma_1,\sigma_2)}\right) + \epsilon\Gamma_2(\sigma_1,\sigma_2)\frac{\partial^2\sigma_2}{\partial x^2} + d_1\frac{\partial^2\sigma_1}{\partial x^2} \\
\frac{\partial\sigma_2}{\partial\tau} &= \frac{1}{1+\Sigma(\sigma_1,\sigma_2)}\left(\alpha\sigma_2^\gamma(\sigma_1+(1-\gamma)K_3) - \eta\sigma_2 + d_2\frac{\partial^2\sigma_2}{\partial x^2}\right),
\end{aligned}
\tag{5.20}
$$

donde hemos definido las funciones

$$
\begin{aligned}
\Gamma_2(\sigma_1,\sigma_2) &\equiv \frac{\gamma\sigma_1\sigma_2^{\gamma-1}(1+\sigma_1-K_1)}{1+\Sigma(\sigma_1,\sigma_2)}d_2 \\
\Sigma(\sigma_1,\sigma_2) &\equiv \epsilon\alpha\gamma\sigma_2^{\gamma-1}\left(K_3+(2+K_3)\sigma_1+\sigma_1^2\right)
\end{aligned}
\tag{5.21}
$$

A pesar del efecto complejo de la interacción con la enzima en la evolución del sustrato y el producto, de las ecuaciones (5.20) surge inmediatamente que el reescaleo de las difusividades es más importante para el activador de la reacción (el ADP, representado en las ecuaciones por σ_2) que para el inhibidor (el ATP, σ_1). Si bien este hecho no es suficiente por si sólo para garantizar la aparición de patrones de Turing, como vimos a partir del análisis del capítulo anterior, es por lo menos necesario que el reescaleo actúe en esta dirección, si las difusividades libres del activador y del inhibidor son similares. Es importante enfatizar, por otra parte, la necesidad de desarrollar hasta orden ϵ para observar las correcciones que aparecen en las difusividades de S_1 y S_2 debido a la interacción selectiva de estas moléculas con la enzima y los complejos.

5.3. Estructuras de Turing en la glucólisis

La forma de las ecuaciones (5.20) está contenida como caso particular del análisis de estabilidad lineal del punto fijo homogéneo estudiado en el apéndice C para un sistema del tipo activador-inhibidor. Utilizando programas de manipulación simbólica, tales como el *Mathematica* o el *Maple*, es inmediato implementar una rutina que, haciendo un barrido en el rango de los parámetros comúnmente aceptados en la literatura [83, 141], calcule el punto fijo y evalúe si se satisfacen las condiciones para la aparición de los patrones sintetizadas en las relaciones (C.7), (C.8) y (C.9) para cada vector de parámetros. Si bien varios de los parámetros están correctamente determinados a partir de los experimentos, para otros lo más que se puede dar es un rango razonable, lo más acotado posible. A partir de la comparación entre los resultados experimentales de Hess [72] y Pye [131], entre otros, dentro del primer grupo se encuentran: [83, 141] $s_1 \simeq 10^{-4} - 10^{-3}\ M$, $s_2 \simeq 10^{-4} - 10^{-3}\ M$, $e_0 \simeq 10^{-6} - 10^{-5}\ M$, $\nu_1 \simeq 6{,}10^{-6}\ M/seg$, $\nu_2 \simeq 4{,}10^{-2}\ 1/seg$, $\nu = 0{,}02$ y $\alpha \simeq 10^{-1} - 1$. Por otro lado, la difusividad del ATP y el ADP en el citoplasma se estima en $150\mu m^2/seg$ [12]. Por lo tanto, k_{+2} es del orden de $3{,}10^1 - 3{,}10^2\ 1/seg$. Valores razonables para el cociente $r = \frac{k_{+2}+k_{-1}}{k_{+1}}$ están comprendidos entre $10^{-4} - 10^{-2}\ M$ [141]. Por lo tanto, el parámetro $\eta = \frac{\nu\nu_2 r}{\nu_1}$ pertence al rango $10^{-2} - 1$. A partir de (5.10) se deduce entonces que T está entre 0,25 y 25 segundos. Si tomamos $\eta = 0{,}01$ y consideramos que L representa el largo de una célula, $L \sim 150\mu m$, resulta que $d_1 = d_2 \sim 0{,}001$ [9]. El resultado fundamental de este capítulo es que el espacio de Turing no es vacío. De hecho, para un rango relativamente extenso del espacio de parámetros, incluyendo las superficies sobre las cuales la difusividad del activador y del inhibidor son exactamente iguales, el análisis del modelo reducido muestra que es de esperar que una pequeña perturbación con la longitud de onda apropiada, sea capaz de crecer en el tiempo hasta conformar un patrón estacionario. En la figura 5.1 se muestra la evolución temporal de las concentraciones σ_1 y σ_2 en el caso homogéneo, para una dada condición inicial. A partir del estudio de estabilidad analizado en el apéndice (en particular, las condiciones (C.7)), notamos que es una condición necesaria que el punto fijo sea estable ante perturbaciones de longitud de onda infinita. Chequeamos esta condición para uno de los vectores de parámetros encontrados previamente, colocando al sistema en un estado inicial uniforme y alejado del equilibrio, y observando que, independientemente de la condición inicial elegida en una cierta vecindad del punto fijo, todas las trayectorias retornan hacia el mismo. En la figura 5.2 se muestra la estructura estacionaria correspondiente a la concentración (adimensionalizada) de ATP (para el ADP se observa un patrón complementario centrado en la concentración de ADP del punto fijo). Dado que la unidad de la coordenada espacial corresponde al tamaño característico de una célula, para el vector de parámetros escogido el patrón resulta intracelular. Para otros juegos de parámetros, dentro de los mencionados arriba, el patrón ocupa (en una dimensión) algunas decenas de células. En este caso, para ser consistentes, es necesario corregir el coeficiente de difusión para tener en cuenta la reducción que ocurre al pasar por la membrana (el coeficiente se reduce en un orden de magnitud allí [12]). Incluso teniendo en cuenta este efecto, se observan patrones

[9] Para los cocientes K_1 y K_3, cuyos valores no se incluyen ni en [141] ni en [83], realizamos un barrido más extenso del espacio (desde 10^{-2} hasta 10^2), encontrando que la presencia de patrones no depende fuertemente del valor de los mismos. En [154] se muestra la forma del espacio de Turing dejando algunos de los parámetros fijos, junto con otros detalles relevantes. En esta sección, nos limitaremos a mostrar directamente los patrones que emergen de la simulación numérica para uno de los vectores de parámetros hallados a partir de las condiciones analíticas.

a nivel supracelular [154]. Por lo tanto, a pesar de que no es posible dicernir con los parámetros con los que contamos, si es de esperar la emergencia de un patrón a nivel intracelular o supracelular, hemos probado que el mecanismo propuesto para la glucólisis es compatible con la aparición de patrones de Turing en células o grupos pequeños de células (del orden de 100).

Como mencionamos anteriormente, el modelo de Selkov describe un mecanismo de conversión activado por producto que es típico de numerosas reacciones catalizadas por enzimas alostéricas. Por consiguiente, el patrón de Turing que encontramos para los parámetros de la glucólisis, podría ser una propiedad compartida con otra clase de reacciones de la bioquímica celular. Por otro lado, el hecho de que la concentración de enzimas puede ser elevada en ciertos compartimientos celulares, sugiere que mecanismos de rescaleo similares a aquellos observados en reactores químicos permanentemente alimentados, podrían operar en las células, creando la diferencia necesaria entre las difusividades de algunos metabolitos involucrados en la aparición de un patrón de Turing. Los resultados de este capítulo proveen el primer ejemplo concreto en este sentido.

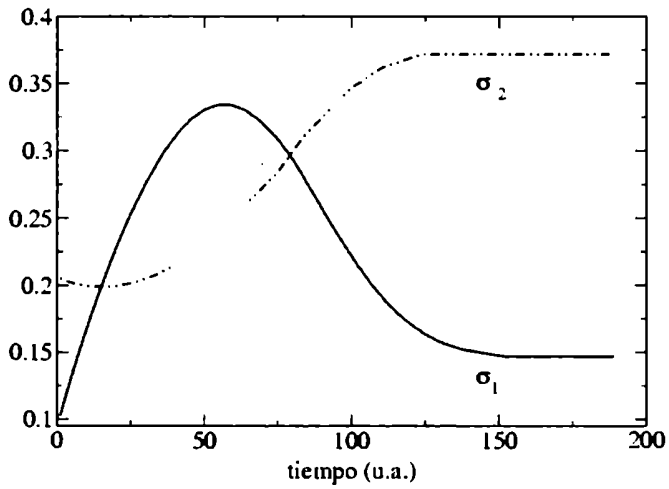

Figura 5.1: Evolución del promedio espacial de las concentraciones (adimensionales) a partir de una condición inicial correspondiente al caso espacialmente homogéneo, con los siguientes parámetros: $\gamma = 2$, $\eta = 0{,}01$, $\nu = 0{,}02$, $\alpha = 0{,}5$, $\epsilon = 0{,}3$, $K_1 = 0{,}1$, $K_3 = 0{,}1$. Efectivamente, en ausencia de los términos difusivos (formalmente, haciendo $D_1 = D_2 = 0$), el sistema evoluciona hacia un punto fijo.

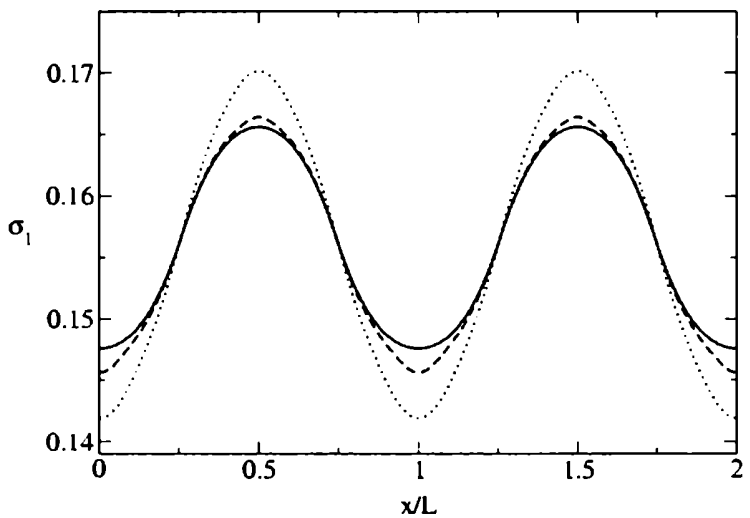

Figura 5.2: Patrón de Turing correspondiente a σ_1 (ATP), para los mismos valores de los parámetros que en la figura 5.1, excepto para las difusividades. En este caso, consideramos $D_1 = D_2 = 150\,\mu m^2/seg$. La longitud característica es $L = 150\,\mu m$. La curva punteada corresponde al perfil de concentración a tiempo $t = 1{,}25\,seg$, la segmentada corresponde al tiempo $t = 3{,}75\,seg$, donde prácticamente se alcanza el patrón estacionario. La línea continua corresponde a la estructura estacionaria ($t = 40\,seg$). El sistema evoluciona a partir de una perturbación sinusoidal de período L. La longitud de onda crítica (teórica) para el caso infinito correspondiente a estos parámetros, es 0,75 medida en la misma escala.

6. Validez de la descripción reducida en la propagación de ondas de calcio

The laws of nature do indeed determine how any process, once started, will evolve and what its outcome will be. But it is the initial state, the situation at any given single instant, that determines just which process is to take place. And the laws of nature do not determine initial states. Or perhaps we might say that initial states are whatever nature allows us to have control over, at least in principle, or, perhaps even better, whatever nature prefers not to be bothered with.
J. Rosen [135].

6.1. Resumen

En los capítulos anteriores, hemos desarrollado y utilizado un método para simplificar sistemas dinámicos extensos, descriptos por medio de ecuaciones de reacción-difusión. Para ello, consideramos que tanto la difusión como el intercambio de moléculas con el exterior del sistema (los términos de fuente o sumidero), ocurrían en una escala temporal lenta comparada con otro grupo de reacciones químicas (rápidas) [1]. Esto implica que, en las ecuaciones de evolución, los términos difusivos y los de tipo fuente (o sumidero) son, en valor absoluto, mucho más pequeños que aquellos que provienen de las reacciones rápidas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales el peso de los términos de fuente y/o los de transporte, pueden variar en forma dinámica, tornándose inadecuada su inclusión dentro de los procesos lentos durante toda la evolución. Esto podría ocurrir, por ejemplo, si una fuente (lenta) incrementa suficientemente su intensidad, apareciendo en el sistema más partículas debido a la presencia de la misma, que a partir de las reacciones, o, en el caso de la difusión, cuando la propia dinámica produce inhomogeneidades muy marcadas en las concentraciones.

En este capítulo final, estudiaremos un problema biológico concreto para el cual, las consideraciones precedentes son relevantes. El problema que analizaremos es el de la *propagación de ondas de calcio intracelular*, en presencia de buffers rápidos (endógenos y exógenos) y de fuentes (canales de calcio individuales o grupos de canales). En particular, nuestro propósito aquí será evaluar los tamaños relativos de los diferentes términos que aparecen en las ecuaciones correspondientes, y mostrar en algun caso concreto, las diferencias cualitativas que pueden surgir al intentar utilizar la descripción reducida fuera del dominio en el cual está correctamente definida. Para hacer algunas comparaciones, nos basaremos en un modelo simplificado para describir dicha propagación, (el *fire-diffuse-fire (FDF)*, ver la sección 1.3.3), utilizando valores para los parámetros extraídos de la literatura. Como resultado de la comparación de los tamaños relativos, seremos capaces de discernir (tanto para el caso de propagación continua, como saltatoria), cuáles son los términos que deberían considerarse rápidos y cuáles lentos. Este es el paso previo a un análisis correcto del

[1] En aquél desarrollo se incluía la posibilidad de que exista también un subconjunto de reacciones lentas.

problema mediante los métodos de escalas temporales múltiples desarrollados en esta tesis, el cual es el tema de un trabajo en preparación [155].

6.2. Consideraciones preliminares

La concentración de calcio en el citosol, es reducida fuertemente por la presencia de proteínas con sitios específicos de unión para el calcio (buffers endógenos de calcio). Los experimentos sugieren que en el citoplasma de diversas células, cerca del 99 % de los iones de calcio se hallan ligados a diferentes buffers [2, 112, 160, 184]. Mientras que la identidad de la mayoría de estos buffers y su rol no han sido aun dilucidados, la existencia de buffers de gran afinidad para el calcio tiene implicancias importantes, en otras cosas, en los mecanismos de señalización [42], exocitosis [71], y en el acoplamiento entre excitación y contracción en células cardíacas [10, 19]. La difusividad efectiva del calcio (reescaleada por la interacción con buffers) es relevante también en cuanto a los protocolos experimentales, en la mayoría de los cuales se introducen buffers exógenos que permiten medir por fluorescencia, las concentraciones citosólicas de calcio. En la introducción (ver sección 1.3.3) hemos mencionado otros roles del calcio en las células. Vimos que uno de los fenómenos de auto-organización más espectaculares asociados al calcio, es la propagación de ondas de calcio intracelular en células vivas (ver figura 1.3.3). Los experimentos muestran que la onda de calcio es regenerada al atravesar zonas en la cuales se hallan ubicados *canales de calcio*, es decir, conductos que permiten el paso de iones de calcio desde reservorios internos, como el retículo endoplasmático, hacia el citosol. Estos canales son a su vez sensibles a la concentración local del calcio en el citosol, $[Ca^{2+}]$. Esta sensibilidad se manifiesta en el aumento de la *probabilidad de apertura* ante un incremento local de $[Ca^{2+}]$. Esto ocurre ya que los cambios conformacionales asociados con la apertura, son facilitados al ligar calcio en sitios de unión específicos de la proteína que constituye el canal. Debido a la enorme diferencia entre la concentración de calcio basal en el citosol, y la del medio extracelular, la del retículo endoplamático o sarcoplasmático, (ver la sección 1.3.3), cuando se produce la apertura de un canal de calcio, la concentración local de calcio intracelular aumenta en forma vertiginosa (ver figura 6.1).

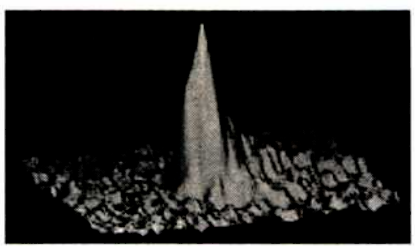

Figura 6.1: Imágen de un evento de liberación de Ca^{2+} tomada con un microscopio confocal sobre un intervalo de 500 ms. Imagen tomada de [119].

La solución estacionaria para la concentración del calcio intracelular correspondiente a un canal de calcio aislado y abierto durante infinito tiempo, en presencia de buffers rápidos, fue encontrada analíticamente por G. Smith [144] y la dinámica del mismo problema fue estudiada numéricamente en [145]. Dado que el calcio ingresa abruptamente en el citosol [2] a través de canales cuyo diámetro de boca típico es menor a 1 nm [73], la cual es una longitud mucho menor que cualquier otra longitud característica del problema, (en especial, la separación media entre canales,

[2]Durante el tiempo que –en promedio– permanece abierto un canal (por ejemplo, 0,05s en el caso de ovocitos inmaduros, o 9s en el caso de ovocitos maduros), circula una corriente que es típicamente del orden de 1 pA. Teniendo en cuenta la concentración basal del calcio en el citoplasma, el flujo de estos iones produce una variación aguda en la concentración de calcio (ver figura 6.1).

que es del orden de $1\mu m$ [182]), al menos en los primeros instantes posteriores a la apertura, la concentración de calcio es relativamente alta respecto a su valor basal ($\sim 0{,}01\mu M$) en una zona cuya extensión espacial es muy reducida. Por lo tanto, es de esperar que en estos primeros instantes, tanto el término de fuente como el de difusión no puedan ser despreciados frente al término de las reacciones rápidas, tal como fue asumido explícitamente en [150] y en [168].

En este capítulo, estamos interesados en estudiar la validez de la dinámica espacio-temporal reducida asociada a un mecanismo que involucra la apertura y cierre de diversos canales de calcio. Efectivamente, se supone que el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio (*CICR*, ver 1.3.3) es el responsable de la propagación de las ondas de calcio intracelular, donde la señal es mantenida mediante la activación de nuevas fuentes. Esto implica que, aun cuando el disparo de un canal individual invalide sólo temporariamente la aproximación de buffers rápidos, un fenómeno que involucra el disparo sucesivo de muchos de ellos puede hacer que la aproximación deje de ser válida para todo tiempo. Resultados preliminares indican que el comportamiento cualitativo puede diferir completamente, pudiéndose encontrar situaciones en las cuales la predicción a partir del modelo reducido se aparte notablemente del modelo completo en cuestiones tan esenciales como la presencia o ausencia de propagación [155]. En otras palabras, en un problema que involucre el disparo de varios canales en forma sucesiva, ya no es claro que pueda hallarse algún instante a partir del cual el efecto del apartamiento de las condiciones que garantizan la validez de la aproximación, se vuelva despreciable. Como veremos, para el caso de propagación continua (por ejemplo en las ondas de fertilización en huevos maduros de Xenopus Laevis [51]), la reducción resulta adecuada durante toda la evolución, mientras que no lo es para el caso de la propagación saltatoria como la que se observa en huevos inmaduros [18, 182].

6.3. Comparación de las escalas temporales

La descripción completa de un sistema en el que el calcio difunde en el citoplasma, interactúa con buffers, y puede ser liberado de centros de almacenaje internos (tales como el *ER*, o el *SR*) a través de canales específicos, y que además puede ser recapturado por estos retículos por medio del bombas (que utilizan energía proveniente de la hidrólisis del *ATP*), está dada por el siguiente conjunto de ecuaciones de reacción-difusión:

$$\frac{\partial[Ca^{2+}]}{\partial t} = -k[Ca^{2+}][B] + k'[C] + f(\mathbf{x},t) + g([Ca^{2+}]) + D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}], \quad (6.1)$$

$$\frac{\partial[B]}{\partial t} = -k[Ca^{2+}][B] + k'[C] + D_B\nabla^2[B], \quad (6.2)$$

$$\frac{\partial[C]}{\partial t} = k[Ca^{2+}][B] - k'[C] + D_C\nabla^2[C], \quad (6.3)$$

las cuales deben ser resueltas sujetas a condiciones iniciales y de contorno para las concentraciones de calcio $[Ca^{2+}](\mathbf{x},t)$, del buffer $[B](\mathbf{x},t)$, y del complejo formado por el buffer y un ion de calcio $[C](\mathbf{x},t)$. Por simplicidad, se asume que el buffer posee un solo sitio de ligadura para el calcio, y que la reacción es de la misma forma que la que hemos estudiado en el capítulo 3, es decir:

$$[Ca^{2+}] + B \underset{k'}{\overset{k}{\rightleftharpoons}} C. \quad (6.4)$$

En las ecuaciones (6.1)-(6.3) está implícita la suposición de que las variaciones en la concentración de calcio en el retículo endoplasmático pueden ser despreciadas de modo que el mismo actúa como un reservorio casi infinito de calcio. Este tratamiento simplificado de la dinámica del calcio dentro del retículo es suficiente para analizar la validez o no de la descripción reducida (o, equivalentemente, de la aproximación de buffers rápidos) en este caso, que es el objetivo de este capítulo.

Como es usual, D_{Ca}, D_B y D_C representan los coeficientes de difusión libre del calcio, del buffer y del complejo respectivamente. El término $g([Ca^{2+}])$ representa al flujo debido a la recaptura de los iones de calcio mediante el bombeo activo. También es posible incluir dentro de este término a un flujo de pérdida que se origina en el paso de iones a favor del gradiente de concentración, a través de la membrana del ER. Más exactamente, $g \equiv g_{pump} + g_{leak}$, donde $g_{pump} = -\alpha[Ca^{2+}]^2/([Ca^{2+}]^2 + \beta^2)$ y $g_{leak} = \gamma([Ca^{2+}]_{ER} - [Ca^{2+}])$ [36]. En otros casos consideraremos directamente $g = 0$. Finalmente, $f(\mathbf{x}, t)$ representa el flujo de calcio a través de canales de calcio operados por IP_3. Como mencionamos anteriormente, la concentración de calcio en el retículo endoplasmático, $[Ca2+]_{ER}$, es tan elevada con respecto a la del citosol, que usualmente se puede asumir que permanece constante.

La dinámica que surge del sistema de ecuaciones (6.1-6.3) puede ser inmediatamente simplificada considerando que la difusividad del buffer y el complejo es la misma, y suponiendo además que inicialmente la distribución de la cantidad total de buffer $[B] + [C] = [B]_T$ es uniforme en el espacio. Por simplicidad en los cálculos supondremos que la concentración basal de calcio intracelular es directamente cero, si bien se podría considerar su verdadero valor y hacer todas las evaluaciones considerando como concentración de calcio a la resta entre el valor verdadero y el basal. Con el objeto de hacer la reducción, es necesario comparar el tamaño relativo de todos los términos que aparecen en la ecuación (6.1). La aproximación de buffers rápidos de [168], o la reducción sistemática de [150] asume que $k[Ca^{2+}][B]$ y $k'[C]$ son mucho mayores que $f(\mathbf{x}, t)$, $g([Ca^{2+}])$ y $D_{Ca}\nabla^2[Ca^{2+}]$. Como indicamos arriba, el problema que surge en este contexto es que todas estas cantidades varían en el tiempo, y por consiguiente no podemos establecer *a priori* si los tamaños relativos verificarán o no las hipótesis. Para algunos buffers rápidos como la Calbindina-$D28K$ (un buffer endógeno con $k = 20\mu M^{-1}s^{-1}$ y $k' = 8{,}6s^{-1}$) o para el BAPTA (un buffer exógeno con $k = 600\mu M^{-1}s^{-1}$ y $k' = 100s^{-1}$), es razonable suponer que la recaptura del calcio hacia el retículo o las pérdidas a través de la membrana, ocurren siempre en una escala de tiempo más lenta que la de las reacciones con estos buffers [145]. Esto puede verse considerando una concentración de buffer típica, $[B] = 100\mu M$, y las constantes de reacción de [36]: $\gamma = 0{,}02s^{-1}$, $\alpha = 0{,}9\mu M^{-1}s^{-1}$ y $\beta = 0{,}01\mu M^2$, el cociente $\alpha/(2\beta k[B])$ que da el valor máximo para $|g_{pump}|/(k[Ca^{2+}][B]) = 0{,}002$ en el caso que el buffer sea Calbindina-$D28K$ e igual a $7{,}5 \times 10^{-5}$ cuando se trata de BAPTA. Por otro lado, el cociente $\gamma[Ca^{2+}]_{ER}|/(k[Ca^{2+}][B])$, que es una cota máxima para $|g_{leak}|/(k[Ca^{2+}][B])$ es igual a $10^{-5}[Ca^{2+}]_{ER}/[Ca^{2+}]$ para la Calbindina-$D28K$ y $3 \times 10^{-7}[Ca^{2+}]_{ER}/[Ca^{2+}]$ para BAPTA. Pero esto implica entonces que $|g_{pump}| \ll k[Ca^{2+}][B]$ y $|g_{leak}| \ll k[Ca^{2+}][B]$, para cualquier valor razonable del cociente $[Ca^{2+}]_{ER}/[Ca^{2+}]$. Este análisis permite asegurar que efectivamente los procesos de recaptura y de pérdida ocurren en una escala mucho menor que la de la reacción del buffer con el calcio libre. A fin de comparar los términos correspondientes a las reacciones con el buffer, con el término del flujo a través de los canales, y con la velocidad del proceso difusivo, es necesario hacer alguna hipótesis adicional respecto a la forma en la cual el canal libera el calcio proveniente del retículo.

Imaginemos que inicialmente partimos de una situación de equilibrio, con la fuente apagada y con todas las especies distribuidas en el espacio de manera homogénea. Esto implica que la reacción entre los buffers y los iones de calcio está inicialmente equilibrada ($k[Ca^{2+}][B] = k'[C]$), que $g([Ca^{2+}]) = 0$ y que $f(\mathbf{x}, 0) = 0$. Supongamos que en el instante $t = 0^+$ se enciende la fuente ($f(\mathbf{x}, 0^+) \neq 0$ al menos en algún $\mathbf{x}$), y que permanence encendida durante un tiempo fijo τ. Teniendo en cuenta el problema que estamos tratando de describir, es razonable asumir que $f(\mathbf{x}, t) = F(\mathbf{x})H(t)$, donde $H(t)$ vale cero para cualquier instante que se encuentre fuera del intervalo $(0, \tau]$ y uno dentro de él, y $F(\mathbf{x})$, que representa el flujo a través de la fuente como función de la posición, puede suponerse despreciable fuera de una región de tamaño característico ℓ centrada en la fuente. El único término que contribuye inicialmente a la variación de $[Ca^{2+}]$ en la ecuación (6.1) es evidentemente el término de fuente, por lo tanto en este caso sería incorrecto despreciarlo frente al término relacionado con las reacciones con los buffers, tal como fue necesario asumir en [150, 168]. La concentración de calcio comenzará a variar exclusivamente por la presencia de la fuente. Para poder hacer una evaluación cuantitativa, supongamos que, al menos en los primeros instantes luego del encendido de la fuente, la concentración de calcio aumenta linealmente en el tiempo: $[Ca^{2+}](\mathbf{x}, t) \sim F(\mathbf{x})t$. En este caso, el término $k[Ca^{2+}][B]$ en (6.1) será aproximadamente igual a $kF(\mathbf{x})t[B]$. Por otro lado, dada la dependencia espacial de la fuente, la concentración de calcio también heredará esta dependencia, con lo cual $\nabla^2[Ca^{2+}]$ será diferente de cero. Considerando que $|\nabla^2 F| \sim F/\ell^2$, podemos estimar el tamaño del término difusivo, $D_{Ca}|\nabla^2[Ca^{2+}]|$, como $D_{Ca}Ft/\ell^2$. Por lo tanto, sólo si la escala de longitud característica de la fuente es suficientemente grande, podremos asumir que las reacciones con los buffers pasan a ser los términos más importantes inmediatamente luego del encendido de la fuente. Más exactamente, $k[Ca^{2+}][B] \sim kFt[B] \gg D_{Ca}|\nabla^2[Ca^{2+}]| \sim D_{Ca}Ft/\ell^2$, si la escala típica de la fuente, ℓ, satisface la siguiente condición:

$$\ell^2 \gg D_{Ca}/k[B]\,. \tag{6.5}$$

Considerando los valores $[B] \sim 100\mu M$ y $D_{Ca} \sim 220\mu m^2/s$, se obtiene $\ell \gg 0{,}33\mu m$ para Calbindina-$D28K$ y $\ell \gg 0{,}06\mu m$ para BAPTA. Esta condición *no se satisface nunca para un canal aislado*, para el cual la longitud del poro característica es de algunos pocos Amstrongs [73]. Los eventos elementales que dan lugar a las señales globales pueden deberse a la apertura prácticamente sincronizada de un cierto conjunto de canales de calcio cercanos (clusters) [18, 182]. Si omitimos los pequeños retardos entre los disparos de los canales pertenecientes a un mismo cluster, podríamos considerar que ℓ representa el tamaño típico de un cluster, el cual ha sido estimado en $60nm$ [157]. Pero este número es aun demasiado pequeño, y por lo tanto *no es posible asumir que las reacciones con los buffers son rápidas frente a la liberación de calcio de clusters aislados.* El último caso que resta analizar es el de las señales más globales que se observan, por ejemplo, en las ondas de fertilización en ovocitos maduros [51], en las cuales canales localizados dentro de distintos clusters liberan iones de calcio hacia el citosol en forma simultánea [33]. En este caso, podemos asumir que la longitud característica ℓ corresponde al tamaño en el cual está ubicados todos los canales que en un dado instante están abiertos. En el caso de las ondas de fertilización, esta longitud es simplemente el ancho del frente de onda que avanza en el ovocito, el cual ha sido estimado en $47\mu m$ [33] [3]. Por consiguiente,

[3] Esta estimación está en concordancia con la que surge del modelo del FDF, a partir de la velocidad típica, u, a la que avanzan estos frentes y el tiempo que permanece uno de estos canales abiertos, τ, como $u\tau$ ($u = 5\,\mu m/s$ y $\tau = 9\,s$ en el caso de los ovocitos maduros).

para señales globales que involucran la apertura de diversos clusters, tal como ocurre en las ondas de fertilización, *es correcto considerar que los términos referidos a las reacciones con los buffers son grandes en comparación a los provenientes de las fuentes, inmediatamente luego de la apertura de los canales.* Por lo tanto, pueden ser tratados como si actuaran en una escala de tiempo rápida comparada con los procesos difusivos.

En resumen, en base a los datos experimentales concluimos que luego de la apertura de un canal aislado, o de un cluster de canales, la difusión actúa en una escala temporal más rápida que las reacciones con los buffers, y por consiguiente, la aproximación de buffers rápidos [168] o la reducción sistemática que se deduce de [150] no puede ser aplicada en este caso. Estas situaciones ocurren típicamente en casos de propagación saltatoria, tal como la que se observa en ovocitos inmaduros de Xenopus. En el caso de la los ovocitos maduros, la propagación es continua, en el sentido de que un frente *suave* avanza rígidamente (sin deformarse) provocando la apertura concertada de numerosos clusters de canales en una zona relativamente ancha del frente. En este caso, el gradiente máximo de la concentración de calcio (que se alcanza en algún punto del frente), es lo suficientemente pequeño como para garantizar que la difusión pueda ser tratada dentro de los procesos lentos, comparada con las reacciones con los buffers, tal como se requiere para hacer la reducción del capítulo 2.

6.4. Algunos experimentos numéricos

A fin de ilustrar estas consideraciones, estudiamos numéricamente la propagación de una onda de calcio en un régimen saltatorio, considerando la presencia de buffers y canales de calcio, basándonos en el modelo del FDF [33]. El FDF es una caricatura relativamente simple y fructífera del mecanismo completo del $CICR$, capaz de explicar, entre otras cosas, bajo qué condiciones es de esperar propagación continua o saltatoria. El FDF describe frentes de ondas planos, por lo que la dinámica se reduce a una dimension espacial. En este contexto, el término de fuente f viene dado por:

$$f(x,t) = \frac{\sigma}{d^2\tau} \sum_{i=-\infty}^{+\infty} \delta(x - x_i)\Theta(t - t_i)\Theta(t_i + \tau - t) \ , \tag{6.6}$$

donde δ es la delta de Dirac, x_i es la posición del i-ésimo canal, con $x_{i+1} - x_i = d \ \forall i$, $\Theta(x)$ es la función escalón, $\Theta(\xi) = 0$ si $\xi < 0$, y $\Theta(\xi) = 1$ si $\xi \geq 0$. El tiempo t_i representa el primer instante para el cual la concentración en el punto x_i supera al umbral. En otras palabras, la ecuación (6.6) representa la suma de las contribuciones de los canales individuales (o de clusters de canales) separados regularmente por una distancia d (la cual representa en este modelo la distancia promedio entre canales), tales que el aporte de calcio proveniente de un canal (o cluster) aparece (*i.e.* el canal se abre), sólo cuando la concentración en la posición en que se encuentra supera un cierto valor umbral. Cuando esto ocurre, el canal permanece abierto durante un cierto intervalo de tiempo τ, liberando en el citosol un cierto número fijo de iones σ.

Comparamos la evolución predicha a partir del sistema reducido, con la correspondiente al problema completo (sin aproximaciones). En la figura 6.2 se muestra el estado del sistema a distintos instantes de tiempo, para los siguientes parámetros (tomados de la literatura sobre ovocitos inmaduros de Xenopus, y considerando que el

buffer es Calbindina): $D_{Ca} = 200\ \mu m^2/s$, $D_B = 25\ \mu m^2/s$, $\sigma = 3{,}5 \times 10^{-12}\ \mu moles$, $k = 20\ \mu M^{-1}s^{-1}$, $k' = 8{,}6\ s^{-1}$, $[B]_T = 100\ \mu M$, $[Ca]_{umbral} = 0{,}25\ \mu M$, $[Ca]_{basal} = 0{,}05\ \mu M$, $\tau = 0{,}05\ s$, $d = 3{,}85\ \mu m$, siendo esta última la distancia entre dos canales sucesivos. La condición inicial tomada fue un escalón en la concentración, ubicado en la posición $x_0 = 34\mu m$. Todos los canales situados a la izquierda del escalón se mantuvieron inactivos durante toda la evolución, mientras que los situados a la derecha, fueron encendidos durante un tiempo τ cuando la concentración en la posición del canal supera a $[Ca]_{umbral}$ (ver 1.3.3). En las cuatro figuras, la línea continua representa la solución del sistema FDF completo, es decir, la solución de las ecuaciones (6.1-6.3) con $g([Ca^{2+}]) = 0$ y $f(x,t)$ dada por (6.6). La línea segmentada corresponde a la solución de la ecuación reducida para la concentración del calcio, utilizando la hipótesis de buffers rápidos [150, 168].

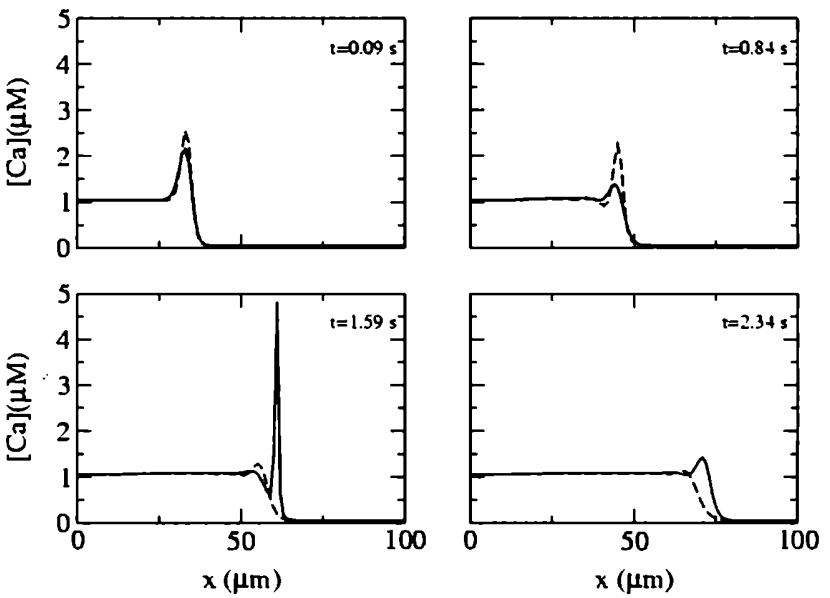

Figura 6.2: Perfil de concentración de calcio a distintos instantes de la evolución de la onda intracelular, segun el modelo completo (FDF con buffers endógenos incluidos explícitamente, línea de trazo continuo), y el modelo reducido que surge de suponer que las reacciones con los buffers son rápidas frente al resto de los procesos durante toda la evolución (línea segmentada). Nótese que el frente en el caso del FDF se adelanta progresivamente con respecto al de la solución basada en la aproximación de buffers rápidos. Los parámetros figuran en el texto.

Como se puede apreciar en la figura, ambas evoluciones son cualitativamente similares, si bien, con el paso del tiempo se evidencia que la onda que aparece en el caso aproximado viaja a una velocidad levemente menor que la verdadera, tal como se muestra en la figura 6.3. Esta diferencia entre ambos comportamientos es la esperada, ya que las soluciones de las ecuaciones reducidas subestiman la intensidad de la difusión en las zonas de altos gradientes (donde la aproximación falla). Esto provoca asimismo que los gradientes sean artificialmente grandes en la cercanía de los canales, empeorando aun más las condiciones de validez de la aproximación. En la figura 6.3 se muestra la velocidad calculada como $d/\delta t_i$, siendo δt_i la diferencia entre el tiempo de activación del canal ubicado en la posición i, (t_i) y el ubicado en la posición $i-1$, para los canales situados a la derecha del escalón. Los círculos corresponden a la solución del modelo completo, y los cuadrados al del modelo

reducido.

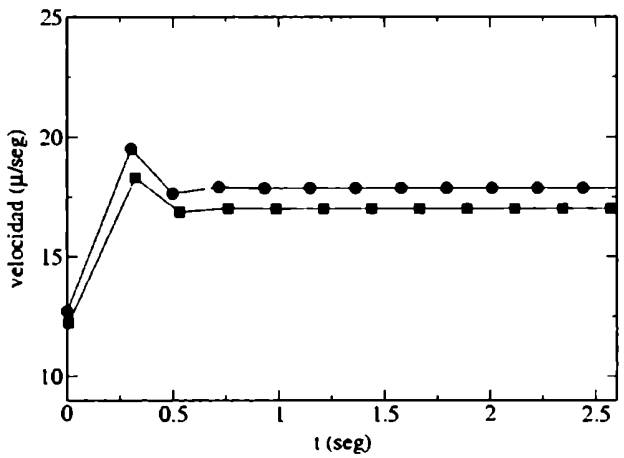

Figura 6.3: Velocidad de los frentes en función del tiempo para el caso exacto (círculos) y aproximado (cuadrados). La velocidad se estima como el cociente entre la distancia entre canales y la diferencia entre los tiempos de activación de canales sucesivos. La velocidad obtenida en ambos casos es compatible con la observada en los experimentos con ovocitos inmaduros, en los que se observa propagación saltatoria [17, 33].

Con el fin de ilustrar hasta qué punto puede fallar la aproximación si los buffers no son lo suficientemente rápidos, en la figura 6.4 se muestra la evolución del sistema con los mismos parámetros excepto las constantes de reacción, que fueron reducidas en un factor 10. La evolución del sistema reducido es exactamente la misma que en el caso anterior, ya que ésta depende sólo de la constante de disociación. Sin embargo, al hacer más lentas las reacciones, el sistema real se comporta de un modo cualitativamente distinto, propagándose una onda en forma violenta a través de toda la célula a una velocidad de 318 $\mu m/s$. Las evoluciones predichas no sólo difieren en la velocidad sino también en la cantidad de sitios que están liberando calcio simultáneamente. Por lo tanto, el ancho de los frentes de la onda y el flujo total de calcio hacia el citosol en un dado instante son también distintos en ambas simulaciones. Divergencias importantes entre el comportamiento del modelo exacto y el reducido, pueden obtenerse sin necesidad de modificar las constantes que definen al buffer, sino variando levemente las propiedades de los canales (por ejemplo, aumentando d y σ, y reduciendo τ) [155].

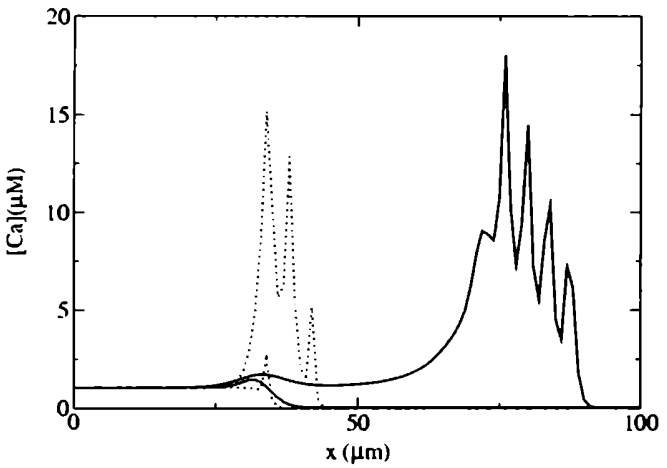

Figura 6.4: Idem figura 6.2 excepto en los valores de las constantes de reacción: $k = 2\mu M^{-1}s^{-1}$, $k' = 0{,}86s^{-1}$. La línea punteada corresponde a las soluciones a tiempo $t = 0{,}025\ s$ y la continua a $t = 0{,}175\ s$. A cada tiempo se muestran los perfiles de concentraciones encontrados a partir del modelo exacto (el que alcanza concentraciones mayores) y aproximado.

7. Conclusiones y perspectivas

En esta tesis nos hemos focalizado en problemas que surgen del estudio de sistemas biológicos. Tres aspectos básicos de esta clase de sistemas fueron de interés para nuestro trabajo. El primero se refiere al hecho conocido de que numerosos problemas en biología pueden ser abordados desde el marco que proveen las ecuaciones de reacción-difusión, interpretando adecuadamente la identidad de cada especie. El segundo aspecto, relacionado con el alto grado de complejidad de los sistemas biológicos, es la coexistencia de procesos actuando simultáneamente en distintas escalas de tiempo. La tercer propiedad es la generación espontánea de orden. Uno de los resultados más importantes de esta tesis ha sido mostrar la relevancia de los dos primeros aspectos en la aparición del tercero.

En la primer etapa de este trabajo, desarrollamos dos métodos para simplificar sistemas genéricos de reacción-difusión, en los cuales todos los procesos se pueden agrupar dentro de dos grandes categorías, rápidos y lentos. Si bien el espíritu de los métodos es similar al de otros desarrollados para ecuaciones diferenciales ordinarias, los de nuestro trabajo *constituyen el primer caso sistemático de reducción de un conjunto genérico de ecuaciones de reacción-difusión.* Dentro de los procesos lentos incluimos el transporte difusivo (junto con un subconjunto de reacciones químicas y los términos de fuente), y entre los rápidos al resto de las reacciones químicas [1]. Al contar con una herramienta sistemática para incorporar la dinámica de los procesos rápidos en los lentos, se facilita la obtención de una descripción desvinculada de una de las escalas (la rápida). Esto resulta ventajoso desde varios puntos de vista, entre ellos:

1. Reducción en el número de ecuaciones diferenciales.
2. Simplificación en el análisis de la dinámica homogénea.
3. Incremento en el paso temporal en la integración numérica.
4. Extracción directa de información relevante inaccesible en el sistema completo.

En efecto, las ventajas (1) y (2) fueron claves para hallar el espacio de Turing tanto en el caso del modelo de Schnackenberg modificado, como para el modelo de la glucólisis, y la (4), sirvió para predecir cualitativamente las diferencias esperadas en la forma de los frentes de las ondas de calcio, en presencia o en ausencia de buffers, o para interpretar las mediciones de la dependencia de la difusividad efectiva del calcio como función de la concentración del mismo. Es importante notar en este sentido, que contar con una estimación apropiada de la longitud característica asociada con la difusividad efectiva en presencia de cierto tipo de buffer, es un parámetro de interés por su relevancia en los experimentos (donde se suelen introducir buffers exógenos) y en las teorías sobre el rol del calcio en los procesos celulares.

Asimismo, en esta primera etapa proporcionamos una explicación intuitiva del significado de la reducción en término de la dinámica microscópica, que es en cierta medida, más general que la aplicación concreta analizada en el capítulo 3, en

[1] Vale aclarar que el caso opuesto, en el cual la difusión es parte de los procesos rápidos, da lugar a un caso mucho más simple, ya que en esta situación es posible suprimir toda dependencia espacial en las concentraciones, quedando un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias.

la cual la identidad de los procesos rápidos (reacciones simples con sustancias tipo buffer) y lentos (difusión) coincidía con la analizada en el capítulo 2. El proceso que se lleva a cabo en el análisis macroscópico de escalas múltiples, puede interpretarse intuitivamente dividiendo el espacio en celdas de tamaño reducido, y el tiempo en intervalos suficientemente pequeños, y encontrando una descripción para los procesos microscópicos que ocurren dentro de cada una de las celdas, durante cada intervalo de tiempo. En una celda dada, el número de moléculas puede variar debido al transporte difusivo entre las celdas adyacentes, a la aparición o remoción de moléculas por la presencia de fuentes o sumideros, o por las reacciones químicas que ocurran entre las moléculas que comparten el mismo nodo durante un cierto intervalo de tiempo. La separación entre procesos rápidos y lentos, permite imaginarnos un esquema en el cual los eventos involucrados en los procesos rápidos ocurren con una frecuencia mucho mayor que los lentos. Por lo tanto, es lícito asumir que (en promedio), durante el intervalo de tiempo entre la ocurrencia de dos procesos catalogados como lentos, la dinámica estará gobernada exclusivamente por los procesos rápidos. Si se supone que los procesos rápidos son capaces de equilibrarse en tiempos menores al característico entre dos eventos lentos, entonces, en la evolución en la escala lenta aparecerán sólo las soluciones asintóticas de los procesos rápidos. Las variaciones introducidas durante los eventos lentos en estas concentraciones asintóticas, son velozmente corregidas por los procesos rápidos, llegando a nuevos valores asintóticos antes de la aparición de un nuevo evento lento. Por lo tanto, los operadores relacionados con los procesos lentos siempre actúan sobre soluciones asintóticas (de equilibrio de los procesos rápidos). Para el caso particular en el que los procesos rápidos son las reacciones químicas y los lentos la difusión de partículas, pudimos probar que *los factores que introduce el reescaleo en las ecuaciones que rigen la dinámica lenta representan exactamente a estas correcciones provenientes de las reacciones rápidas.*

Más allá de la interpretación física de la reducción, el modelo microscópico nos muestra cómo podrían tratarse, con las mismas ideas, problemas que involucren a más de dos escalas temporales. La separación en dos grupos, evidentemente es una deficiencia en los casos donde sea relevante considerar la existencia de más de dos escalas temporales. Sin embargo, creemos que con dos escalas se pueden englobar muchos fenómenos, y que en cualquier caso, la supresión de esta limitación podrá convertirse en una de las posibles extensiones a esta tesis.

La segunda etapa del trabajo estuvo orientada a establecer la conexión existente entre cierto tipo de procesos de auto-organización (la formación de patrones de Turing o la propagación de ondas de calcio), y la presencia de escalas múltiples en sistemas de reacción-difusión. En el caso de los patrones de Turing, pudimos analizar en forma general (*i.e.* para cualquier sistema del tipo activador-inhibidor), cuál es el rol que juegan las reacciones rápidas entre el activador y/o el inhibidor con otras sustancias (para unificar los distintos capítulos decidimos llamarlas *buffers*) en la aparición de estos patrones. En particular, mostramos cuál es el efecto del reescaleo de las ecuaciones por la interacción selectiva con los buffers. Encontramos *bajo qué condiciones se podían estabilizar los patrones de Turing en regiones del espacio de parámetros donde el cociente entre las difusividades libres del activador y el inhibidor sea cercano o incluso igual a uno.* El desarrollo analítico y cuantitativo expuesto aquí es, a nuestro entender, el primero en este sentido, y se contrapone a otros argumentos cualitativos previos, los cuales en algunos casos son insuficientes, y en otros resultan directamente falsos. Desde el punto de vista del experimentador que diseña los instrumentos con los que se pretenden visualizar esta clase de estructuras,

las relaciones matemáticas que obtuvimos, a partir de las cuales puede establecerse en forma directa si un dado juego de los parámetros pertenece o no al espacio de Turing, deberían ser consideradas como *herramientas para optar entre distintos tipos de buffers con movilidades, constantes de disociación y/o concentraciones diferentes.* Si se demostrara que, tal como sugieren algunos experimentos, los patrones de Turing fuesen verdaderamente relevantes en el funcionamiento de células o grupos de ellas durante ciertos períodos del desarrollo, las *relaciones matemáticas que hallamos podrían servir para entender cómo las células encienden o apagan estas estructuras*: pequeñas diferencias en la concentración de ciertos reactivos o cambios en la tasa de producción (o degradación) de ciertas proteínas, podrían generar la aparición o desaparición espontánea de los patrones.

La aplicación más sencilla e interesante que se podría hacer en el futuro, es retomar el análisis de la reacción CIMA, haciendo hincapié en la interacción selectiva de los morfógenos con el gel y las moléculas utilizadas para visualizar, y verificar cuantitativamente la validez de las conclusiones cualitativas (y seguramente correctas) a las que arribaron Lengyel y Epstein [96]. La ventaja de este caso de patrón de Turing "de laboratorio", es que los morfógenos y el buffer están perfectamente identificados, y que existen estimaciones de las constantes de disociación y de otros parámetros relevantes. Partiendo del supuesto de que lo que se observa en los experimentos es efectivamente un patrón de Turing, y de que la reacción CIMA está bien descripta por el sistema de ecuaciones propuesto por Lengyel y Epstein, un trabajo de este tipo podrá validar las conclusiones obtenidas en esta tesis respecto a patrones de Turing en un problema concreto y experimentalmente accesible.

Uno de los problemas que existen con respecto a la plausibilidad de la hipótesis de que diversos procesos morfogenéticos tengan su explicación en patrones de Turing, es que no está clara la identidad de los morfógenos asociados al patrón, y mucho menos aún se conocen las ecuaciones de reacción-difusión que rigen (hipotéticamente) la dinámica, ya que no se conoce la verdadera cinética de las reacciones. En todos los estudios se han utilizado modelos (esquemas de reacción) cuya justificación es generalmente pobre, o directamente está ausente. El hecho de que los patrones observados sean semejantes (visualmente) a los observados en algunos sistemas vivos, o que su evolución ante cambios en las condiciones de contorno sean compatibles, no puede considerarse como una prueba, ya que las ecuaciones de reacción-difusión son sumamente versátiles para generar diversos tipos de formas, tal como ha sido mostrado recientemente en [82]. Peor aún son los casos en los cuales se ofrece cierta justificación respecto del modelo, pero se utilizan valores de los parámetros (especialmente los cocientes de las difusividades libres de los morfógenos propuestos) que son contradictorios con el propio modelo. En este sentido, uno de los resultados más sugestivos de esta tesis es, probablemente, el de la existencia de patrones de Turing en el modelo de Selkov de la glucólisis, ya que *constituye el primer ejemplo de un patrón de Turing salido de un conjunto de reacciones propias de la bioquímica celular, sin necesidad de forzar los parámetros.* Por otro lado, el haber podido demostrar que la dinámica espacio-temporal que se produce en la glucólisis es capaz de generar espontáneamente una diferenciación en las condiciones químicas (básicamente, la cantidad de ATP y ADP) de una célula o un conjunto reducido de células, da un mayor sustento teórico a la conexión propuesta desde el trabajo de Turing [161] entre las propiedades auto-organizativas de la bioquímica celular (en este caso, de la glucólisis) y los procesos morfogenéticos. Si bien la traducción entre las diferencias en las concentraciones de ATP a diferencias morfológicas y/o funcionales de las células

no es evidente, siendo el ATP un combustible ubicuo para diversos procesos, proponerlo como un disparador es, cuanto menos, una hipótesis de trabajo razonable. La predicción de que el mecanismo de diferenciación debería comenzar a funcionar a partir de un cierto tamaño (asociado a un grado de desarrollo crítico), es compatible con las observaciones en este sentido.

Una de las perspectivas más interesantes de este trabajo es ver si efectivamente estos patrones predichos en forma teórica, pueden obtenerse en experimentos de laboratorio (con extractos celulares), o más aún, tratar de ver si operan a nivel celular o supracelular. Una de las líneas teóricas que se debería investigar primero, es repetir un análisis similar al realizado con el modelo de Selkov, pero con el modelo más realista de Goldbeter y Lefever, y ver si las conclusiones que obtuvimos para el caso más sencillo se siguen manteniendo.

Finalmente estudiamos ciertos aspectos de la difusión del calcio intracelular, en presencia buffers y de fuentes de calcio. Las consideraciones sobre los pesos relativos de los distintos términos en las ecuaciones de reacción-difusión correspondientes, pueden servir para evaluar el efecto de los buffers exógenos que se introducen en los experimentos con propósitos de visualización (como por ejemplo, los indicadores fluorescentes sensibles al calcio FURA-2 o AEQUORIN) en el fenómeno mismo que se desea medir. Por otro lado, el resultado de la evaluación de las magnitudes características de cada uno de los términos que entran en la descripción de la propagación, son una advertencia en cuanto al uso de los métodos de reducción [143, 150, 168], ya que, tal como mostramos para diferentes tipos de buffers *pueden resultar inadecuados en presencia de canales de calcio actuando individualmente o en clusters aislados, dado que la importancia relativa de la difusión y de las fuentes, frente a los de las reacciones con los buffers, puede cambiar notablemente durante la evolución.*

A. Descripción matemática: las ODEs y las PDEs

Uno de los descubrimientos propios que Isaac Newton consideró más fabulosos y que decidió esconder bajo la forma de un anagrama en la primer edición de sus Principia (1687), fue el siguiente [94]: *Data aequatione quotcunque fluentes quantitae involvente fluxiones invenire et vice versa* (" dada una ecuación con cantidades fluentes, determinar las fluxiones y viceversa"). En un lenguaje actual, lo que Newton descubrió y atesoró como uno de sus hallazgos más grandiosos, es que las ecuaciones diferenciales (o más exactamente los sistemas dinámicos) eran útiles para describir la evolución temporal de los sistemas naturales. Todas las teorías físicas tuvieron desde entonces la forma matemática de ecuaciones diferenciales. La descripción matemática de los fenómenos biológicos, fue más tardía. Probablemente, la primera vez que un modelo matemático fue utilizado para hacer predicciones en el ámbito biológico fue en un estudio sobre el control de una epidemia a través de una vacuna (Bernoulli, 1760). Sin embargo, fue el modelo de reacción-difusión con el que se estudió la dispersión de alelos ventajosos en una población [46, 47], el que disparó, a comienzos del siglo pasado, innumerables modelos matemáticos de fenómenos biológicos, fundamentalmente en ecología [102], epidemiología [3], bioquímica [59], fisiología [83], genética de poblaciones [120], y en el manejo de recursos naturales [7].

Por *sistema dinámico* entendemos no sólo un conjunto de ecuaciones diferenciales sino también un conjunto de ecuaciones en diferencias (o mapas). Los primeros surgen cada vez que la evolución del sistema es en tiempo continuo, y los segundos, cuando el tiempo avanza a pasos discretos [1]. En ambos casos la evolución es determinista, y dada una condición inicial, es única siempre que se cumplan algunos requisitos básicos [2].

Todo sistema natural ocupa una cierta región del espacio, en la cual, a medida que transcurre el tiempo sus constituyentes se mueven, transforman sus estados internos, interactúan, o son influenciados por agentes externos. Cuando la distribución espacial de los componentes no influye en la evolución del sistema (por ejemplo, cuando el sistema es espacialmente homogéneo), es posible caracterizar al sistema a través de propiedades globales tales como promedios sobre la región del espacio en cuestión. En esta situación, los aspectos espaciales y temporales se desacoplan, y es válido analizar la evolución temporal por separado. La descripción matemática se lleva a cabo proponiendo un conjunto de *ecuaciones diferenciales ordinarias* (ODE [3] según la sigla en inglés), en las cuales las variables dependientes (por ejemplo, las concentraciones de un conjunto de reactivos) son funciones únicamente del tiempo. Sin embargo, los sistemas homogéneos son más bien excepcionales en la naturaleza. La descripción matemática de los sistemas *espacialmente extendidos*, en los cuales la evolución de cada uno de los elementos constituyentes está gobernada

[1] La evolución en tiempo discreto no sólo es útil como herramienta para analizar ecuaciones diferenciales (por ejemplo, a través de los llamados *mapas de Poincaré* [175]), sino que resulta la descripción más adecuada para analizar varios sistemas naturales, como por ejemplo sistemas mecánicos gobernados por impulsos instantáneos, poblaciones animales cuyas generaciones no se superponen, y numerosos problemas en economía y finanzas. Por otro lado, son muy fáciles de implementar en una computadora.

[2] Los teoremas de existencia y unicidad pueden encontrarse en cualquier libro de ecuaciones diferenciales, por ejemplo [75].

[3] Por Ordinary Differential Equations.

por el estado propio y el de los elementos vecinos, se lleva a cabo proponiendo un conjunto de *ecuaciones diferenciales en derivadas parciales* (PDE [4]). En este caso, no sólo el tiempo es la variable independiente, sino también las coordenadas del espacio. Usualmente, los sistemas extendidos pueden pensarse como un conglomerado de sistemas homogéneos interactuantes, dividiendo el volumen que ocupa el sistema en celdas suficientemente reducidas, tales que dentro de las mismas, la hipótesis de homogeneidad sea válida. En forma general, dos clases de mecanismos afectan la evolución de cada celda. Por un lado, procesos locales hacen evolucionar el estado de cada celda independientemente de lo que ocurra en otras. Por otro lado, su comportamiento puede estar influenciado por efecto de la comunicación entre las distintas celdas (usualmente a través del transporte de materia o de algún tipo de información). Es claro entonces que toda la complejidad y variedad de los comportamientos de los sistemas espacialmente homogéneos, se encuentre también -como el caso más simple donde cada celda es un sistema cerrado- en los sistemas extensos. Por ejemplo, para ciertos valores de los parámetros, la solución de una PDE puede ser una oscilación homogéneas, es decir, el campo que se rige con la PDE en todos los puntos del espacio oscila en fase. En este caso, es evidente que podríamos sustituir la PDE por una única ODE sin perder información. Sin embargo, variando los parámetros de la PDE, podemos obtener una amplia gama de las soluciones, tales como la propagación de ondas espirales, caos espacio-temporal, formación de patrones tipo target o estructuras estacionarias, entre otras soluciones que mencionamos en la Introducción como comportamientos observados en seres vivos.

A.0.1. Ecuaciones diferenciales ordinarias

Un sistema de ODE general tiene la forma:

$$\frac{d\mathbf{u}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{u}; \{\mu\}) \tag{A.1}$$

Dependiendo del contexto, las variables $\mathbf{u} = (u_1, \cdots, u_n)$ que entran de este modo en la descripción pueden ser tanto las posiciones y velocidades de los planetas del sistema solar (problema que interesaba a Newton) como las poblaciones de un conjunto de especies en un ecosistema, por mencionar sólo dos posibilidades. La evolución dependerá también de los valores de un conjunto de parámetros $\{\mu\}$ que se suponen constantes durante la misma (por ejemplo, las masas de los cuerpos celestes, o la temperatura de una reacción química). Típicamente en nuestro trabajo, las variables reflejan las concentraciones de ciertas moléculas involucradas en los procesos celulares. Por este motivo hablaremos exclusivamente de *especies químicas* aunque en otros contextos el significado de estas variables pueda ser de una naturaleza completamente diferente. El sistema de ODEs describe de qué modo es de esperar que la concentración de una dada especie química varíe, de acuerdo a las interrelaciones que tenga con el conjunto de las especies presentes, para un dado conjunto de parámetros y condiciones iniciales. La incidencia de una especie en la evolución de otra o de ella misma, se expresa a través de las funciones $\mathbf{f} = (f_1, \cdots, f_n)$.

Existe una primera diferencia crucial en la clase de sistemas dinámicos. Cuando las funciones $\mathbf{f}$ son combinaciones lineales de las variables $u_1, \cdots, u_n$, el sistema dinámico se llama *lineal*. Si esto no ocurre (o sea, en el miembro derecho

[4] Por Partial Differential Equations.

de (A.1) aparecen productos, potencias, funciones trigonométricas, etc..., de u_j ($j = 1, \cdots, n$)), entonces el sistema es *no-lineal.* Los sistemas dinámicos lineales (tanto los de ODEs como los de PDEs) son relativamente fáciles de resolver ya que para ellos vale el *principio de superposición.* Esencialmente, este principio nos dice que podemos descomponer al sistema en subsistemas más simples, y resolver las ecuaciones separadamente para cada subsistema. La solución del problema completo será la suma (apropiadamente pesada) de las soluciones que hallamos para los subsistemas. Esta idea subyace el análisis de Fourier, de modos normales y de Laplace. Pero cuando las partes de un sistema interactúan, cooperando o compitendo, el sistema deja de ser lineal, y con ello, el principio de superposición falla completamente. Esto es lo que ocurre en la inmensa mayoría de los sistemas naturales.

Una solución de un sistema de ODEs como el (A.1), puede pensarse como una trayectoria (parametrizada con el tiempo) de un punto en un espacio de n dimensiones cuyas coordenadas son $u_1, \cdots, u_n$ (conocido como el *espacio de fases*). Dado que, en general, no se puede resolver analíticamente esta clase de problemas, se recurre a métodos que caracterizan cómo es de esperar que resulte en *términos geométricos* la trayectoria para un dado sistema dinámico, y aun más, qué clase de deformaciones experimentará la trayectoria al variar el conjunto de parámetros $\{\mu\}$. Este tipo de análisis geométrico comienza con la identificación de puntos fijos [5], órbitas periódicas [6] u otro tipo de conjuntos invariantes [7], a lo que sigue un estudio de la estabilidad de los mismos frente a perturbaciones. Posteriormente se analiza lo que sucede al variar los parámetros. En muchas situaciones pueden ocurrir cambios cualitativos en la cantidad y/o la estabilidad de las soluciones. Cuando esto ocurre se dice que ha ocurrido una *bifurcación.* Cerca de las bifurcaciones, existen métodos sistemáticos para proyectar la dinámica del sistema en conjuntos (variedades) de menores dimensiones (método de reducción a la variedad central), y allí incluso es posible llevar al sistema a una forma más simple cuya dinámica cualitativa coincide con la del sistema original (teoría de las formas normales) [65, 147, 175]. La teoría de formas normales, por otro lado, permite hacer una clasificación de sistemas cuyas dinámicas son equivalentes.

En la mayoría de las aplicaciones, la identificación de las variables dinámicas proviene del conocimiento de los mecanismos del proceso químico en cuestión (por ejemplo, cuáles son las reacciones químicas que están involucradas en la producción de *ATP* en la glucólisis). Otras veces, sin embargo, es el conocimiento del comportamiento de los sistemas dinámicos (las ODE) el que sugiere qué clase de reacción es compatible con una dada observación, y a partir de allí, qué moléculas podrían estar involucradas. Por ejemplo, si se observa que una reacción produce oscilaciones en las concentraciones de un conjunto de moléculas y se cree que el paso clave es la reacción entre las moléculas A, B y C, entonces el sistema dinámico deberá poseer ciertas características, y ello puede dar información importante sobre el mecanismo de la reacción, como ser, la reacción no puede ser simplemente $A + B \rightleftharpoons C$. O bien tiene otra forma, o quizás otras moléculas que no consideramos en principio forman parte importante del esquema químico.

[5] También llamados soluciones de equilibrio: $\mathbf{u}^*$ es un punto fijo de la ecuación (A.1) si satisface $\mathbf{f}(\mathbf{u}^*; \{\mu\}) = 0$.

[6] Soluciones que satisfacen: $\mathbf{u}(t + \tau) = \mathbf{u}(t + \tau)$ para algún $\tau > 0$.

[7] Conjuntos cerrados con la siguiente propiedad: cualquier trayectoria $\mathbf{u}(t)$ que comience dentro del conjunto invariante, permanecerá para siempre en él.

A.0.2. Ecuaciones diferenciales en derivadas parciales

En los sistemas *espacialmente extendidos*, el estado actual en un punto dado del espacio, es una función del estado del sistema en todos los puntos del espacio en un instante de tiempo anterior. Desde el punto de vista teórico, el estudio de tales sistemas se lleva a cabo proponiendo un conjunto de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales que reflejen en alguna medida, la dinámica microscópica del sistema. Para admitir este tipo de descripción continua, es necesario que las interacciones entre los elementos sean suficientemente débiles, y que las variaciones espaciales de los estados de los elementos constituyentes sean suficientemente suaves. Esta hipótesis hace que en las PDEs aparezcan sólo funciones que dependen del valor local de los campos, y de las primeras derivadas espaciales, cuya forma genérica es la siguiente:

$$\frac{\partial U_i}{\partial t} = F_i + \sum_j \left(A_{ij} \nabla U_j + B_{ij} (\nabla U_j)^2 + D_{ij} \nabla^2 U_j \right) , \tag{A.2}$$

donde $U_1(\mathbf{x}, t), \cdots, U_n(\mathbf{x}, t)$ son las funciones que describen el estado del sistema que estamos considerando, las cuales por hipótesis, dependen suavemente del espacio $\mathbf{x}$ y del tiempo t, y las matrices A_{ij}, B_{ij} y D_{ij} pueden, en principio, ser funciones explícitas de $\mathbf{x}$, t y $\{U_k\}$ con $k = 1, \cdots, n$. Las funciones $F_i = F_i(\{U_k\}, \mathbf{x}, t)$ tienen el mismo significado que las f_i de las ecuaciones (A.1). La evolución del campo de velocidades de un fluido dada por las ecuaciones de Navier-Stokes, o los sistemas de reacción-difusión, son casos particulares de esta ecuación general.

La complejidad de este tipo de ecuaciones es de tal magnitud que en la inmensa mayoría de los casos no existen soluciones analíticas a esta clase de problemas. Típicamente se recurre a métodos numéricos, junto con un análisis de tipo perturbativo: partiendo de una solución uniforme de las ecuaciones, se encuentra una región de parámetros en los cuales esta solución pierde estabilidad dando lugar a otra solución dependiente del espacio [8].

Al igual que en el caso de las estructuras temporales, detrás de todo problema de formación de estructuras espacio-temporales suele haber un fenómeno cooperativo subyacente entre las componentes microscópicas del sistema. Una estructura sería entonces la manifestación colectiva de la interacción entre un gran número de partes elementales, cuyo comportamiento individual puede ser relativamente simple, pero que no obstante, es capaz de dar lugar a un comportamiento cualitativamente distinto en una escala global. Aquéllos que hacen hincapié en este aspecto del problema le llaman al tema de formación de patrones *sinergética* [67, 68, 104], y a esta clase de sistemas, *sistemas complejos*.

Una característica sumamente interesante de los sistemas complejos, es que muchas de las propiedades que emergen a nivel macroscópico resultan insensibles a los detalles de los elementos constituyentes. Este hecho sugiere que la dinámica de los sistemas complejos en distintas escalas está básicamente desacoplada, y además provee una primera pista respecto a la universalidad del comportamiento hallado en sistemas aparentemente muy distintos. De manera indirecta, también indica que

[8] En la práctica, a menudo las ecuaciones con las que se trabaja no tienen un sustento teórico sólido como las de Navier-Stokes o las de reacción-difusión. Son menos realistas, y están construidas de modo que las inestabilidades lineales y las soluciones a tiempos largos den lugar a un tipo de estructuras similar al observado en el sistema bajo estudio. Son las llamadas *ecuaciones modelo*.

una descripción desde un punto de vista puramente reduccionista no tiene mayor sentido para entender esta clase de sistemas.

B. Fluctuaciones en el lattice gas

En este apéndice analizaremos con mayor detalle la derivación de algunos de los resultados analíticos del capítulo 3. En primer lugar, queremos demostrar que debido a la separación de las escalas temporales, las leyes de conservación válidas durante la aplicación del operador de reacción hacen que la varianza de todos los números de ocupación sean iguales y que la covarianza entre dos números de ocupación cualesquiera sea igual a la varianza de cualquiera de ellos. En segundo lugar demostraremos que la varianza de los números de ocupación, una vez que el sistema ha llegado al equilibrio en la escala rápida, es despreciable frente al producto de los promedios de los números de ocupación. Como notamos en el capítulo 3, nuestra intención es mostrar la validez de estos resultados sin utilizar la aproximación de caos molecular, ya que por la naturaleza misma del límite en el que la difusión es muy lenta comparada con las reacciones, es de esperar que esta hipótesis no tenga el sustento que tiene en el caso opuesto, que es el que ha sido más analizado en la literatura.

Definamos una nueva variable aleatoria U, como la resta de los números de ocupación luego de la aplicación del operador de transporte:

$$U = \mathcal{N}_A(x, t + \tau/2) - \mathcal{N}_B(x, t + \tau/2)\,. \tag{B.1}$$

Debido a las leyes de conservación (3.15), U resulta invariante ante cada aplicación de $\mathcal{R}^T$. Lo mismo sucede con la variable aleatoria V definida por:

$$V = \mathcal{N}_A(x, t + \tau/2) + \mathcal{N}_C(x, t + \tau/2)\,. \tag{B.2}$$

Para la derivación de las ecuaciones macroscópicas a partir del estudio microscópico es fundamental calcular los siguientes promedios [1]: $E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_B^j]$ y $E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_C^j]$, donde para abreviar la notación usamos que $\mathcal{N}_A^j = \mathcal{N}_A(x, t + jT + \tau/2)$. Utilizando la definición de covarianza [2] junto con la invarianza mencionada de U y V, podemos escribir:

$$E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_B^j] = E[\mathcal{N}_A^j(\mathcal{N}_A^j - U)] = E[\mathcal{N}_A^j]E[\mathcal{N}_A^j - U] + Cov(\mathcal{N}_A^j, \mathcal{N}_B^j) \tag{B.3}$$

lo cual implica que

$$Cov(\mathcal{N}_A^j, \mathcal{N}_B^j) = E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_A^j] - E[\mathcal{N}_A^j]^2 \equiv Var(\mathcal{N}_A^j)\,, \tag{B.4}$$

y por la simetría de la covarianza, $Var(\mathcal{N}_A^j) = Var(\mathcal{N}_B^j)$. Análogamente,

$$E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_C^j] = E[\mathcal{N}_A^j(V - \mathcal{N}_A^j)] = E[\mathcal{N}_A^j]E[V - \mathcal{N}_A^j] + Cov(\mathcal{N}_A^j, \mathcal{N}_C^j) \tag{B.5}$$

[1] En este apéndice denotaremos a los promedios sobre el ensamble por $E[.]$.
[2] $Cov(X, Y) = Cov(Y, X) = E[(X - E[X])\,(Y - E[Y])] = E[XY] - E[X]E[Y]$.

de lo que se desprende que:

$$Cov(\mathcal{N}_A^j, \mathcal{N}_C^j) = E[\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_A^j] - E[\mathcal{N}_A^j]^2 \equiv Var(\mathcal{N}_A^j)\,, \tag{B.6}$$

con lo que obtenemos el resultado (3.16). Además, este resultado implica que las varianzas de los números de ocupación de las tres especies es exactamente la misma. Este hecho es razonable, ya que en la escala rápida (es decir, en ausencia de acoplamientos difusivos entre nodos adyacentes), las especies experimentan exactamente las mismas fluctuaciones en sus números de ocupación.

En un nodo cualquiera ubicado en la posición x, el número de ocupación de la especie $\mathcal{A}$ luego de la aplicación de $\mathcal{R}^T$ viene dado por:

$$\mathcal{N}_A^{j+1} = \mathcal{N}_A^j + \eta_j - \mu_j \tag{B.7}$$

donde η_j es el número de moléculas de la especie $\mathcal{C}$ ubicadas en el nodo x que se disociaron en una molécula de $\mathcal{A}$ y una de $\mathcal{B}$ durante el lapso de tiempo T, y μ_j es el número de reacciones entre $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$ que dieron lugar a la formación de una molécula de $\mathcal{C}$ en el mismo intervalo T y en el mismo nodo ubicado en x. Tanto η_j como μ_j son variables aleatorias. Independientemente del esquema particular con el que se modelen las reacciones, se alcanzará un estado de equilibrio en el cual los valores promedios de cada una de las especies no varíen con las sucesivas aplicaciones del operador de reacción rápido. Formalmente, en equilibrio $E[\mathcal{N}_A^{j+1}] = E[\mathcal{N}_A^j]$, con $jT \geq T_{eq}$, lo que a su vez implica que (en equilibrio) $E[\eta_j] = E[\mu_j]$. Para encontrar la varianza en los números de ocupación, es necesario proponer un esquema explícito para las reacciones. En particular, elegimos el mismo que utilizamos en el algoritmo numérico, es decir, suponemos que existe una probabilidad por unidad de tiempo p que una dada molécula de la especie $\mathcal{C}$ se disocie, y que la disociación de una molécula es independiente de lo que le ocurra al resto. O sea, podemos pensar que realizamos $\mathcal{N}_C$ experimentos de Bernoulli, en cada uno de los cuales, con probabilidad pT la molécula se disocia en el intervalo T, y con probabilidad $1 - pT$ la disociación no ocurre. Por consiguiente, lo que tenemos es un modelo de reacción jerárquico [20] en el cual la variable aleatoria $\eta_j \mid \mathcal{N}_C^j$ [3] tiene una distribución binomial:

$$P(\eta_j = n \mid \mathcal{N}_C^j) = \binom{\mathcal{N}_C^j}{n} (p\,T)^n (1 - p\,T)^{\mathcal{N}_C^j - n}\,. \tag{B.8}$$

Análogamente, suponemos que cada uno de los pares formados por una molécula del tipo $\mathcal{A}$ y una de $\mathcal{B}$ tiene una probabilidad por unidad de tiempo q de transformarse en una molécula de complejo $\mathcal{C}$ y por lo tanto:

$$P(\mu_j = u \mid \mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_B^j) = \binom{\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_B^j}{n} (q\,T)^u (1 - q\,T)^{\mathcal{N}_A^j \mathcal{N}_B^j - u}\,. \tag{B.9}$$

La validez del esquema descansa sobre la hipótesis de que son escasos los episodios reactivos durante un intervalo T como para que tenga sentido considerar, en el momento de hacer los cálculos, un valor constante para los números de ocupación.

Utilizando el hecho de que para cualquier par de variables aleatorias X e Y, siempre que los valores esperados existan, valen los siguientes teoremas [20]:

$$\begin{aligned} E[X] &= E[E[X \mid Y]] \\ Var[X] &= E[Var[X \mid Y]] + Var[E[X \mid Y]] \end{aligned} \tag{B.10}$$

[3] La barra "|" se lee, η_j dado $\mathcal{N}_C^j$

hacemos a continuación las siguientes evaluciones:

$$
\begin{aligned}
E[\eta_j] &= E[E[\eta_j \mid \mathcal{N}_C^j]] = E[pT\mathcal{N}_C^j] = pT\,E[\mathcal{N}_C^j] && \text{(B.11)}\\
E[\mu_j] &= E[E[\mu_j \mid \mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j]] = E[qT\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] = qT\,E[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] && \text{(B.12)}\\
Var[\eta_j] &= E[pT(1-pT)\mathcal{N}_C^j] + Var[pT\mathcal{N}_C^j] && \text{(B.13)}\\
&= pT(1-pT)E[\mathcal{N}_C^j] + (pT)^2 Var[\mathcal{N}_C^j] \\
Var[\mu_j] &= E[qT(1-qT)\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] + Var[qT\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] && \text{(B.14)}\\
&= qT(1-qT)E[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] + (qT)^2 Var[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j]
\end{aligned}
$$

Para calcular la varianza de $\mathcal{N}_A$ en equilibrio es necesario calcular la distribución de probabilidad en equilibrio. Esta distribución puede hallarse multiplicando la distribución del gran canónico correspondiente a una mezcla ideal de reactivos por una función que asigne probabilidad cero a los números de ocupación que no son accesibles a través de las reacciones químicas (ver [164]). Incluso para una reacción sencilla como la que estamos interesados en este apéndice, la evaluación de cualquiera de los momentos de la distribución es demasiado compleja y puede hacerse sólo en forma aproximada. Sin embargo, es posible *estimar* la varianza en equilibrio a través del siguiente razonamiento, utilizando la ecuación estocástica (B.7). Dado que alrededor del equilibrio las fluctuaciones de los números de ocupación tienen una distribución gaussiana [4], el valor más probable de $\mathcal{N}_A^{j+1}$ coincide con el valor medio $E[\mathcal{N}_A^{j+1}] = N_A^{eq}$. Por lo tanto:

$$Var[\mathcal{N}_A^j] = E[(\mathcal{N}_A^j - N_A^{eq})^2] \simeq E[(\eta_j - \mu_j)^2]\,, \qquad jT \geq T_{eq}. \tag{B.15}$$

entonces,

$$Var[\mathcal{N}_A^j] \simeq E[\eta_j^2] + E[\mu_j^2] - E[\eta_j]^2 \tag{B.16}$$

donde utilizamos que η_j es independiente de μ_j y que, en equilibrio, $E[\eta_j] = E[\mu_j]$. Para evaluar la ecuación (B.16) utilizamos las ecuaciones (B.11)-(B.14). Resulta conveniente realizar previamente una aproximación. Supongamos, por otro lado, que $E[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j], E[\mathcal{N}_C^j] \gg 1$ y $pT, qT \ll 1$. Formalmente haremos $E[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j], E[\mathcal{N}_C^j] \to \infty$, $pT, qT \to 0$ manteniendo $pT\,E[\mathcal{N}_C^j] = H$ y $qT\,E[\mathcal{N}_A^j\mathcal{N}_B^j] = H'$ con H y H' constantes. En este caso, la distribución binomial tiende (en distribución) a una distribución de Poisson. Este hecho se evidencia tomando los límites en las ecuaciones (B.11)-(B.14) y notando que los valores esperados de η_j y μ_j coinciden con sus respectivas varianzas, tal como se espera que ocurra si poseen distribuciones de Poisson. Como en equilibrio los valores esperados son iguales, las varianzas de η_j y μ_j en equilibrio también coincidirán, con lo cual:

$$E[\eta_j^2] = E[\mu_j^2] = pT\,E[\mathcal{N}_C^j](1 - pT\,E[\mathcal{N}_C^j])\,, \qquad jT \geq T_{eq} \tag{B.17}$$

Por lo tanto, llamando $N_s^{eq} = E[\mathcal{N}_s^j]$, $jT \geq T_{eq}$, la ecuación (B.16) implica que:

$$\frac{Var[\mathcal{N}_A^j]}{N_A^{eq}N_B^{eq}} \simeq 2\,qT\,\frac{pT\,N_C^{eq}}{qT\,N_A^{eq}N_B^{eq}} \simeq 2\,qT\,\frac{H}{H'} \to 0\,, \tag{B.18}$$

[4] Si la entropía S del sistema depende de un sólo parámetro n (en nuestro caso, la ocupación), entonces su máximo se verifica para cierto valor $\hat{n}$ determinado por la condición $\frac{\partial S}{\partial n} = 0$. Desarrollando S alrededor de $\hat{n}$ se obtiene que $P(n) \propto \exp(-\frac{(n-\hat{n})^2}{2k} \mid \frac{\partial^2 S}{\partial n^2} \mid)$, donde k es la constante de Boltzmann [88, 159].

que es el resultado que queríamos establecer.

Haciendo una simulación sencilla de lo que ocurre en un nodo aislado podemos verificar la validez de todo lo anterior. La figura B.1 muestra la evolución del sistema colocando en el nodo 500 partículas de $\mathcal{A}$, 300 de $\mathcal{B}$, y 200 de $\mathcal{C}$, y fijando $p = 0{,}001$ y $q = 0{,}0001$, tanto para el caso límite continuo como para la evolución discreta. Los valores de equilibrio calculados a partir de las ecuaciones (3.22) son $N_A^{eq} = 221{,}59$, $N_B^{eq} = 21{,}59$, $N_C^{eq} = 478{,}41$, mientras que los valores de equilibrio calculados a partir de la simulación son 221,21, 21,66, y 477,34 respectivamente. En cuanto a las varianzas, una vez llegado al equilibrio es equivalente tomar valores esperados sobre un conjunto de réplicas que sobre la evolución temporal de una cualquiera de ellas (hipótesis ergódica). Calculando la varianza de este último modo, encontramos que $Var[\mathcal{N}_A] = Var[\mathcal{N}_B] = Var[\mathcal{N}_C] = 26{,}67$. Efectivamente, la varianza está prácticamente 3 órdenes de magnitud por debajo del producto de los valores de equilibrio de $\mathcal{A}$ y $\mathcal{B}$.

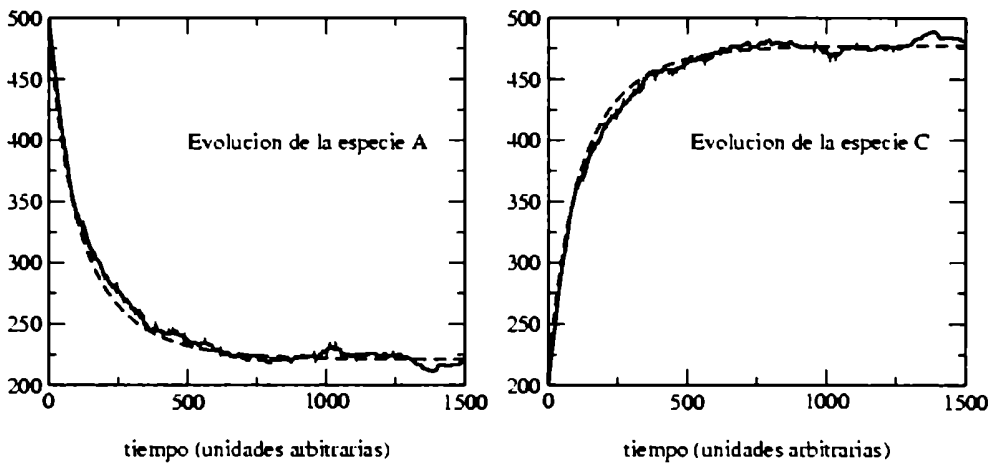

Figura B.1: Comparación entre la evolución del lattice y la continua en un nodo aislado de la red, para las especies $\mathcal{A}$ y $\mathcal{C}$ (la evolución de $\mathcal{B}$ es idéntica a la de $\mathcal{A}$ desplazada hacia abajo en una cantidad igual a la distancia inicial entre los números de ambas). Los valores de los parámetros fueron elegidos de modo tal que, de acuerdo a lo expresado en el apéndice, la descripción discreta se aproxime a la continua.

C. Condiciones necesarias y suficientes para los patrones de Turing

Las hipótesis principales para la reducción obtenida en el capítulo 2, para un sistema de reacción-difusión genérico, era que existía un subgrupo de las reacciones que ocurría en una escala temporal mucho más pequeña (escala rápida) que el resto de las reacciones, la alimentación y/o sustracción de moléculas por medio de fuentes o sumideros, y la difusión molecular. Si las especies que son eliminadas por medio de esta reducción no difunden, y sólo dos ecuaciones rigen la dinámica en la escala lenta, es entonces inmediato probar que el sistema reducido (luego de un proceso de adimensionalización conveniente) puede ser reeescrito en forma general como:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= F(u,v) + D_{11}(u,v)\nabla^2 u + D_{12}(u,v)\nabla^2 v \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= G(u,v) + D_{21}(u,v)\nabla^2 u + D_{22}(u,v)\nabla^2 v \ . \end{aligned} \tag{C.1}$$

Es interesante notar aquí que esta clase de ecuaciones con términos de difusión cruzados aparecen en modelos de múltiples especies en ecología [107]. El significado físico de las funciones $D_{ij}(u,v)$ ha sido analizado detalladamente en el capítulo 3.

El objetivo de este apartado es estudiar las condiciones para la aparición de patrones de Turing en un sistema de la forma (C.1). Dado que las condiciones para la inestabilidad se obtienen a partir de un análisis lineal, sería equivalente en este caso buscar un cambio de variables que diagonalice el sistema, de forma tal de deshacerse de los términos cruzados en los laplacianos. Sin embargo, resulta más transparente y simple hallar las condiciones para el sistema no-diagonal.

En primer lugar analicemos las condiciones bajo las cuales una solución homogénea y estacionaria, que es estable ante perturbaciones espacialmente uniformes, se vuelve inestable ante pequeñas perturbaciones inhomogéneas. El estado homogéneo estacionario (u_s, v_s) es la solución simultánea y no-negativa de:

$$F(u_s, v_s) = 0, \qquad G(u_s, v_s) = 0. \tag{C.2}$$

Como es usual para el caso de las ODEs, realizamos un análisis lineal alrededor del estado estacionario, esto es, definimos un vector $\vec{w}$ de módulo pequeño como:

$$\vec{w}(\vec{r}, t) = \begin{pmatrix} u(\vec{r}, t) - u_s \\ v(\vec{r}, t) - v_s \end{pmatrix}.$$

Luego, expandimos la ecuación (C.1) hasta términos lineales en w. Obtenemos:

$$\frac{\partial \vec{w}}{\partial t} = \mathcal{A}_s \vec{w} + \mathcal{D}_s \nabla^2 \vec{w}, \tag{C.3}$$

donde las componentes de $\mathcal{A}_s$ (matriz de estabilidad) son las derivadas parciales de la cinética de las reacciones evaluadas en el punto fijo (u_s, v_s). Por otro lado, $\mathcal{D}_s$ representa la matriz de difusión evaluada en el mismo punto:

$$\mathcal{A}_s = \begin{pmatrix} F_u & F_v \\ G_u & G_v \end{pmatrix} \quad , \quad \mathcal{D}_s = \begin{pmatrix} D_{11} & D_{12} \\ D_{21} & D_{22} \end{pmatrix}$$

Proponiendo que las soluciones de la ecuación (C.3) tengan la siguiente forma funcional: $\vec{w} \sim \exp(\lambda t - i\vec{k}.\vec{r})$ [1] encontramos, insertando la solución propuesta en la ecuación (C.3), las siguientes condiciones para hallar soluciones no triviales:

$$\left\| \lambda \mathcal{I} - \mathcal{A}_s + k^2 \mathcal{D}_s \right\| = 0. \tag{C.4}$$

La relación de dispersión que obtendremos a partir de esta expresión, supone que las condiciones de contorno no cambian esencialmente el tipo de soluciones posibles, ya que en la forma funcional propuesta para las soluciones está implícito el hecho de que el sistema es infinito [2]. A partir de la relación de dispersión, encontramos los autovalores con los que podemos estudiar el tipo de bifurcaciones que es posible encontrar en el sistema al variar los parámetros. Efectivamente, los autovalores son las raíces de la ecuación de dispersión:

$$\lambda^2 - \lambda \left((F_u + G_v) - k^2 (D_{11} + D_{22}) \right) + H(k^2) = 0 \tag{C.5}$$

donde $H(k^2)$ viene dado por:

$$H(k^2) = k^4 \left\| \mathcal{D}_s \right\| + k^2 \left(F_v D_{21} + G_u D_{12} - F_u D_{22} - G_v D_{11} \right) +^2 \left\| \mathcal{A}_s \right\|. \tag{C.6}$$

Dado que el punto fijo debe ser estable en el caso homogéneo, los autovalores de la ecuación (C.5) deben tener parte real negativa ($Re(\lambda) < 0$) siempre que $k = 0$. Esta condición se garantiza si las siguiente relaciones se verifican:

$$Tr\,(\mathcal{A}_s) = F_u + G_v < 0 \qquad \left\| \mathcal{A}_s \right\| = F_u G_v - F_v G_u > 0\,. \tag{C.7}$$

Para que el estado estacionario sea inestable frente a perturbaciones espaciales, debemos requerir que $Re(\lambda) > 0$ para algún $k \neq 0$. Esto puede, en principio, ocurrir de dos maneras diferentes: por un lado, si el coeficiente que acompaña a λ en la ecuación (C.5) es negativo, y por el otro, si la función $H(k^2) < 0$ para algún $k \neq 0$. Pero dadas las restricciones expresadas por (C.7), y teniendo en cuenta que la traza de la matriz de difusión debe ser positiva, sólo la última posibilidad es de interés. Centraremos el análisis en el caso en que la matriz de difusión tiene determinante positivo $\left\| \mathcal{D}_s \right\| > 0$. Teniendo en cuenta esta restricción junto con la segunda de (C.7), la condición necesaria para la aparición de estructuras espaciales es:

$$F_v D_{21} + G_u D_{12} < F_u D_{22} + G_v D_{11}. \tag{C.8}$$

Esta condición indica, básicamente, que la pendiente de la cuadrática en $k = 0$ es negativa. Sin embargo, no asegura que $H(k^2)$ efectivamente cruce el cero para algún $k \neq 0$. La condición suficiente para que $Re(\lambda) > 0$ para algún $k \neq 0$, es que el valor mínimo de la función $H(k^2)$, $H_{MIN}(k^2)$, sea negativo, es decir:

$$(F_u D_{22} + G_v D_{11} - (F_v D_{21} + G_u D_{12}))^2 \geq 4 \left\| \mathcal{D}_s \right\| \left\| \mathcal{A}_s \right\|. \tag{C.9}$$

Finalmente, la magnitud del primer modo linealmente inestable viene dada por:

$$k_c^2 = \sqrt{\frac{\left\| \mathcal{A}_s \right\|}{\left\| \mathcal{D}_s \right\|}}\,. \tag{C.10}$$

[1] Como es usual al hacer la transformada de Fourier, k es el número de onda, el cual es inversamente proporcional a la longitud de onda.

[2] Hubiese sido equivalente imponer alguna condición de borde, por ejemplo flujo cero. En este caso se obtendría un espectro discreto de números de onda, inversamente proporcionales a la longitud del sistema.

Bibliografía

[1] Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *The Molecular Biology of the Cell*, 3 Ed. Garland Publishing, NY, (1994).

[2] Allbritton N. L., T. Meyer, L. Stryer, Science **258**, (1992).

[3] Anderson R. M., R. M. May, Nature **318**, 323-329, (1985).

[4] Aristóteles, *Metafísica*, Obras Maestras, Editorial Iberia, (1964).

[5] Bak P., K. Sneppen, Phys. Rev. Lett. **71**, (1993).

[6] Baldwin H. H., A. P. Rush, Ann. Rev. Biochem. **34**, 565, (1965).

[7] Beddington J. R., R. M. May, Science, **197**, 463-465, (1977).

[8] Berg H. C., *Random Walks in Biology*, Princeton University Press, (1993).

[9] Bergé P., Y. Pomeau, C. Vidal, *Order Within Chaos. Towards a deterministic approach to turbulence*, John Wiley & Sons, (1984).

[10] Berlin J. R., J. W. M. Bassani, D. M. Bers, Biophys. J. **67**, 1775-1787, (1994).

[11] Berridge M. J., Nature **361**, 315-325, (1993).

[12] Bezrukov S. M., I. Vodyanoy, V. A. Parsegian, Nature (London) **370**, 279 (1994).

[13] Boiteaux A., A. Goldbeter, B. Hess, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 10, 3829-3833, (1975).

[14] Boon J. P., D. Dab, R. Kapral, A. Lawniczak, Physics Reports **273**, (1996).

[15] Borradaile L. A., F. A. Potts, L. E. S. Eastman, J. T. Saunders, *The Invertebrata* London: Cambridge University Press, 3 Ed., (1958).

[16] Byrne G., E. C. Cox, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 4140, (1987).

[17] Callamaras N., J. S. Marchant, X. P. Sun, I. Parker, J. Physiol. **509**, 81, (1998).

[18] Callamaras N., I. Parker, J. Gen. Physiol. **113**, 199-213, (1999).

[19] Cannell M. B., H. Cheng, W. J. Lederer, Science **268**, 1045-1049, (1995).

[20] Casella G., R. L. Berger, *Statistical Inference*, The Wadsworth & Brooks/Cole Statistics/Probability Series, (1990).

[21] Castets V., E. Dulos, J. Boissonade, P. DeKepper, Phys. Rev Lett. **64**, 2953, (1990).

[22] Chance B., E. K. Pye, A. K. Ghosh, B. Hess, eds., *Biological and Biochemical Oscillators*, Academic Press, New York, (1973).

[23] Chialvo D. (comunicación personal).

[24] Chopard B., M. Droz, S. Cornell, L. Frachebourg, Proceedings of the Workshop on Cellular Automata for Astrophysicists, Ardennes, (1992).

[25] Cross M. C., P.C. Hohenberg, Rev. Mod. Phys. **65**, 851, (1993).

[26] Dano S., P. Graae Sorensen, F. Hynne, Nature, **402**, 320-322, (1999).

[27] Davidenko J. M., A. M. Pertsov, R. Solomonsz, W. Baxter, J. Jalife, Nature **355**, 349-351, (1992).

[28] Davidenko J. M., P. F. Kent, J. Jalife, Physica D **49**, 182-197, (1993).

[29] Dawkins R., *The Blind Watchmaker. Why the evidence of evolution reveals a universe without design*, Norton, (1987).

[30] Dawson S. P., A. Lawniczak, R. Kapral, J. Chem. Phys. **100**, 5211, (1994).

[31] Dawson, S. P., S. Chen, G. D. Doolen, J. Chem. Phys **98**, 2, (1993).

[32] Dawson, S. P., M. V. D'Angelo, J. E. Pearson, Phys. Lett. B **B265**, 346, (2000).

[33] Dawson, S. P., J. Keizer, J. E. Pearson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 6060-6063, (1999).

[34] Dawson S. P., D. E. Strier, Proceedings of FLUIDOS-2001, VII International Seminar on Recent Advances in Fluid Mechanics, Physics of Fluids and Associated Complex Systems 17-19 October 2001, Buenos Aires, Argentina.

[35] DeKepper P., V. Castets, E. Dulos, J. Boissonade, Physica D **49**, 161-169, (1991).

[36] De Young G. W., J. Keizer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 9895-9899, (1992).

[37] Dreux P., *Introducción a la Ecología*, Alianza Editorial, (1986).

[38] Dulos E., J. Boissonade, P. DeKepper, Physica A **188**, 120, (1992).

[39] Dupont G., A. Goldbeter, Biophysical J. **67**, 2191-2204, (1994).

[40] Edblom E. C. , M. Orban, I. R. Epstein, J. Am. Chem. Soc. **108**, 2826, (1986).

[41] Eigen M., P. Schuster, *The Hypercycle, A Principle of Natural Self-Organization*, New York, Springer-Verlag, (1979).

[42] Falke J. J., S. K. Drake, A. L. Hazard, O. B. Peersen, Quart. Rev. Biophys. **27**, 219-290, (1994).

[43] Fermi E., *Termodinámica*, Eudeba, 5a. ed., (1985).

[44] Feynman R. P., R. B. Leighton, M. Sands, *Electromagnetismo y Materia*, Addison-Wesley Iberoamericana, Vol II, Cap. 41, (1987).

[45] Field R. J., E. Koros, R. M. Noyes, J. Am. Chem. Soc. **94**, 8649, (1972).

[46] Fife P. C., *Mathematical Aspects of Reacting and Diffusing Systems*, Lect. Notes in Biomathematics **28**, Springer, (1979).

[47] Fisher R. A., Ann. Eugenics **7**, 353-369, (1937).

[48] Fitz-Hugh R., Biophys. J. **1**, 445, (1961).

[49] Foerster P., S. C. Muller, B. Hess, Science **241**, 685-687, (1988).

[50] Foerster P., S. C. Muller, B. Hess, Development **109**, 11-16, (1990).

[51] Fontanilla R. A., R. Nuccitelli, Biophys. J. **75**, 2079-2087, (1998).

[52] Frenzen C. L., P. K. Maini, J. Math. Biol. **26**, 689-703, (1988).

[53] Fygenson D., PhD. Thesis, Princeton University, (1995).

[54] Gallucio S., Phys. Rev. E **56**, 4, 4526-4539, (1997).

[55] Gardiner C. W., *Handbook of Stochastic Methods*, Springer-Verlag, New York, (1985).

[56] Glass L., P. Hunter, Physica D **43**, 1, (1990).

[57] Glass L., Physics Today **49**, 8, part 1, 40-45, (1996).

[58] Glass L., Nature **410**, 277-284, (2001).

[59] Goldbeter A., *Biochemical Oscillations and Cellular Rythms, the Molecular Bases of Periodic and Chaotic Behavior*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1996).

[60] Goldbeter A., Proc. R. Soc. Lond. B **261**, 319-324, (1995).

[61] Goldbeter A., R. Lefever, Biophysical J. **12**, 1302-1315, (1972).

[62] Goodwin B. C., J. D. Murray, d. Baldwin, In: S. Bonotto, F. Cinelli, R. Billiau (eds), Proc. 6th Intern. Symp. on Acetabularia. Pisa, (1984).

[63] Green J. B. A., J. C. Smith, Nature **347**, 391-394, (1990).

[64] Greig-Smith, J. Ecol. **67**, 755-779, (1979).

[65] Guckenheimer J., P. Holmes, *Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems and Bifurcations of Vector Fields*, Springer-Verlag, New York, (1983).

[66] Hagan P. S., M. S. Cohen, J. Theor. Biol. **92**, 881, (1981).

[67] Haken H., *Synergetics, An Introduction. Nonequilibrium Phase Transitions and Self-organization in Physics, Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, Berlín, (1983).

[68] Haken H., *Advanced Synergetics*, Springer-Verlag, Berlín, (1987).

[69] Hasslacher B., R. Kapral, A. Lawniczak, Chaos **3**, 7, (1993).

[70] Heald R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, E. Karsenti, Nature **382**, 420-425, (1996).

[71] Heinemann C. W., R. H. Chow, E. Neher, R. Zucker, Biophys. J. **67**, 2546-2557, (1994).

[72] Hess B., A. Boiteaux, Annu. Rev. Biochem. **10**, 40, 237, (1971).

[73] Hille B., *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, MA., p. 359, (1992).

[74] Hinch E. J., *Perturbation Methods*, Cambridge Texts in Applied Mathematics, Cambridge University Press, (1991).

[75] Hirsh M. W., S. Smale, *Differential Equations, Dynamical Systems, and Linear Algebra*, Academic Press: New York, (1974).

[76] Hodgkin A. L., A. F. Huxley, J. Physiol. (London) **117**, 500, (1952).

[77] Kapral R., A. Lawniczak, P. Masiar, J. Chem. Phys. **96**, (4), (1992).

[78] Karapiperis T., B. Blankleider, Physica D **78**, 30, (1994).

[79] Kauffman S. A., *The Origins of Order*, Oxford University Press, (1993).

[80] Kauffman S. A., J. Theor. Biol. **22**, 437-467, (1969).

[81] Kauffman S. A., R. M. Shymko, K. Trabert, Science **199**, 259, (1978).

[82] Kawczynski, A. L., B. Legawiec, Phys. Rev. E. **64**, 056202, (2001).

[83] Keener J., J. Sneyd, *Mathematical Physiology*, Interdisciplinary Applied Mathematics, Vol. 8, Springer-Verlag, New York, (1998).

[84] Keizer J., G. Smith, S. P. Dawson, J. E. Pearson, Biophysical J. **75**, 595-600, (1998).

[85] Kirschner M., T. Mitchison, Cell **45**, 329-342, (1986).

[86] Kondo S., R. Asai, Nature **376**, 765, (1995).

[87] Kosko B., *Neural Networks and Fuzzy Systems: a dynamical systems approach to machine intelligence*, Prentice Hall, (1992). Ver el prefacio de James A. Anderson.

[88] Landau L. D., E. M. Lifshitz, *Statistical Physics*, secs. 109-111, Addison Wesley, (1959).

[89] Landau L. D., E. M. Lifshitz, *Mecánica de Fluidos*, Vol. 6, Reverté, (1986).

[90] Lauzeral J., J. Halloy, A. Goldbeter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 9153-9158, (1997).

[91] Lawrence P. A., *The Making of a Fly: the genetics of animal design*, Blackwell Scientific Publications, (1992).

[92] Lechleiter J., D. Clapham, Cell **69**, 283-294, (1992).

[93] Lefever R., O. Lejeune, Bulletin of Mathematical Biology **59**, 2, 263-294, (1997).

[94] Leibniz G. G., I. Newton, *El Cálculo Infinitesimal. Origen-Polémica*, EUDEBA, (1977).

[95] Leloup J. C., A. Goldbeter, J. Theor. Biol. **198**, 445-459, (1999).

[96] Lengyel I., I. Epstein, Science **251**, 650, (1991).

[97] Lewis J., J. M. W. Slack, L. Wolpert, J. Theor. Biol. **65**, 579-590, (1977).

[98] Macfadyen J. A., Nature **165**, 121, (1950).

[99] Macnamara G., G. Zanetti, Phys. Rev. Lett. **61**, 2332, (1988).

[100] Maklin M., Nature **217**, 622, (1968).

[101] Margulis L., *El Origen de la Célula*, Reverté, (1986).

[102] May R. M., *Theoretical Ecology: Principles and Applications*, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2nd. Ed., (1981).

[103] Meinhardt H., *Models of Biological Pattern Formation*, Academic, New York, (1982).

[104] Mikhailov A. S., *Foundations of Synergetics I*, Springer-Verlag, Berlín, (1991).

[105] Mikhailov A. S., B. Hess, J. Phys. Chem. **100**, 19059-19065, (1996).

[106] Monod J., J. Wyman, J. P. Changeux, J. Mol. Biol. **12**, 88-118, (1965).

[107] Murray J. D., *Mathematical Biology*, Springer, New York, (1989).

[108] Murray J. D., Scientific American **258**, 3, 80-87, (1988).

[109] Murray J. D., P. K. Maini, R. T. Tranquillo, Physics Reports **171**, 60-84, (1988).

[110] Nagumo J. S., S. Arimoto, S. Yoshisawa, Proc. IRE **50**, 2061, (1962).

[111] Nédélec F. J., T. Surrey, A. C. Maggs, S. Leibler, Nature **389**, 305-308, (1997).

[112] Neher E., G. Agustine, J. Physiol. (Lond) **450**, 273-301, (1992).

[113] Nettesheim S., A. von Oertzen, H. H. Rotermund, G. Erlt, J. Chem. Phys. **98**, 9977-9985, (1993).

[114] Newell P. C., *Fungal Differentiation, A Contemporary Synthesis*, ed. J. E. Smith, Micology Series, 43, (Marcel Dekker, New York), p 43, (1983).

[115] Nicklas R. B., Ann. Rev. Biophys. Chem. **17**, 431-449, (1988).

[116] Nicklas R. B., S. C. Ward, G. Gorbsky, The Journal of Cell Biology **130**, 4, 929-939, (1995).

[117] Nicklas R. B., Science **275**, 632-637, (1995).

[118] Nicolis G., I. Prigogine, *Self-organization in Nonequilibrium Systems, from Dissipative Structures to Order through Fluctuations*, Wiley, New York, (1977).

[119] The Niggli Group Home Page Department of Physiology, University of Bern, Switzerland.

[120] Nisbet R. M., W. S. C. Gurney, *Modelling Fluctuating Populations*, Wiley, New York, (1982).

[121] Nusslein-Volhard C., Scientific American **275**, 2, 38-43, (1996).

[122] Ouyang Q., H. Swinney, Nature **352**, 610, (1991).

[123] Ouyang Q., H. Swinney, Chaos **1**, 411, (1991).

[124] Paley W., *Natural Theology*, 2nd Ed. Oxford (1828).

[125] Panfilov A., J. P. Keener, Chaos, Solitons and Fractals **5**, 681, (1995).

[126] Parker I., Y. Yao, Proc. R. Soc. Lond. B **246**, 269, (1991).

[127] Parker I., J. Choi, Y. Yao, Cell Calcium **20**, 105, (1996).

[128] Pearson J. E., W. Bruno, Chaos **2**, 513, (1992).

[129] Pearson J. E., W. Horsthemke, J. Chem. Phys. **90**, 1588-1599, (1989).

[130] Purcell E., Am. J. Phys. **45**, 1, 3-11, (1977).

[131] Pye E. K., B. Chance, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **55**, 888, (1966).

[132] Reichl L. E., *A Modern Course in Statistical Physics*, University of Texas Press, (1980).

[133] Reif F., *Fundamentos de Física Estadística y Térmica*, Mc. Graw Hill, (1968).

[134] Richter P. H., P. Rehmus, J. Ross, Progress of Theoretical Physics **66**, 2, 385-405, (1981).

[135] Rosen J., *Symmetry in Science: An Introduction to the General Theory*, Springer Verlag, (1995).

[136] Santaló L. A., *Vectores y Tensores con sus Aplicaciones*, 13a ed., Eudeba, (1985).

[137] Sawai S., Y. Maeda, Y. Sawada, Phys. Rev. Lett. **85**, 10, 2212-2215, (2000).

[138] Schnackenberg J., J. Theor. Biol. **81**, 389, (1979).

[139] Schroedinger, E., *What is Life?*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1944).

[140] Segel L. A., M. Slemrod, SIAM Rev. **3**, 466-477, (1989).

[141] Selkov E. E., Eur. J. Biochem. **4**, 79, (1968).

[142] Skelton P., *Evolution: A Biological and Paleontological Approach*, Addison-Wesley, Wokingham, (1994).

[143] Smith G. D., PhD Thesis. University of California, Davis, (1996).

[144] Smith G. D., Biophys. J. **71**, 3064-3072, (1996).

[145] Smith G. D., J. Wagner, J. Keizer, Biophys. J. **70**, 2527-2539, (1996).

[146] Sneyd J., P. Dale, A. Duffy, SIAM J. Appl. Math. **58**, 4, (1998).

[147] Solari H., M. A. Natiello, G. B. Mindlin, *Nonlinear Dynamics, A Two Way Trip From Physics To Math*, Institute of Physics, (1996).

[148] Strier D. E., D. H. Zanette, H. S. Wio, Physica A **226**, 310-323, (1996).

[149] Strier D. E., D. H. Zanette, Physica A **257**, 530-535, (1998).

[150] Strier D. E., S. P. Dawson, J. Chem. Phys. **112**, 2, 825-834, (2000).

[151] Strier D. E., S. P. Dawson, *http://www.aip.org/pubservs/epaps.html*, documento EPAPS No. E-JCPSA6-111-518948. Notas suplementarias.

[152] Strier D. E., A. Chernomoretz, S. P. Dawson, Phys. Rev. E **65**, 4, 046233-47, (2002).

[153] Strier D. E., S. P. Dawson, enviado, (2002).

[154] Strier D. E., S. P. Dawson, en preparación.

[155] Strier D. E., A. Ventura, S. P. Dawson, enviado, (2002).

[156] Strogatz S. H., *Nonlinear Dynamics and Chaos*, Perseus Books Publishing, (1994).

[157] Swillens S., G. Dupont, L. Combettes, P. Champeil, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**, 13750-13755, (1999).

[158] Temam R., *Infinite-Dimensional Dynamical Systems in Mechanics and Physics*, Springer, New York, (1997).

[159] Tolman R. C., *The Principles of Statistical Mechanics*, Dover Publications Inc. New York, (1979).

[160] Tse A., F. W. Tse, B. Hille, J. Physiol. (Lond) **477**, 511-525, (1994)

[161] Turing A. M., Phil. Trans. Roy. Soc. **B 237**, 37, (1952).

[162] Tyson J. J., J. P. Keener, Physica D **32**, 327, (1988).

[163] Tyson J. J., K. A. Alexander, V. S. Manoranjan, J. D. Murray, Physica D **34**, 193-207, (1989).

[164] Van Kampen N. G., *Stochastic Process in Physics and Chemistry*, North-Holland, New York, (1981).

[165] Vigil R. D., Q. Ouyang, H. L. Swinney, Physica A **188**, 17-25, (1992).

[166] Voet D., J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, 2nd Ed., (1995).

[167] Von Hardenberg J., E. Meron, M. Shachak, Y. Zarmi, Phys. Rev. Lett. **87**, 19, 198101-1/4, (2001).

[168] Wagner J., J. Keizer, Biophys. J. **67**, 447, (1994).

[169] Para los proyectos de células virtuales, puede consultarse la página web de John Wagner, *http://nrcam.uchc.edu:8080/wagner.*

[170] Walgraef D., *Spatio-Temporal Pattern Formation*, Springer-Verlag, New York, (1997).

[171] Walter M., A. Fournier, D. Menevaux, Computer Graphics SIGGRAPH 2001, Conference Proceedings.

[172] West G. B., J. H. Brown, B. J. Enquist, Science **276**, 122, (1997).

[173] West G. B. , J. H. Brown, B. J. Enquist, Science **284**, 1677-1679, (1999).

[174] Whitesides G. M., Scientific American **273**, 3, 114-117, (1995).

[175] Wiggins S., *Introduction to Applied Nonlinear Dynamical Systems and Chaos*, Springer-Verlag, New York, (1990).

[176] Winfree A. T., S. H. Strogatz, Nature **311**, 611-615, (1984).

[177] Winfree A. T., Scientific American **248** (5), 144-161, (1983).

[178] Winfree A. T., S. H. Strogatz, Physica 8D, 35, (1983).

[179] Winfree A. T., *The Geometry of Biological Time*, 2nd Ed. Interdisciplinary Applied Mathematics, Vol. 12, Springer Verlag, (2001).

[180] Wio H. S., *An Introduction to Stochastic Processes and Nonequilibrium Statistical Physics*, World Scientific, Singapore, (1994).

[181] Wolpert L., Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond) **B295**, 441-450, (1981).

[182] Yao Y., J. Choi, I. Parker, J. Physiol. **482.3**, 533-553, (1995).

[183] Zanette D. H., Phys. Rev. A **46**, 12, (1992).

[184] Zhou Z. A., E. Neher, J. Physiol. (Lond) **469**, 245-273, (1993).

[185] Zhang D., R. B. Nicklas, Nature **382**, 466-468, (1996).

Agradecimientos

Quiero dedicar las primeras palabras de estos agradecimientos a mi directora, Silvina Ponce Dawson, por haberme ayudado de diversas maneras a concretar este trabajo. Su aporte, va mucho más allá de los aspectos puramente académicos en los cuales sobresale por su claridad, talento, y creatividad. Abarca otros, que son fundamentales para que el alumno logre, en paralelo al trabajo de tesis, potenciar su crecimiento personal e independencia como investigador. De las cosas que más valoro entre las muchas que me ha transmitido Silvina con su ejemplo, es la idea de no anclarse como investigador a los temas que ya se dominan, sino buscar permanentemente nuevos problemas, mantenerse en movimiento. Ella lo logra con la pasión que le pone a lo que hace, y con su trabajo serio y meticuloso, digno de imitar. Seguramente, cuando en algunos años recuerde mi trabajo de tesis con Silvina, la veré allí, sentada frente a la computadora de su caótica oficina, escribiendo, en la mesita del teclado, sobre algun papelito en orientaciones diversas que sólo élla podrá leer de corrido; veré sus emails sugiriéndome delicadamente que apure éste o aquél resultado "que debería salirte rápido"; o la escucharé recordando, como si hubiese visto ayer, lo que decía ese paper que hojeó hace dos años... Muchas gracias.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad de Buenos Aires, por haber financiado mis estudios de doctorado a través de la beca FOMEC y del cargo docente. Espero que en el futuro, nuestros dirigentes no impidan que otros estudiantes gocen al menos de los mismos beneficios que yo tuve en estos años.

Son varios los amigos con los cuales he compartido muchas de las horas de estos años, y que quiero agradecer aquí. Entre ellos, Ariel Chernomoretz, Martín Zimmermann, Germán Drazer, Alejandro Duarte, Pablo Balenzuela, Manuel Eguía, César Miquel, David Ibaceta. También quiero mencionar a los nuevos integrantes del grupo, con quienes de inmediato surgió el afecto y las ganas de trabajar juntos: Daniel Fraiman y Alejandra Ventura. A Quique Maya, le agradezco por la ayuda en la adaptación de varias figuras.

Le agradezco a mamá, por la ayuda permanente que me ofreció en todos estos años, y a papá, por haber dejado un ejemplo a seguir, manteniéndose siempre presente, intacto en mi mente, acompañándome en forma silenciosa a encontrar mi camino.

Y finalmente doy las gracias a mis pequeños hijos, Facundo y Lucas, y a mi esposa, Laura, por hacerme sentir tan feliz y completo. Especialmente a vos, Laura, que con tu esfuerzo fuiste importante detrás de estas páginas, y con tu amor, fundamental para todo lo hermoso que me sucedió fuera de ellas desde el día que te conocí. Gracias por todo el amor que me diste, y por la familia que formamos juntos en un tiempo tan breve. No encuentro nada más importante en mi vida que pueda comparar con haberte conocido.

FCEyN-BA
Nº 71894

30 de julio de 2002

Subcomisión de Doctorado, Departamento de Física
Comisión de Doctorado, FCEN-UBA
Miembros del Jurado de Tesis del Lic. Damián Strier

Estimados Sres.,

Adjunto a la presente el informe sobre la Tesis de Doctorado en Ciencias Físicas del Lic. Damián Strier de quien fuera directora.

Sin otro particular, los saludo atentamente,

Silvina Ponce Dawson
Departamento de Física
Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA
Ciudad Universitaria, Pab. I
(1428) Buenos Aires
teléfono: 4576 3353; 4576 3390 (int 817)
fax: 4576 3357
e-mail: silvina@df.uba.ar

Informe Final. Tesis de Doctorado en Ciencias Físicas
Doctorando: Damián Strier.
Título: Procesos de auto-organización en sistemas biológicos.
Directora: Silvina Ponce Dawson.

La Tesis de Doctorado del Lic. Damián Strier aborda temas interdisciplinarios entre la física y la biología. Como su título lo indica, busca estudiar algunos de los procesos de auto-organización que ocurren en los sistemas biológicos, es decir, la formación de orden a partir de las interacciones entre los componentes del sistema. La principal motivación radica en establecer una base firme para el modelado de procesos que ocurren a nivel celular, aunque algunos de los resultados son aplicables a otros sistemas. La tesis se centra, en particular, en aquellos procesos que son modelables por ecuaciones de reacción-difusión. Las mismas son aplicables para describir la dinámica espacio-temporal de una infinidad de sustancias que cumplen distintas funciones a nivel celular. Si bien parte de la tesis está dedicada al estudio de sistemas de reacción-difusión en general, contiene también aplicaciones de los resultados generales a dos casos particulares de gran importancia biológica: la dinámica del calcio intracelular y la interacción entre el ATP (adenosin-trisfosfato) y el ADP (adenosin-difosfato) en la glucólisis. La importancia del calcio radica en que es un ion que usa una gran variedad de células para señalizar el inicio de una enorme cantidad de procesos distintos. Estos incluyen, entre otros, la fertilización, la comunicación entre neuronas, la contracción muscular y la muerte celular. El ATP, por otro lado, es algo así como la "moneda energética" del mundo celular. En los animales, el ATP es obtenido a partir de los alimentos ingeridos a través de una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en distintas etapas. El proceso más importante de una de estas etapas es la "glucólisis", un camino metabólico ubicuo por el cual los azúcares son degradados parcialmente, dando lugar a la formacin de ATP en ausencia de oxígeno.

El modelado de procesos intra e intercelulares presenta muchos desafíos, dado que las células son objetos sumamente complejos en donde muchas sustancias interactúan simultáneamente para producir la respuesta deseada. A partir de esta complejidad uno se pregunta si es posible simplificar la descripción de algún modo. Una de las características de los procesos dinámicos que ocurren dentro de las células es el hecho de que involucran escalas temporales muy diversas. Una forma de abordar la descripción de la dinámica de sistemas con escalas temporales múltiples es la eliminación adiabática de algunas de las variables. De ese modo se obtiene una descripción "reducida" para la dinámica en la escala lenta. Si bien existían antecedentes en este sentido para el estudio de reacciones enzimáticas (la así llamada aproximación cuasiestacionaria), estos estudios se habían limitado al caso espacialmente homogéneo, mientras que la situación más general de los sistemas de reacción-difusión no había sido abordada sistemáticamente. *El principal objetivo de la tesis fue entonces obtener, de modo sistemático, la descripción reducida, en la escala temporal lenta, de sistemas de reacción-difusión con escalas temporales múltiples, para posteriormente aplicarla a casos de interés biológico.* Una de las primeras motivaciones para este estudio fue la obtención de una descripción matemática precisa que permitiera explicar las primeras observaciones experimentales de "patterns de Turing". En los años 50, Alan Turing propuso un mecanismo por el cual sistemas de reacción-difusión podían dar lugar a la formación de estructuras espaciales a partir de una situación espacialmente homogénea. Turing planteó este trabajo como una "caricatura" de un mecanismo que pudiera explicar el "orden" (la estructura espacial y la diferenciación) a partir del "desorden" (la situación espacialmente homogénea) que pudiera tener relevancia a nivel biológico (una solución de sustancias

químicas que reaccionan y difunden). En su versión más sencilla este mecanismo requiere la presencia de dos sustancias que difunden a tasas diferentes. Los "patterns de Turing" pudieron ser observados experimentalmente por primera vez, usando reactores permanentemente alimentados, a principios de los 90, justamente por la dificultad en encontrar sustancias que difundieran a tasas diferentes. La explicación heurística que se brindó *a posteriori* para explicar la aparición de estos "patterns" se basó en suponer que la interacción de una de las sustancias involucradas en la reacción con sustancias inmóviles presentes en el medio efectivamente "re-escaleaba" su coeficiente de difusión de modo de generar la diferencia de tasas necesaria para los patterns de Turing. Debido a la complejidad de las interacciones que ocurren a nivel intracelular, está bastante difundido dentro de la literatura biológica el suponer que la interacción de alguna sustancia de interés (por ejemplo el calcio) con otras sustancias de las cuales no se conocen demasiados detalles (generalmente proteínas, a las que se suele dar el nombre genérico de "buffers") tiene como resultado un "re-escaleo" de la concentración de la sustancia de interés y de su coeficiente de difusión. De ese modo, se describe la dinámica solamente en términos de un modelo cerrado para esta concentración "re-escaleada". Si bien estas visiones heurísticas suenan razonables, nos pareció importante volcarlas en un modelo matemáticamente más riguroso que permitiera analizar sus condiciones de aplicabilidad y sus limitaciones. En particular, concluimos que era necesaria una separación de escalas temporales que permitiera la reducción de la descripción en la escala temporal lenta.

El primer paso en la tarea realizada por el Lic. Strier fue justamente la reducción sistemática de sistemas de reacción-difusión con escalas temporales múltiples. Estos resultados están contenidos en el Capítulo 2 de la Tesis y en el trabajo "Rescaling of diffusion coefficients in two–timescale chemical systems", Damián E. Strier and Silvina Ponce Dawson, J. Chem. Phys. **112**, 825 (2000). Debemos citar como un antecedente de nuestro trabajo la así llamada "aproximación de buffers rápidos" de la que supimos con posterioridad a la publicación de nuestro paper, pero que se limita a estudiar un caso muy simplificado y en donde la ecuación final se deriva un poco con los dedos. En el Capítulo 3 de la Tesis se aborda el tema de la reducción desde un punto de vista más microscópico para poder dar una interpretación física a algunos de los términos que aparecen en las ecuaciones reducidas. Estos resultados están también publicados en el trabajo "Slow time evolution of two time-scale reaction-diffusion systems: the physical origin of non-diffusive transport", Damián E. Strier, Ariel Chernomoretz and Silvina Ponce Dawson, Phys. Rev. E **65**, 046233 (2002). En el Capítulo 4 de la Tesis se aborda el caso de los patterns de Turing para un sistema de reacción-difusión general y se hace una aplicación a la aparición de estructuras en un alga. Una parte de estos resultados fue publicada en los Proceedings de FLUIDOS-2001, VII International Seminar on Recent Advances in Fluid Mechanics, Physics of Fluids and Associated Complex Systems 17-19 October 2001, Buenos Aires, Argentina ("Buffer induced stabilization of Turing patterns", S. Ponce Dawson and D.E. Strier) y el resto está siendo escrito para enviar a publicar. En el Capítulo 5 de la Tesis se aborda el caso de la glucólisis el que, como mencionamos anteriormente, es un camino metabólico importantísimo a nivel celular. Hace unos años un grupo de autores se propuso estudiar si un modelo sencillo para la glucólisis podía dar lugar a la formación de patterns de Turing. El modelo sencillo estaba descripto por dos variables, las concentraciones de ATP y ADP, y los autores pudieron obtener patterns suponiendo que, por algún mecanismo, estas dos sustancias difundían a tasas diferentes. El trabajo no describía en detalle ningún mecanismo que pudiera explicar la diferencia de coeficientes de difusión usados. Nuestro objetivo en esta parte de la tesis fue determinar si la interacción con las enzimas que regulan parte

de la glucólisis, y a las que se puede suponer inmóviles, puede proveer el mecanismo por el cual, en la escala temporal lenta, la dinámica del ATP y el ADP es tal que uno de ellos (el ATP) difunde más rápidamente que el otro. Para ello partimos de un modelo más abarcador de la glucólisis que incluye alguna de estas enzimas para reducirlo a un sistema de dos ecuaciones (una para la concentración del ATP y otra para la del ADP), aplicando la técnica descripta en el Capítulo 2. Como resultado de este estudio, se encontró un conjunto de parámetros realistas para los cuales pueden existir patterns de Turing estables cuyo tamaño característico es menor que el tamaño de una célula típica. Este resultado es interesantísimo, ya puede predecir la existencia de un gradiente de concentración de ATP dentro de la célula el que podría asociarse a algunos de los procesos que ocurren durante la división celular. Estos resultados están contenidos en un trabajo que está a punto de ser enviado a publicar ("Turing patterns in a biochemical system", Damián E. Strier and Silvina Ponce Dawson, a ser enviado a Phys. Rev. Lett.). Finalmente, en el Capítulo 6, se aborda el tema de la dinámica del calcio intracelular en presencia de buffers rápidos. Este tema es de vital interés, por un lado, por la importancia del calcio como agente señalizador, y, por el otro, por el hecho de que el calcio es liberado de forma espacialmente localizada (a través de canales) dentro del citosol de la célula, y una de las condiciones necesarias para la reducción del Capítulo 2 es el hecho de que no existan gradientes de concentración demasiado grandes. Por lo tanto, era de interés determinar en qué medida esta liberación a través de canales podía afectar la validez de la descripción reducida. En el Capítulo 6 se hace un análisis de las escalas temporales involucradas en la dinámica del calcio intracelular y se concluye la propagación de "ondas continuas", donde la liberación del calcio ocurre a través de varios canales simultáneamente, debería ser pasible de una descripción reducida, pero que, sin embargo, la misma podría fallar para las ondas saltatorias. El capítulo incluye también algunos experimentos numéricos de este último caso en el que se ve que la descripción reducida y la completa no coinciden. Estos resultados están también contenidos en un trabajo que será enviado a publicar ("Saltatory and continuous calcium waves and the rapid buffering approximation", Damián E. Strier, Alejandra C. Ventura and Silvina Ponce Dawson, a ser enviado a Biophys. J.).

En resumen, creo que esta tesis contiene resultados muy interesantes, tanto desde el punto de vista de la física como de la biología. Damián Strier mostró ser un estudiante entusiasta, que puso un gran esfuerzo en entender tanto la matemática y la física como la biología de los problemas abordados y eso se ve reflejado en sus resultados. La tesis muestra un trabajo coherente y abarcador. La presentación es además muy buena, ya que logra una síntesis difícil de alcanzar en donde están tanto la motivación física y biológica como la descripción de la matemática en cantidades necesarias. Por todas razones creo que la defensa de esta Tesis debe ser aprobada.