

UNIVERSIDAD CENTROCCIDENTAL
“LISANDRO ALVARADO”

Decanato de Ciencias y Tecnología
Licenciatura en Ciencias Matemáticas



“ANÁLISIS CINÉTICO DE UNA REACCIÓN COOPERATIVA
MEDIANTE LA APROXIMACIÓN AL PSEUDO ESTADO
ESTACIONARIO. ”

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR

BR NESTOR J. ESCUDERO M.

COMO REQUISITO FINAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO

EN CIENCIAS MATEMÁTICAS

ÁREA DE CONOCIMIENTO: ANÁLISIS NUMÉRICO Y ECUACIONES

DIFERENCIALES.

TUTOR: PROF. WILFREDO ANGULO(UCLA-DCYT)

CO-TUTOR: DR. CLAUDIO MENDOZA(I.V.I.C)

Barquisimeto, Venezuela. Junio de 2009



Universidad Centroccidental
 "Lisandro Alvarado"
 Decanato de Ciencias y Tecnología
 Licenciatura en Ciencias Matemáticas



ACTA
 TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Los suscritos miembros del Jurado designado por el Jefe del Departamento de Matemáticas del Decanato de Ciencias y Tecnología de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", para examinar y dictar el veredicto sobre el Trabajo Especial de Grado titulado:

“ANÁLISIS CINÉTICO DE UNA REACCIÓN COOPERATIVA MEDIANTE LA APROXIMACIÓN AL PSEUDO ESTADO ESTACIONARIO.”

presentado por el ciudadano BR NESTOR J. ESCUDERO M. titular de la Cédula de Identidad No. 18.052.073, con el propósito de cumplir con el requisito académico final para el otorgamiento del título de Licenciado en Ciencias Matemáticas.

Luego de realizada la Defensa y en los términos que imponen los Lineamientos para el Trabajo Especial de Grado de la Licenciatura en Ciencias Matemáticas, se procedió a discutirlo con el interesado habiéndose emitido el veredicto que a continuación se expresa:

¹ _____

Con una calificación de _____ puntos.

En fe de lo expuesto firmamos la presente Acta en la Ciudad de Barquisimeto a los ____ días del mes de _____ de _____.

 TUTOR

 FIRMA

 PRINCIPAL

 FIRMA

 PRINCIPAL

 FIRMA

OBSERVACIONES:

¹ Aprobado ó Reprobado

*A Dios Todopoderoso por ser mi guía, a
mis padres que son todo en mi vida...*

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso porque soy obra de su infinito amor, porque me ha dado el don de la vida, todos los días le doy gracias por ser mi guía ya que me ha dado el discernimiento para caminar por la vida y lograr esta meta. . .

A tres personas que ya no están a mi lado, pero que las extraño como si fuese hoy el primer día de su partida, Abuela Rosa, Abuela Martina, Johanita, sé que desde el cielo ustedes están conmigo. . .

A las dos maravillosas personas que Dios escogió para traerme al mundo: Néstor y Elba, para ustedes y por ustedes es esto, gracias por ese apoyo incondicional, son el motivo de mi existir, los AMO. . .

A mi hermana Rosmairy, porque eres la compañera que Dios puso a mi lado para caminar por la vida, por ti también es este logro, espero que sigas mirando siempre adelante. . .

A Katty y mis tías María Nieves, Sonia, Lelis, a Tío Ramón por estar siempre allí pendientes de mí, sobre todo por su apoyo, por ese ánimo que me levantó cuando creí que todo estaba caído y por todos esos sabios consejos de los cuales les estaré eternamente agradecido

A quien sin duda alguna es el ángel de la guarda que Dios colocó en mi vida para cuidarme y enseñarme con ejemplo gran parte de lo que hoy sé, sobre todo por tu apoyo en cada paso que doy. Hildemar, gracias por estar conmigo, eres parte fundamental en esta meta.

A mi primo Angel, hemos crecido como hermanos y hemos compartido muchos momentos, de ti estoy muy orgulloso, hemos logrado nuestros cometido, gracias por tu apoyo.

A mis amigos de toda la vida; Reydis, Francis, Norelia, Wilmary, Grisnel, Luis Alexander, Luis Alejandro, Liliana, con ustedes he compartido gran parte de mi vida, ustedes han sido importantes en este camino, gracias por todos sus sabios consejos y por compartir ese gran sentimiento de amistad que nos une.

David, Marco, mis compadres del alma, hemos logrado mucho, con tesón y empeño hemos cristalizado parte de nuestro sueño, espero que nuestra hermandad permanezca por siempre. ¡Gracias Compadres! Les deseo todo lo mejor en la vida.

A quienes en todo momento compartieron conmigo, aprendiendo de la Universidad

de la vida y que les estoy eternamente agradecido porque han sido fundamentales en este camino: Gladymar, Jessica, Gaby, José Gregorio, Cruz Mario, María Victoria. Gracias por ese apoyo y por esos momentos de alegría y tristeza que cada día nos hizo crecer más como buenos amigos

A la hermandad Los ANORMALES (Manuel, Luis Freitez, Mario, Adrián, José Gregorio, incluyendo a David). Pasamos por grandes momentos, sin olvidar a Poncho que es nuestro fiel compañero, gracias mis panas. . .

A mis compañeros, amigos y colegas: María de los Angeles, Marilyn, Iris, Tony, Joel, José Mendoza, Jhon, Nélon, Octalis, Yénifer, Erika, para ustedes todo lo mejor del mundo.

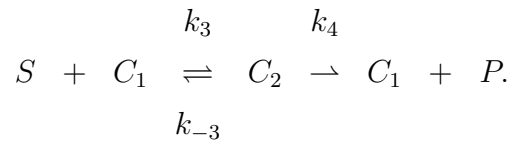
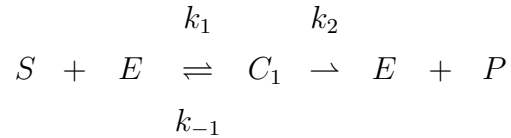
A mi tutor el Prof. Wilfredo Angulo, por poner su confianza en mí, por ser incondicional y sobre todo por esos conocimientos que me ha impartido. Agradecido estaré por siempre, creo que nada de esto hubiese sido posible sin su gran ayuda. A Ud. mi eterna gratitud y admiración.

A quienes por haberme transmitido la esencia de sus conocimientos y por ser ese gran ejemplo que todos buscamos a lo largo de nuestro camino como patrón a seguir: A los Profesores Rómulo Castillo, Éibar Hernández, Ebner Pineda, Mario Rodríguez. Un agradecimiento especial, a dos personas que confiaron en mí y que han sido fundamentales en la elaboración de este trabajo: Santiago Schnell y mi co-tutor Claudio Mendoza. Gracias por el apoyo y la confianza que han depositado en mí.

A todos aquellos que de alguna manera han estado conmigo dándome apoyo, a Ustedes Muchas Gracias. . .

RESUMEN

En este trabajo se realizó un análisis cinético de una reacción enzimática con cooperatividad descrita por el mecanismo:



Para esto, se planteó un modelo matemático de tres ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO's) altamente no lineales en las Variables de estado: concentración de sustrato S y concentración de los complejos-enzima C_1 y C_2 ; quedando las concentraciones de la enzima E y del producto P determinadas por relaciones algebraicas como funciones de estas tres variables de Estado. Se demostró que el modelo es un problema con condiciones iniciales bien planteado y que presenta parámetros característicos del sistema bioquímico asociados con la velocidad a la cual transcurre el mecanismo. Para la evolución de la reacción se distinguieron dos escalas de tiempo: una *transeúnte inicial* en el cual la concentración del sustrato permanece constante y la concentración de los complejos-enzima varían considerablemente hasta un valor máximo, y una escala de tiempo mayor al transeúnte inicial en donde la concentración del sustrato varía considerablemente disminuyendo asintóticamente a cero al igual que las concentraciones de los complejos-enzima. Luego de establecer el parámetro que separa estas escalas de tiempo, se propuso un adimensionamiento del modelo matemático a partir de los cual se obtuvieron dos modelos equivalentes que capturan el comportamiento de las concentraciones de las especies que intervienen en la reacción bioquímica de manera consistente con las hipótesis del *casi-estado estacionario*, o QSSA por sus siglas en inglés. Un análisis de perturbación bajo el enfoque de expansiones asintóticas que validó las hipótesis de la QSSA fue realizado sobre estos modelos. La solución encontrada mediante el análisis asintótico mostró que los términos a orden cero respecto al parámetro que separa las escalas de tiempo son más significativos desde el punto de vista fenomenológico que los de orden

uno en adelante; tales términos no sobrepasan la unidad, y cuando el parámetro que separa las escalas tiempo tiende a cero éstos se desvanecen rápidamente frente a los de orden cero. Consistentemente con lo esperado por el mecanismo de la reacción enzimática, se encontró, que durante el transeúnte inicial la concentración del sustrato permanece igual a su valor inicial, mientras que las concentraciones de los complejos-enzima aumentan hasta un máximo. En éste se tiene el tiempo donde las soluciones del modelo asociado a esta etapa del transeúnte inicial se *empalman* con las soluciones correspondientes al modelo asociado a la etapa para tiempos mayores que la del transeúnte inicial, y para los cuales la concentración de sustrato disminuye considerablemente como lo hacen las concentraciones de los complejos-enzimas. Todo el análisis se realizó considerando valores realistas para las constantes cinéticas: k_{-3} , k_{-1} , k_1 , k_2 , k_3 y k_4 , y fueron ilustrados mediante representaciones gráficas.

Palabras claves: análisis cinético, ecuaciones diferenciales, análisis de perturbación, expansiones asintóticas, hipótesis de la QSSA.

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Resumen	iii
Introducción	1
1. Planteamiento del Problema	5
1.1. Descripción de la reacción bioquímica	5
1.2. Presentación del modelo matemático	6
1.3. Problema matemático a estudiar	7
2. Técnica de Perturbación Singular	11
2.1. Preliminares matemáticos	12
2.1.1. Aproximaciones asintóticas	14
2.1.2. Aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales	16
2.2. Descripción de la técnica de perturbación singular	17
3. Problemas de perturbación singular asociado a la cinética	21
3.1. Descripción de la cinética de estado estacionario. La QSSA	21
3.2. Determinación de las escalas de tiempo	22
3.3. Estimación del dominio de parámetros para el cual la QSSA es válida	25
3.4. Adimensionamiento del modelo matemático	26
3.5. Soluciones asintóticas y análisis	28
3.5.1. Soluciones asintóticas de orden $\mathcal{O}(1)$	29
3.5.2. Condición <i>matching</i>	33
3.5.3. Sobre las soluciones asintóticas de orde $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$	35
4. Conclusiones	39
A. Prueba de la Proposición 1.1	41

B. Desarrollo de las Expansiones Asintóticas	43
B.1. Expansiones Asintóticas Después del Transeúnte Inicial	43
B.2. Expansiones Asintóticas con la escala $\omega = \tau/\hat{\varepsilon}$	44
C. Deducción de las soluciones a $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$	47
Referencias	49

INTRODUCCIÓN

Las reacciones bioquímicas ocurren continuamente en todos los organismos vivos y muchas de ellas involucran proteínas llamadas *enzimas* [4], las cuales actúan como un eficiente catalizador. Las enzimas que participan en una reacción bioquímica determinada aceleran o inhiben el proceso de transformación en *productos* de otros compuestos que se denominan *sustratos*. Por ejemplo, la hemoglobina en las células sanguíneas es una enzima y el oxígeno con el cual se combina para producir un compuesto orgánico determinado es el sustrato. Por esta razón, las enzimas juegan un rol fundamental en la regulación de los procesos biológicos que debe ser entendido a fin de proponer mecanismos mediante los cuales se pueda seguir, en el tiempo, el curso de una determinada reacción bioquímica.

Para entender el rol que juegan las enzimas en las reacciones bioquímicas, se debe realizar un análisis dinámico denominado *cinética enzimática* [4]. La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones bioquímicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas [11]. Aun cuando los mecanismos enzimáticos pueden ser divididos en mecanismo de único sustrato o mecanismo de múltiples sustratos, es importante determinar la etapa controlante de la reacción, la velocidad a la que ocurre la reacción, la velocidad de cambio de las concentraciones de moléculas presentes y el tiempo en que ocurren o no cambios significativos en tales concentraciones, entre otros aspectos [19].

Con un estudio de la cinética enzimática de la reacción bioquímica se pueden estimar las velocidades a las que ocurren sus etapas, la evolución temporal de los reactivos, productos y las condiciones que influyen sobre la acción de las moléculas presentes en el mecanismo de reacción. Particularmente, la evolución temporal de los reactivos y productos puede ser monitoreada mediante el uso de modelos matemáticos que involucran la concentración de moléculas presentes en la reacción desde que ésta se inicia hasta que culmina.

La complejidad del proceso biológico y bioquímico es tal que el desarrollo de un modelo matemático simplificado es poco estándar y requiere que el fenómeno consi-

derado se conozca con detalle. De igual forma, el modelado también requiere de una parte no tan científica y más intuitiva que demanda un esfuerzo considerable por parte del investigador. Una vez obtenido un modelo matemático lo suficientemente representativo del fenómeno, se procede a su resolución, consistiendo en: verificar que el modelo es un problema matemático bien planteado (que exista solución única, o conjunto de soluciones, y que sea estable) y calcular las soluciones en situaciones bien particulares del fenómeno estudiado. En casi todos los casos, los modelos matemáticos que se plantean para estudiar la cinética de una reacción enzimática se presentan en forma de *ecuaciones diferenciales*, ordinarias o en derivadas parciales, que si resultan ser problemas bien planteados para ciertas condiciones iniciales, de fronteras y parámetros específicos, la mayoría de las veces la solución analítica o una fórmula cerrada adecuada no puede ser determinada [19]. Adicionalmente, estos modelos involucran variables y/o parámetros que se vuelven numéricamente muy grandes o pequeños, o se encuentran en la vecindad del valor de un parámetro o punto en donde la solución no es analítica. Por esta razón, es necesario el uso de las técnicas que proporciona el análisis numérico como rama del análisis matemático para proponer una aproximación funcional a la solución del problema. Particularmente se cuentan con las técnicas de análisis de perturbación mediante expansiones asintóticas [19] y, de manera específica, para el análisis cinético se cuentan con aquellas fundamentadas sobre las hipótesis del *casi estado de equilibrio de las especies reaccionantes* o *casi estado estacionario* (QSSA por sus siglas en inglés) [2, 14].

Por lo anterior, en este trabajo se presenta el análisis cinético de una reacción enzimática con fenómeno de cooperatividad enmarcada dentro de las reacciones bioquímicas con múltiples sustratos. El análisis cinético se realizó mediante el estudio de un modelo matemático planteado en términos de ecuaciones diferenciales ordinarias, cuyas soluciones fueron aproximadas mediante la técnica de perturbación basada en la QSSA debido a la presencia de dos escalas de tiempos diferentes en las que el mecanismo de la reacción procede. Para un entendimiento adecuado, el trabajo se estructuró de la manera siguiente: En el Capítulo 1 se plantea formalmente el modelo matemático que describe la evolución temporal de las concentraciones asociadas a las especies que intervienen en la reacción enzimática. Seguidamente en el Capítulo 2 se realiza una breve descripción de los fundamentos de la técnica de perturbación para el análisis cinético. El Capítulo 3 contiene los resultados fundamentales del trabajo. En este

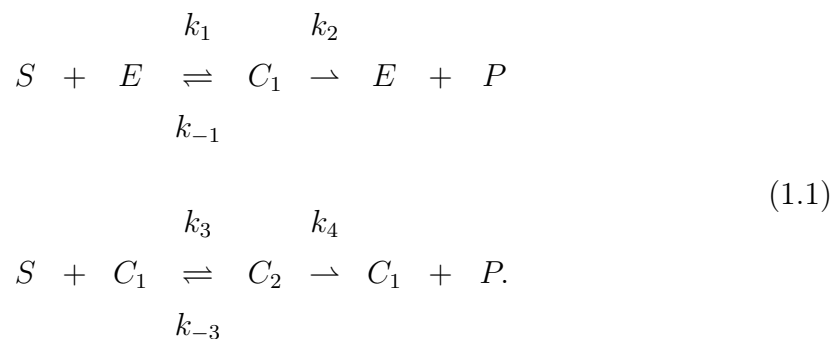
Capítulo se presentan los problemas de perturbación asociados al análisis cinético como consecuencia de un adimensionamiento del modelo matemático, tomando en cuenta la existencia de dos escalas de tiempo en las que ocurre la reacción bioquímica, y definiendo el parámetro de separación de ambas escalas como el parámetro característico del análisis de expansión asintótica. Finalmente, en el Capítulo 4 se presentan las conclusiones y algunas perspectivas para trabajos futuros.

CAPÍTULO 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la reacción bioquímica

En este trabajo se realiza el análisis cinético de una reacción bioquímica basada en un mecanismo de múltiples sustratos, denominada *reacción enzimática cooperativa*, que involucra dos partes y seis etapas en total. En esta reacción, la enzima está presente en tres posibles estados: una molécula libre que se denotará por E , una molécula compleja presente en la primera parte de la reacción que se denotará por C_1 y otra molécula compleja presente en la segunda parte de la reacción y que se denotará por C_2 . En efecto, el mecanismo de reacción se representa mediante las dos siguientes ecuaciones estequiométricas:



El mecanismo tiene la siguiente interpretación: en la primera ecuación una molécula del sustrato S se combina con una molécula de la enzima libre E para formar una molécula del complejo-enzima C_1 a una velocidad constante k_1 . En esta misma reacción, el complejo C_1 puede desdoblarse en el sentido inverso de la reacción a una velocidad constante k_2 para generar de nuevo el sustrato y la enzima, o produce una molécula de enzima libre y del producto P a una velocidad constante k_2 ; esto dependerá de la magnitud de ambas velocidades, k_1 y k_2 , involucradas. Luego, en la segunda reacción una molécula de sustrato se combina con el complejo-enzima C_1 para formar el complejo-enzima C_2 a una velocidad constante k_3 . Este complejo puede

desdoblarse bien sea para producir nuevamente al sustrato S y al complejo-enzima C_1 a una velocidad k_{-3} o producir una molécula del complejo-enzima C_1 y el producto P a una velocidad constante k_4 como tercera etapa de esta segunda ecuación estequiométrica; nuevamente esto dependerá de la magnitud relativa entre las velocidades constantes involucradas y el proceso de autoregulación que la propia enzima proporciona a la reacción. No obstante, en la literatura experimental especializada (ver [6]) se reportan restricciones bioquímicamente realistas sobre estas velocidades que fueron consideradas en este trabajo:

$$\left. \begin{aligned} k_4 > k_2 \gg (k_1 = k_2) \gg (k_{-1} = k_{-3}) \\ k_{-1} = k_{-3} \ll 1 \\ k_1 = k_3 = 1. \end{aligned} \right\} \quad (1.2)$$

1.2. Presentación del modelo matemático

Las ecuaciones que describen la evolución temporal de la concentración de las moléculas presentes, en la reacción bioquímica, se obtienen mediante la Ley de Acción de Masas que a continuación se define.

Definición 1.1 (Ley de Acción de Masas). La velocidad de una reacción química es proporcional al producto de las concentraciones de los reactivos, donde la constante de proporcionalidad es la **constante de velocidad**.

De acuerdo a esta definición, siguiendo muy de cerca la referencia [9], si denotamos por s , e , c_1 , c_2 y p las concentraciones para el sustrato, la enzima, los complejos-enzima y el producto de la reacción, entonces las ecuaciones para la evolución temporal de estas cantidades vienen dadas por:

$$\frac{ds}{dt} = -k_1se + (k_{-1} - k_3s)c_1 + k_{-3}c_2, \quad (1.3)$$

$$\frac{de}{dt} = -k_1es + k_1K_m c_1, \quad (1.4)$$

$$\frac{dc_1}{dt} = k_1es - (k_1K_m + k_3s)c_1 + k_3K'_m c_2, \quad (1.5)$$

$$\frac{dc_2}{dt} = k_3sc_1 - k_3K'_m c_2, \quad (1.6)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_2c_1 + k_4c_2, \quad (1.7)$$

en donde

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{y} \quad K'_m = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3}.$$

Se imponen condiciones iniciales apropiadas al sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (1.3)-(1.7) denotadas por:

$$s(0) = s_0, \quad e(0) = e_0, \quad \text{y} \quad c_1(0) = c_2(0) = p(0) = 0, \quad (1.8)$$

donde $e_0 \ll 1$ denota la concentración inicial de la enzima y $s_0 \gg 1$ la concentración inicial del sustrato.

Según el mecanismo, la enzima es liberada en la primera ecuación estequiométrica una vez que finaliza la reacción bioquímica. Matemática y bioquímicamente esta propiedad implica que la concentración e de la enzima es la *cantidad conservada* del sistema, por lo tanto una ecuación constitutiva o ley de conservación para la enzima se puede obtener sumando las ecuaciones diferenciales (1.4), (1.5) y (1.6); esto es:

$$e(t) = e_0 - (c_1(t) + c_2(t)). \quad (1.9)$$

La ecuación para la concentración $p(t)$ del producto puede desacoplarse del sistema e integrar una vez encontradas $c_1(t)$ y $c_2(t)$, como en el caso de la enzima, para obtener:

$$p(t) = \int_0^t (k_2 c_1 + k_4 c_2)(t) dt.$$

Así, usando (1.9), el modelo matemático que resulta es el siguiente

$$\frac{ds}{dt} = -k_1 e_0 s + [k_{-1} + (k_1 - k_3)s]c_1 + (k_{-3} + k_1 s)c_2, \quad (1.10)$$

$$\frac{dc_1}{dt} = k_1 e_0 s - [k_1 K_m + (k_1 + k_3)s]c_1 + (k_3 K'_m - k_1 s)c_2, \quad (1.11)$$

$$\frac{dc_2}{dt} = k_3 s c_1 - k_3 K'_m c_2, \quad (1.12)$$

sujeto a las condiciones iniciales

$$s(0) = s_0 \quad \text{y} \quad c_1(0) = c_2(0) = 0.$$

1.3. Problema matemático a estudiar

En esta sección presentamos los problemas matemáticos que se estudiaron en este trabajo con el propósito de analizar la cinética de la reacción enzimática cooperativa anteriormente descrita y cuya dinámica viene dada por el sistema de ecuaciones

diferenciales ordinarias (EDO's) no lineales (1.10)-(1.12). Estos problemas son consistentes con hipótesis realistas y mediciones de validación experimental hechas por biólogos matemáticos que pueden ser citadas en las referencias [19], [10] y [1].

Para especificar los problemas matemáticos consistentes con las situaciones bioquímicamente realistas, el modelo (1.10)-(1.12) se reescribe de la manera siguiente:

$$\frac{d\mathbf{u}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{u}), \quad (1.13)$$

en donde $\mathbf{u}(t) = (s(t), c_1(t), c_2(t))$ es el vector de concentraciones de las especies involucradas en la reacción y $\mathbf{f}(\mathbf{u})$ representa el *campo vectorial* del sistema cuyos elementos son las velocidades de producción de las especies dadas por la *ley de acción de masas*. Una consideración realista, adicional y acorde con el buen planteamiento del problema, es la siguiente:

$$\begin{aligned} 0 \leq s(t) \leq \|s\|_\infty &= \max_{\substack{t \in [0, T] \\ T > 0}} |s(t)| = s_0, \\ 0 \leq c_i(t) \leq \|c_i\|_\infty &= \max_{\substack{t \in [0, T] \\ T > 0}} |c_i(t)| = \hat{C}_i, \quad \text{para cada } i = 1, 2. \end{aligned}$$

Con esto, el dominio de validez para el campo vectorial \mathbf{f} es el conjunto $\bar{\Omega}$ de \mathbb{R}_+^3 definido por:

$$\bar{\Omega} = [0, s_0] \times [0, \hat{C}_1] \times [0, \hat{C}_2]. \quad (1.14)$$

Luego, el problema matemático principal se reduce al siguiente problema de Cauchy: dado un intervalo $[0, T]$, con $T > 0$ una constante fija, dada la función $\mathbf{f} : \bar{\Omega} \rightarrow \mathbb{R}^3$ y las constantes k_j , para $j \in \{-3, -1, 1, 2, 3, 4\}$; según las restricciones (1.2), encontrar la función $\mathbf{u} : [0, T] \rightarrow \bar{\Omega}$ tal que

$$\begin{cases} \frac{d\mathbf{u}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{u}), & \forall t \in (0, T] \\ \mathbf{u}(0) = \mathbf{u}^0, \end{cases} \quad (1.15)$$

en donde $\mathbf{u}^0 = (s_0, 0, 0)$ es el vector de condiciones iniciales del sistema. El buen planteamiento de este modelo como problema matemático, es decir: existencia, unicidad y estabilidad de soluciones, es inmediato gracias a las restricciones naturales de las variables y parámetros ya especificadas. Al respecto el siguiente resultado, cuya prueba se esquematiza en el Apéndice A, se tiene:

Proposición 1.1. *El problema de Cauchy (1.15) que describe la dinámica de la reacción enzimática cooperativa (1.1) posee una única solución \mathbf{u} que depende continuamente de la condición inicial \mathbf{u}^0 definida en el intervalo $[0, T]$ con $T > 0$ una constante fija.*

Los biólogos matemáticos, así como otros investigadores en cinética química, han establecido que un mecanismo de reacción detallado y preciso [1] no sólo involucra un gran número de especies, sino que también las etapas de estos mecanismos se dan sobre un amplio espectro de escalas de tiempo que pueden ir desde nanosegundos a minutos. En efecto, se ha encontrado que existen dos escalas de tiempos definidas de la manera siguiente [7, 19]: un transeúnte inicial $[0, t^*]$, con $0 < t^* \ll T$, en donde las concentraciones de algunas de las especies varían considerablemente rápido mientras que otras se mantienen aproximadamente invariantes; ésta se denomina *escala rápida*. La otra escala $(t^*, T]$, denominada *escala lenta*, es aquélla en donde las concentraciones de las especies que variaron rápidamente en el transeúnte inicial lo hacen con más lentitud, y se percibe de manera notable el cambio en la concentración de aquellas especies que se mantienen aproximadamente invariantes en el transeúnte inicial. Esta situación se presenta de manera bien particular en la reacción enzimática cooperativa considerada en este trabajo, además dificulta el análisis cinético debido a que el modelo matemático (1.15), a pesar de estar bien planteado, no captura el comportamiento de las concentraciones en el transeúnte inicial. En consecuencia, los métodos numéricos de integración usuales resultan poco adecuados para aproximar la solución del modelo matemático (1.15). Para solventar esto, los biólogos, con base en sus observaciones experimentales, suponen que en el transeúnte inicial la concentración del sustrato permanece invariante y aproximadamente igual a la concentración inicial ($s \approx s_0$), de manera tal que el modelo se reduce a un sistema de dos ecuaciones diferenciales ordinarias lineales para la variación de las concentraciones asociadas a los complejos-enzima c_1 y c_2 que son integrables; esta suposición es denominada *aproximación del pseudo-estado estacionario* o *aproximación del casi-estado estacionario* (QSSA por sus siglas en inglés). Posterior al transeúnte inicial se considera que las concentraciones de los complejos-enzima se mantienen casi constante e iguales a cero, además que la deflexión $\Delta s(t)$ de la concentración del sustrato es grande. Esto implica que las ecuaciones diferenciales para los complejos-enzima, dadas en el modelo (1.15), se transforman en dos ecuaciones algebraicas que pueden ser resueltas para c_1

y c_2 como función de la concentración s del sustrato, para luego ser sustituidas en la EDO del sustrato y así poder obtener una expresión del lado derecho sólo en función de s ; esta suposición después del transeúnte inicial también es denominada QSSA. Sin embargo, desde el punto de vista matemático, el modelo (1.15) pierde sentido debido a que las soluciones $c_1(t)$ y $c_2(t)$ que se obtienen no satisfacen las condiciones iniciales y sólo se tiene una EDO que define la dinámica completa del sistema; en efecto el sistema de ecuaciones algebraicas para las concentraciones c_1 y c_2 después del transeúnte inicial son restricciones y no ecuaciones de evolución. Esta situación es vista por los biólogos matemáticos como un abuso en el uso de la QSSA, pues no se consideran condiciones para los parámetros involucrados en el modelo bajo las cuales esta aproximación es válida y el modelo no pierda su condición de buen planteamiento después del transeúnte inicial. Aún más, no se definen con claridad las escalas de tiempo y la medida de separación entre ambas escalas para la cual el modelo matemático (1.15) es consistente con lo esperado desde el punto de vista bioquímico.

Por lo anteriormente planteado, y con el propósito de realizar el análisis cinético de la reacción enzimática con cooperatividad, en este trabajo se propone aplicar la QSSA al modelo (1.15) bajo el formalismo matemático de la *teoría de perturbación singular*. La aplicación sistemática de esta teoría permite establecer las condiciones de los parámetros bajo las cuales la QSSA es válida, el parámetro que representa la medida de separación entre las escalas de tiempo, rápida y lenta, y por ende definir de manera precisa estas escalas. Posteriormente se proponen dos adimensionamientos del modelo (1.15) que toman en cuenta cada escala de tiempo mediante el parámetro que las separa. Este es el parámetro característico de la teoría de perturbación con el cual las soluciones de los dos modelos adimensionales y equivalentes al modelo (1.15), se ajustan durante y después del transeúnte inicial. El estudio se realiza siguiendo muy de cerca las referencias [14], [16], [12], [2], [18].

CAPÍTULO 2

TÉCNICA DE PERTURBACIÓN SINGULAR

La solución analítica exacta para muchas ecuaciones diferenciales e integrales que provienen de situaciones reales en la mayoría de los casos no puede ser encontrada. Por solución exacta se entiende aquella que viene expresada en términos de funciones cuyas propiedades son conocidas o tabuladas: funciones de Bessel, funciones trigonométricas, funciones de Legendre, funciones exponenciales, entre otras. Tales soluciones exactas pueden resultar difíciles de manipular incluso desde el punto de vista computacional. Por ejemplo, una solución que involucre una serie infinita de funciones de Bessel regularmente convergente es de hecho poco manejable analítica y computacionalmente si interesa estudiar la dependencia de tal solución respecto de algún parámetro; lo cual es el caso frecuente en casos reales. Incluso dentro de la clase de ecuaciones lineales con las condiciones de frontera lineales, en las cuales las técnicas de transformadas son aplicables, la integral que representa la inversa de la solución transformada no puede ser integrable en términos adecuados, en el sentido útil para la representación de la solución al problema.

Muchas de las situaciones anteriormente citadas pueden ser solventadas haciendo uso del *análisis asintótico* del problema subyacente. En general, el análisis asintótico es la rama del análisis matemático concerniente al desarrollo de técnicas y soluciones analíticas aproximadas a tales problemas cuando un parámetro o alguna variable en la ecuación, o en su integral, llega a ser grande o pequeña o se encuentra en la vecindad del valor de un parámetro o un punto en el cual la solución no es analítica. Aunque algunas ideas del análisis asintótico ya se conocían en el siglo dieciséis y décimo octavo, fue Poincaré quien en 1886 dió una definición exacta de lo que se conoce como *expansión asintótica* y estableció los fundamentos del análisis asintótico moderno. La motivación principal en el vigésimo siglo se originó a partir del estudio de la mecánica de fluidos, pues las ecuaciones que la rigen son fundamentalmente no lineales y exhiben una cantidad abundante de parámetros que pueden ser pequeños

o grandes dependiendo de las situaciones prácticas relevantes que son cubiertas por ambos casos, de manera similar como se presenta en el análisis cinético de reacciones enzimáticas. Entre los grandes desarrollos en este área del análisis asintótico se encuentra la *Teoría de Perturbación Singular*. Esta teoría proporciona técnicas que se han desarrollado tanto desde el punto de vista formal como heurístico, y una gran cantidad de bibliografía adaptada a las situaciones reales de estudio pueden ser encontradas con relativa facilidad. Entre las referencias más relevantes con prospección al análisis cinético de reacciones enzimáticas se encuentra la obra de J. D. Murray [19] que se ha seguido en este trabajo.

El propósito de este capítulo es presentar algunos preliminares sobre la *técnica de perturbación singular* usada para llevar a cabo el análisis cinético de la reacción enzimática cooperativa, aplicada al modelo matemático (1.15). Los detalles y generalidades de la técnica pueden ser consultados en [18] y las referencias que se citan en la misma.

2.1. Preliminares matemáticos

A continuación se presentan algunas definiciones y resultados teóricos generales del análisis asintótico que, además de ser básicos y bien conocidos, pueden ser consultados en las referencias ya mencionadas arriba.

Definición 2.1 (*o chica*). Se dice que la solución $s(\varepsilon)$ es una *o chica* de $\delta(\varepsilon)$ cuando ε tiende a cero y se escribe

$$s(\varepsilon) = o(\delta(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.1)$$

si y sólo si para todo $\mu > 0$ se cumple $|s(\varepsilon)| \leq \mu|\delta(\varepsilon)|$ para todo $\varepsilon \in D$ (D un conjunto) tal que ε está suficientemente cercano a cero.

Observación:

La definición anterior significa que para todo $\mu > 0$ existe $\bar{\varepsilon} > 0$ tal que $|s(\varepsilon)| \leq \mu|\delta(\varepsilon)|$ para todo $\varepsilon \in (-\bar{\varepsilon}, \bar{\varepsilon}) \cap D$. En particular, si $\delta(\varepsilon)$ no se anula en D ,

$$\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon)}{\delta(\varepsilon)} \Rightarrow s(\varepsilon) = o(\delta(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.2)$$

Definición 2.2 (Desprecio y Dominación). Se dice que la solución $s(\varepsilon)$ es despreciable frente a $\delta(\varepsilon)$ cuando $\varepsilon \rightarrow 0$ y se escribe

$$s(\varepsilon) \ll \delta(\varepsilon) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.3)$$

si y sólo si $s(\varepsilon) = o(\delta(\varepsilon))$ cuando $\varepsilon \rightarrow 0$. Equivalentemente, se dice que $\delta(\varepsilon)$ es dominante frente a $s(\varepsilon)$ y se escribe

$$\delta(\varepsilon) \gg s(\varepsilon) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.4)$$

Observación

Las ideas de desprecio y dominación se refieren al comportamiento de la combinación lineal $c_1\delta(\varepsilon) + c_2s(\varepsilon)$ con $c_i \neq 0$, $i = 1, 2$ dos constantes reales. Cuando ε tiende a cero, si $s(\varepsilon) = o(\delta(\varepsilon))$, esta combinación se comporta esencialmente como su primer termino $c_1\delta(\varepsilon)$.

Definición 2.3 (\mathcal{O} grande). Se dice que $s(\varepsilon)$ es una \mathcal{O} grande de $\delta(\varepsilon)$ cuando ε tiende a cero y se escribe

$$s(\varepsilon) = \mathcal{O}(\delta(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.5)$$

si y sólo si existe una constante $C > 0$ tal que $|s(\varepsilon)| \leq C|\delta(\varepsilon)|$ para todo $\varepsilon \in D$ suficientemente cerca de cero.

Observación

De la definición tenemos $\bar{\varepsilon} > 0$ y $C > 0$ (independientes de ε) tales que $|s(\varepsilon)| \leq C|\delta(\varepsilon)|$ para todo $\varepsilon \in (-\bar{\varepsilon}, \bar{\varepsilon}) \cap D$. En particular, si $\delta(\varepsilon)$ no se anula en D

$$\frac{s(\varepsilon)}{\delta(\varepsilon)} \text{ es acotada en } (-\bar{\varepsilon}, \bar{\varepsilon}) \cap D \Rightarrow s(\varepsilon) = \mathcal{O}(\delta(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.6)$$

Definición 2.4 (Orden Estricto). Se dice que $s(\varepsilon)$ es estrictamente del orden de $\delta(\varepsilon)$ cuando ε tiende a cero y se escribe

$$s(\varepsilon) = \mathcal{O}_s(\delta(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.7)$$

si y sólo si $s(\varepsilon) = \mathcal{O}(\delta(\varepsilon))$ y $s(\varepsilon) \neq o(\delta(\varepsilon))$.

En particular, si $s(\varepsilon)$ y $\delta(\varepsilon)$ no se anulan en D .

$$\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon)}{\delta(\varepsilon)} \in \mathbb{R} - \{0\} \Rightarrow \begin{cases} s(\varepsilon) = \mathcal{O}_s(\delta(\varepsilon)), & (\varepsilon \rightarrow 0) \\ \delta(\varepsilon) = \mathcal{O}_s(s(\varepsilon)), & (\varepsilon \rightarrow 0) \end{cases} \quad (2.8)$$

Observación

Las definiciones (2.1)-(2.4) tienen sus analogías al restringirse las funciones s y δ a valores no negativos de ε ; en tal caso, se escribe $s(\varepsilon) = o(\delta(\varepsilon))$ cuando $\varepsilon \rightarrow 0^+$, $s(\varepsilon) \ll \delta(\varepsilon)$, cuando $\varepsilon \rightarrow 0^+$.

Teorema 2.1 (De la Función Implícita). *Sea $y = f(x, \varepsilon)$ con valores en \mathbb{R} tal que las derivadas parciales f_x y f_ε existen y son continuas. Sea $x_0 \in \mathbb{R}$ tal que $f(x_0, 0) = 0$. Si $f_x(x_0, 0) \neq 0$ entonces para algún $\bar{\varepsilon} > 0$ existe una única función $x = s(\varepsilon)$ definida en $(-\bar{\varepsilon}, \bar{\varepsilon})$ tal que $s(0) = x_0$ y $f(s(\varepsilon), \varepsilon) = 0$. Esta función de s es continuamente diferenciable y su derivada satisface*

$$s'(\varepsilon) = -\frac{f_\varepsilon(s(\varepsilon), \varepsilon)}{f_x(s(\varepsilon), \varepsilon)} \quad (2.9)$$

Teorema 2.2 (Taylor). *Sea s una función real n veces continuamente diferenciable en un intervalo abierto que contiene al cero. Entonces*

$$s(\varepsilon) = s(0) + \varepsilon s'(0) + \frac{1}{2}\varepsilon^2 s''(0) + \dots + \frac{1}{n!} s^{(n)}(0) \varepsilon^n + o(\varepsilon^n) \quad (2.10)$$

2.1.1. Aproximaciones asintóticas

Definición 2.5 (Sucesiones Asintóticas). *Sea una sucesión de funciones $\{\delta_n\}_n$ y una sucesión numérica $\{x_n\}_n$, se dice que $\sum_n x_n \delta_n(\varepsilon)$ es una aproximación asintótica de s cuando ε tiende a cero y se escribe*

$$s(\varepsilon) \sim \sum_n x_n \delta_n(\varepsilon) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.11)$$

si y sólo si

$$s(\varepsilon) = \sum_{n \leq m} x_n \delta_n(\varepsilon) + o(\delta_m(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.12)$$

para todo m .

Definición 2.6 (Equivalencia Asintótica). *Se dice que la función s es asintóticamente equivalente a la función δ cuando ε tiende a cero y se escribe*

$$s(\varepsilon) \sim \delta(\varepsilon) \quad (\varepsilon \rightarrow 0) \quad (2.13)$$

si y sólo si

$$\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon)}{\delta(\varepsilon)} = 1 \quad (2.14)$$

Observación

Si una función s tiene una aproximación asintótica

$$s(\varepsilon) \sim \sum_{n \geq 0} x_n \delta_n(\varepsilon) \quad (\varepsilon \rightarrow 0)$$

entonces, en términos de la sucesión asintótica $\{\delta_n\}_n$, esta aproximación es la única. En efecto, los coeficientes numéricos x_n están únicamente determinados. Al hallar x_0 , con $m = 0$, se tiene

$$s(\varepsilon) = x_0 \delta_0(\varepsilon) + o(\delta_0(\varepsilon)) \quad (\varepsilon \rightarrow 0)$$

Como $\delta_0(\varepsilon) \neq 0$ para ε suficientemente cercano al cero pero no nulo (por la definición de sucesión asintótica), entonces

$$\frac{s(\varepsilon)}{\delta_0(\varepsilon)} = x_0 + o(1)$$

Es decir

$$x_0 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon)}{\delta_0(\varepsilon)} \tag{2.15}$$

Similarmente

$$x_1 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon) - x_0 \delta_0(\varepsilon)}{\delta_1(\varepsilon)}$$

Además

$$x_n = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{s(\varepsilon) - \sum_{j < n} x_j \delta_j(\varepsilon)}{\delta_n(\varepsilon)} \tag{2.16}$$

para todo n . Cabe destacar que dos funciones distintas pueden tener la misma *aproximación asintótica* respecto de una sucesión asintótica dada.

Definición 2.7. Una función s cuya aproximación asintótica en términos de $\{\varepsilon^n\}_n$ es nula, se dice que es *trascendentalmente pequeña*.

Definición 2.8. Las aproximaciones asintóticas se pueden combinar linealmente, si $s(\varepsilon) \sim \sum_n x_n \delta_n(\varepsilon)$ y $\sigma(\varepsilon) \sim \sum_n \chi_n \delta_n(\varepsilon)$, entonces

$$(cs + \gamma\sigma)(\varepsilon) \sim \sum_n (cx_n + \gamma\chi_n) \delta_n(\varepsilon) \tag{2.17}$$

donde c y γ son dos constantes reales y ε tiende a cero.

Nota

Las aproximaciones asintóticas se pueden **multiplicar** si es posible ordenar los productos $\delta_n \delta_m$ resultantes para definir una sucesión asintótica, el caso sencillo es cuando $s(\varepsilon) \sim \sum_n x_n \delta_n(\varepsilon)$ y $\sigma(\varepsilon) \sim \sum_n \chi_n \delta_n(\varepsilon)$. Entonces

$$(s\sigma)(\varepsilon) \sim \sum_{n \geq 2m} \left(\sum_{j=m}^{n-m} x_j \chi_{n-j} \right) \varepsilon^n \quad (2.18)$$

donde m es un entero cualquiera y ε tiende a cero.

Definición 2.9 (Integración y Multiplicación). Una aproximación asintótica se puede **integrar** de 0 a ε si está bien definida la sucesión asintótica $\{\int_0^\varepsilon \delta_n(\tilde{\varepsilon}) d\tilde{\varepsilon}\}$. El caso sencillo es

$$s(\varepsilon) \sim \sum_{n \geq 0} x_n \varepsilon^n \Rightarrow \int_0^\varepsilon s(\tilde{\varepsilon}) d\tilde{\varepsilon} \sim \sum_{n \geq 1} \frac{x_{n-1}}{n} \varepsilon^n \quad (2.19)$$

donde ε tiende a cero.

En general no se puede **diferenciar** directamente una aproximación asintótica, esto sólo es posible bajo ciertas condiciones adicionales. De nuevo el caso relativamente sencillo es para $s(\varepsilon) \sim \sum_{n > m} x_n \varepsilon^n$ y $s'(\varepsilon) \sim \sum_{n \geq m} \chi_n \varepsilon^n$ cuando ε tiende a cero, lo cual implica que:

$$\chi_n = (n + 1)x_{n+1} \quad (\forall n \geq m).$$

Es decir, es necesario saber de antemano que $s'(\varepsilon)$ existe y admite una aproximación asintótica.

2.1.2. Aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales

Definición 2.10 (Problema de Valor Inicial). Dada una función f de dos variables y dados valores t_0 y s_0 , un problema que se presenta bajo la forma

$$\frac{dy}{dt} = f(t, y), \quad y(t_0) = s_0 \quad (2.20)$$

se denomina Problema de Valor Inicial (P.V.I.) y consiste en buscar una función diferenciable $y = s(t)$, definida en algun intervalo I que contenga a t_0 , tal que $\frac{ds}{dt}(t) = f(t, s(t))$ para todo $t \in I$ y tal que $s(t_0) = s_0$. La condición $y(t_0) = s_0$ se llama condición inicial aun cuando se integre tanto a la izquierda como a la derecha de $t = t_0$.

Teorema 2.3 (Básico para P.V.I). *Sea $z = f(t, y, \varepsilon)$ una función continuamente diferenciable de \mathbb{R}^3 a \mathbb{R} y sea $s_0 \in \mathbb{R}$. Entonces, para algún $\bar{t} > 0$ y algún $\bar{\varepsilon} > 0$, existe una única función $y = s(t; \varepsilon)$ continuamente diferenciable en $(-\bar{t}, \bar{t}) \times (-\bar{\varepsilon}, \bar{\varepsilon})$ tal que $\dot{s}(t; \varepsilon) = f(t, s(t; \varepsilon), \varepsilon)$ y $s(0; \varepsilon) = s_0$. La derivada parcial $s_\varepsilon = \partial s / \partial \varepsilon$ satisface el P.V.I.*

$$\dot{s}_\varepsilon = f_y(t, s(t; \varepsilon), \varepsilon) + f_\varepsilon(t, s(t; \varepsilon), \varepsilon), \quad s_\varepsilon(0; \varepsilon) = 0 \quad (2.21)$$

En la sección siguiente, con base a los conceptos y resultados expuestos en esta sección, se describe la técnica de perturbación singular que se utilizó en este trabajo.

2.2. Descripción de la técnica de perturbación singular

La dinámica o análisis cinético de una reacción enzimática se puede describir en forma general mediante un sistema de EDO's

$$\frac{d\mathbf{u}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{u}), \quad (2.22)$$

en donde $\mathbf{u}(t)$ es el vector de concentraciones de las especies y $\mathbf{f}(\mathbf{u})$ representa el *campo vectorial* del sistema cuyos elementos son las velocidades de producción de las especies dadas por la *ley de acción de masas* aplicada sobre el mecanismo de reacción. La teoría de perturbación singular será efectiva cuando las concentraciones se clasifiquen en rápidas y lentas como ya se mencionó antes. Esto significa que el conjunto de variables evolucionan en dos escalas de tiempo distintas y separadas. Usualmente, la separación entre las escalas de tiempo se mide mediante un *parámetro arbitrariamente pequeño* $\hat{\varepsilon}$. En este caso la ecuación (2.22) adquiere la forma *singularmente perturbada*:

$$\frac{d\mathbf{u}_\ell}{dt} = \hat{\varepsilon} \mathbf{f}_\ell(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, \hat{\varepsilon}) \quad (2.23)$$

$$\frac{d\mathbf{u}_r}{dt} = \mathbf{f}_r(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, \hat{\varepsilon}) \quad (2.24)$$

en donde $\mathbf{u}_\ell \in \mathbb{R}^m$ es el vector de variables lentas, $\mathbf{u}_r \in \mathbb{R}^n$ el vector de variables rápidas y en donde se considera que $\mathbf{f}_\ell \in \mathbb{R}^m$ y $\mathbf{f}_r \in \mathbb{R}^n$ tal como sus derivadas a orden $\mathcal{O}(1)$. Note que t puede ser referido como el tiempo rápido que define la escala de tiempo sobre la cual las variables rápidas evolucionan. Por esta razón el sistema (2.23)-(2.24) puede ser identificado como el *sistema rápido*. Definiendo la escala de

tiempo para las variables lentas como $\tau = \hat{\varepsilon}t$, el sistema (2.23)-(2.24) adquiere una forma equivalente (o *sistema lento*):

$$\frac{d\mathbf{u}_\ell}{d\tau} = \mathbf{f}_\ell(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, \hat{\varepsilon}) \quad (2.25)$$

$$\hat{\varepsilon} \frac{d\mathbf{u}_r}{d\tau} = \mathbf{f}_r(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, \hat{\varepsilon}) \quad (2.26)$$

En el límite $\hat{\varepsilon} \rightarrow 0$, el sistema (2.25)-(2.26) se reduce a

$$\frac{d\mathbf{u}_\ell}{d\tau} = \mathbf{f}_\ell(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, 0) \quad (2.27)$$

$$0 = \mathbf{f}_r(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r, 0) \quad (2.28)$$

en donde la primera ecuación describe la evolución de las variables lentas y la segunda ecuación representa una *restricción algebraica* que confina al sistema reducido lento a una variedad denominada *variedad lenta reducida* y que se denotará por \mathcal{M}_0 . Si \mathbf{h}_0 es una función a valor vectorial (definida en \mathbb{R}^m) tal que $\mathbf{f}_r(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{h}_0(\mathbf{u}_\ell), 0) = \mathbf{0}$, entonces la variedad lenta reducida puede ser definida como:

$$\mathcal{M}_0 = \{(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r)^T \in \mathbb{R}^{m+n}; \mathbf{u}_r = \mathbf{h}_0(\mathbf{u}_\ell)\} \quad (2.29)$$

El método de reducción que propone la técnica de perturbación, al igual que todos los métodos de reducción, considera que cada punto $(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{h}_0(\mathbf{u}_\ell)) \in \mathcal{M}_0$ es un *punto fijo asintóticamente estable* para la ecuación (2.24).

La teoría de perturbación geométrica (GSPT por su siglas en ingles), bajo las hipótesis anteriores, garantiza la existencia de una *variedad invariante lenta* \mathcal{M}_ε para $\hat{\varepsilon}$ suficientemente pequeño, la cual es una perturbación de \mathcal{M}_0 , que tiene la misma dimensión y es invariante bajo el sistema (2.23)-(2.24). Aún más, \mathcal{M}_ε es *atractiva exponencialmente* para toda *trayectoria entorno* del sistema (2.23)-(2.24). El siguiente teorema resume estas conclusiones:

Teorema 2.4. *Para todo $\hat{\varepsilon}$ suficientemente pequeño, existe una función \mathbf{h}_ε , tal que el gráfico*

$$\mathcal{M}_\varepsilon = \{(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{u}_r)^T \in \mathbb{R}^{m+n}; \mathbf{u}_r = \mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell)\} \quad (2.30)$$

*es invariante bajo el sistema dinámico (2.22)-(2.24). Se dice que \mathcal{M}_ε es la **variedad invariante lenta** para tal sistema. La función \mathbf{h}_ε admite una **expansión asintótica** para $\hat{\varepsilon} \rightarrow 0$,*

$$\mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell) = \mathbf{h}_0(\mathbf{u}_\ell) + \hat{\varepsilon}\mathbf{h}_1(\mathbf{u}_\ell) + \hat{\varepsilon}^2\mathbf{h}_2(\mathbf{u}_\ell) + \dots \quad (2.31)$$

La dinámica para grandes tiempos del sistema (2.23)-(2.24) se rige por la ecuación (2.25)

$$\frac{d\mathbf{u}_\ell}{d\tau} = \mathbf{f}_\ell(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell), \hat{\varepsilon}) \quad (2.32)$$

restringida sobre \mathcal{M}_ε , con $\tau = \hat{\varepsilon}t$.

Note que los coeficientes $\mathbf{h}_1, \mathbf{h}_2, \dots$ pueden ser determinados imponiendo la invarianza de la variedad, es decir, sustituyendo la ecuación definida por (2.30) en la ecuación (2.26) de tal modo que se obtenga la siguiente *ecuación invariante*:

$$\hat{\varepsilon} D\mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell) \mathbf{f}_\ell(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell), \hat{\varepsilon}) = \mathbf{f}_r(\mathbf{u}_\ell, \mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell), \hat{\varepsilon}) \quad (2.33)$$

en donde se reemplazó $\frac{d\mathbf{u}_r}{d\tau} = D\mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell) \frac{d\mathbf{u}_\ell}{d\tau}$ y en donde $D\mathbf{h}_\varepsilon(\mathbf{u}_\ell)$ se entiende como la matriz de tamaño $n \times m$ cuyos coeficientes vienen dados por

$$\frac{\partial h_\varepsilon^i}{\partial u_\ell^j}.$$

Si el sistema original en efecto posee una variedad invariante lenta, entonces este puede ser reducido a un sistema mucho más pequeño para la evolución de las variables lentas solamente, restringido sobre la variedad \mathcal{M}_ε . La pregunta fundamental de cualquier método de reducción es, por lo tanto, con qué tanta precisión se puede aproximar \mathcal{M}_ε . Para poder responder esto, se debe señalar que la forma singularmente perturbada explícita del sistema (2.23)-(2.24) nunca está disponible en sistemas físico-químicos complejos, en donde la determinación de las variables lentas y rápidas y el parámetro $\hat{\varepsilon}$ es una parte sustancial del proceso. Los métodos de reducción basados en teoría de perturbación singular, por lo tanto, deben proporcionar algoritmos automáticos capaces de recuperar \mathcal{M}_ε y la forma asintótica reducida (2.32).

CAPÍTULO 3

PROBLEMAS DE PERTURBACIÓN SINGULAR ASOCIADOS A LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA COOPERATIVA. SOLUCIONES ASINTÓTICAS Y ANÁLISIS

En este capítulo se presentan los problemas de perturbación singular que describen la cinética de la reacción enzimática cooperativa durante el transeúnte inicial, o etapa rápida, y luego del transeúnte inicial o etapa lenta. Las soluciones serán determinadas y un breve análisis del comportamiento de éstas en los intervalos de ambas escalas será expuesto de manera consistente con lo esperado realmente.

De manera bien natural con el análisis cinético de la reacción enzimática, el presente capítulo comienza con una breve descripción de la cinética del estado estacionario, en base a la aproximación QSSA, siguiendo muy de cerca los trabajos de Schnell y Mendoza en [15] y [16]. Esta descripción permitirá definir bien el parámetro de separación entre las escalas de tiempo y por lo tanto dichas escalas. Seguidamente, se presenta la versión adimensionalizada del modelo matemático que desde el punto de vista de la teoría de perturbación singular proporciona la forma lenta del mismo; a partir de esta versión se obtiene el problema de perturbación singular que representa la forma rápida del modelo matemático. El desarrollo en este capítulo se presenta de manera sistemática y la prueba de algunos lemas, proposiciones y cálculos detallados estarán referidos a fuentes especializadas y/o anexos dentro del trabajo.

3.1. Descripción de la cinética de estado estacionario. La QS-SA

La mayoría de los experimentos cinéticos en reacciones enzimáticas se centran en medir la velocidad de reacción [11, 3], y las observaciones han llevado a considerar dos suposiciones diferentes que conforman la aproximación al casi estado estacionario o QSSA. En primer lugar, cuando la enzima es mezclada con un gran exceso

de sustrato, el intermediario enzima-sustrato se forma y acumula en un transeúnte inicial rápido $[0, t^*]$ con $t^* \ll T$ para cualquier $T > 0$ fijo. Como el sustrato está en exceso durante este transeúnte inicial, se puede considerar que $s(t) \approx s_0$ para todo $t \in [0, t^*]$. Al final de este transeúnte inicial rápido, la reacción alcanza un estado estacionario cinético y las concentraciones $c_i(t)$, para $i = 1, 2$ y todo $t \in [0, t^*]$, permanecen aproximadamente constantes tal como la velocidad de reacción cambia de manera relativamente lenta. Esto implica que la deflexión $\Delta s(t)$ de la concentración es despreciablemente pequeña frente a la correspondiente deflexión de los productos (complejos enzima-sustrato y productos principales) y la velocidad máxima inicial de la deflexión del sustrato [2]. Con esto se tiene que

$$\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right| = \frac{t^*}{s_0} \left\| \frac{ds}{dt} \right\|_{\infty} \ll 1. \quad (3.1)$$

Después del transeúnte inicial, es decir para todo $t > t^*$, las concentraciones c_i , $i = 1, 2$, de los complejos-enzima permanecen aproximadamente constantes. Esto es, en el estado casi estacionario se puede considerar que $\frac{dc_i}{dt} \approx 0$. Desde el punto de vista bioquímico, esta aproximación toma vigencia cuando existe un tiempo

$$t_s \gg t^*, \quad \therefore \frac{t^*}{t_s} \ll 1, \quad (3.2)$$

en el que la concentración s del sustrato cambia de manera mucho más significativa que en el transeúnte inicial. Es decir, cuando la deflexión de la concentración del sustrato Δs es considerablemente mucho más grande que la de los productos.

Las expresiones (3.1) y (3.2) que provee la QSSA proporcionan dos hipótesis para las cuales esta aproximación es válida. Ambas hipótesis son utilizadas para establecer matemáticamente las escalas de tiempo y el parámetro $\hat{\varepsilon}$ que las separa; con esas hipótesis se establece el dominio de validez de los parámetros y se proponen los problemas de perturbación asociados al análisis cinético.

3.2. Determinación de las escalas de tiempo

Con la primera hipótesis de la QSSA el modelo (1.10)-(1.12) se transforma en el siguiente sistema de dos EDO's lineales para las concentraciones de los complejos-enzima.

$$\frac{d\mathbf{c}}{dt}(t) = A\mathbf{c}(t) + \mathbf{b}, \quad (3.3)$$

donde: $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^2$ es el vector de concentraciones, $A \in \mathbb{R}^{2 \times 2}$ y $\mathbf{b} \in \mathbb{R}^2$ dependen solamente de s_0 . Para este sistema de EDO's lineales, la solución para cada componente del vector \mathbf{c} viene dada por

$$\begin{aligned} c_1(t) &= C_{11}e^{\lambda_1 t} + C_{12}e^{\lambda_2 t} + \bar{C}_1 \\ c_2(t) &= C_{21}e^{\lambda_1 t} + C_{22}e^{\lambda_2 t} + \bar{C}_2, \end{aligned} \tag{3.4}$$

en donde $C_{i,j}$, $i, j \in \{1, 2\}$, son constantes de integración a determinar usando las condiciones iniciales $c_1(0) = c_2(0) = 0$, \bar{C}_1 y \bar{C}_2 son constantes dadas, en este caso, por las siguientes expresiones

$$\bar{C}_1 = \frac{\sigma e_0}{\sigma\sigma' + \sigma + 1} \quad \text{y} \quad \bar{C}_2 = \frac{\sigma\sigma' e_0}{\sigma\sigma' + \sigma + 1}, \tag{3.5}$$

con

$$\sigma = \frac{s_0}{K_m} \quad \text{y} \quad \sigma' = \frac{s_0}{K'_m}.$$

Las soluciones en (3.4) tienden a cero cuando $t \rightarrow \infty$ ya que λ_1 y λ_2 son autovalores reales estrictamente negativos gracias a las restricciones particulares (1.2) que se están considerando en este trabajo. En efecto, estos autovalores vienen dados por la siguiente expresión

$$\lambda_{1,2} = -\frac{K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')}{2}(1 \mp \sqrt{1 - \varepsilon}). \tag{3.6}$$

En esta expresión

$$K_\delta = k_1 K_m, \quad K'_\delta = k_3 K'_m \quad \text{y} \quad \varepsilon = \frac{4K_\delta K'_\delta (\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{\left(K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')\right)^2}.$$

También, por las restricciones (1.2), se tiene que $K_\delta \ll K'_\delta$ y el siguiente lema se establece.

Lema 3.1. *Para el corto período de estado estacionario, $\varepsilon \ll 1$.*

Demostración. Es físicamente realista considerar que $\varepsilon \ll 1$ para el corto período del estado estacionario, pero este hecho también es matemáticamente cierto. Específicamente, si se supone por contradicción que $\varepsilon \gg 1$, entonces se tiene que $\sqrt{1 - \varepsilon}$ es un número complejo puro y por lo tanto λ_1 y λ_2 no son autovalores estrictamente negativos. Luego, $\varepsilon \ll 1$. \square

Con el Lema anterior, los autovalores vienen dados por

$$\lambda_1 = -\frac{K_\delta K'_\delta(\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')} + \mathcal{O}(\varepsilon^2), \quad (3.7)$$

$$\lambda_2 = -[K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')] + \mathcal{O}(\varepsilon^2). \quad (3.8)$$

Ahora, para determinar la escala de tiempo t^* se elige el autovalor que posea menor magnitud. Para esto, el siguiente lema se requiere.

Lema 3.2. λ_2 es mucho más pequeño que λ_1

Demostración. En efecto, si por contradicción se supone que $\lambda_2 \gg \lambda_1$, entonces se tiene que

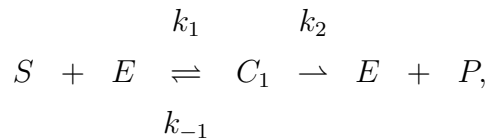
$$\begin{aligned} -[K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')] &\gg -\frac{K_\delta K'_\delta(\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')} \\ [K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')] &\ll \frac{K_\delta K'_\delta(\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')} \\ 1 &\ll \frac{K_\delta K'_\delta(\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{\left[K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')\right]^2} \\ 4 &\ll \frac{4K_\delta K'_\delta(\sigma\sigma' + \sigma + 1)}{\left[K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')\right]^2} \\ (\text{---}) 4 &\ll \varepsilon. \end{aligned}$$

Por lo tanto $\lambda_2 \ll \lambda_1$. □

Con el resultado anterior, se tiene que la escala de tiempo más pequeña que garantiza la validez de la QSSA es

$$t^* = \left| \frac{1}{\lambda_2} \right| \approx \frac{1}{K_\delta(1 + \sigma) + K'_\delta(1 + \sigma')}. \quad (3.9)$$

Note que si $k_3 = 0$ entonces $K'_\delta(1 + \sigma') = 0$ y la escala de tiempo es la misma que se reporta en [19] para el mecanismo de reacción de Michaelis-Menten dado por



es decir: se tiene el caso donde la cooperatividad enzimática debida al complejo C_1 reaccionando con sustrato S no existe.

Para estimar la escala de tiempo t_s , en la cual $s(t)$ cambia significativamente, se toma el máximo cambio posible en el sustrato, específicamente s_0 dividido por el tamaño de la máxima velocidad de cambio de $s(t)$, es decir

$$t_s \approx \frac{s_0}{\left\| \frac{ds}{dt} \right\|_{\infty}}, \quad (3.10)$$

donde

$$\left\| \frac{ds}{dt} \right\|_{\infty} = v_0 = \frac{dp}{dt} = k_2 c_1(s_0) + k_4 c_2(s_0),$$

con

$$c_1(s_0) = \frac{K'_m e_0 s_0}{K'_m (K_m + s_0) + s_0^2} \quad \text{y} \quad c_2(s_0) = \frac{e_0 s_0^2}{K'_m (K_m + s_0) + s_0^2},$$

las cuales se obtienen al suponer que durante esta escala: $\frac{d\mathbf{c}}{dt} \approx \mathbf{0}$. Entonces se tiene

$$t_s \approx \frac{K'_m (K_m + s_0) + s_0^2}{v_{\text{máx}} K'_m + v'_{\text{máx}} s_0},$$

donde

$$v_{\text{máx}} = k_2 e_0 \quad \text{y} \quad v'_{\text{máx}} = k_4 e_0.$$

En efecto

$$t_s = \frac{\rho}{e_0}$$

donde

$$\rho = \frac{K'_m (K_m + s_0) + s_0^2}{k_2 K'_m + k_4 s_0}.$$

3.3. Estimación del dominio de parámetros para el cual la QSSA es válida

La hipótesis $t^* \ll t_s$ para la cual la QSSA es válida implica la siguiente relación de restricción para los parámetros

$$\rho^{-1} \frac{e_0}{|\lambda_2|} \ll 1. \quad (3.11)$$

La otra hipótesis de validez para la QSSA:

$$\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right| \ll 1,$$

proporciona otro requerimiento sobre los parámetros dado por la siguiente expresión:

$$\tilde{\varepsilon} = \frac{k_1 e_0}{|\lambda_2|} \ll 1. \quad (3.12)$$

Para obtener este requerimiento sobre los parámetros, se sobre-estimó $\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right|$ mediante la máxima velocidad de deflexión posible $\|ds/dt\|_\infty$, la cual es igual a $k_1 e_0 s_0$ usando la EDO para el sustrato s , multiplicada por t^*/s_0 .

Por la condición (3.11), la expresión (3.12) puede ser reescrita de la manera siguiente

$$\frac{\tilde{\varepsilon}}{k_1 \rho} \ll 1. \quad (3.13)$$

La condición (3.13) garantiza la validez de la QSSA. Además, aún cuando $e_0/s_0 = \mathcal{O}(1)$, se sigue satisfaciendo si K_m y K'_m son grandes.

3.4. Adimensionamiento del modelo matemático y problema de perturbación singular asociado

El adimensionamiento del modelo (1.10)-(1.12) depende crucialmente de las dos escalas de tiempo t^* y t_s que se determinaron. La elección de estas escalas dependerá de la solución deseada: como ya se señaló anteriormente, con t^* se obtiene la solución en la región cerca de $t = 0$, mientras que con t_s se obtiene la solución para la cual $s(t)$ cambia significativamente. Un problema que involucre las dos escalas de tiempo generalmente es un problema de *perturbación singular* para el cual las técnicas de análisis se han expuesto en el Capítulo 2.

En este orden de ideas, considerando el hecho de que $e_0 \ll s_0$ durante la escala de tiempo t^* y las restricciones de validez para la QSSA establecidas anteriormente para $t_s \gg t^*$, se introducen las siguientes variables y constantes adimensionales

$$u(\tau) = \frac{s(t)}{s_0}, \quad v_1(\tau) = \frac{c_1(t)}{e_0}, \quad v_2(\tau) = \frac{c_2(t)}{e_0}, \quad \tau = k_1 e_0 t, \quad (3.14)$$

$$\left. \begin{aligned} \alpha_1 &= \frac{k_{-1}}{k_1 s_0}, & \alpha_2 &= \frac{k_2}{k_1 s_0}, & \alpha_3 &= \frac{k_3}{k_1} \\ \alpha_4 &= \frac{k_{-3}}{k_1 s_0}, & \alpha_5 &= \frac{k_4}{k_1 s_0} & \hat{\varepsilon} &= \frac{|\lambda_2|}{k_1 s_0} \tilde{\varepsilon} \end{aligned} \right\}, \quad (3.15)$$

para obtener el siguiente problema correspondiente al sistema lento

$$\frac{du}{d\tau} = -u + [\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u]v_1 + (\alpha_4 + u)v_2, \quad (3.16)$$

$$\hat{\varepsilon} \frac{dv_1}{d\tau} = u - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u]v_1 + (\alpha_4 + \alpha_5 - u)v_2, \quad (3.17)$$

$$\hat{\varepsilon} \frac{dv_2}{d\tau} = \alpha_3 uv_1 - (\alpha_4 + \alpha_5)v_2, \quad (3.18)$$

el cual se complementa con las siguientes condiciones iniciales

$$u(0) = 1, \quad v_1(0) = v_2(0) = 0. \quad (3.19)$$

El hecho de que el parámetro pequeño $0 < \hat{\varepsilon} \ll 1$ multiplica las derivadas en (3.17) y (3.18) indica que éste es un problema de *perturbación singular*. Esta clase de problemas se identifica de manera fácil si, al tomar $\hat{\varepsilon} = 0$, el orden del sistema de EDO's se reduce; tal sistema reducido en general no satisface las condiciones iniciales. La idea es entonces utilizar la técnica de perturbación singular para determinar la *solución asintótica* del sistema de ecuaciones para $\hat{\varepsilon}$ pequeño. Tal solución se corresponde con aquéllas que describen el comportamiento de las concentraciones de las especies que intervienen en la reacción enzimática después del transeúnte inicial t^* , es decir para $\tau > 0$ en el sistema de EDO's (3.16)-(3.17)-(3.18). Sin embargo, el comportamiento de las concentraciones durante el transeúnte inicial también puede ser obtenido a partir del sistema (3.16)-(3.17)-(3.18), estudiándolo para τ cercano de cero. Para esto, se realiza un cambio en la escala de tiempo del sistema (3.16)-(3.17)-(3.18) apropiado para percibir el comportamiento de las variables cerca de $\tau = 0$. En efecto, se propone la siguiente transformación

$$\omega = \frac{\tau}{\hat{\varepsilon}};$$

ésta hace que

$$\hat{\varepsilon} \frac{dv_1}{d\tau} = \frac{dv_1}{d\omega} \quad \text{y} \quad \hat{\varepsilon} \frac{dv_2}{d\tau} = \frac{dv_2}{d\omega}.$$

El efecto de la transformación $\omega = \frac{\tau}{\hat{\varepsilon}}$ es el de magnificar el entorno de $\tau = 0$ y poder observar de manera más cercana la región correspondiente al transeúnte inicial t^* , ya que, para $0 < \tau \ll 1$ fijo, se tiene que $\omega \gg 1$ cuando $\hat{\varepsilon} \rightarrow 0$. Se usará esto para analizar (3.16)-(3.18) alrededor de $\tau = 0$, después de lo cual se obtendrá la solución asintótica fuera del entorno de $\tau = 0$, y finalmente se dará una solución asintótica válida para $\tau \geq 0$.

Con las transformaciones

$$\omega = \frac{\tau}{\hat{\varepsilon}}, \quad u(\tau; \hat{\varepsilon}) = \bar{u}(\omega; \hat{\varepsilon}), \quad v_1(\tau; \hat{\varepsilon}) = \bar{v}_1(\omega; \hat{\varepsilon}), \quad v_2(\tau; \hat{\varepsilon}) = \bar{v}_2(\omega; \hat{\varepsilon}) \quad (3.20)$$

las ecuaciones en (3.16)-(3.18) se transforman en el siguiente problema correspondiente al sistema rápido

$$\frac{d\bar{u}}{d\omega} = \hat{\varepsilon}(-\bar{u} + [\alpha_1 + (1 - \alpha_3)\bar{u}]\bar{v}_1 + (\alpha_4 + \bar{u})\bar{v}_2), \quad (3.21)$$

$$\frac{d\bar{v}_1}{d\omega} = \bar{u} - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}]\bar{v}_1 + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u})\bar{v}_2, \quad (3.22)$$

$$\frac{d\bar{v}_2}{d\omega} = \alpha_3\bar{u}\bar{v}_1 - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_2, \quad (3.23)$$

con las condiciones iniciales

$$\bar{u}(0) = 1, \quad \bar{v}_1(0) = \bar{v}_2(0) = 0.$$

3.5. Soluciones asintóticas y análisis

Al utilizar de manera sistemática la técnica de perturbación singular, primero se estudia la solución asintótica externa del sistema (3.16)-(3.18) en la forma de una expansión regular en serie de Taylor para cada variable dada por

$$u(\tau; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n u_n(\tau), \quad v_1(\tau; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n v_{1,n}(\tau), \quad v_2(\tau; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n v_{2,n}(\tau). \quad (3.24)$$

Con esto, la sucesión de ecuaciones correspondiente a los ordenes $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ vienen dadas por (ver detalles en el Apéndice B):

$$\mathcal{O}(1) : \begin{cases} \frac{du_0}{d\tau} = -u_0 + [\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0]v_{1,0} + (\alpha_4 + u_0)v_{2,0}, \\ 0 = u_0 - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u_0]v_{1,0} + (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)v_{2,0}, \\ 0 = \alpha_3 u_0 v_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5)v_{2,0}, \end{cases} \quad (3.25)$$

$$\mathcal{O}(\hat{\varepsilon}) : \begin{cases} \frac{du_1}{d\tau} = [(1 - \alpha_3)v_{1,0} + v_{2,0} - 1]u_1 + [\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0]v_{1,1} + (\alpha_4 + u_0)v_{2,1}, \\ \frac{dv_{1,0}}{d\tau} = [1 - (1 + \alpha_3)v_{1,0} - v_{2,0}]u_1 - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u_0]v_{1,1} \\ \quad \quad \quad + (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)v_{2,1}, \\ \frac{dv_{2,0}}{d\tau} = \alpha_3(u_0 v_{1,1} + u_1 v_{1,0}) - (\alpha_4 + \alpha_5)v_{2,1}, \end{cases} \quad (3.26)$$

las cuales son válidas para $\tau > 0$. Las soluciones de esta sucesión de ecuaciones, por cada orden, involucran constantes de integración que deben ser determinadas *empalmando* ambas soluciones cuando $\tau \rightarrow 0$ con las soluciones singulares cuando $\omega \rightarrow \infty$.

En segundo lugar se estudia la solución asintótica interna del sistema (3.16)-(3.18) haciendo uso del sistema (3.21)-(3.23) y la expansión regular para cada variable dada por

$$\bar{u}(\omega; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n \bar{u}_n(\omega), \quad \bar{v}_1(\omega; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n \bar{v}_{1,n}(\omega), \quad \bar{v}_2(\omega; \hat{\varepsilon}) = \sum_{n=0} \hat{\varepsilon}^n \bar{v}_{2,n}(\omega). \quad (3.27)$$

En efecto, la sucesión de ecuaciones correspondiente a los ordenes $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ para el sistema lento vienen dadas por (ver detalles en el Apéndice B):

$$\mathcal{O}(1) : \begin{cases} \frac{d\bar{u}_0}{d\omega} = 0, \\ \frac{d\bar{v}_{1,0}}{d\omega} = \bar{u}_0 - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0]\bar{v}_{1,0} + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u}_0)\bar{v}_{2,0}, \\ \frac{d\bar{v}_{2,0}}{d\omega} = \alpha_3\bar{u}_0\bar{v}_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,0}, \end{cases} \quad (3.28)$$

$$\mathcal{O}(\hat{\varepsilon}) : \begin{cases} \frac{d\bar{u}_1}{d\omega} = -\bar{u}_0 + [\alpha_1 + (1 - \alpha_3)\bar{u}_0]\bar{v}_{1,0} + (\alpha_4 + \bar{u}_0)\bar{v}_{2,0}, \\ \frac{d\bar{v}_{1,1}}{d\omega} = [1 - (1 + \alpha_3)\bar{v}_{1,0} - \bar{v}_{2,0}]\bar{u}_1 - [\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0]\bar{v}_{1,1} \\ \qquad \qquad \qquad + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u}_0)\bar{v}_{2,1}, \\ \frac{d\bar{v}_{2,1}}{d\omega} = \alpha_3(\bar{u}_0\bar{v}_{1,1} + \bar{u}_1\bar{v}_{1,0}) - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,1}. \end{cases} \quad (3.29)$$

3.5.1. Soluciones asintóticas de orden $\mathcal{O}(1)$

Las soluciones asintóticas de orden $\mathcal{O}(1)$ se obtienen de los sistemas (3.25) y (3.28). Estas soluciones son de principal interés en este trabajo, ya que describen el comportamiento de las concentraciones en las escalas de tiempo para las cuales la QSSA es válida. Además se espera que estas soluciones se correspondan con lo observado experimentalmente en los estudios de cinética enzimática cuando se quiere medir la velocidad de la reacción bioquímica.

La situación particular en la aproximación de (3.25), como se mencionó antes, es que posee una sola ecuación diferencial y dos ecuaciones algebraicas simples que no

satisfacen las condiciones iniciales; en efecto si $u_0(0) = 1$ entonces

$$v_{1,0}(0) = \frac{1}{1 + \kappa_1 + \kappa_2} \neq 0 \quad \text{y} \quad v_{2,0}(0) = \frac{\kappa_2}{1 + \kappa_1 + \kappa_2} \neq 0,$$

donde

$$\kappa_1 = \alpha_1 + \alpha_2, \quad \kappa_2 = \frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}.$$

Si se resuelven las ecuaciones algebraicas que aparecen en (3.25) se obtiene

$$v_{1,0}(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{\kappa_1 + u_0(\tau) + \kappa_2 u_0^2(\tau)}, \quad v_{2,0}(\tau) = \frac{\kappa_2 u_0^2(\tau)}{\kappa_1 + u_0(\tau) + \kappa_2 u_0^2(\tau)} \quad (3.30)$$

por lo tanto una EDO, o *ecuación de velocidad*, para u_0 es la siguiente

$$\frac{du_0}{d\tau} = r(u_0) = -u_0 \left(\frac{\alpha_2 + \alpha_5 \kappa_2 u_0}{\kappa_1 + u_0 + \kappa_2 u_0^2} \right). \quad (3.31)$$

Ahora, tomando $u_* = \min_{\tau} |u_0(\tau)|$, el siguiente resultado se obtiene

Proposición 3.1. *La función $r(u_0)$ definida en (3.31) es estrictamente negativa para todo $u_0 \in [u_*, 1]$.*

Demostración. Sean $h_1 = (\alpha_2 + \alpha_5 \kappa_2 u_0)$ y $h_2 = (\kappa_1 + u_0 + \kappa_2 u_0^2)$, entonces probar que la función $r = r(u_0)$ sea estrictamente negativa para todo $u_0 \in [u_*, 1]$ es equivalente a probar que la relación $\frac{h_1}{h_2}$ es estrictamente positiva para todo $u_0 \in [u_*, 1]$. En efecto

$$h_1 = k_2 k_1 (k_{-3} + k_4) + k_1 k_3 k_4 s_0 u_0$$

y

$$h_2 = k_1^2 K_m (k_{-3} + k_4) + k_1^2 (k_{-3} + k_4) s_0 u_0 + \frac{k_1 (k_{-3} + k_4)}{K_m} u_0^2,$$

y, ya que todas las constantes de velocidad son estrictamente positivas, entonces h_1 y h_2 son funciones estrictamente positivas. De aquí la relación $\frac{h_1}{h_2}$ es estrictamente positiva. \square

Con la Proposición anterior se establece que la concentración del sustrato es una función decreciente después del transeúnte inicial tal como se espera desde el punto de vista bioquímico.

De (3.31) se obtiene la siguiente solución implícita para $u_0 = u_0(\tau)$:

$$\frac{u_0(\tau)}{\alpha_5} + \left(\frac{\kappa_1}{\alpha_2} \right) \ln u_0(\tau) + \left(\frac{\alpha_5 - \alpha_2}{\alpha_5^2 \kappa_2} - \frac{\kappa_1}{\alpha_2} \right) \ln(\alpha_2 + \alpha_5 \kappa_2 u_0(\tau)) = \hat{C} - \tau. \quad (3.32)$$

Si se impone la condición inicial $u_0(0) = 1$, entonces

$$\hat{C} = \frac{1}{\alpha_5} + \left(\frac{\alpha_5 - \alpha_2}{\alpha_5^2 \kappa_2} - \frac{\kappa_1}{\alpha_2} \right) \ln(\alpha_2 + \alpha_5 \kappa_2).$$

Por aproximación del término $\ln(\alpha_2 + \alpha_5 \kappa_2 u_0(\tau))$ usando una expansión de Taylor respecto de $u_0(\tau)$, para τ fijo, se encuentra el siguiente resultado

$$u_0(\tau) = \left(\frac{\delta_2}{\delta_1} \right) \mathcal{W} \left[\left(\frac{\delta_1}{\delta_2} \right) \exp \left(\frac{\delta_3 - \tau}{\delta_2} \right) \right] \quad (3.33)$$

en donde

$$\delta_1 = \left[\frac{1}{\alpha_5} + \left(\frac{\alpha_5 - \alpha_2}{\alpha_5^2 \kappa_2} - \frac{\kappa_1}{\alpha_2} \right) \left(\frac{\alpha_5 \kappa_2}{\alpha_2} \right) \right], \quad \delta_2 = \frac{\kappa_1}{\alpha_2},$$

$$\delta_3 = \hat{C} - \left(\frac{\alpha_5 - \alpha_2}{\alpha_5^2 \kappa_2} - \frac{\kappa_1}{\alpha_2} \right) \ln(\alpha_2)$$

y \mathcal{W} es la función especial Omega, solución de la famosa ecuación tipo Lambert [15]:

$$\mathcal{W}(x) + \ln(\mathcal{W}(x)) = \ln(x), \quad \forall x \geq -\frac{1}{e}.$$

En la figura 3.1 se ilustran las soluciones obtenidas aquí para valores realistas de los parámetros, según las restricciones consideradas en este trabajo, tomados de [9].

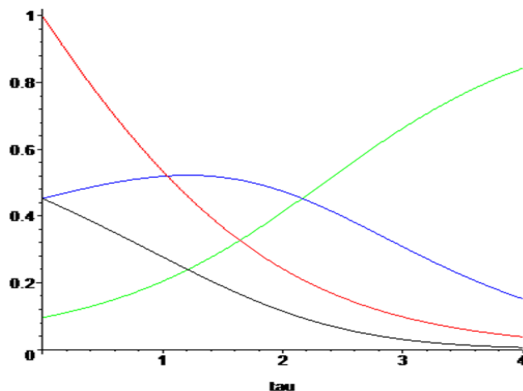


Figura 3.1: Soluciones: $u_0(\tau)$ (línea roja), $v_1(\tau)$ (línea azul), $v_2(\tau)$ (línea negra) y $\frac{e}{e_0}(\tau) = 1 - [v_1(\tau) + v_2(\tau)]$ (línea verde) para $\tau \in [0, 0.5k_1e_0 * 40]$

La solución $\mathbf{u}_0(\tau) = (u_0(\tau), v_{1,0}(\tau), v_{2,0}(\tau))$ para el sistema (3.25) no es una solución aproximada uniformemente válida para todo $\tau \geq 0$ ya que, como se vió, $v_{i,0} \neq 0$ para $i = 1, 2$. Esto no es sorprendente debido a que (3.25) involucra solamente una EDO; esto es equivalente a tomar $\hat{\varepsilon} = 0$ in (3.17)-(3.18). El sistema de ecuaciones

(3.25) tiene una sola constante de integración de la ecuación para u , por lo tanto no es sorprendente que las condiciones iniciales no se satisfagan respecto a u_0 y $v_{i,0}$ para cada $i = 1, 2$. Por esta razón, desde el punto de vista matemático se concluye que al menos una solución $u(\tau; \hat{\varepsilon})$, $v_1(\tau; \hat{\varepsilon})$ y $v_2(\tau; \hat{\varepsilon})$ *no es una función analítica* de $\hat{\varepsilon}$ cuando $\hat{\varepsilon} \rightarrow 0$; esta situación no cambia aún cuando se incluyan términos de orden mayor en $\hat{\varepsilon}$ ([18] y [19]).

Tomando en cuenta que cada $\hat{\varepsilon} \frac{dv_i}{d\tau}$ es $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ en (3.25), estratégicamente se considera que $v_i(\tau; \hat{\varepsilon})$, para cada $i = 1, 2$, es analítica; de hecho (3.24) también requiere ser analítica. En vista que las condiciones iniciales $v_i(0) = 0$, $i = 1, 2$, no se satisfacen al despreciar $\hat{\varepsilon} \frac{dv_i}{d\tau}$, entonces con la técnica de perturbación estos términos se pueden retener en el análisis al menos cerca de $\tau = 0$ mediante el sistema a $\mathcal{O}(1)$ dado por (3.28). Las soluciones de este sistema, llamadas interiores, posteriormente deben pegarse con las $\mathcal{O}(1)$ obtenidas anteriormente; lo cual es conocido en análisis asintótico como *condición "matching"* [18].

A continuación se obtienen las soluciones asintóticas interiores a partir de (3.28) con las condiciones iniciales

$$\bar{u}_0(0) = 1, \quad \bar{v}_{1,0}(0) = \bar{v}_{2,0} = 0.$$

El sistema (3.28) *no es* de menor orden que el sistema original (3.21)-(3.23) y las EDO's son integrables. De hecho, la solución viene dada por (ver deducción en el Apéndice B)

$$\begin{cases} \bar{u}_0(\omega) = 1, \\ \bar{v}_{1,0}(\omega) = \left(\frac{m_1 + \gamma_3}{\alpha_3} \right) \tilde{C}_2 e^{m_1 \omega} + \left(\frac{m_2 + \gamma_3}{\alpha_3} \right) \tilde{C}_1 e^{m_2 \omega} + \frac{\gamma_3}{\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3}, \\ \bar{v}_{2,0}(\omega) = \tilde{C}_2 e^{m_1 \omega} + \tilde{C}_1 e^{m_2 \omega} + \frac{\alpha_3}{\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3}, \end{cases} \quad (3.34)$$

en donde

$$\gamma_1 = (\kappa_1 + \alpha_3 + 1), \quad \gamma_2 = (\alpha_4 + \alpha_5) - 1, \quad \gamma_3 = (\gamma_2 + 1)$$

$$m_{1,2} = -\frac{(\gamma_1 + \gamma_3)}{2} \left(1 \mp \sqrt{1 - 4 \frac{(\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3)}{(\gamma_1 + \gamma_3)^2}} \right),$$

$$\tilde{C}_1 = -\frac{\alpha_3 m_1}{(\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3)(m_1 - m_2)}, \quad \tilde{C}_2 = \frac{\alpha_3 m_2}{(\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3)(m_1 - m_2)}.$$

En estas expresiones m_1 y m_2 son, siempre, números reales estrictamente negativos debido a que

$$\frac{(\gamma_1\gamma_3 - \gamma_2\alpha_3)}{(\gamma_1 + \gamma_3)^2} \ll \frac{1}{4}$$

para todos los parámetros cinéticos. La figura 3.2 ilustra las soluciones \bar{u}_0 , $\bar{v}_{1,0}$, $\bar{v}_{2,0}$ y $\frac{\bar{e}}{e_0}$ para los mismos valores realistas de parámetros considerados anteriormente.

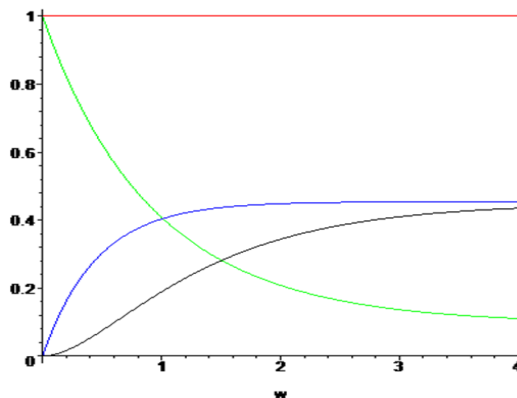


Figura 3.2: Soluciones $\bar{u}_0(\omega)$ (línea roja), $\bar{v}_{1,0}(\omega)$ (línea azul), $\bar{v}_{2,0}(\omega)$ (línea negra) y $\frac{\bar{e}}{e_0}(\omega) = 1 - [\bar{v}_{1,0}(\omega) + \bar{v}_{2,0}(\omega)]$ para $\omega \in [0, 0.5k_1s_0]$

3.5.2. Condición *matching*

No puede esperarse que las soluciones anteriores se tengan para todo $\tau \geq 0$, ya que si esto ocurriera entonces significa que $\frac{dv_i}{d\omega} = \hat{\varepsilon} \frac{dv_i}{d\tau}$ es $\mathcal{O}(1)$ para todo τ . Las partes de las soluciones dadas por (3.34) son las partes *singulares* o *internas* para u , v_1 y v_2 , y son válidas para $0 \leq \tau \ll 1$, mientras que (3.30)-(3.32) es la solución *no singular* o *externa* válida para todo τ que no sea inmediato al entorno de $\tau = 0$. Si ahora se hace $\hat{\varepsilon} \rightarrow 0$ se tiene para un $0 < \tau \ll 1$ fijo, pero bien pequeño, entonces $\omega \rightarrow \infty$. Por lo tanto, en el límite de $\hat{\varepsilon}$ se espera que la solución (3.30)-(3.32), cuando $\tau \rightarrow 0$, sea igual a la solución (3.34) cuando $\omega \rightarrow \infty$; esto es, la solución singular cuando $\omega \rightarrow \infty$ se *pega* a la solución no singular cuando $\tau \rightarrow 0$. Esta es la esencia de la *condición matching* en la teoría de perturbación singular [18].

Si se denota la solución no singular por $\bar{\mathbf{u}}_0(\omega) = (\bar{u}_0(\omega), \bar{v}_{1,0}(\omega), \bar{v}_{2,0}(\omega))$, entonces de (3.34) y (3.30)-(3.32) se ve directamente que

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} \bar{\mathbf{u}}_0(\omega) = \left(1, \frac{\gamma_3}{\gamma_1\gamma_3 - \gamma_2\alpha_3}, \frac{\alpha_3}{\gamma_1\gamma_3 - \gamma_2\alpha_3} \right) = \lim_{\tau \rightarrow 0} \mathbf{u}_0(\tau).$$

En la Figura 3.3 se ilustran las regiones durante y después del transeúnte inicial, y las soluciones correspondientes a:

$$\begin{aligned} u(\tau; \hat{\varepsilon}) &= u_0(\tau) + \mathcal{O}(\hat{\varepsilon}), \\ v_1(\tau; \hat{\varepsilon}) &= v_{1,0}(\tau) + \mathcal{O}(\hat{\varepsilon}), \\ v_2(\tau; \hat{\varepsilon}) &= v_{2,0}(\tau) + \mathcal{O}(\hat{\varepsilon}). \end{aligned}$$

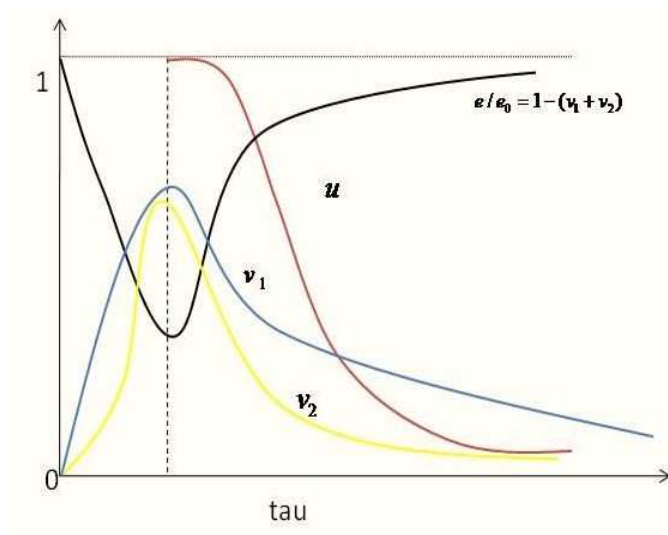


Figura 3.3: Ilustración de las soluciones $u(\tau)$, $v_1(\tau)$, $v_2(\tau)$ y $\frac{e}{e_0}(\tau) = 1 - [v_1(\tau) + v_2(\tau)]$

En la figura anterior, la línea vertical segmentada que divide las regiones ilustra el tiempo τ en el que la condición de matching entre las soluciones singulares y no singulares se da. También se observa el comportamiento esperado para la reacción enzimática con cooperatividad: en la región del transeúnte inicial la concentración de sustrato u se mantiene constante e igual a su valor inicial, mientras que las concentraciones v_1 y v_2 para los complejos-enzima aumentan bruscamente desde $v_1 = 0$ y $v_2 = 0$, respectivamente, hasta los valores

$$v_1 = \frac{\gamma_3}{\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3} \quad \text{y} \quad v_2 = \frac{\alpha_3}{\gamma_1 \gamma_3 - \gamma_2 \alpha_3}.$$

Por otra parte, la concentración de la enzima, calculada mediante la ecuación constitutiva de conservación, disminuye desde el valor inicial $e_0 = 1$ hasta un valor mínimo justo en el tiempo en el que se tiene la condición de matching. Finalmente, después del transeúnte inicial y a partir del tiempo en que la condición de matching se da, la

concentración del sustrato disminuye bruscamente desde $u = 1$ y tendiendo asintóticamente a cero tal como lo hacen las concentraciones de los complejos-enzima desde el valor límite correspondiente al tiempo de matching. Por su lado la concentración de la enzima aumenta desde su valor mínimo consistentemente con lo que se espera que suceda bioquímicamente y como lo establece el mecanismo de la reacción con cooperatividad.

3.5.3. Sobre las soluciones asintóticas de orden $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$

En muchos estudios de análisis cinético, desde el punto de vista matemático de la teoría de perturbación, se ha encontrado que las soluciones asintóticas a orden $\mathcal{O}(1)$ validan las hipótesis de la QSSA, y además reproducen el comportamiento real de la reacción bioquímica descrito por el mecanismo correspondiente [7]. En efecto, para el caso particular de la reacción enzimática con cooperatividad, este hecho se ha probado en las secciones anteriores. Por otro lado, muchos autores (ver por ejemplo [8]) señalan que la contribución de términos a mayor orden en $\hat{\varepsilon}$ puede llegar a ser despreciable, y la solución completa del sistema se puede describir bien sólo con las soluciones asintóticas de orden $\mathcal{O}(1)$. En esta sección se ilustra, mediante cálculo numérico, que en el caso de la reacción bioquímica con cooperatividad bajo la restricción de los parámetros que se están considerando, las soluciones asintóticas a orden $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ son despreciables frente a las de orden $\mathcal{O}(1)$. Será suficiente ilustrarlo para las soluciones externas, pues para las internas se procede de manera similar y también se verifica, aún más, que éstas no contribuyen significativamente en la expansión.

Considerando el sistema de ecuaciones a orden $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ dado en (3.26), y conocidas las soluciones asintóticas a orden $\mathcal{O}(1)$, se pueden obtener las expresiones para $v_{1,1}$ y $v_{2,1}$ como función de u_0 , $v_{1,0}$, $v_{2,0}$ y u_1 . Posteriormente, a partir de estas expresiones algebraicas, se obtiene una ecuación diferencial ordinaria para u_1 con lado derecho sólo dependiente de $(u_1(\tau), \tau)$ (ver deducción en el Apéndice C). En efectos las expresiones mencionadas y la EDO vienen dadas por:

$$\begin{cases} v_{1,1}(\tau) = \varphi_1(\tau) + \varphi_2(\tau)u_1(\tau), \\ v_{2,1}(\tau) = \varphi_3(\tau) + \varphi_4(\tau)u_1(\tau), \\ \frac{du_1}{d\tau} = \varrho_1(\tau)u_1(\tau) + \varrho_2(\tau), \end{cases} \quad (3.35)$$

en donde φ_ℓ , para cada $\ell = 1, 2, 3$ y $\varrho_{\ell'}$ para cada $\ell' = 1, 2$ son funciones de τ conocidas. Si de manera natural se impone la condición inicial $u_1(0) = 1$, de manera natural, nuevamente es obvio que no se satisfacen las condiciones iniciales $v_{i,1} = 0$, para cada $i = 1, 2$. En efecto, en $\tau = 0$ se tiene que $v_{1,1}(0) = \varphi_1(0)$ y $v_{2,1}(0) = \varphi_2(0)$ que necesariamente no tienen porque ser idénticamente igual a cero; sin embargo se pueden considerar válidas para $\tau > 0$ alejado del transeúnte inicial.

Una observación importante, gracias a que las funciones ϱ_1 y ϱ_2 son bien regulares para todo τ en el intervalo de trabajo, es que la ecuación diferencial en (3.35) admite un factor de integración que proporciona una forma cerrada para u_1 dada por:

$$u_1(\tau) = \left\{ \left[\int \left(\exp \left(- \int \varrho_1(\tau) d\tau \right) \right) \varrho_2(\tau) d\tau \right] + \hat{C} \right\} \exp \left(\int \varrho_1(\tau) d\tau \right), \quad (3.36)$$

en donde \hat{C} es la constante de integración que se determina haciendo uso de la condición inicial $u_1(0) = 1$. El problema aquí, desafortunadamente contrario al caso de las soluciones asintóticas a orden $\mathcal{O}(1)$, es que las integrales que aparecen involucradas en la expresión (3.36) no se pueden realizar de manera exacta, y por lo tanto se recurrió a un método de integración numérica para obtener de manera aproximada la solución $u_1(\tau)$. Muchos de estos métodos estándares son bien conocidos en la literatura (ver detalles, por ejemplo, en [5]). En este trabajo se realizó una implementación del método de Runge-Kutta: Para un entero estrictamente positivo n , se divide el intervalo $[0, T]$ en $n + 1$ -subintervalos $[\tau_i, \tau_{i+1}]$ de longitud fija $\delta\tau = T/n$, con $\tau_i = i\delta\tau$. Se calcula la solución aproximada $u_1^{i+1} \approx u_1(\tau_{i+1})$, de (3.36), conocido el valor aproximado $u_1^i \approx u_1(\tau_i)$ para cada $i = 0, \dots, n$ de la manera siguiente:

$$u_1^{i+1} = u_1^i + \frac{\delta\tau \left(\Phi_1 + 2\Phi_2 + 2\Phi_3 + \Phi_4 \right)}{6}, \quad (3.37)$$

en donde

$$\begin{cases} \Phi_1 = \varrho_1(\tau_i)u_1^i + \varrho_2(\tau_i), \\ \Phi_2 = \varrho_1(\tau_i + \delta\tau/2) \left(u_1^i + \delta\tau\Phi_1/2 \right) + \varrho_2(\tau_i + \delta\tau/2), \\ \Phi_3 = \varrho_1(\tau_i + \delta\tau/2) \left(u_1^i + \delta\tau\Phi_2/2 \right) + \varrho_2(\tau_i + \delta\tau/2), \\ \Phi_4 = \varrho_1(\tau_i + \delta\tau) \left(u_1^i + \delta\tau\Phi_3 \right) + \varrho_2(\tau_i + \delta\tau) \end{cases} \quad (3.38)$$

Las expresiones de aproximación (3.37) se van empleando reiterativamente para obtener en cada τ_i el valor correspondiente de $v_{1,1}$ y $v_{2,1}$:

$$v_{1,1}(\tau_i) \approx v_{1,1}^i = \varphi_1(\tau_i) + \varphi_2(\tau_i)u_1^i \quad \text{y} \quad v_{2,1}(\tau_i) \approx v_{2,1}^i = \varphi_3(\tau_i) + \varphi_4(\tau_i)u_1^1.$$

En la siguiente figura se ilustran las soluciones aproximadas para las ecuaciones a orden $\mathcal{O}(\varepsilon)$.

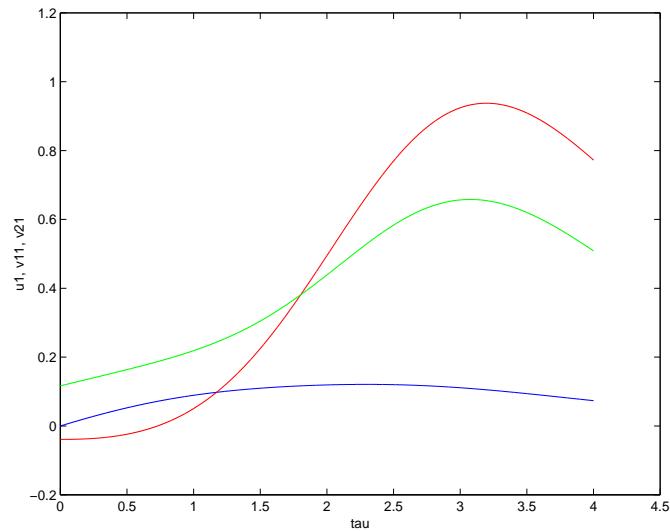


Figura 3.4: Soluciones: $u_1(\tau)$ (línea azul), $v_{1,1}(\tau)$ (línea roja), $v_{2,1}(\tau)$ (línea verde) para $\tau \in [0, 0.5k_1e_0 * 40]$

Como se observa en la figura anterior, las soluciones asintóticas u_1 , $v_{1,2}$ y $v_{2,1}$ nunca sobrepasan la unidad ni presentan ningún comportamiento oscilatorio monótono creciente, por lo tanto para $\hat{\varepsilon} \ll 1$ se tiene que

$$\begin{aligned} u(\tau; \hat{\varepsilon}) &= u_0(\tau) + \hat{\varepsilon}u_1(\tau) \cong u_0(\tau) + \mathcal{O}(1), \\ v_1(\tau; \hat{\varepsilon}) &= v_{1,0}(\tau) + \hat{\varepsilon}v_{1,1}(\tau) \cong v_{1,0}(\tau) + \mathcal{O}(1), \\ v_2(\tau; \hat{\varepsilon}) &= v_{2,0}(\tau) + \hat{\varepsilon}v_{2,1}(\tau) \cong v_{2,0}(\tau) + \mathcal{O}(1). \end{aligned}$$

En la gráfica siguiente se ilustra el comportamiento de estas soluciones en donde en efecto se ve que coinciden con las soluciones asintóticas a orden $\mathcal{O}(1)$; con lo cual se concluye que la contribución a $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ no es apreciable para el caso considerado en este trabajo.

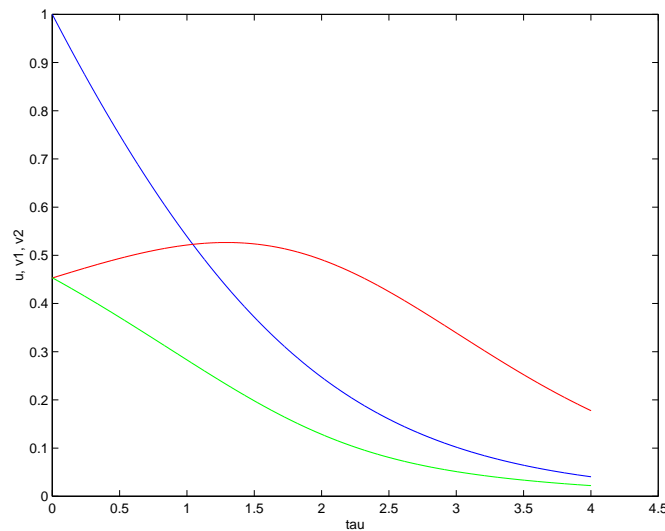


Figura 3.5: Soluciones: $u(\tau)$ (línea azul), $v_1(\tau)$ (línea roja), $v_2(\tau)$ (línea verde) para $\tau \in [0, 0.5k_1e_0 * 40]$

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizó la cinética de una reacción enzimática cooperativa haciendo uso de la aproximación al pseudo estado estacionario (QSSA). Para esto se planteó un modelo matemático de la evolución temporal de las concentraciones de sustrato y complejos-enzimas que intervienen en el mecanismo de reacción. La estructura matemática del modelo presentó la forma de un Problema de Cauchy (de condiciones iniciales) para un sistema de tres ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO's) altamente no lineales. Para las variables de evolución consideradas y los parámetros del modelo restringidos a valores biológicamente realistas, se demostró que el modelo es un problema matemático bien planteado: tiene una única solución que depende continuamente de la condición inicial. Por lo tanto, el modelo matemático planteado es viable para analizar la cinética de la reacción enzimática con cooperatividad. Dos escalas de tiempos en las que transcurre el mecanismo de la reacción enzimática con cooperatividad fueron determinadas, una fue identificada como la región en donde todos los tiempos están muy cercanos a cero (transeunte inicial), y la otra fue identificada como la región en donde los tiempos están significativamente alejados de cero. Estas escalas de tiempo están separadas por un parámetro pequeño para el cual las hipótesis de la QSSA es válida. Consistentemente con las hipótesis de la QSSA, se propusieron variables y parámetros adimensionales a partir de los cuales se planteó un problema de perturbación singular respecto al parámetro que separa las escalas de tiempo. Para ambas escalas de tiempo se plantearon expansiones asintóticas a orden $\mathcal{O}(1)$ y a $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$. Para ambas escalas de tiempo se encontró que la contribución de soluciones a orden $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ no es significativa respecto a las de orden $\mathcal{O}(1)$. La aproximación asintótica de la soluciones en ambas escalas de tiempo reproducen el comportamiento de las concentraciones de sustrato, enzima y complejos-enzima que describe el mecanismo de la reacción enzimática. Por esta razón, los resultados obtenidos mediante el análisis de perturbación asintótico sirven

para describir la cinética enzimática de la reacción bioquímica con cooperatividad presentada en este trabajo.

APÉNDICE A

PRUEBA DE LA PROPOSICIÓN 1.1

La prueba de este resultado es inmediata verificando las condiciones de los Teoremas de existencia, unicidad y estabilidad de soluciones a EDO's (ver [17]). En efecto, al considerar por cada componente $i = 1, 2, 3, u_j \in \{s, c_1, c_2\}$ fijas, el problema escalar Las derivadas vienen dadas por

$$\begin{cases} \frac{du_i}{dt} = f_i(u_i), & \forall t \in (0, T] \\ u_i(0) = u_i^0, \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

basta verificar que cada función $f_i : \bar{\Omega} \rightarrow \mathbb{R}$ es continua Lipschitz. Al respecto, la siguiente proposición establece cotas para las derivadas.

Proposición A.1. *Las derivadas parciales, $\partial f_i / \partial u_j$, $u_j = s, c_1, c_2$, de las funciones a valores reales $f_i : \bar{\Omega} \rightarrow \mathbb{R}$ componentes del campo vectorial de direcciones f , existen, son continuas y están acotadas para toda $u \in \bar{\Omega}$.*

Demostración. Por un lado, gracias a la estructura de cada función f_i la existencia de las derivadas parciales se tiene. En efecto

$$\begin{aligned} \frac{\partial f_1}{\partial s} &= -k_1 e_0 + (k_1 - k_3)c_1 + k_1 c_2, & \frac{\partial f_1}{\partial c_1} &= k_{-1} + (k_1 - k_3)s, & \frac{\partial f_1}{\partial c_2} &= k_{-3} + k_1 s \\ \frac{\partial f_2}{\partial s} &= k_1 e_0 + (k_1 + k_3)c_1 - k_1 c_2, & \frac{\partial f_2}{\partial c_1} &= k_1 K_m + (k_1 + k_3)s, & \frac{\partial f_2}{\partial c_2} &= k_3 K'_m - k_1 s \\ \frac{\partial f_3}{\partial s} &= k_3 c_1, & \frac{\partial f_3}{\partial c_1} &= k_3 s, & \frac{\partial f_3}{\partial c_2} &= k_{-3} K'_m \end{aligned}$$

estas derivadas están bien definidas y para todo punto $u \in \omega$ están acotadas. Es decir, existen constantes $C_i^j > 0$ con $i = 1, 2, 3$, $j = s, c_1, c_2$ tales que

$$\left| \frac{\partial f_i}{\partial u_j} \right| \leq C_i^j$$

Mediante simple manipulaciones algebraicas, considerando el dominio de validez de cada variable de estado, encontramos explícitamente que

$$\begin{aligned}C_1^s &= (e_0 + \hat{C}_2), & C_1^{c_1} &= k_{-1}, & C_1^{c_2} &= (k_{-3} + s_0). \\C_2^s &= (e_0 + \hat{C}_2) + 2\hat{C}_1, & C_2^{c_1} &= K_m + 2s_0, & C_2^{c_2} &= (K'_m + s_0). \\C_3^s &= \hat{C}_1, & C_3^{c_1} &= s_0, & C_3^{c_2} &= K'_m.\end{aligned}$$

□

APÉNDICE B

DESARROLLO DE LAS EXPANSIONES ASINTÓTICAS

B.1. Expansiones Asintóticas Después del Transeúnte Inicial

En el transeúnte para $\tau > 0$ los términos de $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\varepsilon)$ se obtienen haciendo en (3.25) $u = u_0 + \hat{\varepsilon}u_1$, $v_1 = v_{1,0} + \hat{\varepsilon}v_{1,1}$, $v_2 = v_{2,0} + \hat{\varepsilon}v_{2,1}$, luego en el sistema (3.16)-(3.18)

$$\begin{aligned} \frac{du_0}{d\tau} + \hat{\varepsilon} \frac{du_1}{d\tau} &= \left(-u_0 + (\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0)v_{1,0} + (\alpha_4 + u_0)v_{2,0} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon} \left((-1 + (1 - \alpha_3)v_{1,0} + v_{2,0})u_1 + ((1 - \alpha_3)u_0 + \alpha_1)v_{1,0} + (\alpha_4 + v_{2,0})v_{2,1} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon}^2 \left((1 - \alpha_3)u_1v_{1,0} + u_1v_{2,1} \right) \end{aligned} \tag{B.1}$$

Análogamente para v_1 y v_2 se tiene

$$\begin{aligned} \hat{\varepsilon} \frac{dv_{1,0}}{d\tau} + \hat{\varepsilon}^2 \frac{dv_{1,1}}{d\tau} &= \left(u_0 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u_0)v_{1,1} + (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)v_{2,0} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon} \left(1 - (1 + \alpha_3)v_{1,0} - v_{2,0} \right) u_1 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_5)u_0)v_{1,1} + (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)v_{2,1} \\ &\quad + \hat{\varepsilon}^2 \left(-(1 + \alpha_3)u_1v_{1,1} - (u_1v_{2,1}) \right) \end{aligned} \tag{B.2}$$

$$\begin{aligned} \hat{\varepsilon} \frac{dv_{2,0}}{d\tau} + \hat{\varepsilon}^2 \frac{dv_{2,1}}{d\tau} &= \left(\alpha_3 u_0 v_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5) v_{2,0} \right) + \hat{\varepsilon} \left(\alpha_3 v_{1,0} u_1 + \alpha_3 u_0 v_{1,1} - (\alpha_4 + \alpha_5) v_{2,1} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon}^2 \left(\alpha_3 u_1 v_{1,1} \right) \end{aligned} \tag{B.3}$$

de lo que resultan las expansiones a $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\varepsilon)$ respectivamente

$$\begin{cases} \frac{du_0}{dt} = -u_0 + (\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0)v_{1,0} + (\alpha_4 + u_0)v_{2,0} \\ 0 = u_0 - (\alpha_1 + \alpha_2)v_{1,0} - (1 + \alpha_3)u_0v_{1,0} + (\alpha_4 + \alpha_5)v_{2,0} - u_0v_{2,0} \\ 0 = \alpha_3u_0v_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5)v_{2,0} \end{cases} \quad (\text{B.4})$$

De la misma manera los terminos de orden $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ en (3.26) son

$$\begin{cases} \frac{du_1}{dt} = -u_1 + (\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0)v_{1,1} + (\alpha_4 + u_0)v_{2,1} + (1 - \alpha_3 + v_{2,0})u_1 \\ \frac{dv_{1,0}}{dt} = (1 - (1 + \alpha_3)v_{1,0} - v_{2,0})u_1 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u_0)v_{1,1} + (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)v_{2,1} \\ \frac{dv_{2,0}}{dt} = \alpha_3(u_0v_{1,1} + u_1v_{1,0}) - (\alpha_4 + \alpha_5)v_{2,1} \end{cases} \quad (\text{B.5})$$

B.2. Expansiones Asintóticas con la escala $\omega = \tau/\hat{\varepsilon}$

En el transeúnte para $\omega > 0$ los términos de $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ se obtienen haciendo el cambio $\bar{u} = \bar{u}_0 + \hat{\varepsilon}\bar{u}_1$, $\bar{v}_1 = \bar{v}_{1,0} + \hat{\varepsilon}\bar{v}_{1,1}$, $\bar{v}_2 = \bar{v}_{2,0} + \hat{\varepsilon}\bar{v}_{2,1}$ en (3.34) y agrupando los terminos comparables, tenemos

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{u}_0}{d\omega} + \hat{\varepsilon} \frac{d\bar{u}_1}{d\omega} &= \hat{\varepsilon} \left(-\bar{u}_0 + (\alpha_1 + (1 - \alpha_3)\bar{u}_0)\bar{v}_{1,0} + (\alpha_4 + \bar{u}_0)v_{2,0} \right) + \hat{\varepsilon}^2 \left((1 - (1 - \alpha_3)\bar{v}_{1,0} \right. \\ &\quad \left. + \bar{v}_{2,0})\bar{u}_1 + ((1 - \alpha_3)\bar{u}_0 + \alpha_1)\bar{v}_{1,1} + (\alpha_4 + \bar{u}_0)v_{2,1} \right) + \hat{\varepsilon}^3 \left((1 - \alpha_3)\bar{u}_1\bar{v}_{1,1} + \bar{u}_1\bar{v}_{2,0} \right) \end{aligned} \quad (\text{B.6})$$

Similarmente para \bar{v}_1 y \bar{v}_2

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{v}_{1,0}}{d\omega} + \hat{\varepsilon} \frac{d\bar{v}_{1,1}}{d\omega} &= \left(\bar{u}_0 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0)\bar{v}_{1,0} + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u}_0)\bar{v}_{2,0} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon} \left(1 - (1 + \alpha_3)\bar{v}_{1,0} - \bar{v}_{2,0} \right) \bar{u}_1 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0)\bar{v}_{1,1} \Big) \quad (\text{B.7}) \\ &\quad + \hat{\varepsilon}^2 \left(-(1 + \alpha_3)\bar{u}_1\bar{v}_{1,1} - \bar{u}_1\bar{v}_{2,1} \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d\bar{v}_{2,0}}{d\omega} + \hat{\varepsilon} \frac{d\bar{v}_{2,1}}{d\omega} &= \left(\alpha_3\bar{u}_0\bar{v}_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,0} \right) + \hat{\varepsilon} \left(\alpha_3\bar{v}_{1,0}\bar{u}_1 + \alpha_3\bar{u}_0\bar{v}_{1,0}(\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,1} \right) \\ &\quad + \hat{\varepsilon}^2 \left(\alpha_3\bar{u}_1\bar{v}_{1,1} \right) \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

Luego nos queda para $\mathcal{O}(1)$ y $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$ las expresiones

$$\begin{cases} \frac{d\bar{u}_0}{d\omega} = 0, \\ \frac{d\bar{v}_{1,0}}{d\omega} = \bar{u}_0 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0)\bar{v}_{1,0} + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u}_0)\bar{v}_{2,0} \\ \frac{dv_{2,0}}{d\omega} = \alpha_3\bar{u}_0\bar{v}_{1,0} - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,0}, \end{cases} \quad (\text{B.9})$$

Similarmente para los términos $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$

$$\begin{cases} \frac{d\bar{u}_1}{d\omega} = -\bar{u}_0 + (\alpha_1(1 - \alpha_3)\bar{u}_0)v_{1,0} + (\alpha_4 + \bar{u}_0)\bar{v}_{2,0}, \\ \frac{d\bar{v}_{1,1}}{d\omega} = (1 - (1 + \alpha_3)\bar{v}_{1,0} - \bar{v}_{2,0})\bar{u}_1 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)\bar{u}_0)\bar{v}_{1,1} + (\alpha_4 + \alpha_5 - \bar{u}_0)\bar{v}_{2,1} \\ \frac{dv_{2,1}}{d\omega} = \alpha_3\bar{v}_{1,0}\bar{u}_1 + \alpha_3\bar{u}_0\bar{v}_{1,1} - (\alpha_4 + \alpha_5)\bar{v}_{2,1}, \end{cases} \quad (\text{B.10})$$

APÉNDICE C

DEDUCCIÓN DE LAS SOLUCIONES A $\mathcal{O}(\hat{\varepsilon})$

En primer lugar resolvemos las ecuaciones a $\mathcal{O}(1)$, de donde encontramos de manera explícita: $v_{2,0} = v_{2,0}(u_0)$ y $v_{1,0} = v_{1,0}(u_0)$ y por tanto $\frac{du_0}{d\tau} = r(u_0)$ con condición inicial $u_0(0) = 1$. Esta EDO se puede resolver y se encuentra de manera explícita: $u_0 = u_0(\tau)$ luego podemos intentar resolver la ecuaciones a $\mathcal{O}(\varepsilon)$. Por un lado tenemos en (3.35):

$$v_{2,1} = \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}v_{1,0}\right)u_1 + \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}u_0\right)v_{1,1} - \frac{1}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{dv_{v_{2,0}}}{d\tau} \quad (\text{C.1})$$

Luego substituyendo (C.1) en la segunda EDO

$$\begin{aligned} \frac{dv_{1,0}}{d\tau} &= (1 - (1 + \alpha_3)v_{1,0} - v_{2,0})u_1 - (\alpha_1 + \alpha_2 + (1 + \alpha_3)u_0)v_{1,1} \\ &+ (\alpha_4 + \alpha_5 - u_0)\left(\left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}v_{1,0}\right)u_1 + \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}u_0\right)v_{1,1} - \frac{1}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{dv_{v_{2,0}}}{d\tau}\right) \end{aligned} \quad (\text{C.2})$$

Sean

$$\begin{aligned} h_1(u_0) &= \alpha_3 \left(\frac{\alpha_4 + \alpha_5 - u_0}{\alpha_4 + \alpha_5}\right)u_0, & h_2(u_0) &= \frac{\alpha_4 + \alpha_5 - u_0}{\alpha_4 + \alpha_5} \\ h_3(u_0, v_{1,0}, v_{2,0}) &= \alpha_3 \left(\frac{\alpha_4 + \alpha_5 - u_0}{\alpha_4 + \alpha_5}\right)v_{1,0} + ((1 + \alpha_3)v_{1,0} + v_{2,0} - 1) \end{aligned}$$

Despejando $v_{1,1}$ de la expresión tenemos

$$v_{1,1} = \left(\frac{h_2}{h_1}\right) \frac{dv_{2,0}}{d\tau} + \left(\frac{1}{h_1}\right) \frac{dv_{1,0}}{d\tau} + \left(\frac{h_3}{h_1}\right)u_1 \quad (\text{C.3})$$

Substituyendo (C.3) en (C.1) tenemos

$$\begin{aligned} v_{2,0} &= \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5}v_{1,0} + \frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{h_3}{h_1}u_0\right)u_1 + \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{h_2}{h_1}u_0 \right. \\ &\left. - \frac{1}{\alpha_4 + \alpha_5}\right) \frac{dv_{2,0}}{d\tau} + \frac{1}{h_1} \frac{dv_{1,0}}{d\tau} \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

Sean

$$\varphi_1 = \left(\frac{h_2}{h_1} \frac{dv_{2,0}}{d\tau} + \frac{1}{h_1} \frac{dv_{1,0}}{d\tau}\right)(u_0), \quad \varphi_2 = \left(\frac{h_3}{h_1}\right)(u_0)$$

$$\varphi_3 = \left(\left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{h_2}{h_1} u_0 - \frac{1}{\alpha_4 + \alpha_5} \right) \frac{dv_{2,0}}{d\tau} + \frac{1}{h_1} \frac{dv_{1,0}}{d\tau} \right) u_0 \quad \varphi_4 = \left(\frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5} v_{1,0} + \frac{\alpha_3}{\alpha_4 + \alpha_5} \frac{h_3}{h_1} u_0 \right) (u_0)$$

Así que podemos escribir: $v_{1,1} = \varphi_1(\tau) + \varphi_2(\tau)u_1$ y $v_{2,1} = \varphi_3 + \varphi_4v_{2,1}$. Sustituyendo estas expresiones en la EDO para $du_1/d\tau$ nos queda

$$\begin{aligned} \frac{du_1}{d\tau} = & \left((1 - \alpha_3)v_{1,0} + v_{2,0} - 1 + \varphi_2(\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0) + \varphi_4 \right) u_1 \\ & + \varphi_1 \left(\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0 \right) + \varphi_3(\alpha_4 + u_0) \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

Ahora definamos

$$\varrho_1(\tau) = \left((1 - \alpha_3)v_{1,0} + v_{2,0} - 1 + \varphi_2(\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0) + \varphi_4 \right) (\tau), \quad \varrho_2(\tau) = \left(\varphi_1(\alpha_1 + (1 - \alpha_3)u_0) + \varphi_3(\alpha_4 + u_0) \right)$$

Luego se tiene la siguiente EDO

$$\frac{du_1}{d\tau} = \varrho_1(\tau)u_1(\tau) + \varrho_2(\tau) \quad (\text{C.6})$$

Con la condición inicial: $u_1(0) = 0$ cuya solución esta dada por

$$u_1(\tau) = e^{\int \varrho_1(\tau) d\tau} \left(\int \varrho_2(\tau) e^{-\int \varrho_1 d\tau} d\tau \right) + \hat{c} e^{\int \varrho_1 d\tau}$$

REFERENCIAS

- [1] J. MONOD, J.WYMAN, AND J. P. CHANGEUX, *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*, J. Mol. Biol, vol. 12, (1965).
- [2] L. SEGEL, *On the validity of the steady state assumption of enzyme kinetics*, Bulletin of Mathematical Biology, Vol 50, N°6, pp. 579-593, (1988).
- [3] R. ARIS, *Análisis de Reactores*, Editorial Alhambra, España, (1973).
- [4] W. BENSON, *The Foundations of Chemical Kinetics*, McGraw-Hill Book Co. New York, (1960).
- [5] R. BURDEN Y J. FAIRES, *Análisis Numérico*, Math. Learning, Séptima Edición, (2001).
- [6] G. E. BRIGGS AND HALDANE, *A Note on the kinetics of Enzime Action*, Biochem J. (1925), 19(2), pp. 338-339.
- [7] R. G DUGGLEBY, *Analysis of Enzyme Progress Curves by Non-linear Regression. Methods and Enzimology*, (249),(1995), pp. 61-90.
- [8] R. EISENTHAL AND M.J DANSON, *Enzyme Assay: A Practical Approach*, Oxford Unversity Press, (2002).
- [9] K. HELMSTAEDT, S. KRAPPMANN AND G. H. BRAUS, *Allosteric regulation of catalytic: Escheriachicoli aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase*, Microbiol.Mol.Biol.Rev.,(3),(2001), pp.404-421.
- [10] E. LEFFLER AND E. GRUNDWAL, *Rates and Equilibria of Organic Reactions*, Jhon WileyandSons,Inc., New York (1963).
- [11] L. MICHAELIS AND M. L MENTEN, *Kinetik der Invertinwinkung Biochem*, Z,(49), (1913), pp. 333-369.

-
- [12] K. R. SCHNEIDER AND T. WILHELM, *Model Reduction by Extended quasy-steady-state Approximation*, Weierstrayß-Institut für Angewandte und Stochastik, Preprint(457) ISSN 0946-8633, Berlin (1988).
- [13] L. A SEGEL *On the Validity of the Steady State Assumption of enzyme kinetics*, Bull.Math.Biol.,**(50)**, (1988), pp.579-593.
- [14] L. A SEGEL AND M. SLEMROD, *The quasy-steady-state assumption: A case in Perturbation*, SIAM, Review,**(31)**,(1989), pp.446-477.
- [15] S. SCHNELL AND C. MENDOZA, *Closed form Solution for time-dependent Enzyme kinetics*, J theor. Biol.,**(187)**, (1997), pp. 207-212.
- [16] S. SCHNELL AND C. MENDOZA, *The Condition for pseudo-first-order kinetics in Enzimatic Reactions is Independent of the initial enzyme concentration*, Biophysical Chemistry, **(107)**, (2004), pp.165-174.
- [17] N. LEVINSON E.CODDINGTON, *Theory of Ordinary Differential Equations*. McGraw-Hill, New York-USA, 1995
- [18] J. D. MURRAY, *Asymptotic Analysis*, Springer, New York, (1984).
- [19] J. D. MURRAY, *Mathematical Biology. I. An Introduction*, Third Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, (1993).