



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MATEMÁTICA

MODELO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN MATEMÁTICAS APLICADAS
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL MATEMÁTICO

MARTÍN ALONSO FACUNDO RÍOS WILSON

PROFESOR GUÍA:
ALEJANDRO MAASS SEPÚLVEDA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MAURICIO LATORRE MORA
JAIME ORTEGA PALMA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto Fondecyt de Iniciación
11150679 y el proyecto Fondap CRG 15090007

SANTIAGO DE CHILE
2017

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL MATEMÁTICO
Y AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN MATEMÁTICAS APLICA-
DAS.

POR: MARTÍN ALONSO FACUNDO RÍOS WILSON
FECHA: 2017

PROF. GUÍA: SR. ALEJANDRO MAASS SEPÚLVEDA

MODELO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

La homeostasis es un estado de equilibrio sobre las distintas condiciones internas que preservan los organismos vivos [17]. Como tales condiciones son afectadas por los estímulos del medio externo, los organismos vivos desarrollan complejos mecanismos de adaptación que les permiten mantener este estado de armonía interna. Casi la mitad de las enzimas, piezas claves en la maquinaria metabólica de los sistemas biológicos, necesitan de ciertos metales como el cobre, el hierro o el zinc para cumplir sus funciones [73]. Sin embargo, altas concentraciones de estos metales pueden producir la muerte del organismo [71]. Como resultado de esta dinámica, las bacterias han evolucionado complejos mecanismos homeostáticos para equilibrar la presencia de estos metales [71]. Basándose en evidencia experimental [51, 57, 39] y en trabajos de modelamiento previos [49], en el transcurso de esta memoria se busca describir matemáticamente la dinámica de la homeostasis del cobre en *E. faecalis*, haciendo uso de la teoría clásica de sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias y, recurriendo a herramientas recientes, provenientes de la teoría de sistemas dinámicos monótonos [22, 21, 6, 28].

Para enfrentar la complejidad y la no-linealidad de las ecuaciones que aparecen en los sistemas, provenientes de los formalismos de modelamiento de reacciones químicas, se divide el análisis en el estudio de dos modelos: a) un modelo que incluye solo ecuaciones polinomiales y b) un modelo más realista que incluye la descripción de fenómenos como la cooperatividad y saturación, usando funciones de regulación. Como resultados derivados de este análisis, se describe la homeostasis en términos cualitativos, concluyendo con la demostración de que este estado es un atractor global al cual el sistema tiende, a partir de una dinámica transiente. Además, se presentan simulaciones numéricas en las que se constata este tipo de comportamiento.

Los hallazgos planteados en este trabajo constituyen un primer paso para el estudio de estas propiedades en sistemas homeostáticos más generales. Esto último tiene una importancia crítica para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en la industria como lo son, por ejemplo, los procesos de bióxidación en la minería del cobre [1, 2].

"No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños
porque cada día es un comienzo nuevo,
porque esta es la hora y el mejor momento;
porque no estás solo, porque yo te quiero."

-Mario Benedetti.

Agradecimientos

Como me dijo hace poco un gran amigo, este trabajo no marca un final, marca un inicio. Y así lo vivo.

Es por lo que quisiera agradecer en este nuevo comienzo a todos quienes han hecho posible este maravilloso viaje.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia. A mi Papá, por ser un compañero, un amigo y un referente. A mi Mamá, por su infinito cariño y sabiduría que me han acompañado durante todos estos años.

Me gustaría agradecer también a mi abuela, Nana, por ser mi cómplice en todas las aventuras que me han llevado hasta este punto. Sé que desde donde estés me estás acompañando también en ésta.

Quiero agradecer también a mis hermanos por su cariño y ánimo.

Ahora, desde el agradecimiento mismo, por hacer lo que nadie hace y tu sí, gracias Pollo, por todo.

Desde el punto de vista académico, agradezco profundamente el trabajo de mis profesores guías, que me han dado la oportunidad de trabajar en lo que me gusta y que me han guiado y acompañado en todo el proceso, y de los que he aprendido mucho.

Agradezco en esta instancia, el apoyo del proyecto Fondecyt de Iniciación 11150679 y del proyecto Fondap CRG 15090007.

Quisiera agradecer también a toda la comunidad del DIM, por su buena voluntad, apoyo y cercanía.

A mis amigos, David Hasson y Felipe Campos, compañeros de los retornos, en los que pasamos penas y celebramos victorias. A mis compañeros de oficina Sebastián Pérez, Felipe Contreras, Francisco Venegas y Christopher Cabezas, por apoyarme e impulsarme a trabajar y a superarme. A mi amigos Enrique Calisto y Pedro Vergara, que siempre me dieron su apoyo y buena onda. A mis compañeros, Piero Zanocco, Mauricio Campos y Alonso Guzmán, por estar conmigo en los momentos más importantes. Agradezco a Felipe Garrido, Juan Marshall, Cristóbal Rojas, Sebastián Tapia, Felipe Arbulú y José Palacios, que me ayudaron y me apoyaron durante todo este proceso.

En fin, se me acaba el espacio y me falta mencionar a muchas otras personas que contribuyeron con su afecto, buena voluntad y amistad a la realización de este trabajo como mis amigos-hermanos, Benjamín Gomez y Aldo Coquedano. A todos ellos: gracias.

Tabla de Contenido

Introducción	1
0.0.1. Motivación.	1
0.0.2. Modelamiento matemático de sistemas homeostáticos.	2
0.0.3. Proyecciones.	3
1. Modelo biológico.	5
1.1. Introducción.	5
1.2. Conceptos básicos.	6
1.2.1. Homeostasis.	6
1.2.2. Regulación transcripcional en bacterias.	6
1.3. Modelo biológico del operón <i>cop</i> en <i>E. faecalis</i>	8
2. Modelamiento matemático.	11
2.1. Introducción.	11
2.2. Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias.	12
2.2.1. Ley de acción de masas y formalismo de potencias.	12
2.2.2. Aproximaciones del estado estacionario.	13
2.2.2.1. Modelo de Michaelis-Menten.	14
2.2.2.2. Modelo de Hill y cooperatividad.	16
2.2.3. Ecuaciones del modelo.	17
2.2.3.1. Hipótesis generales.	17
2.2.3.2. Modelo polinomial (ΣP).	18
2.2.3.3. Modelo más realista (Σ).	19
3. Preliminares.	22
3.1. Introducción.	22
3.2. Conceptos básicos.	23
3.2.1. Conceptos de estabilidad e invarianza	24
3.3. Teoría de control y sistemas monótonos.	26
3.4. Estudio del grafo de interacciones asociado a un sistema de EDO.	30
3.4.1. Condiciones necesarias relacionadas con la homeostasis.	32
3.4.2. Caracterización gráfica de la monotonía.	32
3.4.3. Método de descomposición de sistemas autónomos en sistemas monótonos controlados.	33
3.5. Teoría de perturbaciones.	35
3.5.1. Definiciones.	36

3.5.2. Teoremas principales.	36
4. Análisis matemático de los modelos ΣP y Σ.	38
4.1. Introducción.	38
4.2. Análisis de los modelos ΣP	39
4.2.1. Estudio de puntos críticos.	39
4.2.2. Condiciones necesarias de estabilidad.	42
4.2.2.1. Análisis del grafo de interacciones asociado al modelo ΣPI	43
4.2.2.2. Análisis del grafo de interacciones asociado al modelo ΣPII	44
4.2.3. Estabilidad del único equilibrio de ΣPII a través de linealización.	47
4.2.4. Aplicación de resultados de la teoría de control.	48
4.3. Análisis del modelo Σ	53
4.3.0.1. Invarianza del cono positivo.	53
4.3.0.2. Análisis de puntos críticos y estabilidad local.	54
4.3.0.3. Comportamiento asintótico.	57
5. Simulaciones.	68
5.1. Introducción.	68
5.2. Simulaciones modelo ΣP	69
5.2.1. Estudio asintótico del modelo.	69
5.2.2. Fuente de cobre y perturbaciones.	72
5.2.2.1. Fuentes periódicas.	72
5.2.2.2. Perturbaciones constantes.	78
5.3. Simulaciones modelo Σ	82
5.3.1. Experimentos numéricos.	82
5.3.1.1. Diseño de las simulaciones.	83
5.3.1.2. Pulso 0,5 mM por 3 hrs.	84
5.3.1.3. Pulso 1 mM por 3hrs.	91
5.3.1.4. Pulso 0,5 mM por 6 hrs.	95
5.3.1.5. Tren de 3 pulsos de 0,5 mM cada una hora por 3 hrs.	99
5.3.2. Estudio numérico del comportamiento asintótico.	103
Conclusión	107
Bibliografía	108

Índice de Tablas

1.1.	Resumen de reacciones modelo operón <i>cop E faecalis</i>	10
2.1.	Lista de parámetros modelo ΣP	19
2.2.	Variables de estado del modelo Σ	20
2.3.	Lista de parámetros modelo Σ	21
5.1.	Parámetros usados en los experimentos numéricos.	83
5.2.	Tabla de valores estado estacionario.	103

Índice de Ilustraciones

1.1. Esquema operón.	7
1.2. Esquema operón <i>cop</i> de <i>E. faecalis</i>	9
3.1. Grafo de interacción para el modelo de Goodwin simplificado.	35
4.1. Modelo ΣPI . Subgrafo formado por x_1, x_2, x_4, x_5, x_7 y x_8	43
4.2. Modelo ΣPI . Ciclo negativo formado por x_1, x_2, x_4, x_5, x_7 y x_8	44
4.3. Grafo de interacción asociado al sistema ΣPII	45
4.4. Modelo ΣPII . Subgrafo formado por x_1, x_2, x_5 y x_7	45
4.5. Modelo ΣPII . Ciclo negativo formado por x_2, x_4, x_5 y x_8	46
4.6. Grafo de interacciones sistema ΣPII	49
4.7. Grafo de interacciones del sistema controlado asociado a ΣPII	50
4.8. Soluciones de (4.71) para valores de $r = \frac{S\beta}{\delta\beta'}$ y K_d entre 0 y 100.	66
5.1. Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que satisfacen las condiciones del Teorema 4.6	69
5.2. Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que satisfacen las condiciones del Teorema 4.6 con igualdad.	70
5.3. Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que no satisfacen las condiciones del Teorema 4.6	70
5.4. Dinámica del sistema bajo perturbación periódica para $\varepsilon = 10^{-6}$	73
5.5. Dinámica del sistema bajo perturbación periódica para $\varepsilon = 10^{-4}$	74
5.6. Dinámica del sistema bajo perturbación periódica para $\varepsilon = 10^{-2}$	75
5.7. Dinámica del sistema bajo perturbación periódica para $\varepsilon = 1$	76
5.8. Dinámica de la concentración de mRNA bajo perturbación periódica para $\varepsilon = 10^{-4}$	77
5.9. Dinámica del sistema bajo perturbación constante para $\varepsilon = 10^{-6}$	78
5.10. Dinámica del sistema bajo perturbación constante para $\varepsilon = 10^{-4}$	79
5.11. Dinámica del sistema bajo perturbación constante para $\varepsilon = 10^{-2}$	80
5.12. Dinámica del sistema bajo perturbación constante para $\varepsilon = 1$	80
5.13. Incrementos porcentuales de las concentraciones de cobre intracelular experimentales y simuladas a partir del modelo Σ	84
5.14. Incrementos en concentraciones de mRNA experimentales y simuladas a partir del modelo Σ en distintos tiempos.	85
5.15. Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso de 0,5 mM por 3 hrs.	87

5.16. Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 0,5 mM por 3 hrs.	88
5.17. Concentraciones de variables de estado bajo un pulso de 0,5 mM por 3 hrs. .	89
5.18. Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso 1 mM por 3 hrs.	91
5.19. Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 1 mM por 3 hrs.	92
5.20. Concentraciones de variables de estado del sistema bajo un pulso de 1 mM por 3 hrs.	93
5.21. Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso de 0,5 mM por 6 hrs.	95
5.22. Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 0,5 mM por 6 hrs.	96
5.23. Concentraciones de variables de estado bajo un pulso 0,5 mM por 6 hrs. . . .	97
5.24. Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un tren de pulsos de 0,5 mM cada 1hr	99
5.25. Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un tren de pulsos de 0.5 mM cada 1hr.	100
5.26. Concentraciones de variables de estado bajo un tren de pulsos de 0.5 mM cada 1hr.	101
5.27. Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs.	104
5.28. Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs.	105
5.29. Concentraciones variables de estado, bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs. . . .	106

Introducción

0.0.1. Motivación.

Entre los aspectos fundamentales que caracterizan a los seres vivos, está la capacidad para adaptarse a cambios bruscos en las condiciones ambientales. En términos generales, se observa que, sin cambios extremos del medio ambiente, los organismos vivos mantienen un equilibrio o condición de armonía denominada **homeostasis** [17].

Para hacer frente al desafío de entender los mecanismos homeostáticos que han desarrollado los distintos organismos vivos, cobra relevancia un enfoque conocido en biología, llamado **comprendimiento a nivel de sistemas**, que se caracteriza por el análisis de la estructura y la dinámica de lo observado por sobre el estudio de cada elemento por separado [36].

Un sistema es una colección de elementos interrelacionados que exhibe un comportamiento único como estructura o como todo [32]. En las últimas décadas, se ha cimentado un nuevo campo de investigación multidisciplinario conocido como **biología de sistemas**. Más allá de la definición del concepto (que puede variar entre distintos autores), existe consenso en dos características propias de esta disciplina: a) el uso y comprensión de un conjunto de datos relativos al comportamiento de un sistema y b) el uso de modelos matemáticos como herramientas para hacer predicciones y aportar intuición sobre el funcionamiento de un sistema biológico [20]. Este avance, va de la mano de una serie de adelantos en las técnicas experimentales empleadas por la biología celular y molecular que han hecho posible el avance y crecimiento de la biología de sistemas en los últimos tiempos [52, 27, 29].

Además del estudio de la estructura, la dinámica es uno de los elementos claves en el análisis de un fenómeno biológico a nivel de sistemas, existiendo diversos métodos tanto analíticos como experimentales que permiten su entendimiento [36]. En este sentido, resulta común en biología de sistemas, así como en otras áreas relacionadas con la biología, usar los modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) [19]. En este tipo de construcciones, se estudia la evolución temporal de la tasa de variación de las concentraciones promedio de los distintos elementos de un sistema biológico.

Una elección fundamental en el estudio de la homeostasis en sistemas vivos es el tipo de organismo que se escoge para construir un modelo. En general, dada su complejidad comparativa con otro tipo de sistemas vivos, las bacterias son modelos ideales para el estudio de diversos aspectos fundamentales en bioquímica y biología molecular [3]. Esto se debe, principalmente a su simpleza. Por ejemplo, se ha determinado que el genoma de la bacteria

E. coli es del orden de miles de veces más simple que el genoma humano [3]. Junto con la elección de un organismo simple, en los inicios de la biología molecular los investigadores se centraron en el estudio de cuatro mecanismos claves: la replicación, la transcripción, la síntesis de proteínas y el control de la actividad de los genes [31]. En particular, la regulación transcripcional, entendida como el conjunto de mecanismos que seleccionan y dosifican la transcripción de los genes [40], es un aspecto esencial en el estudio de la homeostasis. Por ejemplo, en [40] se lo estudia como un elemento clave en la homeostasis de energía de un organismo, así como en [50] se lo estudia en el marco de una investigación de la homeostasis del hierro en seres humanos.

Así como se entiende la homeostasis en cuanto a una condición de armonía, existen fuerzas antagonistas que se oponen a ella, amenazando su mantención en el tiempo. Se entenderá por estrés a un estado de disarmonía que se opone o amenaza a la homeostasis y que es propiciado o generado por un agente externo denominado estresor, frente al que, un organismo puede defenderse mediante mecanismos específicos o inespecíficos [17]. En este contexto, la elección del cobre como señal o agente estresor para el estudio de la homeostasis es interesante debido a la gran variedad de mecanismos que exhiben distintas bacterias para su captación y transporte así como su relevancia biológica, dada por su constitución, que se traduce en su capacidad de funcionar como cofactor en procesos enzimáticos [55].

Ciertos metales, como es el caso del cobre, el hierro y el zinc, son oligoelementos fundamentales en la mayoría de los organismos [61]. Estos últimos, forman parte esencial de distintos procesos biológicos. Se ha demostrado que cerca de la mitad de las enzimas necesita asociarse a algún tipo de metal para cumplir con su función, por ejemplo, el cobre y el hierro son metales que sirven como conductores de electrones en el caso de las oxidoreductasas. [73]. Sin embargo, aún cuando estos metales son claves para distintos procesos vitales en los organismos vivos, en grandes concentraciones, pueden actuar como agentes tóxicos, especialmente el cobre, debido a su actividad *redox* y a su capacidad de unirse a los sitios activos correspondientes a otros metales [71].

Estas últimas observaciones, sugieren la existencia de un mecanismo que permite mantener la concentración interna de metales en un organismo vivo en rangos tales que no inhabilite su uso en los distintos procesos biológicos, pero que no esté por encima de un umbral tóxico. En efecto, se ha constatado la evolución de complejos mecanismos homeostáticos en bacterias [71]. En este contexto, el modelamiento matemático constituye una herramienta potente, capaz de enfrentar el desafío de describir la dinámica de los sistemas homeostáticos, resumiendo los datos provenientes de observaciones experimentales así como constituyendo modelos predictivos [18].

0.0.2. Modelamiento matemático de sistemas homeostáticos.

Desde el punto de vista del modelamiento matemático, una forma de entender la homeostasis consistió en conjeturar [68] el tipo de relación que debían satisfacer las variables dentro de un sistema de EDO que presentaba un comportamiento de oscilaciones acotadas en torno a un estado de equilibrio. Esto se interpreta como que las concentraciones de las sustancias que componen el sistemas en estudio se mantienen en un cierto rango. Esta conjetura fue

demostrada en [65].

Aún cuando este tipo de condiciones es de carácter necesario, constituye un indicio que motiva el estudio de estructuras generales en los modelos que garanticen un comportamiento homeostático definido en algún sentido.

Siguiendo esta línea de razonamiento, uno de los modelos clásicos y más estudiados en esta área es el modelo de Goodwin [23, 24]. Esta construcción describe la auto regulación negativa de la actividad de un gen. En su versión más simple, el modelo se puede representar por un sistema de 3 ecuaciones diferenciales. No es difícil demostrar que en este caso, el sistema tiene un único equilibrio (ver ejemplo 3.4.3). En un caso más general, se ha demostrado que, bajo ciertas condiciones, existen oscilaciones estables en torno a un único equilibrio [47]. También hay otros resultados sobre modelos de sistemas homeostáticos ampliamente estudiados como, por ejemplo, el modelo del operón lac [43].

Respecto a la homeostasis de metales, existen distintos estudios que buscan describir los mecanismos de regulación de diferentes tipos de bacterias desde la biología molecular. En particular, un modelo para el operón *cop* de *E. hirae* se explica en [51, 62], mientras que para *E. faecalis* está el trabajo [57]. Esta última bacteria, establece un campo de estudio más amplio. En efecto, existe evidencia experimental que sugiere la existencia de otros procesos aparte del funcionamiento del operón *cop* relacionados con la homeostasis de cobre en *E. faecalis* [57]. Estas evidencias, presentan la posibilidad de construir modelos que sean capaces de describir la homeostasis de cobre incorporando otros mecanismos que complementen la función del operón *cop*. Adicionalmente, la cercanía filogenética de *E. faecalis* con *E. hirae* permite suponer la existencia de homología en los mecanismos de homeostasis de cobre en ambas bacterias [57]. Estos aportes de la biología sirven de fundamento al modelamiento matemático. En este sentido, en [49] se propone un modelo de EDO para el operón *cop* de *E. hirae*, en el que se demuestra la existencia de un único equilibrio y se explora la idea de homeostasis en el sentido de [68, 65].

En un contexto más general, basándose en el estudio de una clase de sistema dinámico, llamada sistemas monótonos, los trabajos [64, 6, 22, 21] han aportado fuertes herramientas en la búsqueda de condiciones generales que aseguren convergencia y estabilidad de sistemas biológicos.

Finalmente, la referencia a otros trabajos vinculados al estudio de la homeostasis de metales diferentes en [61, 16], especialmente en [16], donde se ataca el problema de los parámetros de un sistema de EDO desde el punto de vista de los problemas inversos.

0.0.3. Proyecciones.

Desde el punto de vista económico, la minería del cobre constituye una actividad fundamental para una sociedad moderna donde este metal tiene un uso intensivo en diversas áreas de la industria. En Chile, su extracción constituye una piedra angular de la economía nacional. Dentro de los mecanismos sustentables de importancia reciente para la refinación de minerales de cobre, aparece el uso industrial de las bacterias *At. ferrooxidans* en un pro-

ceso conocido como **biolixiviación**. Estas últimas, se alimentan principalmente de arsénico y azufre, dos impurezas que deben ser extraídas del mineral para producir cobre, generando ácido sulfurico además de otros compuestos que son inocuos para el ser humano, lo que hace a este proceso menos dañino para el ambiente en comparación con otros mecanismos [1]. Junto con sus bondades ambientales, la biolixiviación es un procedimiento de bajo costo en relación a otros usados actualmente [1]. Se estima que la cantidad de recursos de baja ley que tiene Codelco sin explotar y que serían utilizables a partir de estos métodos, debido a sus bajos costos, son similares en monto a los que se están explotando actualmente por lo que, el avance y desarrollo en esta área contribuiría a multiplicar la producción de la empresa, significando más recursos para el país [2]. Por otra parte, se destaca en el último tiempo los trabajos [38, 69] como una contribución a esta área de investigación.

Los argumentos anteriores son suficientes para pensar en el beneficio de construir modelos predictivos que permitan entender el funcionamiento de sistemas biológicos, buscando incidir en la innovación tecnológica de procesos relacionados con la industria. Es así como, el esfuerzo realizado en este trabajo, cobra relevancia como una primera aproximación para entender los procesos del metabolismo del cobre en bacterias, aportando una base para generalizar los resultados obtenidos a sistemas homeostáticos de metales pesados más generales.

Capítulo 1

Modelo biológico.

1.1. Introducción.

La capacidad de un organismo para adaptarse frente a cambios del medio es una de las cualidades fundamentales que permiten la supervivencia de muchas especies. Los distintos avances de las ciencias biológicas experimentales han permitido en las últimas décadas desentrañar misterios tras el funcionamiento y regulación de la expresión de los genes como mecanismo adaptativo. Uno de los modelos más importantes de regulación genética, el operón, fue propuesto hace más de 40 años por Jacob y Monod en [32]. En ese trabajo, los investigadores postularon el marco conceptual que permitía entender cómo las bacterias pasaban de un estado de crecimiento a otro en los distintos cultivos [41]. El modelo proponía la existencia de una estructura funcional, compuesta de varios genes encargados de una tarea específica relacionada con el metabolismo de la bacteria. Este conjunto de genes estaría regulado respecto a un estímulo o señal externa y respondería de acuerdo a las necesidades metabólicas del organismo. Este modelo todavía sigue en vigencia, en términos generales, hasta hoy en día [41].

Comenzando con una revisión de los conceptos básicos relacionados con homeostasis y regulación transcripcional, en el presente capítulo, se formulan las bases biológicas del modelo del operón *cop* de *E. faecalis* que será estudiado durante este trabajo. Se propondrán las principales hipótesis, contrastadas con evidencia experimental, que sustentan el modelamiento. Finalmente, se resumirán, las reacciones químicas de las que se compone el modelo y que se traducirán en el siguiente capítulo, en un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias.

1.2. Conceptos básicos.

1.2.1. Homeostasis.

Los distintos seres vivos sobreviven manteniendo la armonía sobre complejas condiciones internas que se ven afectadas constantemente por diversos estímulos externos. A este equilibrio dinámico se le denomina homeostasis [17].

Para que la homeostasis, como estado de equilibrio se mantenga, requiere que el organismo esté dotado de una serie de mecanismos adaptativos cuyo objetivo es funcionar como una fuerza restitutiva frente a estímulos que perturben este estado y lo lleven a un estado de estrés [17].

Tal como se señalaba en la introducción de este trabajo, los metales son un modelo interesante de estímulo dada la existencia de amplios y sofisticados mecanismos de homeostasis en bacterias [55]. Adicionalmente, los metales son elementos indispensables para una serie de reacciones vitales pero, en concentraciones elevadas resultan tóxicos y pueden significar la muerte del organismo. Esto último con especial énfasis en relación con los distintos mecanismos que poseen los seres vivos para mantener las condiciones internas de metales en niveles que permitan la subsistencia. Ello ha motivado diversos estudios [62, 45, 46], en donde se estudian los mecanismos relacionados con la homeostasis de metales en bacterias.

Desde un punto de vista matemático, y como se verá más adelante en este trabajo, la homeostasis aparece ligada a la existencia de atractores globales estables únicos (estados o trayectorias oscilatorias estables a las que la dinámica tiende a largo plazo). En este contexto, en [68] se conjetura respecto a las condiciones necesarias para la existencia de un comportamiento homeostático. Estas últimas son demostradas en [65], bajo ciertas hipótesis.

Además de ésta última definición, se puede entender la homeostasis desde un punto de vista débil, entendiendo esta última como la capacidad de mantener las condiciones internas durante un intervalo de tiempo acotado [49].

Un objetivo central de este trabajo, será la construcción de un modelo que permita reflejar los mecanismos mediante los que, la bacteria *E. faecalis*, mantiene las concentraciones internas de cobre en un rango seguro para la vida, es decir suficiente abundancia para utilizar el cobre como cofactor en reacciones químicas vitales pero menor a una cantidad tóxica que pudiese poner en riesgo la vida de la bacteria.

1.2.2. Regulación transcripcional en bacterias.

Se conoce como **transcripción**, al proceso mediante el cual la proteína RNA-polimerasa (RNAP) sintetiza una molécula de RNA mensajero (mRNA) que contiene la información codificada de un gen. Luego, a partir del mRNA se sintetiza una proteína, también llamada expresión o producto del gen. Este proceso se conoce como **traducción**. La tasa a la que se sintetiza el mRNA, es decir, la cantidad de mRNA por unidad de tiempo se regula en una

región específica del DNA, conocida como **promotor**, situada especialmente antes de los genes que se van a transcribir. La proteína RNAP se une físicamente a esta región, estableciendo el concepto de afinidad de la interacción entre la región promotora y la RNAP. Esta interacción puede ser afectada por componentes denominados **factores de transcripción**, los que inciden sobre la tasa de transcripción de un conjunto determinado de genes, llamados **genes objetivo**. Si un factor de transcripción aumenta la tasa de transcripción de sus genes objetivo, se denominará **activador** y si produce el efecto contrario, se le denominará **represor**.

La región sobre el promotor donde un activador o un represor se unen se llama operador o *binding site*. La presencia de los *binding sites* va a impactar(activando o reprimiendo) la transcripción de un conjunto de genes objetivo. En particular, los genes objetivo en las bacterias pueden constituir una sola unidad, lo que implica que comparten la misma región promotora(incluyendo los binding sites). El conjunto de estos elementos: promotor, binding site y genes objetivo determinan la unidad funcional de la transcripción que se denomina operón, el cual se describe en la Figura 1.1.

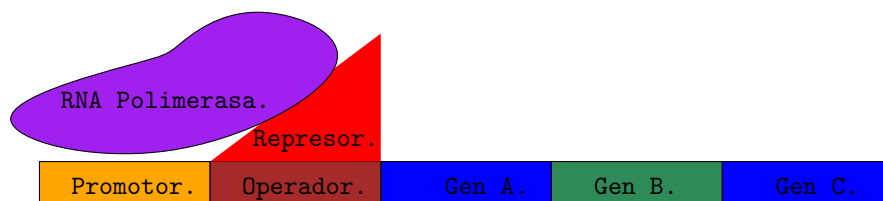


Figura 1.1: Esquema operón. Los genes A, B y C son corregulados por el represor en rojo.

En el funcionamiento de un operón, generalmente, existe una señal externa que incide en el factor de transcripción que incide en el aumento o la disminución en la tasa de producción del mRNA, lo que significa finalmente un aumento o disminución en la expresión de un gen. Esta señal es típicamente una sustancia química que se denomina **inductor**. Este tipo de mecanismo adaptativo le permite a la bacteria responder frente a cambios en las condiciones ambientales. Para más detalles se sugiere consultar [4, Cap. 2].

Un ejemplo clásico es el del operón *lac* en la bacteria *E. coli*. El operón está compuesto por tres genes: *lacY*, *lacZ* y *lacA*. Los dos primeros cumplen funciones de transporte y degradación de la lactosa respectivamente y el último tiene una función no relacionada con el metabolismo de la lactosa pero, vital para la célula [41]. En presencia de lactosa, la expresión de estos genes se encuentra inhibida por una molécula llamada alolactosa que es producida a partir de la lactosa transportada dentro de la célula. Cuando los niveles de lactosa son bajos, los genes *lac* producen proteínas que intervienen en la entrada y metabolismo de la lactosa. Por otra parte, para iniciar la transcripción se requiere de dos moléculas llamadas cAMP y CAP. Para más detalles sobre este proceso se sugiere ver [10, 11].

Desde el punto de vista matemático, se han estudiado desde hace tiempo distintos modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias que describen modelos de regulación génica [8, 9].

Basándose en estos últimos, en [43] se presenta un estudio sobre propiedades de estabilidad global de un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias que modela la dinámica del operón *lac*.

1.3. Modelo biológico del operón *cop* en *E. faecalis*.

La siguiente descripción de la dinámica del operón *cop* en *E. faecalis* está basada en el trabajo [51] sobre el operón *cop* en *E. hirae*, entendiendo que las lógicas en las que funcionan estos mecanismos, en ambas bacterias son similares, dado el alto porcentaje de homología entre ambos operones [56]. De acuerdo con los resultados planteados en [57], el modelo de operón está compuesto de tres genes: *copY*, *copZ* y *copA*. Los dos últimos codifican para proteínas involucradas en la distribución y salida del cobre de la célula, mientras que *copY* contiene la información para un represor que autorregula negativamente al operón. En términos de su funcionamiento, una vez que el cobre ingresa a la célula, la homeostasis del cobre consta de los siguientes procesos clave:

1. **Transporte intracelular del cobre:** la proteína CopZ funciona como una proteína chaperona, transportando el cobre al interior de la célula. Esta proteína forma el complejo CopZCu que interactúa a su vez con el factor transcripcional CopY y con la proteína CopA.
2. **Salida del cobre:** La proteína CopA opera como una ATPasa de eflujo de cobre, encargada de expulsar este metal hacia el medio extracelular.
3. **Regulación transcripcional:** La proteína CopY opera en forma de dímero, es decir, dos moléculas interactúan con el *binding site*. En bajas concentraciones de cobre, esta proteína bloquea la transcripción, formando un complejo con el zinc permitiéndole reconocer la secuencia *binding site*. No obstante, CopY posee una mayor afinidad con el cobre que por éste último metal, por lo que cuando las concentraciones de cobre aumentan, esta se une al cobre y se disocia del *binding-site*, permitiendo la transcripción de los genes del operón.

Un resumen del modelo del operon *cop* de *E. faecalis* se muestra en la Figura 1.2.

Respecto a la entrada de cobre, a la fecha se desconoce en todas las bacterias (incluyendo *E. faecalis*), cuál es el mecanismo mediante el cual, el cobre ingresa a la célula. No obstante, para efectos del modelamiento, se considera el hecho que una cantidad mínima de cobre externo debe alcanzarse para permitir la permeabilidad.

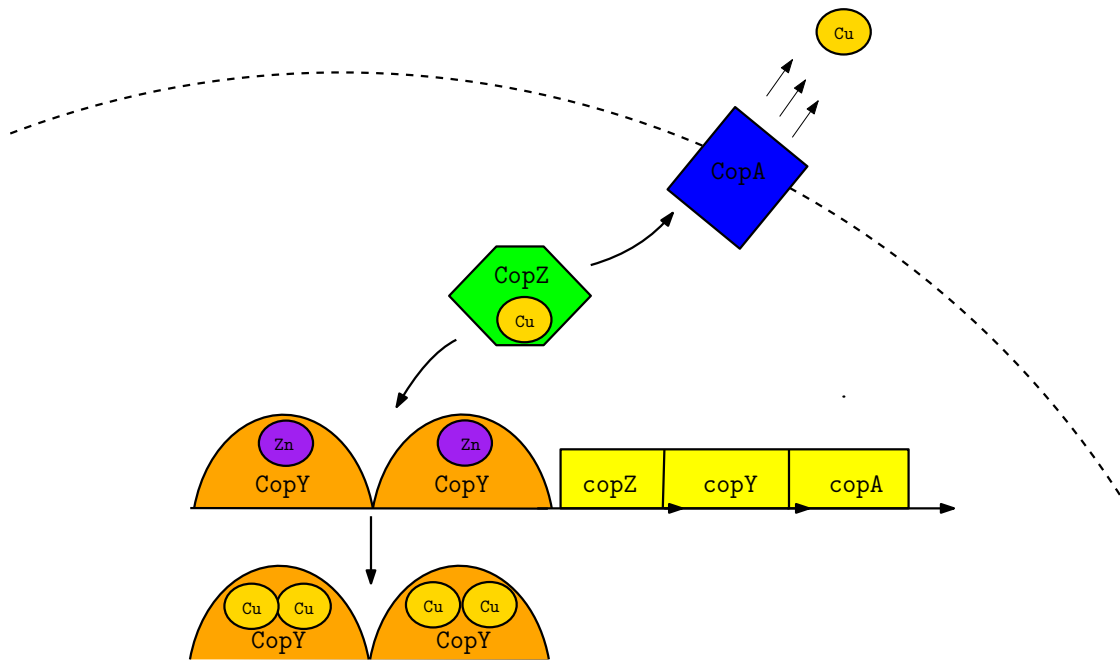


Figura 1.2: Esquema operón *cop* *E. faecalis*. La proteína chaperona CopZ transporta el cobre en el medio intracelular, permitiendo su salida a través de la proteína transportadora CopA. Por otro lado, también el complejo CopZCu interactúa con el factor de transcripción CopY que regula la expresión de los genes a partir de los que se sintetizan estas proteínas. En presencia de cobre, CopY se disocia del *binding site*, permitiendo que se active la maquinaria de transcripción.

Por otro lado, para representar otros posibles usos del cobre al interior de la membrana celular, así como, por ejemplo, mecanismos de almacenaje, se introduce una variable al sistema, denominada cobre libre. Se hace incapié en que la evidencia indica que el cobre no se encuentra de esta forma en el citoplasma [53], por lo que su adición al modelo cumple la única función de sumar otros usos antes descritos. Adicionalmente, a esta variable se le permite interactuar con las proteínas CopZ y CopY. Esto último, suponiendo la existencia de otros posibles mecanismos desconocidos que estén operando en la homeostasis del cobre.

Finalmente, recogiendo todo lo descrito anteriormente, se plantean un conjunto de reacciones químicas, cuyo objetivo es describir los elementos principales del operón *cop* en la homeostasis de cobre de *E. faecalis*, es decir: transporte intracelular de cobre, salida de cobre del medio intracelular y regulación transcripcional. Estas reacciones aparecen descritas en la Tabla 1.1

No	Reacción	Descripción
1	$BS1 \xrightarrow{\beta} mRNA$	transcripción.
2	$mRNA \xrightarrow{S} CopA, mRNA \xrightarrow{S} CopY, mRNA \xrightarrow{S} CopZ$	síntesis de proteínas.
3	$Cu_{ex} \rightarrow Cu$	entrada de cobre.
4	$Cu \xrightarrow{+CopA} Cu_{ex}, CopZCu \xrightarrow{+CopA} Cu_{ex} + CopZ$	salida de cobre.
5	$CopZ + Cu \xrightleftharpoons[A_{CopZCu}]{D_{CopZCu}} CopZCu$	transporte de cobre.
6	$CopY + 2Cu \xrightleftharpoons[A_{CopYCu}]{D_{CopYCu}} CopYCu_2$	regulación transcripcional.
7	$CopY + 2CopZCu \xrightleftharpoons[A_{CopYCopZCu}]{D_{CopYCopZCu}} CopYCu_2 + 2CopZ$	regulación transcripcional.
8	$CopA, CopY, CopZ \xrightarrow{\delta} \emptyset, CopZCu \xrightarrow{\delta} \emptyset + Cu, CopYCu_2 \xrightarrow{\delta} \emptyset + 2Cu$	degradación de proteínas.
9	$mRNA \xrightarrow{\delta'} \emptyset$	degradación mRNA.

Tabla 1.1: Resumen de reacciones modelo operón *cop* *E faecalis*.

Capítulo 2

Modelamiento matemático.

2.1. Introducción.

Uno de los modelos más comunes en biología de sistemas son los basados en Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO). De hecho, es uno de los modelos más comunes en el análisis de redes de regulación genética [19]. En este tipo de modelos, se considera la evolución temporal de las concentraciones promedio de los distintos componentes que se están estudiando. Los efectos espaciales son ignorados y se asume que las especies químicas interactúan en un compartimiento cerrado (puede ser el citoplasma de la célula por ejemplo). Distintas clases de estrategias de análisis y estudios de este tipo de modelos han sido planteados y significan un aporte importante para los cimientos de esta nueva disciplina (ver [35] o [48]).

En este contexto, existen diferentes formas de modelar la tasa de cambio de las concentraciones de los distintos componentes que se están estudiando. Uno de los modelos más clásicos utilizados aquí es la ley de acción de masas. Éste plantea que, dada una reacción química, la tasa de cambio de las concentraciones es proporcional a la concentración de los reactantes involucrados.

Por otro lado, para explicar fenómenos que ocurren frecuentemente en procesos bioquímicos como, por ejemplo, la cooperatividad y la saturación, se hace necesario plantear otro tipo de modelos, basados en aproximaciones que tienen en cuenta las distintas escalas temporales en las que suceden diversos subprocesos dentro del fenómeno que se busca modelar. Tales modelos son las aproximaciones de Michaelis-Menten y la ecuación de Hill.

En el presente capítulo, se plantearán dos modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias para estudiar la homeostasis de cobre en *E. faecalis*: un primer modelo compuesto únicamente por polinomios en el lado derecho, haciendo uso de la ley de acción de masas y aproximaciones lineales (ΣP) y un modelo más realista que incluye funciones de regulación (Σ). El primer tipo de modelo se propuso con un propósito exploratorio y, por lo mismo, da cuenta de todos los procesos del modelo biológico descritos en el capítulo anterior. A partir de estas operaciones que aportaron un entendimiento general de la dinámica del cobre, se construyó un modelo más realista que se hace cargo de elementos más específicos del mismo e identificados como

esenciales en las etapas anteriores del modelamiento.

Por último, la estructura de organización de este capítulo es la siguiente: en primer lugar, se presentarán, las principales herramientas usadas en la construcción de modelos en biología de sistemas. Estas constituyen la piedra angular del modelo propuesto en el presente trabajo. Luego, se explicarán las hipótesis adoptadas en la construcción de éste y finalmente se terminarán planteando las ecuaciones del modelo.

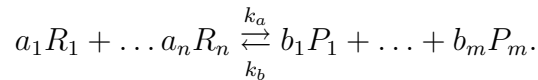
2.2. Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias.

2.2.1. Ley de acción de masas y formalismo de potencias.

Una de las representaciones más comunes de la velocidad de una reacción en un proceso químico o biológico es la ley de acción de masas. Considerada una de las más antiguas formas de representar la tasa de cambio de una reacción química, ha tenido un impacto significativo en el desarrollo de la biología de sistemas, tanto así que es considerada como una de las responsables del comienzo del desarrollo de las simulaciones de procesos químicos y dinámicas de difusión con impacto en otras disciplinas como la epidemiología y la ecología [72].

A continuación, se define formalmente la ley de acción de masas. La premisa fundamental de este modelo es que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de los reactantes involucrados.

Definición 2.1 (Ley de acción de masas) *Dada una reacción química de la forma:*

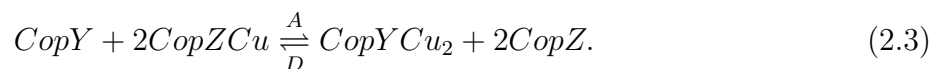


La cinética de cada especie queda dada por:

$$\frac{d[R_i]}{dt} = -a_i k_a \prod_{j=1}^n [R_j] + a_i k_b \prod_{k=1}^m [P_k], \quad (2.1)$$

$$\frac{d[P_i]}{dt} = -b_i k_b \prod_{j=1}^m [P_j] + b_i k_a \prod_{k=1}^n [R_k]. \quad (2.2)$$

Ejemplo. Dentro de las reacciones involucradas en la dinámica del operón Cop, una reacción muy importante es la relación entre CopZ con cobre y el represor CopY:



Usando la ley de acción de masas, la dinámica queda definida por:

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{CopY}]}{dt} &= -A[\text{CopY}][\text{CopZCu}]^2 + D[\text{CopYCu}_2][\text{CopZ}]^2, \\ \frac{d[\text{CopZCu}]}{dt} &= -2A[\text{CopY}][\text{CopZCu}]^2 + 2D[\text{CopYCu}_2][\text{CopZ}]^2, \\ \frac{d[\text{CopYCu}_2]}{dt} &= -D[\text{CopYCu}_2][\text{CopZ}]^2 + A[\text{CopY}][\text{CopZCu}]^2, \\ \frac{d[\text{CopZ}]}{dt} &= -2D[\text{CopYCu}_2][\text{CopZ}]^2 + 2A[\text{CopY}][\text{CopZCu}]^2.\end{aligned}$$

La inspiración fundamental de la ley de acción de masas radica en la teoría de colisiones. Se piensa en un medio bien mezclado (homogéneo) en donde existen muchas partículas, estas últimas interactúan entre si, colisionando unas con otras. Sin embargo, no todas estas colisiones desencadenan una reacción química.

En este contexto, la ley de acción de masas busca modelar una reacción química basándose en el comportamiento promedio de las distintas moléculas del medio. En ese sentido, la constante de proporcionalidad representa, en alguna medida, las condiciones de temperatura, proximidad, afinidad que pueden incidir en la forma en que las partículas colisionan y en esta medida de como se producen las reacciones químicas.

Dicho lo anterior, cuando no se cumplen las hipótesis anteriores, es decir, cuando existen concentraciones muy pequeñas o cuando el medio no es homogéneo, se presentan limitaciones al modelo. Otro caso en donde este modelo no funciona bien, es al describir procesos químicos mediados por catalizadores como, por ejemplo, enzimas. Si hay un sustrato que se está convirtiendo en otro compuesto como producto en una reacción mediada por una enzima, un aumento en la concentración de sustrato no representa automáticamente un aumento de la concentración de producto. Existe un efecto de saturación asociado. Para más detalles ver [63, pg. 66]

Finalmente, se señala que se ha propuesto una generalización de la ley de acción de masas, llamada ley de acción de masas generalizada o ley de potencias. Esta última tiene una forma similar que (2.2), pero incluye la adición de exponentes racionales en las concentraciones de reactantes y productos (ver [59]). Se ha postulado en distintos trabajos que el resto de los formalismos usados en el modelamiento en biología de sistemas (así como en otras disciplinas relacionadas con la ecología o la epidemiología) son reducidos a esta forma [59, 60].

2.2.2. Aproximaciones del estado estacionario.

Tal como se señalaba al final de la sección anterior, existen limitaciones para la ley de acción de masas. Para establecer un modelamiento más detallado de la dinámica a estudiar, se hace necesario usar modelos que permitan describir fenómenos como la cooperatividad y la saturación. La cooperatividad tiene que ver con la dependencia entre la afinidad de una molécula por otra y la concentración de alguna de ellas. Por ejemplo, si hay una molécula que se adhiere a otra y esta última tiene varios sitios posibles donde la primera puede anclarse

(*binding sites*) la afinidad de la última por la primera aumenta o disminuye si hay binding sites que se han ido ocupando (ver, por ejemplo, [42] en donde se estudia la cooperatividad positiva del calcio).

La saturación, tiene que ver con la capacidad estructural de una enzima de servir de catalizador en una reacción química. La saturación ocurre cuando todos los sitios activos de la enzima están ocupados por sustrato (ver, por ejemplo, [12, sección 8.4] donde se explica la dinámica de las enzimas junto con el modelo de Michaelis-Menten).

Para modelar estos fenómenos, se introducen los formalismos de Hill y Michaelis-Menten. El primero, tiene su origen en el estudio de la reacción de la hemoglobina con el oxígeno (ver [74, pg.66-74]) en el torrente sanguíneo y ha sido muy usado en el modelamiento de la regulación transcripcional (ver [4, Apéndice A]). El segundo, es un modelo clásico en el estudio de la cinética enzimática y recoge el fenómeno de la saturación producido en este tipo de dinámicas. Ambos se basan en la ley de acción de masas y en las aproximaciones basadas en la observación de las distintas escalas de tiempo en la que suceden diversos procesos asociados al fenómeno a estudiar.

A continuación, se deduce cada uno de estos modelos:

2.2.2.1. Modelo de Michaelis-Menten.

Se considera una reacción de la forma:



En donde, E representa la concentración de una enzima, S el sustrato, ES el complejo enzima-producto y P el producto generado. La hipótesis principales para la aproximación son las siguientes:

- La concentración de enzima es menor que la concentración de sustrato ($[E] \ll [S]$).
- La reacción de formación del complejo enzima-sustrato ocurre mucho más rápido que la de síntesis del producto ($k_a, k_b \gg k$). Por lo que se puede considerar:

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0. \quad (2.5)$$

Esta aproximación se conoce como aproximación de estado estacionario.

Usando la ley de acción de masas, se obtiene el siguiente sistema de cuatro ecuaciones:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_a[E][S] + k_b[ES], \quad (2.6)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_a[E][S] + (k_b + k)[ES], \quad (2.7)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_a[E][S] - (k_b + k)[ES], \quad (2.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = k[ES]. \quad (2.9)$$

Usando las hipótesis, se impone:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0. \quad (2.10)$$

Por otro lado, sumando (2.7) con (2.8) se obtiene

$$\frac{d[E]}{dt} + \frac{d[ES]}{dt} = 0,$$

de lo que se deduce:

$$[E]_t = [E] + [ES], \quad (2.11)$$

donde $[E]_t$ es una constante que representa la concentración total de enzima.

Usando (2.10) y (2.11) en 2.8, se obtiene:

$$0 = k_a([E]_t - [ES])[S] - (k_b + k)[ES], \quad (2.12)$$

despejando $[ES]$, se deduce:

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{[S] + \frac{k_b+k}{k_a}}, \quad (2.13)$$

de donde se concluye de 2.9 que:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{[S] + K_m} = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}, \quad (2.14)$$

donde $k_{cat} = k$, $K_m = \frac{k_b+k}{k_a}$ y $v_{max} = k_{cat}[E]_t$.

Además, reemplazando en (2.6), se obtiene:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_{cat}[E]_t[S]}{[S] + K_m} = -v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}. \quad (2.15)$$

Observación. Este modelo fue originalmente planteado en [44], pero en [14], aparece un desarrollo más simple de justificar. La diferencia de interpretaciones entre estos enfoques, tiene relación con (2.11). A menudo, a la segunda interpretación se la llama aproximación de cuasi-estado estacionario. Una discusión detallada respecto a las posibles interpretaciones y a la intuición detrás de este resultado, puede leerse en [63].

Ejemplo. Se considera la siguiente reacción química, con la que se modela la salida de cobre en *E. Faecalis*:



Aplicando la lógica anterior, se obtiene:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Cu}_{\text{ext}}]}{dt} &= k_{\text{catCopA}}[\text{CopA}] \frac{[\text{CopZCu}]}{K_{\text{m,CopA}} + [\text{CopZCu}]}, \\ \frac{d[\text{CopZCu}]}{dt} &= -k_{\text{catCopA}}[\text{CopA}] \frac{[\text{CopZCu}]}{K_{\text{m,CopA}} + [\text{CopZCu}]}, \\ \frac{d[\text{CopZ}]}{dt} &= k_{\text{catCopA}}[\text{CopA}] \frac{[\text{CopZCu}]}{K_{\text{m,CopA}} + [\text{CopZCu}]}. \end{aligned}$$

2.2.2.2. Modelo de Hill y cooperatividad.

Comúnmente, los factores de transcripción están compuestos de múltiples copias de la misma proteína (por ejemplo, en el caso de ser dos copias, se les llama dímero) y cada una de estas subunidades puede unirse libremente con una sustancia inductora, alcanzando usualmente un nivel de actividad completo cuando todas las subunidades que lo componen se han unido al inductor [4]. Por otro lado, estas subunidades también interactúan con el binding site del operón, produciendo también un efecto de cooperatividad [13].

Según lo expuesto en [51], el factor de transcripción CopY funciona como un dímero (dos copias interactúan con el binding site). Para modelar este tipo de situaciones de forma más realista, se introduce el formalismo denominado ecuación de Hill.

El fenómeno a modelar es la interacción de n subunidades de un factor de transcripción (TF) que funciona como un represor al unirse con el binding site (BS):



Se busca derivar una expresión que entregue la actividad del promotor en función de la concentración del factor de transcripción. En ese sentido, se busca encontrar una expresión para la probabilidad de que el BS esté libre, es decir:

$$\frac{[\text{BS}]}{[\text{BS}]_t}. \quad (2.17)$$

Usando, como en el caso de Michaelis-Menten, la ley de acción de masas, se deduce:

$$[\text{BS}]_t = [\text{BS}] + [\text{BSTF}_n]. \quad (2.18)$$

Haciendo una aproximación del estado estacionario análoga a la realizada en el caso de Michaelis-Menten, se impone:

$$\frac{d[TF]}{dt} = 0. \quad (2.19)$$

Se usa la ley de acción de masa para deducir la dinámica:

$$\frac{d[BSTF_n]}{dt} = k_a[TF]^n - k_b[BSTF_n]. \quad (2.20)$$

Usando (2.19) y (2.18) en (2.20), se despeja

$$\frac{[BS]}{[BS]_t} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[TF]}{K}\right)^n}, \quad (2.21)$$

en donde, $K^n = K_d = \frac{k_b}{k_a}$. Al valor n se lo conoce como el coeficiente de Hill y K es la concentración de represor necesaria para que la probabilidad de que BS esté libre sea $\frac{1}{2}$ y se conoce como **coeficiente de represión** del gen [4, pg.15]. A partir de este cálculo, se define la función de input del gen (según la notación de [13]) como:

$$f([TF]) = \beta \frac{[BS]}{[BS]_t}, \quad (2.22)$$

donde β es la tasa de máxima de síntesis de RNAm.

Ejemplo. En el caso del operón *cop* de *E. faecalis*, CopY es un dímero, es decir, $n=2$ [51], por lo que la función de Hill tendrá la forma:

$$f([CopY]) = \frac{\beta}{1 + \frac{[CopY]^2}{K^2}}. \quad (2.23)$$

2.2.3. Ecuaciones del modelo.

2.2.3.1. Hipótesis generales.

Teniendo definida una serie de herramientas que permitirán el estudio de la dinámica del operón *cop*, se formulan hipótesis teniendo en cuenta la evidencia experimental disponible y buscando simplificar lo más posible la descripción del modelo:

1. Las tasas de síntesis de las proteínas por mRNA son las mismas.
2. Se cuantifica la concentración de una sola variable asociada al mRNA que representa la concentración total de transcrito a partir del operón.
3. Las tasas de degradación de todas las proteínas sintetizadas a partir del operón son las mismas.
4. Las tasas de degradación de las proteínas y de los complejos cobre-proteínas son la misma.

Con esto se busca, por un lado, no perder precisión en la descripción del fenómeno a modelar y por otro, trabajar con un nivel de complejidad que permita hacer un análisis teórico de las ecuaciones. Respecto al punto 4 se señala en [49, pg. 6] que no existe evidencia que justifique considerar tasas de degradación distintas, salvo para el caso de CopZ, por lo que, 4, aparece como una aproximación razonable.

Teniendo en consideración las precisiones anteriores, se plantean tres sistemas de ecuaciones diferenciales:

1. Con reciclaje de cobre polinomial (ΣPI).
2. Sin reciclaje de cobre polinomial (ΣPII).
3. Sin reciclaje de cobre usando las funciones de Hill y Michaelis-Menten (Σ).

2.2.3.2. Modelo polinomial (ΣP).

Para lo que viene a continuación, se adopta la siguiente notación: $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$, $x_3 = [\text{CopZ}]$, $x_4 = [\text{CopA}]$, $x_5 = [\text{CopY}]$, $x_6 = [\text{CopZCu}]$, $x_7 = [\text{CopYCu}_2]$, $x_8 = [\text{mRNA}_1]$. Con lo que los sistemas ΣP quedan dados por las ecuaciones:

$$(\Sigma PI) \begin{cases} \dot{x}_1 = -Ux_1 + Ex_2x_4 + Ex_6x_4, \\ \dot{x}_2 = -2A_2x_2^2x_5 - A_1x_2x_3 - Ex_2x_4 + Ux_1 + D_1x_6 + 2D_2x_7 + \delta x_6 + 2\delta x_7, \\ \dot{x}_3 = 2A_3x_6^2x_5 - 2D_3x_3^2x_7 - A_1x_2x_3 + Ex_6x_4 + Sx_8 - \delta x_3 + D_1x_6, \\ \dot{x}_4 = Sx_8 - \delta x_4, \\ \dot{x}_5 = -A_2x_2^2x_5 - A_3x_6^2x_5 + D_3x_3^2x_7 + Sx_8 + D_2x_7 - \delta x_5, \\ \dot{x}_6 = -2A_3x_6^2x_5 + 2D_3x_3^2x_7 + A_1x_2x_3 - Ex_6x_4 - D_1x_6 - \delta x_6, \\ \dot{x}_7 = A_2x_2^2x_5 + A_3x_6^2x_5 - D_3x_3^2x_7 - D_2x_7 - \delta x_7, \\ \dot{x}_8 = k_0 + k_1x_2 + k_1x_6 - k_2x_5 - \delta'x_8. \end{cases} \quad (2.24)$$

En el caso ΣPII , lo único que cambia es la dinámica de x_1 , resultando simplemente:

$$\dot{x}_1 = -Ux_1. \quad (2.25)$$

Por otro lado, la notación utilizada para referirse a cada parámetro se encuentra en la siguiente tabla:

Parámetro	Descripción
A_1	Tasa de asociación CopZ - Cu.
A_2	Tasa de asociación CopY - Cu.
A_3	Tasa de asociación CopY - CopZCu.
D_1	Tasa de disociación CopZCu.
D_2	Tasa de disociación CopYCu ₂ .
D_3	Tasa de disociación CopYCu-CopZ ₂ .
U	Tasa de entrada de cobre.
E	Tasa de salida de cobre.
k_0	Tasa de transcripción basal.
k_1	Tasa de transcripción.
k_2	Tasa de transcripción.
δ	Tasa de degradación de proteínas.
δ'	Tasa de degradación de mRNA.
S	Tasa de producción de proteínas.

Tabla 2.1: Lista de parámetros modelo ΣP .

El modelo descrito en (2.24) consta de 8 variables de estado y 14 parámetros desconocidos.

2.2.3.3. Modelo más realista (Σ).

Con el objetivo de representar con mayor detalle la evidencia empírica referente al modelo biológico expuesta en el capítulo anterior se hacen las siguientes suposiciones:

1. La entrada de cobre se produce por difusión simple a una tasa máxima τ por sobre un umbral de concentración externa θ y lo hace de forma proporcional a la concentración externa para valores de concentración por debajo de θ . Esto se modela con una función sigmoide de la forma:

$$\mathcal{R}(x) = \frac{\tau x^n}{\theta + x^n},$$

donde n es un natural que se denominará coeficiente de cooperatividad.

2. La regulación transcripcional se medirá a partir de una función de *output* dada por un modelo de Hill de la forma:

$$f(x) = \frac{\beta}{1 + \left(\frac{x}{K_d}\right)^2}.$$

3. La transferencia de cobre entre proteínas en el medio intracelular se efectúa sólo a través de la proteína chaperona CopZ. La variable correspondiente al cobre interno libre sólo

representa el posible almacenaje u otros usos que la célula le dé al cobre intracelular disponible.

4. La reacción entre la chaperona CopZ con cobre y el regulador CopY, se describe en una sola dirección, es decir, $\text{CopY} + 2 \text{CopZCu} \xrightarrow{A_2} 2 \text{CopZ} + \text{CopYCu}_2$.

Basándose en estas suposiciones y asumiendo la notación:

Variable	Descripción
$x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$	Cobre extracelular
$x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$	Cobre libre intracelular
$x_3 = [\text{CopZ}]$	CopZ libre
$x_4 = [\text{CopA}]$	CopA total
$x_5 = [\text{CopY}]$	CopY libre
$x_6 = [\text{CopZCu}]$	CopZ + Cobre
$x_7 = [\text{CopYCu}_2]$	CopY + Cobre
$x_8 = [\text{mRNA}]$	mRNA
$x_9 = [\text{Cu}_{\text{ext}}^*]$	Cobre externo expulsado

Tabla 2.2: Variables de estado del modelo Σ .

Se propone el siguiente modelo de EDO (Σ):

$$\dot{x}_1 = -\frac{\tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n} \left. \vphantom{\dot{x}_1} \right\} \text{Cobre extracelular.}$$

$$\dot{x}_2 = -A_1 x_2 x_3 + D_1 x_6 + \delta x_6 + 2 \delta x_7 + \frac{\tau x_1^n}{\theta + x_1^n} \left. \vphantom{\dot{x}_2} \right\} \text{Cobre intracelular.}$$

$$\left. \begin{aligned} \dot{x}_3 &= S x_8 + 2 A_2 x_5 x_6^2 - A_1 x_2 x_3 - \delta x_3 + D_1 x_6 + \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \\ \dot{x}_4 &= S x_8 - \delta x_4 \\ \dot{x}_5 &= -A_2 x_5 x_6^2 - \delta x_5 + S x_8 \end{aligned} \right\} \text{Proteínas sin cobre.}$$

$$\left. \begin{aligned} \dot{x}_6 &= -2 A_2 x_5 x_6^2 + A_1 x_2 x_3 - D_1 x_6 - \delta x_6 - \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \\ \dot{x}_7 &= A_2 x_5 x_6^2 - \delta x_7 \end{aligned} \right\} \text{Proteínas + cobre.}$$

$$\dot{x}_8 = \frac{\beta}{\frac{x_2^2}{K_d^2} + 1} - \delta' x_8 \left. \vphantom{\dot{x}_8} \right\} \text{mRNA.}$$

$$\dot{x}_9 = \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \left. \vphantom{\dot{x}_9} \right\} \text{Cobre extracelular expulsado.}$$

Al igual que el modelo anterior, se tiene la siguiente tabla de parámetros:

Parámetro	Descripción
A_1	Tasa de asociación CopZ - Cu.
A_2	Tasa de asociación CopY - CopZCu.
D_1	Tasa de disociación CopZCu.
τ	Tasa de entrada de cobre.
θ	Umbral de entrada cobre.
β	Tasa de transcripción basal.
K_d	Coefficiente de represión.
δ	Tasa de degradación de proteínas.
δ'	Tasa de degradación de mRNA.
S	Tasa de producción de proteínas.
K_c	Constante catalítica Michaelis-Menten.
K_m	Constante salida Michaelis-Menten.

Tabla 2.3: Lista de parámetros modelo Σ .

Este modelo cuenta con 9 variables de estado y 12 parámetros.

Capítulo 3

Preeliminares.

3.1. Introducción.

El presente capítulo tiene por objetivo introducir los conceptos básicos y las herramientas teóricas que se usarán en el estudio de la homeostásis desde el punto de vista del análisis cualitativo de los sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO). Los instrumentos expuestos en la presente sección, servirán para analizar los modelos planteados en los capítulos anteriores, desde dos enfoques: a) condiciones necesarias de homeostasis en el sentido de la conjetura de Thomas [68] y b) la existencia de atractores globales, es decir, estados a los que los sistemas convergen a largo plazo usando la teoría de control y de sistemas dinámicos monótonos [6, 22, 21]. Como una forma de establecer un contexto en relación a estos últimos tópicos se exponen en forma resumida algunos conceptos básicos en teoría de sistemas dinámicos monótonos además de enunciar uno de los resultados principales de [21] que será usado en el análisis del modelo ΣPII en el capítulo siguiente. Para ello, será clave la presentación del procedimiento de descomposición descrito en [22, Apéndice I], basado en el análisis del grafo de interacción asociado a un sistema de EDO. Adicionalmente, para entregar intuición respecto a la relación entre los modelos ΣPI y ΣPII , se introducen conceptos básicos de teoría de perturbaciones que facilita el estudio del comportamiento de ΣPII , en presencia de distintos tipos de fuentes de cobre.

El capítulo está estructurado de la siguiente forma: primero se revisan los conceptos básicos relacionados con el análisis cualitativo de sistemas de EDO; en segundo lugar, se establece un resumen de los resultados más relevantes expuestos en [22, 21, 6, 28]; en tercer lugar, se explican conceptos claves relacionados con el análisis del grafo de interacción, asociado a un sistema de EDO y, finalmente, se da cuenta brevemente de algunos resultados en teoría de perturbaciones.

3.2. Conceptos básicos.

En la presente sección se establece el marco teórico básico en el contexto de los modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias. En particular, se definen los conceptos esenciales y se dan a conocer los resultados que se necesitarán para el análisis matemático de la estabilidad de los modelos presentados en este trabajo.

En general, se trabajará con sistemas de la forma

$$\frac{dx}{dt} = f(t, x) \quad (3.1)$$

En donde, se considerará $f : \mathbb{R}_+ \times X \rightarrow \mathbb{R}^n$, donde $X \subseteq \mathbb{R}^n$ es en general un abierto conexo y f es una función continua por pedazos en t y continuamente diferenciable en la variable x . Bajo estas condiciones se asegura la existencia local de soluciones [34, Teorema 3.1]¹. En particular, el caso a analizar en este trabajo es aquel autónomo, en donde el lado derecho no depende del tiempo, es decir:

$$\frac{dx}{dt} = f(x). \quad (3.2)$$

Observación. En general, los modelos de EDO pueden depender de parámetros (usualmente desconocidos). Es decir, $f = f(t, x, \lambda)$, $\lambda \in \mathbb{R}^p$. Si f es suficientemente regular (como es el caso del modelo a estudiar), en dichas variables se tendrá regularidad de la solución $x(t, \lambda)$ con respecto a λ , ver [34, Teorema 3.5].

Antes de definir los conceptos enfocados al análisis asintótico del sistema, se enuncia el siguiente teorema que es de utilidad al momento de estudiar si la soluciones del sistema (3.1) son acotadas.

Lema 3.1 (Principio de comparación²) *Sea la ecuación escalar:*

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(t, x(t)), \quad x(0) = x_0,$$

donde f es continua en t y localmente Lipschitz en la variable x para todo $(t, x) \in \Omega \subseteq \mathbb{R}^{n+1}$ abierto conexo. Sea $x(t)$ una solución del sistema anterior definida para todo $t \in [a, b]$. Sea $v(t)$ una función continuamente diferenciable que satisface:

$$\dot{v}(t) \leq f(t, v(t)), \quad v(a) \leq x(a), \quad \forall t \in [a, b],$$

entonces $v(t) \leq x(t)$, $\forall t \in [a, b]$.

Observación. Este teorema será de vital importancia en la elaboración del argumento que permitirá probar la convergencia a un único estado estacionario de las trayectorias del modelo Σ .

¹Por otro lado, pidiendo que la función f sea globalmente Lipschitz, se tiene un resultado de existencia global de soluciones. Ver [34, Teorema 3.2].

²En realidad, basta pedir que la derivada de Dini de $v(t)$ esté bien definida y cumpla con el resto de las hipótesis del teorema. Ver, por ejemplo: [34, 67, Lema 3.4 y Lema E4 respectivamente].

3.2.1. Conceptos de estabilidad e invarianza

Se introducen definiciones básicas que permitirán el estudio cualitativo del comportamiento asintótico del modelo.

Definición 3.2 (Estado estacionario) *Un punto \bar{x} se dirá estado estacionario, punto crítico o equilibrio del sistema (3.2) si satisface $f(\bar{x}) = 0$.*

Ejemplo. $\bar{x} = 0$ es el único equilibrio del sistema $\dot{x} = -x^2$.

Los estados estacionarios son elementos característicos de cada sistema de EDO y dan señas respecto a las propiedades que éstos poseen. En ese sentido, es interesante preguntarse por el comportamiento de las soluciones del sistema que parten con condiciones iniciales cercanas a los equilibrios. Esto motiva las definiciones siguientes:

Definición 3.3 (Clasificación de estados estacionarios) *Sea $x = \bar{x}$ un estado estacionario del sistema*

$$\frac{dx}{dt} = f(x).$$

Se dirá que \bar{x} es:

1. **Estable.** *Si para cada $\varepsilon > 0$ existe $\delta(\varepsilon) > 0$ tal que*

$$\|x(0) - \bar{x}\| < \delta \implies \|x(t) - \bar{x}\| < \varepsilon, \forall t \geq 0.$$

2. **Inestable.** *Si no es estable.*

3. **Asintóticamente estable.** *Si es estable y si δ puede ser escogido de modo que*

$$\|x(0) - \bar{x}\| < \delta \implies \lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = \bar{x}, \forall t \geq 0.$$

Para evaluar la estabilidad de un punto crítico, existen diversos métodos. Los más clásicos se basan en la teoría de estabilidad de Lyapunov. Estos últimos se encuentran descritos en [34] y no se abordarán en el presente trabajo.

A continuación, se presenta un teorema clásico que permite evaluar la estabilidad y convergencia a un estado estacionario de forma local. Éste último se basa en la aproximación lineal del sistema en torno al equilibrio que se está analizando. Este tipo de métodos se conocen como métodos indirectos.

Teorema 3.4 *Sea $x = \bar{x}$ un estado estacionario del sistema:*

$$\frac{dx}{dt} = f(x),$$

donde $f : D \subseteq \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ es una función continuamente diferenciable y D es una vecindad del punto \bar{x} . Sea:

$$J = \frac{\partial f}{\partial x}(\bar{x}),$$

entonces

1. \bar{x} es un punto asintóticamente estable si $\text{Re}(\lambda_i) < 0$ para cualquier λ_i valor propio de J .
2. \bar{x} es un punto inestable si $\text{Re}(\lambda_i) > 0$ para cualquier λ_i valor propio de J .

Observación. Notar que si algún valor propio λ_i es tal que $\text{Re}(\lambda_i) = 0$, falla la linealización en el sentido que no se puede decir nada de la convergencia de las trayectorias al punto de equilibrio que se está analizando.

Observación. Se introduce la siguiente notación: se llamará por $x(t, x_0)$ a la única solución del sistema (3.2) con condición inicial $x(0) = x_0$.

Definición 3.5 *Un estado estacionario \bar{x} del sistema:*

$$\frac{dx}{dt} = f(x).$$

Se dirá que un equilibrio es globalmente asintóticamente estable si es estable y si se cumple:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = \bar{x}, \forall t \geq 0,$$

independiente de la condición inicial $x(0) = x_0$.

A un punto \bar{x} que satisface la propiedad de convergencia anterior se lo denominará atractor global.

Definición 3.6 (Órbita) *Se define la órbita de solución del sistema (3.2), partiendo del punto $x_0 \in X$ como:*

$$\mathcal{O}(x_0) = \{x(t, x_0) \mid t \geq 0\}.$$

Definición 3.7 (Conjunto ω -límite) *Dado $x_0 \in X$, se define el conjunto ω -límite asociado a x como*

$$\omega_F(x_0) = \{z \in X \mid \exists t_{n_k} \nearrow \infty \text{ tal que } \lim_{k \rightarrow \infty} x(t_{n_k}, x_0) = z\}. \quad (3.3)$$

Asímismo se define para $A \subseteq X$, el conjunto $\omega_F(A) = \bigcup_{x_0 \in A} \omega_F(x_0)$.

Definición 3.8 (Conjunto invariante) *Un conjunto $M \subseteq X$ se dice invariante para (3.2) si se cumple:*

$$x_0 \in M \implies x(t, x_0) \in M, \forall t \geq 0. \quad (3.4)$$

Observación. Las definiciones anteriores se encuentran a menudo con el prefijo “positivo(a)” en la literatura, haciendo referencia al caso más general, en donde se considera un tiempo inicial arbitrario $t_0 \in \mathbb{R}$, y se considera la evolución del sistema para todo $t \in \mathbb{R}$. En el desarrollo de este trabajo solo se considerará el caso $t \geq 0$. Ver, por ejemplo [70, pg.17]

Una interrogante natural, es saber cuándo cierto conjunto es invariante para una dinámica dada por un sistema de ecuaciones diferenciales. En [6], se entrega un criterio útil para evaluar

cuándo un conjunto es invariante. A continuación se resumirá este resultado, en el contexto de los sistemas de EDO.

Para estas definiciones, se considerará el siguiente contexto: se considerará $\tilde{X} \subseteq \mathbb{R}^n$ un abierto y $X \subset \tilde{X}$ un cerrado relativo a \tilde{X} , es decir, $X = H \cap \tilde{X}$ para algún $H \subseteq \mathbb{R}^n$ cerrado.

Definición 3.9 *Se dice que x está en el cono tangente de X , relativo a un punto p , denotado $\mathcal{T}_p X$, si y solo si existe una secuencia $x_n \in \tilde{X}$ convergente a x y una secuencia de reales positivos $t_n \searrow 0$, tales que $p + t_n x_n \in X$.*

Observación. No es difícil ver que si $p \in \text{Int}(X)$, entonces $\mathcal{T}_p X = \mathbb{R}^n$. Luego, los puntos de interés serán los puntos $p \in \partial X$.

Ejemplo. Si $X = \mathbb{R}^+ \times \mathbb{R}^+$, entonces los puntos de la frontera son de la forma $b = (a, 0)$ y $c = (0, a)$, con $a \geq 0$. En este caso, se tendrá $\mathcal{T}_b X = \mathbb{R} \times \mathbb{R}^+$ y $\mathcal{T}_c X = \mathbb{R}^+ \times \mathbb{R}$.

Teorema 3.10³ *Sea $f : \tilde{X} \times D \rightarrow \mathbb{R}^n$ una función continua en (x, u) , localmente Lipschitz en x , uniforme en u y donde $D \subseteq \mathbb{R}^+$ es compacto. Las siguientes afirmaciones son equivalentes:*

1. X es invariante para el sistema $\frac{dx}{dt} = f(x(t), u(t))$.
2. $f(x, u) \in \mathcal{T}_x X$, $\forall x \in X$, $\forall u \in D$.

3.3. Teoría de control y sistemas monótonos.

Como respuesta a la pregunta sobre son las condiciones suficientes que debe cumplir un sistema de EDO para que existan atractores globales, los estudios reciente en la teoría de sistemas monótonos [6, 5, 22, 21, 64, 28] constituyen una herramienta potente. En el presente capítulo se resumen los conceptos básicos relacionados con estos trabajos y se establece el teorema principal que se usará en el capítulo siguiente, en la búsqueda de una estimación de una región atractora para el sistema ΣPII .

En general se trabajará en el siguiente contexto y con la siguiente notación: B_X , B_U denotarán espacios de Banach. $X \subseteq B_X$ y $U \subseteq B_U$ denotarán conjuntos borel-medibles y U será denominado como conjunto de valores de entrada.

Definición 3.11 *Se llamará entrada a una función $u : \mathbb{R}^+ \rightarrow U$, tal que $u \in L_{loc}^\infty(U)$. Además, se denotará por U_∞ , al conjunto de todas las funciones de entrada. Finalmente, se denotará por \hat{U} , al conjunto de funciones de entrada constantes $\hat{u}(t) = u \in U$, $\forall t \geq 0$, y se entenderá $\hat{U} \subseteq U$.*

Definición 3.12 *Un sistema dinámico controlado (SDC) es una función*

$$\Phi : \mathbb{R}^+ \times X \times U_\infty \rightarrow X,$$

³Para una versión más general de este teorema, formulado en el contexto de las inclusiones diferenciales ver [6].

que satisface las siguientes propiedades:

1. Φ es continua en sus dos primeras variables y su restricción a $\mathbb{R}^+ \times X \times \hat{U}$ es continua.
2. Para todo $u, v \in U_\infty$ tal que $u(s) = v(s)$ c.t.p. se cumple

$$\Phi(t, x_0, u) = \Phi(t, x_0, v),$$

para cualquier $x_0 \in X$.

3. Para todo $x_0 \in X$ y todo $u \in U_\infty$ se cumple:

$$\Phi(0, x_0, u) = x_0.$$

4. (Propiedad de Semigrupo) Si $y = \Phi(s, x, u)$ y $z = \Phi(t, y, v)$, entonces si

$$w(\tau) = \begin{cases} u & \text{si } \tau \in [0, s], \\ v & \sim, \end{cases}$$

se tiene

$$\Phi(s + t, x, w) = z.$$

Definición 3.13 Dado B_Y espacio de Banach, se llama función de salida o output a una función continua $h : X \rightarrow Y$, con $Y \subseteq B_Y$, medible. En este caso, se llamará sistema dinámico con entrada y salida (SDES) al par (Φ, h) .

Proposición 3.14 Sea $K_X \subseteq B_X$, un cono convexo y no vacío que cumple $K_X \cap -K_X = \{0\}$. K_X induce una relación de orden natural dada por:

- $x \leq_{K_X} y \iff x - y \in K_X$.
- $x <_{K_X} y \iff x - y \in K_X, x \neq y$.
- $x \ll_{K_X} y \iff x - y \in \text{Int}(K_X)$.

Observación. En el caso de $B_X = \mathbb{R}^n$, una tupla $s = (s_1, \dots, s_n)$, donde $s_i = \pm 1$ define el cono hiper octante $K = \mathbb{R}^{s_1} \times \dots \times \mathbb{R}^{s_n}$. El orden definido por este cono está dado por:

$$x \leq_K y \iff s_i x_i \leq s_i y_i, \forall i \in \{1, \dots, n\}.$$

Definición 3.15 Dados dos conos K_1 y K_2 en B_X y B_Y respectivamente y una función $h : X \rightarrow Y$ diremos que h es creciente de acuerdo a los ordenes inducidos por K_1 y K_2 si:

$$x \leq_{K_1} y \implies h(x) \leq_{K_2} h(y),$$

y será decreciente si:

$$x \leq_{K_1} y \implies h(y) \leq_{K_2} h(x).$$

La definición de estrictamente decreciente o creciente se entiende en el sentido natural.

Definición 3.16 Dado (Φ, h) , un sistema dinámico con entrada y salida, en el caso en que $B_Y = B_U$, se dirá que h es una función de retroalimentación o feedback. Si además, h es decreciente, entonces h se llama feedback negativo.

Definición 3.17 *Dados dos conos $K_X \subseteq X$ y $K_U \subseteq U$, un SDC se dice monótono, si para todo par de entradas $u, v \in U_\infty$ tales que $u(t) \leq_{K_U} v(t)$ c.t.p y cualquier condición inicial $x_1, x_2 \in X$, satisfaciendo $x_1 \leq_{K_X} x_2$ se cumple:*

$$\Phi(t, x_1, u) \leq_{K_X} \Phi(t, x_2, v), \forall t \geq 0.$$

Si el sistema Φ es autónomo, i.e, Φ no depende de u , la definición se adapta de la forma natural.

Definición 3.18 *Se dice que un SDC Φ posee una $I \setminus S$ -característica $\kappa^X : U \rightarrow X$ si para toda entrada constante $\hat{u} \in \hat{U}$ se cumple:*

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \Phi(t, x_0, \hat{u}) = \kappa^X(\hat{u}), \forall x_0 \in X.$$

Observación. Existen distintas definiciones para la característica asociada a un SDC. Por ejemplo, en [6] se pide que el valor que toma la característica sea un equilibrio globalmente asintóticamente estable, en cambio, en la definición anterior sólo se pide atractividad global de los valores que toma k^X . Por otro lado, en [21] sólo se pide que el valor que toma esta función sea un único equilibrio del sistema controlado, asociado a la entrada constante correspondiente.

Definición 3.19 *Dado un SDC Φ , de tipo feedback ($Y = U$), se denomina a la función $k = h \circ k^X : U \rightarrow U$ característica de feedback asociada a Φ .*

Observación. Se puede demostrar que si Φ es un SDC monótono, entonces κ es una función creciente respecto al orden dado por los respectivos conos.

Definición 3.20 *En el caso $B_U = B_Y$, $Y = U$, dada una condición inicial $x_0 \in X$ y una función continua $x : \mathbb{R}^+ \rightarrow \mathbb{R}$, se dirá que x es una trayectoria de loop cerrada para (Φ, h) con condición inicial x_0 si*

$$x(t) = \Phi(t, x_0, h(x(t))), \forall x \in X.$$

Definición 3.21 *Sea Φ un SDC tal que para toda condición inicial $x_0 \in X$, existe una única trayectoria de loop cerrado $x(t)$, con $x(0) = x_0$. Se define la función de loop cerrado asociada Φ por:*

$$\Psi : \mathbb{R}^+ \times X \rightarrow X, \Psi(t, x_0) = x(t).$$

En el caso en que Ψ satisfaga las condiciones para ser un sistema dinámico controlado, se hablará de Ψ como el sistema de loop cerrado asociado a Φ .

Definición 3.22 *Sea $K_X \subseteq B_X$, un cono con interior no vacío. Se define su cono dual K_X^* como:*

$$K_X^* = \{\phi \in B_X^* \mid \langle \phi, x \rangle \geq 0, \forall x \in K_X\}.$$

Definición 3.23 *Dado un orden \leq , dado por un cono $K_X \subseteq \mathbb{R}^n$, se dirá que un campo vectorial $f : X \times U \subseteq \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^m \rightarrow \mathbb{R}^n$ satisface la condición de cuasimonotonía (QM) en X ,*

si para todo $x, y \in X$, todo $u \in U$, y $\phi \in K_X^*$ se cumple:

$$x \leq y, \phi(x) = \phi(y) \implies \phi(f(x, u)) \leq \phi(f(y, u)). \quad (3.5)$$

Proposición 3.24 Si $\frac{dx}{dt} = f(x)$ es un sistema monótono respecto al orden \leq , dado por un cono K_X , entonces f satisface la condición (QM).

DEMOSTRACIÓN. Sean x_0, y_0 , en X tales que $x_0 \leq y_0$ y $\phi \in K_X^*$ tal que $\phi(x_0) = \phi(y_0)$. Por la monotonía del sistema de EDO asociado a f , se tiene que las soluciones $x(t, x_0)$ y $x(t, y_0)$ que cumplen $x(0, x_0) = x_0$ y $x(0, y_0) = y_0$ satisfacen:

$$x(t, x_0) \leq x(t, y_0), \forall t \geq 0 \iff x(t, y_0) - x(t, x_0) \in K_X.$$

Luego, como $\phi \in K_X^*$ se tiene $\phi(x(t, y_0) - x(t, x_0)) \geq 0$. Usando que $\phi(x_0) = \phi(y_0)$, no es difícil probar que:

$$\frac{d}{dt}(\phi(x(t, y_0) - x(t, x_0))) \geq 0.$$

De lo que se deduce que $\phi(f(y_0)) \geq \phi(f(x_0))$. □

Observación. Se puede demostrar recíprocamente que si f satisface (3.5), entonces el sistema de EDO definido por f es monótono con respecto al orden \leq [28].

Si bien los resultados de [22] garantizan la existencia de atractores globales, exigen que el sistema controlado posea un único estado estacionario asintóticamente estable para cada control constante \bar{u} . Esto último no siempre es fácil de probar. Los siguientes resultados, expuestos en [21], permiten caracterizar el comportamiento asintótico, sin la necesidad de encontrar una característica para el sistema en el sentido de la Definición 3.18. A partir de inyectar el sistema original en un sistema monótono en mayor dimensión, se obtienen propiedades de invarianza y convergencia para el sistema original.

En lo que sigue, se trabajará con un sistema de la forma:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = f(x, u) \\ y = h(x) \end{cases} \quad (3.6)$$

Se supondrá, además de ciertas hipótesis que serán descritas más adelante, que f tiene suficiente regularidad para asegurar la existencia global de soluciones en todo el conjunto $X \subset \mathbb{R}^{n_4}$. Además se supondrá que B_X está dotado de un orden dado por un cono K_X y B_U está dotado de un orden dado por K_U . En general, se llamarán por \leq y \leq_U a los ordenes dados por K_X y K_U respectivamente o sencillamente \leq cuando no haya confusión.

Se recuerda que las órbitas de loop cerrado de (3.6) están dadas por el sistema:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, h(x)) = F(x) \quad (3.7)$$

Para los siguientes resultados se necesitarán las siguientes suposiciones:

⁴Ver [6], en donde se pide que la función sea localmente Lipschitz en (x, u) .

Sean \leq y \leq_U dos ordenes asociados a B_X y B_U respectivamente. Se supondrá que $f : X \times U \rightarrow \mathbb{R}^n$ y $h : X \rightarrow U$ son funciones continuas que satisfacen las siguientes propiedades:

1. $\forall u \in U, x \rightarrow f(x, u)$ es cuasimonótona en el sentido de (3.5).
2. $\forall x \in X, u_1 \leq_U u_2 \implies f(x, u_1) \leq f(x, u_2)$.
3. $x_1 \leq x_2 \implies h(x_2) \leq_U h(x_1)$.

Definición 3.25 Se define el sistema producto asociado al sistema (3.7) como el sistema

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = f(x, h(y)), \\ \frac{dy}{dt} = f(y, h(x)). \end{cases} \quad (3.8)$$

Observación. Se hace notar que toda solución del problema de valor inicial asociado a (3.8) es simétrica, es decir $(x(t), y(t))$ es solución de (3.8) $\iff (y(t), x(t))$ es solución de (3.8). Por otro lado, la unicidad de soluciones de (3.6) hace que el conjunto diagonal:

$$D = \{(x, x) : x \in X\},$$

sea un conjunto invariante para (3.8).

Proposición 3.26 El sistema (3.8) genera un sistema monótono en $X \times X \subseteq \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^n$, con respecto al orden dado por el cono $C = K \times (-K)$, es decir, bajo el orden

$$(x, y) \leq_C (\bar{x}, \bar{y}) \iff x \leq \bar{x}, \bar{y} \leq y.$$

Teorema 3.27 [21, Proposition 3]

Sea $u_0, v_0 \in U$, tales que: $u_0 \leq_U v_0$. Si existe x_0, y_0 satisfaciendo:

1. $x_0 \leq y_0$,
2. $f(y_0, v_0) \leq 0 \leq f(x_0, u_0)$ con $[x_0, y_0] \subseteq X$,
3. $u_0 \leq_U h(y_0) \leq_U h(x_0) \leq_U v_0$.

Entonces $[x_0, y_0]$ es un conjunto invariante para (3.7) y existen $x_*, y_* \in [x_0, y_0]$ con $x_* \leq y_*$ tales que: $\omega_F([x_0, y_0]) \neq \emptyset$. Más aún $f(x_*, h(y_*)) = f(y_*, h(x_*)) = 0$.

Corolario 3.28 [21, Corollary 5] Dadas las hipótesis del teorema anterior, si se cumple que:

$$a, b \in [x_0, y_0], a \leq b, f(a, h(b)) = f(b, h(a)) \implies a = b,$$

entonces $x_* = y_* = \bar{x}$, \bar{x} es un equilibrio del sistema (3.7) y además

$$\omega_F([x_0, y_0]) = \{\bar{x}\}.$$

3.4. Estudio del grafo de interacciones asociado a un sistema de EDO.

Una técnica útil para el estudio cualitativo de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias es el grafo de interacciones. A partir de propiedades sobre la derivada de la función

f del lado derecho de la EDO, es posible construir una representación gráfica que ilustra la correlación de las distintas variables del sistema. En lo que sigue, se definirá el grafo de interacciones asociado a un sistema de ecuaciones diferenciales, así como una caracterización de monotonía de sistemas a partir de propiedades de éste.

La técnica que se describe ha tenido un amplio desarrollo y se ha consolidado como un enfoque clásico en el análisis cualitativo de sistemas de ecuaciones diferenciales. Un antecedente conocido es la llamada conjetura de Thomas [68] que establece una relación entre la estructura de ciclos de este grafo y el comportamiento homeostático de este tipo de sistemas. Esta línea de investigación ha derivado en diversos trabajos que buscan probar la conjetura en presencia de distintas hipótesis sobre f [65, 58].

Finalmente, se ilustrará un método explicado en [22] que permite, a partir de cualquier sistema de ecuaciones diferenciales, derivar un sistema controlado, cuyas órbitas de loop cerrado corresponden al sistema original. A partir de la aplicación de los teoremas anteriores, es posible obtener información sobre el comportamiento asintótico de éste último.

Definición 3.29 *Dado un sistema de EDO autónomo (3.2), se define el grafo de interacciones local asociado al sistema en el punto $\bar{x} \in \mathbb{R}^n$, como: $Gf(\bar{x}) = (V, E)$ donde, $V = \{1, \dots, n\}$ y E está dado por $ij \in E \iff \frac{\partial f_j(\bar{x})}{\partial x_i} \neq 0$. Además, se define el etiquetado de aristas dado por:*

$$l(ij) = \begin{cases} 1 & \frac{\partial f_j(\bar{x})}{\partial x_i} > 0, \\ -1 & \frac{\partial f_j(\bar{x})}{\partial x_i} < 0. \end{cases}$$

Definición 3.30 *Se define el grafo de interacciones de (3.2) como:*

$$Gf = \bigcup_{x \in X} Gf(x),$$

donde la unión se refiere a unir los conjuntos de aristas asociados a los grafos locales.

Respecto a esta última definición, es importante estudiar ciertos tipos de sistemas donde la construcción del grafo de interacción no depende de x :

Definición 3.31 *Se dirá que el sistema*

$$\frac{dx}{dt} = f(x),$$

es de signo definido si para todo $i, j \in \{1, \dots, n\}$, se cumple alguno de estos casos:

$$\begin{cases} \frac{\partial f_j(x)}{\partial x_i} \geq 0 & \text{y estricto para algún } x, \\ \frac{\partial f_j(x)}{\partial x_i} \leq 0 & \text{y estricto para algún } x, \\ \frac{\partial f_j(x)}{\partial x_i} = 0 & \sim. \end{cases}$$

Observación. No todo sistema es de signo definido. Por ejemplo, considerar el sistema

$$\begin{cases} \dot{x} = \cos(y), \\ \dot{y} = \sin(x). \end{cases}$$

En lo que sigue se trabajará con sistemas que tengan signo definido y el grafo de interacciones se considerará como el grafo global Gf , a menos que se especifique lo contrario.

3.4.1. Condiciones necesarias relacionadas con la homeostasis.

Desde el punto de vista matemático, existen distintas interpretaciones de la homeostasis. Además de la convergencia a un único estado estacionario, existen nociones más débiles, ligadas a la existencia de órbitas periódicas, con oscilaciones acotadas en un rango determinado. Este es el caso de las discusiones que se establecen en [49]. En este mismo sentido, a modo de ejemplo, se exponen las siguientes que están basadas en la conjetura de Thomas:

Proposición 3.32 *Si el sistema $\frac{dx}{dt} = f(x)$ tiene órbitas periódicas estables entonces existe $x \in \mathbb{R}^n$, tal que $Gf(x)$ contiene un ciclo negativo de largo al menos dos, es decir, un ciclo de largo al menos dos C , tal que: $l(C) = \prod_{ij \in C} l(ij) \leq 0$.*

En este mismo sentido, en [65] se discuten condiciones necesarias para la multiestabilidad. En particular, se habla de la existencia de ciclos positivos. Estos últimos se interpretan en este trabajo como indicios de la capacidad de transición de la célula de un tipo de régimen a otro, comúnmente generado por la acción de estímulo externo.

Si bien en general, este tipo de criterios solo aportan condiciones necesarias, generan un contexto interesante para la discusión e interpretación de las características y alcances de un modelo.

3.4.2. Caracterización gráfica de la monotonía.

A continuación, se introduce un criterio de monotonía basado en el estudio de las propiedades del grafo de interacción, asociado al sistema (3.2). Esta caracterización será fundamental para el método de descomposición planteado en [22] que permite transformar un sistema de EDO en un sistema monótono.

Previo a esta caracterización, se requiere de la siguiente definición:

Definición 3.33 *Dado un grafo dirigido $G = (V, E)$ con un etiquetado $l : E \rightarrow \{-1, 1\}$, se llama asignación de spin a una función $\sigma : V \rightarrow \{-1, 1\}$. Dada una arista $e = ij \in E$, se dirá que es consistente con la asignación de spin si $\sigma(i)\sigma(j) = l(e)$. Se dirá que G admite una asignación de spin consistente, si existe una asignación de spin σ que cumple que toda arista $e \in E$ es consistente con ella.*

Usando esta última definición, se cambia la noción de sistemas monótonos para ubicarla en el contexto de los modelos a analizar durante este trabajo.

Definición 3.34 *Un sistema autónomo de la forma (3.1) se dice monótono si su grafo de interacciones asociado G admite una asignación de spin consistente.*

Observación. Se puede demostrar que esta última definición es equivalente a la de la definición 3.17 para el orden dado por un hiper octante (ver [6, Corollary III.3]). Así mismo, se puede demostrar que la caracterización anterior es equivalente a la propiedad de no tener ciclos negativos en el grafo de interacciones, entendiendo el signo del ciclo como la multiplicación de las etiquetas de las aristas perteneciente a éste. Para más detalles respecto a estas caracterizaciones, revisar [64].

3.4.3. Método de descomposición de sistemas autónomos en sistemas monótonos controlados.

En el contexto de redes de interacción, se habla de una medida que cuantifica qué tan lejos está un sistema de ser monótono, en términos de la cantidad mínima de aristas que deben ser removidas de un grafo para que éste admita una asignación de spin consistente [64]. El método que se expone a continuación, es particularmente efectivo cuando esta cantidad de aristas es pequeña y se basa en asociar a (3.2) un sistema controlado que sea monótono en el sentido de la definición anterior, reemplazando las variables asociadas a ciertas aristas por variables de control. El sistema controlado asociado cumplirá además que las órbitas de loop cerrado corresponderán a las soluciones del sistema original.

Se introduce la siguiente notación: A un conjunto $A \subseteq \{x_1, \dots, x_n\}$, arbitrario, se le llamará conjunto de variables *agonistas*. Las variables de este conjunto, en principio, no tienen ninguna relación entre sí, pero en la práctica, se toman de modo que, vistas como nodos del grafo de interacciones asociado al sistema (3.2), tengan la mayor cantidad de arcos positivos. Esto se interpreta como que estas variables se correlacionan de forma positiva en la dinámica definida por (3.2). Se elige, por otro lado, el conjunto de variables *antagonistas* como el conjunto $B = A^c$. Este conjunto, también está pensado de modo que, entre ellas, se maximice la cantidad de arcos positivos en el grafo de interacción.

Definición 3.35 *Un arco e , en el grafo de interacción G de (3.2), se llamará discordante, si cumple alguna de las siguientes propiedades:*

1. $l(e) = +1$ y $e = x_i x_j$ con $x_i \in A$, $x_j \in B$.
2. $l(e) = -1$ y $e = x_i x_j$ con $x_i, x_j \in A$.
3. $l(e) = -1$ y $e = x_i x_j$ con $x_i, x_j \in B$.

Definición 3.36 *Para cada $j \in \{1, \dots, n\}$, se define el conjunto:*

$$D_j = \{x_i \mid \text{existe un arco discordante entre } x_i \text{ y } x_j\}$$

y el conjunto:

$$D = \bigcup_{j=1}^n D_j.$$

Definición 3.37 Se define la función $s : \{1, \dots, n\} \rightarrow \{-1, 1\}$ dada por:

$$s(i) = \begin{cases} 1 & x_i \in A, \\ -1 & x_i \notin A. \end{cases}$$

Definición 3.38 Sea $U = (\mathbb{R}^+)^m$, con $m = |D|$ y sea la numeración $D = \{x_{l_1}, \dots, x_{l_m}\}$. Se define el sistema $\frac{dx}{dt} = f(x, u)$ de la siguiente forma:

- $f_j(x, u)$ se define como $g_j(x)$ reemplazando cada variable x_{l_i} por u_i para toda $x_{l_i} \in D_j$.
- $u(t)$ está dado por $u(t) = h(x(t))$ con $h_k(t) = x_{l_k}$ para $k \in \{1, \dots, m\}$.
- K_X está dado por el hiper octante definido por s en \mathbb{R}^n , es decir, $K_X = \mathbb{R}^s = (\mathbb{R}^{s_1} \times \dots \times \mathbb{R}^{s_n})$.
- K_U está dado por el hiper octante definido por $p = -s$ en \mathbb{R}^m es decir $K_X = \mathbb{R}^p = (\mathbb{R}^{p_1} \times \dots \times \mathbb{R}^{p_n})$.

Teorema 3.39 El sistema controlado, dado por la construcción de la Definición 3.38 es monótono y la función de feedback negativo, dada por h , es decreciente respecto a los ordenes dados por K_X y K_U . Además, su sistema de loop cerrado está bien definido y dado por el sistema (3.2). Más aún, si denotamos por G' al grafo de interacciones asociado a $\frac{dx}{dt} = f(x, u)$, se tiene que si cada componente fuertemente conexa con vértices $S \subseteq \{1, \dots, n\}$, define un subsistema que admite una $I \setminus S$ -característica. Entonces, $\frac{dx}{dt} = f(x, u)$, admite una $I \setminus S$ -característica.

Ejemplo. Una versión simplificada del modelo de Goodwin se discute en [48] y tiene la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \dot{m} &= S_1 \mathcal{R}(g) - \delta_1 m, \\ \dot{e} &= S_2 m - \delta_2 e, \\ \dot{g} &= S_3 e - \delta_3 g. \end{aligned}$$

Este último representa una de las formas más simples de regulación transcripcional. En este caso, m representa el mRNA y E es la proteína cuyo proceso de síntesis está co-regulado por una proteína G . Cada variable está asignada a la letra correspondiente minúscula y los parámetros, S_i, δ_i , corresponden a tasas de síntesis y de degradación respectivamente. Con esto, $(m, e, g) \in (\mathbb{R}^+)^3$, $S_i > 0$, $\delta_i > 0$. Por otro lado,

$$\mathcal{R}(g) = \frac{\theta^n}{\theta^n + g^n},$$

es una función de tipo sigmoide, en donde θ representa un umbral para la concentración g .⁵

El Jacobiano $Jf(x)$ asociado a este sistema, es de la forma:

⁵Para más detalles, ver modelo de Hill, en la sección 2.2.2, en el capítulo anterior.

$$Jf(x) = \begin{pmatrix} -d_1 & 0 & -\frac{S_1 g^{n-1} n u^n}{(g^n + u^n)^2} \\ S_2 & -d_2 & 0 \\ 0 & S_3 & -d_3 \end{pmatrix}.$$

Y como muestra la Figura 3.1, el grafo de interacción forma un único ciclo que tiene signo negativo, es decir, tiene una cantidad impar de aristas negativas. En vista de lo anterior, el sistema no es monótono. Una posible descomposición, usando el método de descomposición antes descrito, es la siguiente: elegir el conjunto de variables agonistas $A = \{m, g, e\}$, con lo que las antagonistas corresponden a $B = \emptyset$. Esto último equivale a quitar las aristas negativas del grafo de la Figura 3.1.

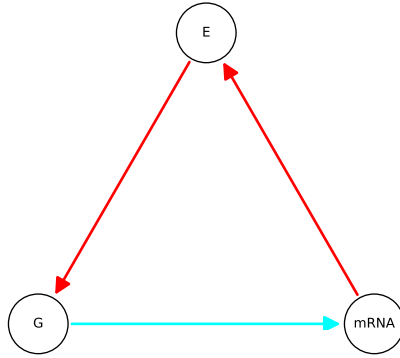


Figura 3.1: Grafo de interacción para el modelo de Goodwin simplificado.

Con esto se obtiene: $D_e = D_g = \emptyset$, $D_{mRNA} = g$. Así, el sistema controlado resulta:

$$\begin{aligned} \dot{m} &= S_1 \mathcal{R}(g) - \delta_1 m, \\ \dot{e} &= S_2 m - \delta_2 e, \\ \dot{g} &= S_3 e - \delta_3 g. \end{aligned}$$

Que resulta ser un sistema monótono respecto a los conos $K_X = (\mathbb{R}^+)^3$, $K_U = \mathbb{R}^-$, con $(m, e, g) \in (\mathbb{R}^+)^3$, $u \in \mathbb{R}^+$

3.5. Teoría de perturbaciones.

Dada la estructura del modelo ΣPII , se puede modelar la adición de una fuente externa de cobre al sistema, interpretándola como una perturbación del sistema original. Con el objetivo de estudiar el comportamiento de ΣPII (que no considera recicle de cobre), en presencia de distintas fuentes de cobre, se dará a continuación un marco teórico sobre teoría de perturbaciones. El teorema principal que se explica en esta sección, sostiene que si las trayectorias del sistema perturbado parten de una condición inicial cercana a un equilibrio exponencialmente

estable del sistema original (que en el caso autónomo equivale a un equilibrio asintóticamente estable), éstas entran eventualmente en una vecindad del equilibrio de tamaño proporcional, en algún sentido, a la perturbación.

3.5.1. Definiciones.

A continuación, se comenzará a describir el contexto y las definiciones básicas con las que se trabajará:

Definición 3.40 *Un equilibrio \bar{x} del sistema $\frac{dx}{dt} = f(t, x)$ se dirá exponencialmente estable, si existen constantes positivas K, r, λ tales que:*

$$\|x(t_0) - \bar{x}\| < r \implies \|x(t) - \bar{x}\| \leq K\|x_0 - \bar{x}\|e^{-\lambda(t-t_0)}, \quad \forall t \geq t_0 \geq 0.$$

Se dirá que el equilibrio es globalmente exponencialmente estable si lo anterior se tiene para cualquier condición inicial $x(t_0)$.

Proposición 3.41 *Sea \bar{x} un equilibrio del sistema autónomo $\frac{dx}{dt} = f(x)$, donde f es de clase C^1 en alguna de vecindad de \bar{x} , entonces \bar{x} es asintóticamente estable si y solo si es exponencialmente estable.*

Dadas las difiniciones anteriores, se trabajará bajo las siguientes hipótesis: Sean $f, g : [0, \infty) \times D \times [-\varepsilon_0, \varepsilon_0] \rightarrow \mathbb{R}^n$, dos funciones continuamente diferenciables respecto a la variable x y acotadas en todo $(t, x, \varepsilon) \in [0, \infty) \times D_0 \times [-\varepsilon_0, \varepsilon_0] \rightarrow \mathbb{R}^n$, para todo $D_0 \subseteq D$ compacto.

Definición 3.42 *Se entenderá por sistema nominal o no perturbado al sistema autónomo:*

$$\frac{dx}{dt} = f(x).$$

Definición 3.43 *Se llamará sistema perturbado al sistema de EDO dado por:*

$$\frac{dx}{dt} = f(x) + \varepsilon g(t, x, \varepsilon).$$

3.5.2. Teoremas principales.

Teorema 3.44 *Bajo las suposiciones anteriores, si \bar{x} es un equilibrio exponencial del sistema nominal, entonces existen r, ε_1, k, c constantes positivas, tales que: si $\varepsilon \leq |\varepsilon_1|$ y $\|\bar{x} - x(0)\| \leq r$, se cumple:*

$$\|x(t_0) - \bar{x}\| \leq a \implies \|x(t) - \bar{x}\| \leq k|\varepsilon|, \quad \forall t \geq t_0 + T, \quad \forall a \in (0, c).$$

Este último teorema se deduce de [34, Teorema 4.14 y Lema 9.2] además del hecho de que g es acotada. El resultado se puede interpretar como que las trayectorias de soluciones del sistema perturbado que parten de condiciones iniciales cercanas al equilibrio exponencialmente estable \bar{x} del sistema nominal, se aproximan a una vecindad de tamaño proporcional a $|\varepsilon|$ a medida que $t \rightarrow \infty$.

El siguiente resultado explica lo que ocurre dentro de la vecindad de tamaño proporcional a $|\varepsilon|$, con las trayectorias del sistema perturbado, en el caso en que la función g sea T -periódica en la variable t , esto es:

$$g(t + T, x, \varepsilon) = g(t, x, \varepsilon), \quad \forall (t, x, \varepsilon) \in [0, \infty) \times D \times [-\varepsilon_0, \varepsilon_0].$$

Teorema 3.45 *Si se cumplen las siguiente hipótesis:*

1. $f, g : [0, \infty) \times D \times [-\varepsilon_0, \varepsilon_0] \rightarrow \mathbb{R}^n$ son funciones continuamente diferenciables respecto a la variable x y acotadas en todo $(t, x, \varepsilon) \in [0, \infty) \times D_0 \times [-\varepsilon_0, \varepsilon_0] \rightarrow \mathbb{R}^n$, para todo $D_0 \subseteq D$ compacto, donde $D \subseteq \mathbb{R}^n$ es un dominio que contiene un equilibrio \bar{x} del sistema nominal.
2. El punto \bar{x} es un equilibrio exponencialmente estable del sistema nominal.
3. $g(t, x, \varepsilon)$ es una función T -periódica en t .

Entonces, existen constantes positivas ε^* y k tales que para todo $|\varepsilon| < \varepsilon^*$ el sistema perturbado tiene una única solución T -periódica $\bar{x}(t, \varepsilon)$ que satisface $\|\bar{x}(t, \varepsilon) - \bar{x}\| \leq k|\varepsilon|$. Más aún, la trayectoria de dicha solución es exponencialmente estable, es decir, existen constantes c, M, λ positivas tales que:

$$\|x(t_0) - \bar{x}(t_0, \varepsilon)\| < c \implies \|x(t) - \bar{x}(t, \varepsilon)\| \leq M\|x(t_0) - \bar{x}(t_0, \varepsilon)\|e^{-\lambda(t-t_0)}, \quad \forall t \geq t_0 \geq 0.$$

Observación. Si en el mismo contexto, se tiene que \bar{x} es tal que $g(t, \bar{x}, \varepsilon) = 0$ entonces, \bar{x} será un equilibrio del sistema perturbado. En este caso, el teorema anterior dice que $\bar{x}(t, \varepsilon)$ es igual a \bar{x} para todo tiempo por unicidad, y en tal caso, el equilibrio \bar{x} es también un equilibrio exponencialmente estable para el sistema perturbado.

Capítulo 4

Análisis matemático de los modelos ΣP y Σ .

4.1. Introducción.

La presente sección tiene como objetivo la aplicación de las herramientas teóricas expuestas en la sección anterior. Se busca entender la homeostasis del cobre en *E. faecalis*, a partir de un análisis de los modelos ΣP y Σ . Se recuerda que, como una forma de enfrentar el desafío de describir los mecanismos relacionados con la dinámica del operón *cop*, se plantearon en el Capítulo 2, dos clases de modelos: A) ΣP que tiene una estructura polinomial y que considera dos variantes: i) con reciclaje de cobre, denominado ΣPI y ii) sin reciclaje de cobre, denominado ΣPII y B) Σ un modelo que considera, además de polinomios, funciones de regulación y no considera reciclaje de cobre. Esta sección se compone principalmente de dos apartados: el primero se enfoca en el análisis de los modelos ΣP y está subdividido en cuatro partes: i) un análisis de puntos críticos, en el que por inspección se buscan puntos críticos o relaciones entre las variables de estado en el equilibrio para los modelos ΣPI y ΣPII , ii) un análisis cualitativo de las condiciones necesarias para la existencia de un comportamiento homeostático, analizando los grafos de interacción asociados a las dos variantes del modelo ΣP , iii) un estudio de la estabilidad local de único equilibrio de ΣPII en donde se demuestra su estabilidad asintótica y finalmente iv) la aplicación de un resultado de teoría de control para estimar la región de atracción asociada al único equilibrio del sistema ΣPII .

El segundo apartado de este capítulo está completamente dedicado al análisis del sistema Σ . Este último se compone de: i) una demostración de la invarianza del cono positivo, en donde se prueba la consistencia del modelo y ii) la demostración de la existencia de un único equilibrio al que las trayectorias de solución del sistema convergen bajo ciertas condiciones sobre los parámetros. En términos más generales, lo que se demuestra es que las variables de estado del sistema se mantienen siempre en un determinado rango, a largo plazo, lo que evidencia un comportamiento homeostático del modelo.

4.2. Análisis de los modelos ΣP .

A continuación, se aplican las técnicas anteriores al estudio cualitativo del modelo polinomial ΣP . Se busca principalmente encontrar evidencias del comportamiento homeostático. Fundamentalmente, se investiga la existencia de atractores globales, es decir, estados estacionarios a los que las trayectorias de solución del sistema convergen, independiente de las condiciones iniciales. Se comienza buscando puntos críticos del modelo ΣPI . Sin embargo, dada la complejidad introducida por la no linealidad de las ecuaciones de éste, la que inducen a la aparición de ecuaciones polinomiales de alto grado, se hace necesario focalizar el análisis, principalmente en el modelo ΣPII , lo que permite la descripción explícita de un único equilibrio, en función de los parámetros. Se recuerda que el modelo ΣP está compuesto por las siguientes ecuaciones:

$$(\Sigma PI) \begin{cases} \dot{x}_1 = -Ux_1 + Ex_2x_4 + Ex_6x_4, \\ \dot{x}_2 = -2A_2x_2^2x_5 - A_1x_2x_3 - Ex_2x_4 + Ux_1 + D_1x_6 + 2D_2x_7 + \delta x_6 + 2\delta x_7, \\ \dot{x}_3 = 2A_3x_6^2x_5 - 2D_3x_3^2x_7 - A_1x_2x_3 + Ex_6x_4 + Sx_8 - \delta x_3 + D_1x_6, \\ \dot{x}_4 = Sx_8 - \delta x_4, \\ \dot{x}_5 = -A_2x_2^2x_5 - A_3x_6^2x_5 + D_3x_3^2x_7 + Sx_8 + D_2x_7 - \delta x_5, \\ \dot{x}_6 = -2A_3x_6^2x_5 + 2D_3x_3^2x_7 + A_1x_2x_3 - Ex_6x_4 - D_1x_6 - \delta x_6, \\ \dot{x}_7 = A_2x_2^2x_5 + A_3x_6^2x_5 - D_3x_3^2x_7 - D_2x_7 - \delta x_7, \\ \dot{x}_8 = k_0 + k_1x_2 + k_1x_6 - k_2x_5 - \delta'x_8. \end{cases} \quad (4.1)$$

En donde, $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$, $x_3 = [\text{CopZ}]$, $x_4 = [\text{CopA}]$, $x_5 = [\text{CopY}]$, $x_6 = [\text{CopZCu}]$, $x_7 = [\text{CopYCu}_2]$, $x_8 = [\text{mRNA}_1]$.

En el caso ΣPII , lo único que cambia es la dinámica de x_1 , resultando simplemente:

$$\dot{x}_1 = -Ux_1. \quad (4.2)$$

4.2.1. Estudio de puntos críticos.

Un primer intento por comprender el comportamiento del sistema ΣP en el equilibrio es el análisis que deriva en la siguiente proposición, en la que se deducen relaciones entre las variables de estado del sistema en el estado estacionario. En este caso, se despejan todas las concentraciones en función de $x_5 = [\text{CopY}]$, $x_6 = [\text{CopZCu}]$ y $x_7 = [\text{CopYCu}_2]$, encontrando una relación que cumplen x_5 y x_7 en términos de los parámetros y de la concentración total de cobre (ver (4.5))

Proposición 4.1 *Todo equilibrio x^* del sistema ΣPI , satisface las siguientes relaciones:*

$$\begin{cases} x_1^* = \omega(x_5^* + x_7^*)(\alpha x_5^* + \beta x_7^* - \frac{k_0}{k_1}). \\ x_2^* = \alpha x_5^* + \beta x_7^* - x_6^* - \frac{k_0}{k_1}. \\ x_3^* = -x_6^* + (x_5^* + x_7^*). \\ x_4^* = (x_5^* + x_7^*). \\ x_8^* = \frac{\delta}{S}(x_5^* + x_7^*). \end{cases} \quad (4.3)$$

$$\alpha\omega(x_5^*)^2 + \beta\omega(x_7^*)^2 + \omega(\alpha + \beta)x_7^*x_5^* + (\beta + 2 - \frac{k_0}{k_1})x_7^* + (\alpha - \frac{k_0}{k_1})x_5^* - \frac{k_0}{k_1} = \mathcal{C}, \quad (4.4)$$

y donde $\alpha, \omega, \beta, \mathcal{C}$ constantes positivas.

Observación. La cantidad de cobre total del sistema $[\text{Cu}_{\text{total}}]$, se conserva, es decir, se tiene la siguiente ecuación para todo $t \geq 0$

$$[\text{Cu}_{\text{ext}}] + [\text{Cu}_{\text{int}}] + [\text{CopZCu}] + 2[\text{CopYCu}_2] = [\text{Cu}_{\text{total}}]. \quad (4.5)$$

DEMOSTRACIÓN. Realizando una inspección y desarrollo algebraico de las ecuaciones de (4.1), es posible derivar las siguientes relaciones entre las variables del sistema en un estado estacionario cualquiera:

$$\begin{cases} -\delta x_5 - \delta x_7 + Sx_8 = 0. \\ -\delta x_3 - \delta x_6 + Sx_8 = 0. \\ E(x_2 + x_6)x_4 - Ux_1 = 0. \\ -\delta x_4 + Sx_8 = 0. \\ k_0 + k_1x_2 - k_2x_5 + k_1x_6 - \delta'x_8 = 0. \end{cases} \quad (4.6)$$

Usando estas igualdades es posible despejar las variables x_1, x_2, x_3, x_4, x_8 en función de x_5, x_6, x_7 , resultando las siguientes relaciones:

$$\begin{cases} x_1 = \omega(x_5 + x_7)(\alpha x_5 + \beta x_7 - \frac{k_0}{k_1}), \\ x_2 = \alpha x_5 + \beta x_7 - x_6 - \frac{k_0}{k_1}, \\ x_3 = -x_6 + (x_5 + x_7), \\ x_4 = (x_5 + x_7), \\ x_8 = \frac{\delta}{S}(x_5 + x_7). \end{cases} \quad (4.7)$$

Donde,

$$\begin{cases} \alpha = \frac{\delta\delta'}{Sk_1} + \frac{k_2}{k_1}. \\ \beta = \frac{\delta\delta'}{Sk_1}. \\ \omega = \frac{E}{U}. \end{cases} \quad (4.8)$$

Por otro lado, recordando la observación anterior respecto a la conservación del cobre total, definiendo $\mathcal{C} = [\text{Cu}_{\text{total}}]$ y usando (4.7), se obtiene:

$$\alpha\omega x_5^2 + \beta\omega x_7^2 + \omega(\alpha + \beta)x_7x_5 + (\beta + 2 - \frac{k_0}{k_1})x_7 + (\alpha - \frac{k_0}{k_1})x_5 - \frac{k_0}{k_1} = \mathcal{C}. \quad (4.9)$$

□

La proposición anterior entrega luces en dos aspectos fundamentales: 1) las concentraciones totales de proteínas son todas las mismas y son proporcionales a la concentración de mRNA, lo que es consistente con lo esperado en relación al funcionamiento del operón y 2) los parámetros que definen α , β y γ (en (4.4)), además de δ y S , en conjunto, son parámetros fundamentales del sistema que definen las concentraciones de equilibrio. Estos parámetros corresponden principalmente a: tasa de síntesis de proteínas, tasa basal de transcripción, constantes de degradación, constantes relacionados con la transcripción y constantes relacionadas con la entrada y salida del cobre.

Por otra parte, a pesar de que la no linealidad de las ecuaciones polinomiales en (4.1) constituye un desafío en el despeje de los valores de las variables de estado en el equilibrio, la constatación de una ley de conservación y del tipo de relaciones que cumplen las variables aportan intuición respecto al funcionamiento de la dinámica del sistema, que, junto con una simplificación dada por el modelo ΣPII es fundamental para los resultados a consignarse más adelante, en particular, para la determinación de un único estado estacionario en este último modelo.

Proposición 4.2 *El modelo ΣPII tiene un único estado estacionario.*

DEMOSTRACIÓN. A continuación se demostrará que este tipo de sistemas poseen un único estado estacionario x^* y este último quedará expresado en función de los parámetros del modelo. Sea: $C_{\text{int}} = x_2 + x_6 + 2x_7$. Usando (4.2) y (4.1) se obtiene

$$C_{\text{int}} = Ux_1 - E_1x_2x_4 - E_2x_4x_6 = 0. \quad (4.10)$$

Por otro lado, como el cobre no se recicla, de la dinámica de x_1 se deduce que en el equilibrio

$$Ux_1 = 0 \implies x_1 = 0. \quad (4.11)$$

A partir de esto, de (4.10) se deriva que se cumple alguna de las siguientes alternativas:

$$\begin{cases} x_4 = 0, \\ x_2 = x_6 = 0. \end{cases} \quad (4.12)$$

A continuación, se analiza cada caso por separado:

1. Al asumir $x_4 = 0$, de su dinámica se obtiene que:

$$Sx_8 - \delta x_4 = 0 \implies x_8 = 0. \quad (4.13)$$

Por otro lado, definiendo:

$$[\text{CopY}_{\text{total}}] = x_5 + x_7,$$

se obtiene

$$\frac{d[\text{CopY}_{total}]}{dt} = Sx_8 - \delta[\text{CopY}_{total}] = 0 \implies [\text{CopY}_{total}] = 0,$$

con lo que

$$x_5 + x_7 = 0 \implies x_5 = x_7 = 0.$$

Pero, reemplazando lo anterior en la dinámica de x_8 , resulta lo siguiente:

$$k_0 + k_1(x_2 + x_6) - k_2x_5 - \delta'x_8 = 0 \implies k_0 + k_1(x_2 + x_6) = 0 \quad (4.14)$$

Sin embargo, dado el supuesto que $k_0 > 0$, se tiene que $k_0 + k_1(x_2 + x_6) > 0$, lo que es una contradicción.

2. Por otro lado si $x_2 = x_6 = 0$ se obtiene de la dinámica de x_7 que:

$$-D_3x_3^2x_7 - D_2x_7 - \delta x_7 = 0 \implies x_7 = 0, \quad (4.15)$$

pues de otro modo, se tendría que $D_3x_3^2 + D_2 + \delta = 0$, y esto no es posible. Usando este resultado en la dinámica de x_5 , además de las condiciones anteriores, se obtiene:

$$x_5 = \frac{S}{\delta}x_8. \quad (4.16)$$

De forma análoga, usando las dinámicas de x_3 y x_4 se obtiene:

$$x_4 = x_3 = x_5 = \frac{S}{\delta}x_8 \quad (4.17)$$

Finalmente, de la ecuación asociada a la dinámica de x_8 se desprende que:

$$k_0 - k_2x_5 - \delta'x_8 = 0 \implies x_8 = \frac{k_0}{k_2\frac{S}{\delta} + \delta'} \quad (4.18)$$

En vista de lo anterior, se concluye que ΣPII tiene un único estado estacionario, dado por:

$$\bar{x} = \left(0, 0, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, 0, 0, \frac{k_0}{(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}\right). \quad (4.19)$$

□

Observación. Notar que en (4.19) los parámetros que funcionan como parámetros estructurales del modelo, definiendo el equilibrio corresponden a la síntesis y degradación de proteínas y mRNA además de a las tasa de transcripción basal.

4.2.2. Condiciones necesarias de estabilidad.

En esta sección, se analizan condiciones necesarias de estabilidad (ver proposición 3.32). Para ello, se hace una primera observación:

Lema 4.3 *Los sistemas ΣPI y ΣPII son sistemas de signo definido.*

DEMOSTRACIÓN. Se concluye de notar que los lados derechos de las EDOs que definen ΣPI y ΣPII son polinomiales y todos los parámetros asociados son constantes positivas. □

4.2.2.1. Análisis del grafo de interacciones asociado al modelo ΣPI .

En el caso de (4.1) se tiene el siguiente Jacobiano asociado:

$$JF(x) = \begin{pmatrix} -U & Ex_4 & 0 & Ex_2 + Ex_6 & 0 & Ex_4 & 0 & 0 \\ U & -4A_2x_2x_5 - A_1x_3 - Ex_4 & -A_1x_2 & -Ex_2 & -2A_2x_2^2 & D_1 + \delta & 2D_2 + 2\delta & 0 \\ 0 & -A_1x_3 & -4D_3x_3x_7 - A_1x_2 - \delta & Ex_6 & 2A_3x_6^2 & 4A_3x_5x_6 + Ex_4 + D_1 & -2D_3x_3^2 & S \\ 0 & 0 & 0 & -\delta & 0 & 0 & 0 & S \\ 0 & -2A_2x_2x_5 & 2D_3x_3x_7 & 0 & -A_2x_2^2 - A_3x_6^2 - \delta & -2A_3x_5x_6 & D_3x_3^2 + D_2 & S \\ 0 & A_1x_3 & 4D_3x_3x_7 + A_1x_2 & -Ex_6 & -2A_3x_6^2 & -4A_3x_5x_6 - Ex_4 - D_1 - \delta & 2D_3x_3^2 & 0 \\ 0 & 2A_2x_2x_5 & -2D_3x_3x_7 & 0 & A_2x_2^2 + A_3x_6^2 & 2A_3x_5x_6 & -D_3x_3^2 - D_2 - \delta & 0 \\ 0 & k_1 & 0 & 0 & -k_2 & k_1 & 0 & -\delta' \end{pmatrix}$$

Se puede apreciar que el signo de las entradas de $JF(x)$ no depende del punto x .

Para simplificar el análisis, se toma el grafo inducido por los vértices $x_1 = [Cu_{ext}]$, $x_2 = [Cu_{int}]$, $x_4 = [CopA]$, $x_5 = [CopY]$, $x_7 = [CopYCu_2]$ y $x_8 = [mRNA_1]$. Todos estos elementos, del punto de vista biológico, son fundamentales para los mecanismos que regulan la concentración interna de cobre. El grafo resultante se puede observar en la Figura 4.1.

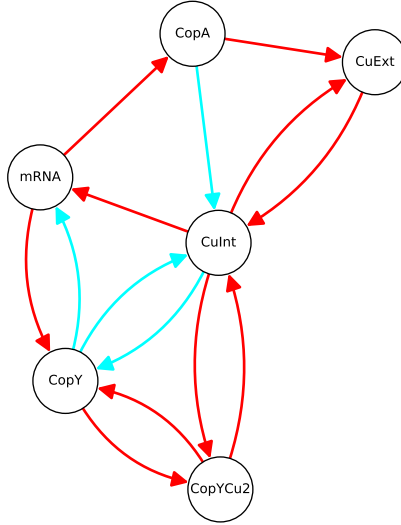


Figura 4.1: Subgrafo del grafo de interacción asociado al modelo ΣPI , formado por $x_1 = [Cu_{ext}]$, $x_2 = [Cu_{int}]$, $x_4 = [CopA]$, $x_5 = [CopY]$, $x_7 = [CopYCu_2]$ y $x_8 = [mRNA_1]$. Las aristas negativas aparecen pintadas de color celeste mientras que las positivas se colorean de color rojo

Notar que aparecen interacciones negativas entre x_4 y x_2 y x_5, x_2 y x_8 , representando las interacciones de efflux y regulación transcripcional respectivamente. El ciclo negativo más grande que involucra a todas las variables en el subgrafo inducido se ilustra en la Figura 4.2

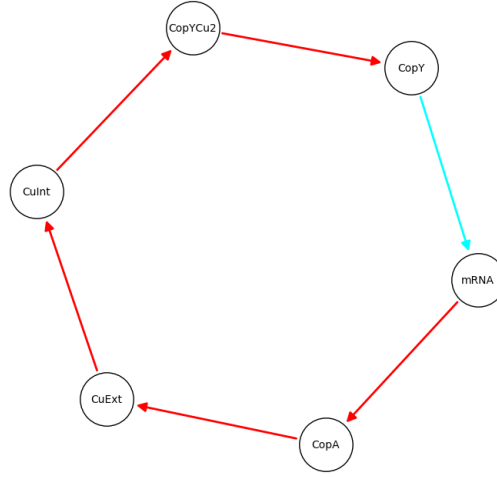


Figura 4.2: Ciclo negativo formado por $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$, $x_4 = [\text{CopA}]$, $x_5 = [\text{CopY}]$, $x_7 = [\text{CopYCu}_2]$ y $x_8 = [\text{mRNA}_1]$. Las aristas negativas aparecen pintadas de color celeste mientras que las positivas se colorean de color rojo

Por otro lado, es interesante recalcar que este último, es el único ciclo negativo que incorpora $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$ en el subgrafo inducido considerado. Una posible interpretación de lo que representa este ciclo para la dinámica del cobre, es que cada elemento que aparece como un nodo en el grafo de la Figura 4.2, es parte del mecanismo que regula la concentración interna de cobre, en concordancia de lo que se sabe del modelo biológico. Se hace notar que cada arco rojo se interpreta en el sentido de que un aumento de la concentración de la variable representada en la cola del arco, produce un aumento en la concentración de la variable representada en la cabeza de este. Por otro lado, los arcos azules se interpretan en sentido contrario, es decir que un aumento en la concentración de la variable representada en la cola, produce una disminución en la concentración de la variable representada en la cabeza del arco. De acuerdo a la Figura 4.2, todas las interacciones entre las variables tienen una correlación positiva, salvo el arco que va desde CopY a la concentración de mRNA. Esto último indica una autorregulación negativa de la transcripción, debido a cambios externos en las concentraciones de cobre. En el sentido de [68], se establece una condición necesaria para la homeostasis.

4.2.2.2. Análisis del grafo de interacciones asociado al modelo ΣPII .

En este caso, el Jacobiano asociado al sistema es de la forma:

$$JF(x) = \begin{pmatrix} -U & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ U & -4A_2x_2x_5 - A_1x_3 - Ex_4 & -A_1x_2 & -Ex_2 & -2A_2x_2^2 & D_1 + \delta & 2D_2 + 2\delta & 0 & 0 \\ 0 & -A_1x_3 & -4D_3x_3x_7 - A_1x_2 - \delta & Ex_6 & 2A_3x_6^2 & 4A_3x_5x_6 + Ex_4 + D_1 & -2D_3x_3^2 & S & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\delta & 0 & 0 & 0 & 0 & S \\ 0 & -2A_2x_2x_5 & 2D_3x_3x_7 & 0 & -A_2x_2^2 - A_3x_6^2 - \delta & -2A_3x_5x_6 & D_3x_3^2 + D_2 & S & 0 \\ 0 & A_1x_3 & 4D_3x_3x_7 + A_1x_2 & -Ex_6 & -2A_3x_6^2 & -4A_3x_5x_6 - Ex_4 - D_1 - \delta & 2D_3x_3^2 & 0 & 0 \\ 0 & 2A_2x_2x_5 & -2D_3x_3x_7 & 0 & A_2x_2^2 + A_3x_6^2 & 2A_3x_5x_6 & -D_3x_3^2 - D_2 - \delta & 0 & 0 \\ 0 & k_1 & 0 & 0 & -k_2 & k_1 & 0 & 0 & -\delta' \end{pmatrix}$$

El grafo completo se puede observar en la Figura 4.3.

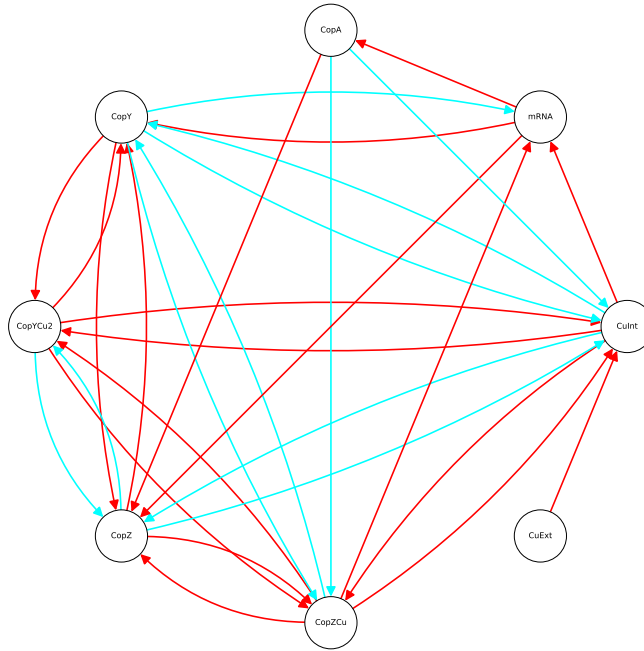


Figura 4.3: Grafo de interacción asociado al sistema ΣPII . Las aristas negativas aparecen pintadas de color celeste mientras que las positivas se colorean de color rojo.

En este caso, el grafo inducido por las variables $x_1 = [Cu_{ext}]$, $x_2 = [Cu_{int}]$, $x_4 = [CopA]$, $x_5 = [CopY]$, $x_7 = [CopYCu_2]$ y $x_8 = [mRNA_1]$ tiene la siguiente estructura:

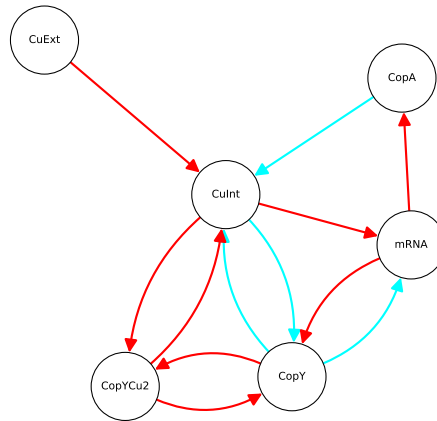


Figura 4.4: Subgrafo del grafo de interacción asociado al modelo ΣPII , formado por $x_1 = [Cu_{ext}]$, $x_2 = [Cu_{int}]$, $x_4 = [CopA]$, $x_5 = [CopY]$, $x_7 = [CopYCu_2]$ y $x_8 = [mRNA_1]$. Las aristas negativas aparecen pintadas de color celeste mientras que las positivas se colorean de color rojo.

Se puede observar que las aristas negativas son las mismas que en el caso del grafo de

la Figura 4.1, sin embargo, al remover las aristas que iban hacia $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, no es posible formar el ciclo de la Figura 4.2. Esto último se debe a que se ha eliminado el mecanismo de reciclaje de cobre. No obstante, se siguen formando ciclos negativos en esta parte del grafo de interacción.

El ciclo negativo de mayor largo que aparece en este grafo, tampoco contempla a x_6 y se basa en la regulación negativa del factor de transcripción x_5 y del sistema de salida de cobre, dado por x_4 . Este último se puede apreciar en la Figura 4.5. Este caso también corresponde a un mecanismo de autorregulación negativa. Sin embargo, este es más simple que el de la Figura 4.2. Su dinámica se puede entender de la siguiente forma:

- Un aumento en la concentración de cobre intracelular, produce una disminución en la tasa de cambio de la concentración de CopY.
- Una disminución en la concentración de CopY, produce un aumento en la producción de mRNA.
- Si aumenta la producción de mRNA, aumenta la producción de CopA.
- Si aumenta la producción de CopA disminuye la tasa de cambio de la concentración de cobre intracelular.

El carácter cíclico de esta dinámica y la alternancia producida por la regulación negativa sugiere el mantenimiento de un estado de homeostasis. Nuevamente, en términos de [68] se aprecian condiciones necesarias para la existencia de homeostasis.

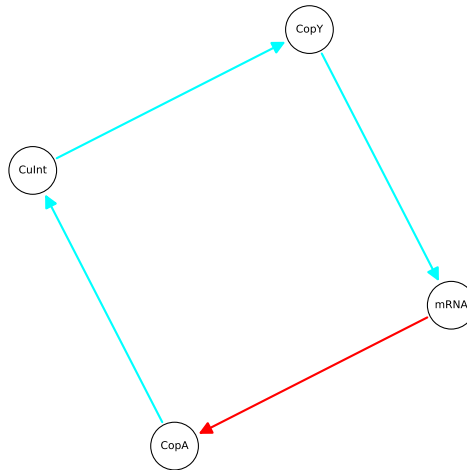


Figura 4.5: Ciclo negativo formado por $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$, $x_4 = [\text{CopA}]$, $x_5 = [\text{CopY}]$ y $x_8 = [\text{mRNA}_1]$

4.2.3. Estabilidad del único equilibrio de ΣPII a través de linealización.

En esta sección se usará la linealización para evaluar la estabilidad local del único equilibrio del sistema ΣPII , dado por (4.19), usando el Teorema (3.4). Por otro lado, es importante mencionar que este análisis es posible principalmente por la estructura polinomial del modelo ΣPII y falla en el caso Σ como se verá en el capítulo siguiente. Esto último debido a que la estructura polinomial del modelo ΣPII resulta en una menor dependencia del Jacobiano de las variables de estado y produce que no existan filas nulas para determinados valores de las variables de estado.

Teorema 4.4 *El sistema ΣPII tiene un único equilibrio asintóticamente estable dado por (4.18).*

DEMOSTRACIÓN. En secciones anteriores se determinó la existencia de un único punto crítico para ΣPII :

$$\bar{x} = \left(0, 0, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, 0, 0, \frac{k_0}{(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}\right). \quad (4.20)$$

Usando el criterio de estabilidad dado por el Teorema 3.4, se calcula el Jacobiano del sistema en el \bar{x}

$$JF(\bar{x}) = \begin{pmatrix} -U & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ U & -\frac{A_1Sk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} - \frac{ESk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} & 0 & 0 & 0 & D_1 + \delta & 2D_2 + 2\delta & 0 \\ 0 & -\frac{A_1Sk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} & -\delta & 0 & 0 & D_1 + \frac{ESk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} & -\frac{2D_3S^2k_0^2}{\delta^2(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})^2} & S \\ 0 & 0 & 0 & -\delta & 0 & 0 & 0 & S \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -\delta & 0 & D_2 + \frac{D_3S^2k_0^2}{\delta^2(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})^2} & S \\ 0 & \frac{A_1Sk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} & 0 & 0 & 0 & -D_1 - \delta - \frac{ESk_0}{\delta(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})} & \frac{2D_3S^2k_0^2}{\delta^2(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})^2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -D_2 - \delta - \frac{D_3S^2k_0^2}{\delta^2(\delta'+\frac{Sk_2}{\delta})^2} & 0 \\ 0 & 0 & k_1 & 0 & 0 & -k_2 & k_1 & 0 & -\delta' \end{pmatrix}$$

Al calcular los valores propios se obtiene:

$$\begin{cases} \lambda_1 = -\frac{\delta^2\delta' + D_1Sk_2 + (D_1\delta' + Sk_2)\delta + (A_1S + ES)k_0}{\delta\delta' + Sk_2} \\ \lambda_2 = -\frac{ESk_0}{\delta\delta' + Sk_2}, \\ \lambda_3 = -\frac{1}{2}\delta - \frac{1}{2}\delta' - \frac{1}{2}\sqrt{\delta^2 - 2\delta\delta' + \delta'^2 - 4Sk_2}, \\ \lambda_4 = -\frac{1}{2}\delta - \frac{1}{2}\delta' + \frac{1}{2}\sqrt{\delta^2 - 2\delta\delta' + \delta'^2 - 4Sk_2}, \\ \lambda_5 = -\frac{D_2\delta^2\delta'^2 + \delta^3\delta'^2 + (D_3k_0^2 + D_2k_2^2 + \delta k_2^2)S^2 + 2(D_2\delta\delta'k_2 + \delta^2\delta'k_2)S}{\delta^2\delta'^2 + 2S\delta\delta'k_2 + S^2k_2^2}, \\ \lambda_6 = -U, \\ \lambda_7 = -\delta, \\ \lambda_8 = -\delta. \end{cases} \quad (4.21)$$

Es fácil ver que todos los valores propios λ_i cumplen $\text{Re}(\lambda_i) < 0$, por lo que, en virtud del Teorema 3.4, el único equilibrio del sistema ΣPII es asintóticamente estable. \square

4.2.4. Aplicación de resultados de la teoría de control.

A continuación, se aplican los resultados de la sección anterior, relacionados con la teoría de control, al modelo ΣPII . El objetivo principal a lograrse consiste en, a partir de los resultados expuestos en el apartado 3.3, estimar una región atractora para el único equilibrio de ΣPII . Se determinó en la sección anterior que este último tenía la propiedad de ser asintóticamente estable. Esto quiere decir, en palabras simples, que si una trayectoria parte cerca de este punto termina convergiendo, a largo plazo, a este estado estacionario. Sin embargo, el teorema (3.4) no establece el tamaño de la región que atrae estas trayectorias. En este sentido, una pregunta natural es: ¿este equilibrio es globalmente asintóticamente estable?, es decir, ¿es todo $(\mathbb{R}^+)^8$ la región atractora?. Como una forma de enfrentar esta pregunta, se busca descomponer el sistema ΣPII , en un sistema de loop cerrado asociado a un sistema controlado que cumple con la propiedad de ser monótono. Finalmente, se aplica el teorema 3.27 a este sistema para deducir las propiedades deseadas.

Proposición 4.5 *El sistema (4.2) puede ser visto como el sistema de loop cerrado del sistema controlado con espacio de estados $X = (\mathbb{R}^+)^8$ y espacio de control $U = (\mathbb{R}^+)^5$ dado por:*

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = f_1(x) = -Ux_1 + Ex_2x_4 + Ex_6x_4, \\ \dot{x}_2 = f_2(x) = -2A_2x_2^2x_5 - A_1x_2x_3 - Ex_2x_4 + Ux_1 + D_1x_6 + 2D_2x_7 + \delta x_6 + 2\delta x_7, \\ \dot{x}_3 = f_3(x, u_5) = 2A_3u_5^2x_5 - 2D_3x_3^2x_7 - A_1x_2x_3 + Eu_5x_4 + Sx_8 - \delta x_3 + D_1u_5, \\ \dot{x}_4 = f_4(x) = Sx_8 - \delta x_4, \\ \dot{x}_5 = f_5(x, u_2) = -A_2x_2^2x_5 - A_3x_6^2x_5 + D_3x_3^2u_2 + Sx_8 + D_2u_2 - \delta x_5, \\ \dot{x}_6 = f_6(x, u_1) = -2A_3x_6^2x_5 + 2D_3u_1^2x_7 + A_1x_2u_1 - Ex_6x_4 - D_1x_6 - \delta x_6, \\ \dot{x}_7 = f_7(x, u_4) = A_2x_2^2u_4 + A_3x_6^2u_4 - D_3x_3^2x_7 - D_2x_7 - \delta x_7, \\ \dot{x}_8 = f_8(x, u_3, u_4, u_5) = k_0 + k_1u_3 + k_1u_5 - k_2u_4 - \delta'x_8, \end{cases} \quad (4.22)$$

y feedback dado por

$$h(x) = (x_3, x_7, x_2, x_5, x_6).$$

Además, el sistema (4.22) es monótono respecto a los conos K_X y K_U dados por los hiper octantes definidos por las tuplas:

$$\begin{cases} s = (-1, -1, 1, 1, 1, -1, -1, 1) \\ p = (-1, 1, 1, -1, 1) \end{cases}$$

respectivamente.

DEMOSTRACIÓN. El resultado es directo de la transformación 3.38 usando como variables agnistas $A = \{[\text{CopZ}], [\text{CopY}], [\text{CopA}], [\text{mRNA}]\} = \{x_3, x_4, x_5, x_8\}$ y del Teorema 3.39 \square

En la Figura 4.6 se puede ver el grafo de interacciones asociado al sistema Σ_{PII} . Tal como se comenta en 4.2.2.2, el sistema (2.25) es un sistema de signo definido cuando $X = (\mathbb{R}^+)^8$.

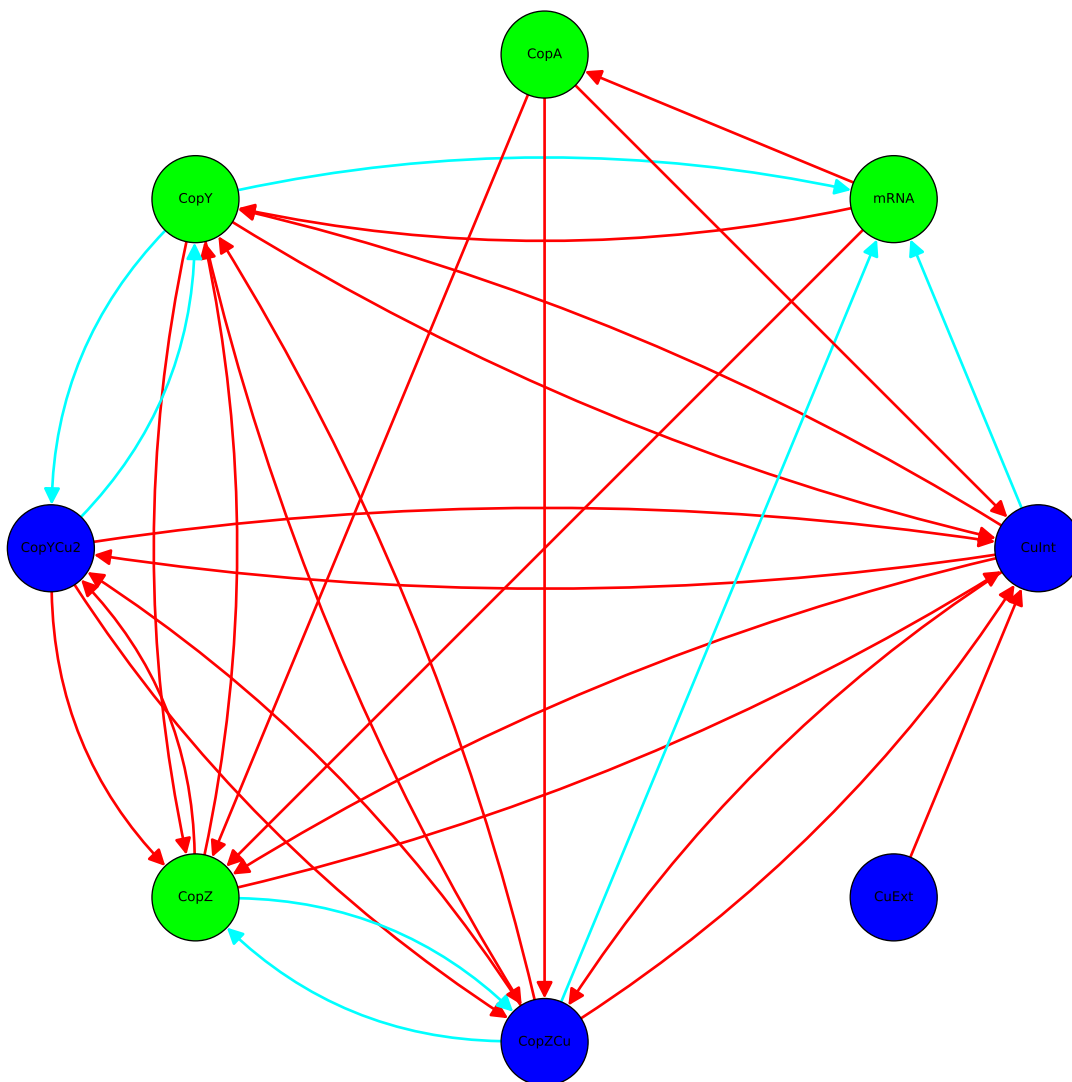


Figura 4.6: Grafo de interacciones sistema Σ_{PII} . En verde se ven los vértices pertenecientes a las variables agonistas y en azul a las antagonistas. Las aristas en celeste claro son las aristas discordantes que se eliminan del grafo de interacciones al aplicar el método descrito en la Definición 3.38

Al remover las aristas celestes que se ven en la Figura 4.6, se obtiene el grafo que muestra la Figura 4.7 en donde no hay aristas discordantes. Este grafo admite una asignación de spin dada por la partición de vértices elegida.

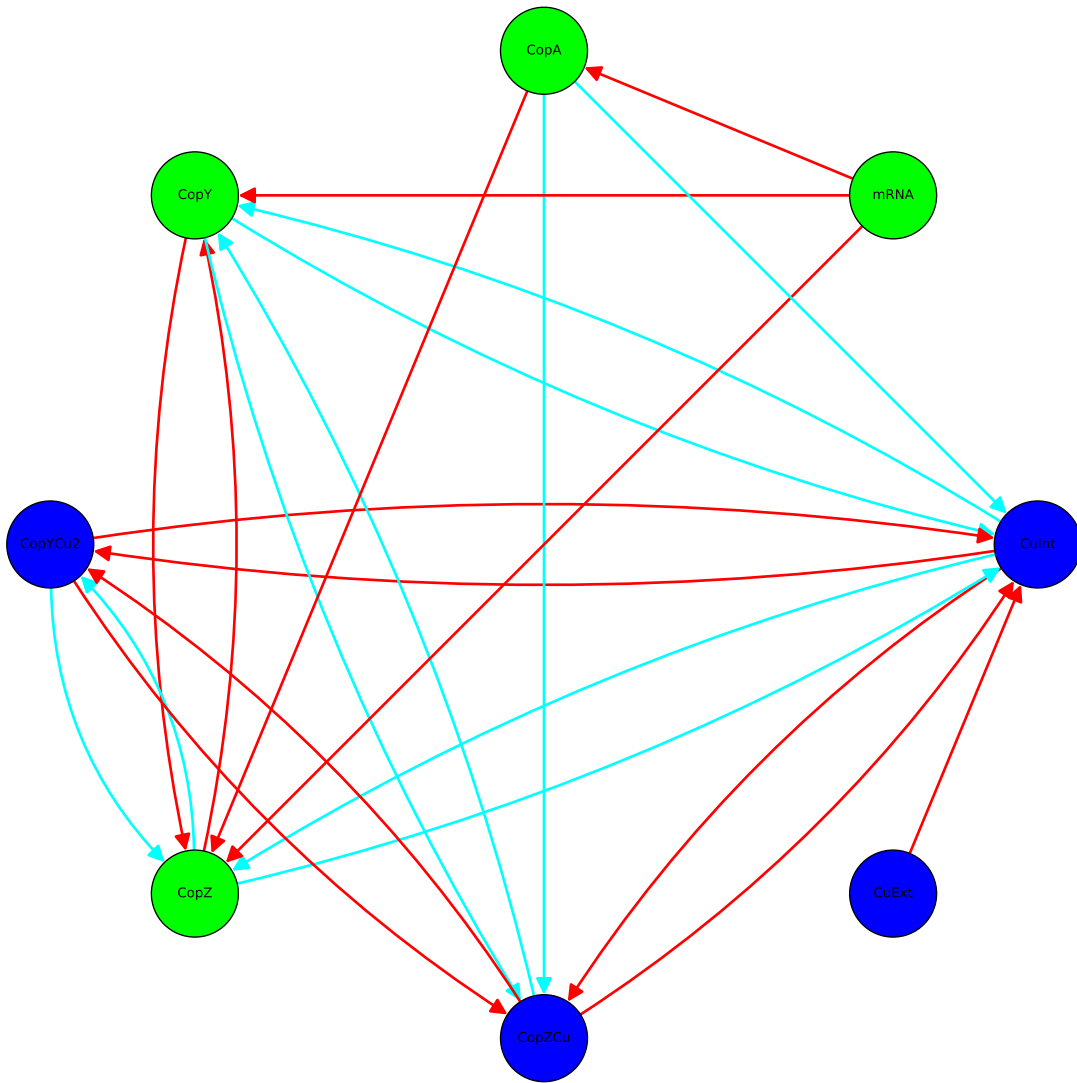


Figura 4.7: Grafo de interacciones del sistema controlado asociado a ΣPII . En rojo se ven las aristas con etiqueta +1 y en celeste las aristas con etiqueta -1. No existen aristas discordantes, es decir, aristas negativas entre vértices de la misma partición o aristas positivas que conecten vértices en distintas particiones.

Teorema 4.6 Sea $\bar{x} = (0, 0, r\alpha, r\alpha, r\alpha, 0, 0, \alpha)^T$ el único equilibrio del sistema ΣPII con $\alpha \geq 0$, $r = \frac{S}{\delta}$. Sea $\varepsilon \in (0, r\alpha)$ y $Q_\varepsilon = \{x \in \mathbb{R}^8 | x_1 = x_2 = x_6 = x_7 = 0, (x_3, x_4, x_5, x_8) \in (r\alpha - \varepsilon, r\alpha + \varepsilon)^3 \times (\alpha - \varepsilon, \alpha + \varepsilon)\}$. Si se cumple que $\delta \geq S$ y $\delta' \geq k_2$, entonces Q_ε es una región invariante para ΣPII tal que $\omega_F(Q_\varepsilon) = \{\bar{x}\}$. Más aún, todas las trayectorias con condición inicial en Q_ε convergen a \bar{x} cuando $t \rightarrow \infty$.

DEMOSTRACIÓN. Notar primero que si se satisface $\delta \geq S$ y $\delta' \geq k_2$, entonces $r \leq 1$; por lo que, para todo $\varepsilon \in (0, r\alpha)$, se tiene $Q_\varepsilon \subseteq X = (\mathbb{R}^+)^8$. Se comienza corroborando las hipótesis del Teorema 3.27 y el Corolario 3.28:

- $x \rightarrow f(x, u)$, dada por (4.22), cumple la condición (3.5) pues el sistema (4.22) es monótono, por la Proposición 4.5.
- Si $u, v \in U = (\mathbb{R}^+)^5$, $u \leq_U v$, donde \leq_U es el orden dado por el cono K_U definido en la Proposición 4.5 y $x \in X = (\mathbb{R}^+)^8$ entonces:

$$\begin{cases} u_1 \geq v_1. \\ u_2 \leq v_2. \\ u_3 \leq v_3. \\ u_4 \geq v_4. \\ u_5 \leq v_5. \end{cases}$$

Y de aquí se deduce que:

$$\begin{cases} f_3(x, u_5) \leq f_3(x, v_5). \\ f_5(x, u_2) \leq f_5(x, v_2). \\ f_6(x, u_1) \geq f_6(x, v_1). \\ f_7(x, u_4) \geq f_7(x, v_4). \\ f_8(x, u_3, u_4, u_5) \leq f_8(x, v_3, v_4, v_5). \end{cases}$$

Con lo que se concluye que:

$$f(x, u) \leq f(x, v) \text{ para } x \in X, u, v \in U.$$

- Por la Proposición 4.5 se tiene que h es decreciente.

Se definen:

$$\begin{cases} x_0 = (0, 0, r\alpha - \varepsilon, r\alpha - \varepsilon, r\alpha - \varepsilon, 0, 0, \alpha - \varepsilon)^T \in X. \\ y_0 = (0, 0, r\alpha + \varepsilon, r\alpha + \varepsilon, r\alpha + \varepsilon, 0, 0, \alpha + \varepsilon)^T \in X. \end{cases}$$

En vista de esto, es directo que: $x_0 \leq y_0$. Además, se hace notar que $Q_\varepsilon = [x_0, y_0]$. Por otra parte, se tiene que:

$$\begin{cases} (f(x_0, h(y_0)))_1 = f_1(x_0) = 0 = (f(y_0, h(x_0)))_1, \\ (f(x_0, h(y_0)))_2 = f_2(x_0) = 0 = (f(y_0, h(x_0)))_2, \\ (f(x_0, h(y_0)))_6 = f_6(x_0, y_0^3) = f_6(y_0, x_0^3) = 0 = (f(y_0, h(x_0)))_6, \\ (f(x_0, h(y_0)))_7 = f_7(x_0, y_0^5) = f_7(y_0, x_0^5) = 0 = (f(y_0, h(x_0)))_7. \end{cases}$$

Y además,

$$\begin{cases} (f(x_0, h(y_0)))_i = f_i(x_0, 0) = \varepsilon(\delta - S), & i \in \{3, 4, 5\}. \\ (f(y_0, h(x_0)))_i = f_i(y_0, 0) = \varepsilon(S - \delta), & i \in \{3, 4, 5\}. \end{cases}$$

Por lo que tomando $\delta \geq S$ se tiene:

$$(f(y_0, h(x_0)))_i \leq 0 \leq (f(x_0, h(y_0)))_i, \text{ para } i \in \{3, 4, 5\}.$$

De forma análoga, se concluye:

$$\begin{cases} (f(x_0, h(y_0)))_8 = f_i(x_0, y_0^2, y_0^5, y_0^6) = \varepsilon(\delta' - k_2), & i \in \{3, 4, 5\} \\ (f(y_0, h(x_0)))_8 = f_i(y_0, x_0^2, x_0^5, x_0^6) = \varepsilon(k_2 - \delta'), & i \in \{3, 4, 5\} \end{cases}$$

Así, tomando $\delta' \geq k_2$ se cumple:

$$(f(y_0, h(x_0)))_8 \leq 0 \leq (f(x_0, h(y_0)))_8.$$

Con lo que se concluye que:

$$(f(y_0, h(x_0))) \leq 0 \leq (f(x_0, h(y_0))).$$

Finalmente, dados $a, b \in [x_0, y_0]$ tales que $a \leq b$, se tiene que existen $a_1, a_2, a_3, a_4, b_1, b_2, b_3, b_4 \in (-\varepsilon, \varepsilon)$, tales que:

$$\begin{cases} a = (0, 0, r\alpha + a_1, r\alpha + a_2, r\alpha + a_3, 0, 0, \alpha + a_4)^T, \\ b = (0, 0, r\alpha + b_1, r\alpha + b_2, r\alpha + b_3, 0, 0, \alpha + b_4)^T. \end{cases} \quad (4.23)$$

Imponiendo $f(a, h(b)) = f(b, h(a)) = 0$ se obtienen las siguientes relaciones:

$$\begin{cases} S(a_4 - b_4) = \delta(a_i - b_i), & i = 1, 2, 3, \\ -k_2 a_3 - \delta' a_4 = 0, \\ -k_2 b_3 - \delta' b_4 = 0. \end{cases} \quad (4.24)$$

Restando las dos últimas ecuaciones, se obtiene:

$$-k_2(a_3 - b_3) - \delta'(a_4 - b_4) = 0. \quad (4.25)$$

Pero, como $a \leq b$ entonces $a_i \leq b_i$ para $i = 1, 2, 3, 4$, lo que es equivalente a $(a_i - b_i) \leq 0$. Por lo que cada término en la última ecuación es no negativo. Se concluye que $a_4 = b_4, b_3 = a_3$ y en vista de lo anterior $a_i = b_i$ para $i = 1, 2, 3, 4$. Así $a = b$. En virtud del Teorema 3.27 y el Corolario 3.28 se tiene que Q_ε es invariante y $\omega_F([x_0, y_0]) = \{\bar{x}\}$. Por otro lado, en virtud de la compacidad e invarianza de la región Q_ε no es difícil ¹ ver que si z es una condición inicial arbitraria en Q_ε entonces la trayectoria asociada $x(t, z)$, satisface:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} x(t, z) = \bar{x}.$$

□

¹Ver [34, Lema 4.2] para ampliar respecto a esto último.

4.3. Análisis del modelo Σ .

A continuación se realiza un análisis cualitativo del sistema Σ , definido en la sección 3.17. Se buscará demostrar la existencia de un atractor global, es decir, un estado estacionario estable al que las trayectorias de solución del sistema de EDO convergen independiente de la condición inicial (ver Definición 3.5). Esto último, como se ha discutido en capítulos anteriores es una forma de entender la homeostasis desde el punto de vista matemático. Para dar con este resultado, esta sección está organizada de la siguiente forma: i) demostración de la consistencia del modelo en términos de que las trayectorias que parten de condiciones iniciales positivas, no entregan valores negativos en los tiempos posteriores. En lenguaje de los sistemas dinámicos, se prueba que el cono positivo es invariante para el modelo Σ ; ii) demostración de la existencia de un único estado estacionario; iii) estudio de la estabilidad local de este último. Dada la complejidad de las ecuaciones del modelo, los métodos de linealización usados anteriormente (Teorema 3.4)) no funcionan en este caso. No obstante, al final del capítulo, se demuestra que las concentraciones de las variables del sistema, se encuentran eventualmente entre un valor máximo y mínimo en función de los parámetros del modelo Σ . Más aún, para ciertos valores de estos últimos, las trayectorias convergen al único estado estacionario, independiente de la condición inicial.

4.3.0.1. Invarianza del cono positivo.

El objetivo de esta sección es demostrar que el sistema Σ está bien definido en el sentido de que las trayectorias con condiciones iniciales positivas se mantengan siempre positivas. Esto refleja que el modelo no admite concentraciones negativas, lo que es coherente con la realidad del fenómeno que se está describiendo.

Se comienza esta sección recordando las ecuaciones del modelo Σ :

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= -\frac{\tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n} \left. \vphantom{\frac{\tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n}} \right\} \text{Cobre extracelular.} \\
 \dot{x}_2 &= -A_1 x_2 x_3 + D_1 x_6 + \delta x_6 + 2\delta x_7 + \frac{\tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n} \left. \vphantom{\frac{\tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n}} \right\} \text{Cobre intracelular.} \\
 \dot{x}_3 &= Sx_8 + 2A_2 x_5 x_6^2 - A_1 x_2 x_3 - \delta x_3 + D_1 x_6 + \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \left. \vphantom{\frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6}} \right\} \text{Proteínas sin cobre.} \\
 \dot{x}_4 &= Sx_8 - \delta x_4 \\
 \dot{x}_5 &= -A_2 x_5 x_6^2 - \delta x_5 + Sx_8 \\
 \dot{x}_6 &= -2A_2 x_5 x_6^2 + A_1 x_2 x_3 - D_1 x_6 - \delta x_6 - \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \left. \vphantom{\frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6}} \right\} \text{Proteínas + cobre.} \\
 \dot{x}_7 &= A_2 x_5 x_6^2 - \delta x_7 \\
 \dot{x}_8 &= \frac{\beta}{\frac{x_5^2}{K_d^2} + 1} - \delta' x_8 \left. \vphantom{\frac{\beta}{\frac{x_5^2}{K_d^2} + 1}} \right\} \text{mRNA.} \\
 \dot{x}_9 &= \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \left. \vphantom{\frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6}} \right\} \text{Cobre extracelular expulsado.}
 \end{aligned}$$

En donde, $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}]$, $x_3 = [\text{CopZ}]$, $x_4 = [\text{CopA}]$, $x_5 = [\text{CopY}]$, $x_6 = [\text{CopZCu}]$, $x_7 = [\text{CopYCu}_2]$, $x_8 = [\text{mRNA}]$ y $x_9 = [\text{Cu}_{\text{ext}}^*]$.

Proposición 4.7 *El sistema Σ está bien definido, en el sentido que toda condición inicial $x_0 \in X = (\mathbb{R}^+)^9$ admite una única solución $x(t) \in X$, $\forall t \geq 0$.*

DEMOSTRACIÓN. La existencia y unicidad de soluciones es directa de la regularidad de f (ver sección 3.2). Para demostrar la invarianza se usará el Teorema 3.10. Se hace notar que basta con verificar la siguiente condición:

$$f(p) \in \mathcal{T}_p X, \forall p \in X. \quad (4.26)$$

Recordando que:

1. $\mathcal{T}_p X = \mathbb{R}^8$, $\forall p \in \text{Int}(X)$,
2. $\partial X = \{x \in X : \exists i \in \{1, \dots, 9\}, x_i = 0\}$,
3. si $p \in X$ es tal que $p_i = 0$ entonces $\mathcal{T}_p X = \{x \in \mathbb{R}^9 : x_i \geq 0\}$,

es suficiente probar la siguiente propiedad para un $x \in X$ arbitrario:

$$x_i = 0 \implies f_i(x) \geq 0, \forall i \in \{1, \dots, 9\}. \quad (4.27)$$

Se revisa caso por caso. Sea $x \in X$:

1. $x_1 = 0 \implies f_1(x) = 0 \geq 0$,
2. $x_2 = 0 \implies f_2(x) = \frac{\tau x_1^n}{\theta + x_1^n} + \delta(x_6 + 2x_7) + D_1 x_6 \geq 0$,
3. $x_3 = 0 \implies f_3(x) = Sx_8 + 2A_2 x_5 x_6 + D_1 x_6 + \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \geq 0$,
4. $x_4 = 0 \implies f_4(x) = Sx_8 \geq 0$,
5. $x_5 = 0 \implies f_5(x) = Sx_8 \geq 0$,
6. $x_6 = 0 \implies f_6(x) = A_1 x_3 x_2 \geq 0$,
7. $x_7 = 0 \implies f_7(x) = A_2 x_5 x_6^2 \geq 0$,
8. $x_8 = 0 \implies f_8(x) = \frac{\beta}{1 + \frac{x_5^2}{K_d^2}} \geq 0$,
9. $x_9 = 0 \implies f_9(x) = \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6} \geq 0$.

En virtud de la observación anterior y del Teorema 3.10 se concluye en virtud de (4.27). □

4.3.0.2. Análisis de puntos críticos y estabilidad local.

El objetivo de esta sección es demostrar que el sistema admite un único estado estacionario.

Proposición 4.8 *El sistema Σ admite un único equilibrio $\bar{x} \in X$.*

DEMOSTRACIÓN. Se comienza notando que $\dot{x}_9 = 0$ ocurre bajo dos posibilidades:

1. $x_4 = 0$,
2. $x_6 = 0$.

Se analizan ambos casos por separado

1. Si $x_4 = 0$, entonces, de la ecuación $\dot{x}_4 = 0$, se obtiene que

$$Sx_8 - \delta x_4 = 0 \implies x_8 = 0. \quad (4.28)$$

Sustituyendo esto último en la ecuación $\dot{x}_8 = 0$, se deduce la siguiente igualdad:

$$\frac{\beta}{1 + \frac{x_5^2}{K_d^2}} = 0. \quad (4.29)$$

Lo que es una contradicción, dado que la función del lado izquierdo en la ecuación anterior es siempre estrictamente positiva para $x_5 \geq 0$.

2. Por otra parte, si $x_6 = 0$, se tiene de la ecuación $\dot{x}_7 = 0$ que:

$$-\delta x_7 = 0, \quad (4.30)$$

de la que se deduce que $x_7 = 0$. Reemplazando $x_7 = x_6 = 0$ en la ecuación $\dot{x}_6 = 0$, se obtiene:

$$A_1 x_2 x_3 = 0. \quad (4.31)$$

Nuevamente, aparecen dos posibilidades:

- (a) $x_3 = 0$.
- (b) $x_2 = 0$.

Se revisan ambos casos:

- (a) Si $x_3 = 0$, se tiene que al reemplazar $x_6 = x_7 = 0$ en la ecuación $\dot{x}_3 = 0$:

$$Sx_8 - \delta x_3 - A_1 x_2 x_3 = 0. \quad (4.32)$$

Análogo al caso $x_4 = 0$, reemplazando $x_3 = 0$ en la expresión anterior, fuerza nuevamente a la igualdad (4.29), por lo que esta opción no es posible.

- (b) Tomando $x_2 = 0$, de $\dot{x}_3 = 0$, la siguiente ecuación:

$$Sx_8 - \delta x_3 = 0, \quad (4.33)$$

de la que se deduce $x_3 = \frac{S}{\delta} x_8$. Por otro lado, de las ecuaciones $\dot{x}_4 = 0$ y $\dot{x}_5 = 0$, se deducen, de la misma forma, las siguientes igualdades:

$$x_4 = \frac{S}{\delta} x_8, \quad x_5 = \frac{S}{\delta} x_8. \quad (4.34)$$

Por último, de la ecuación $\dot{x}_8 = 0$ se deduce que:

$$x_8 = \frac{\beta}{\delta'} \left(\frac{1}{1 + \frac{x_5^2}{K_d^2}} \right). \quad (4.35)$$

Reemplazando esto último en la igualdad para x_5 en (4.34) se concluye que x_5 es solución de la siguiente ecuación cúbica:

$$x^3 + cx - d = 0, \quad (4.36)$$

donde $c = K_d^2$ y $d = K_d^2 \frac{S\beta}{\delta\delta'}$.

En vista de la última observación, para demostrar lo propuesto es suficiente mostrar que (4.36) admite una única solución real positiva.

Para ello calculando el discriminante de (4.36) se observa que:

$$\Delta = -4c^3 - 27(-d)^2 = -4c^3 - 27d^2 < 0. \quad (4.37)$$

Es un resultado conocido que si el discriminante de una ecuación cúbica es negativo, entonces la ecuación admite una única raíz real. Sea α , la única raíz real de (4.36). Lo único que resta para completar la demostración es mostrar que $\alpha > 0$. En efecto, usando las fórmulas de Cardano-Vieta y usando que (4.36) tiene una única raíz real α (y por lo tanto dos raíces complejas conjugadas z y \bar{z}), se tiene:

$$\alpha z \bar{z} = \alpha |z|^2 = (-1)^3(-d) = d \implies \alpha > 0. \quad (4.38)$$

Finalmente, falta encontrar una expresión para x_9 . Para esto notamos lo siguiente: si se define $\text{Cu}_{\text{int,tot}} = x_2 + x_6 + 2x_7$ ($[\text{Cu}_{\text{int}}] + [\text{CopZCu}] + 2[\text{CopYCu}_2]$) se tiene de las ecuaciones de Σ (recordar que $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}]$, $x_9 = [\text{Cu}_{\text{ext}}^*]$) que:

$$\dot{\text{Cu}}_{\text{int,tot}} + \dot{\text{Cu}}_{\text{ext}} + \dot{\text{Cu}}_{\text{ext}}^* = 0, \quad (4.39)$$

lo que permite deducir la siguiente relación de conservación:

$$\text{Cu}_{\text{int,tot}}(t) + \text{Cu}_{\text{ext}}(t) + \text{Cu}_{\text{ext}}^*(t) = \mathcal{C}, \quad \forall t \geq 0, \quad (4.40)$$

en donde $\mathcal{C} = x_1(0) + x_2(0) + x_6(0) + 2x_7(0) + x_9(0)$. En particular, en el estado estacionario se tendrá $x_9 = \mathcal{C}$. Notar que si en la condición inicial no hay cobre en el medio intracelular, se tendrá $\mathcal{C} = \text{Cu}_{\text{ext}}(0)$.

Con esto último, se concluye que Σ tiene un único estado estacionario dado por

$$\bar{x} = (0, 0, \alpha, \alpha, \alpha, 0, 0, \frac{\beta}{\delta'}(\frac{1}{1 + \frac{\alpha^2}{K_d^2}}), \mathcal{C}), \quad (4.41)$$

donde α está dado por:

$$\alpha = -\frac{K_d^2}{3 \left(\frac{1}{6} \sqrt{\frac{4}{3} K_d^6 + \frac{9 S^2 \beta^2}{\delta^2 \delta'^2}} + \frac{S \beta}{2 \delta \delta'} \right)^{\frac{1}{3}}} + \left(\frac{1}{6} \sqrt{\frac{4}{3} K_d^6 + \frac{9 S^2 \beta^2}{\delta^2 \delta'^2}} + \frac{S \beta}{2 \delta \delta'} \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (4.42)$$

□

Observación. Es importante notar que el último resultado tiene una tremenda relevancia en términos de la descripción del fenómeno a estudiar. Esto último pues, se evidencia cuales son los parámetros estructurales del modelo que determinan las concentraciones de equilibrio. En este caso, aparecen 5 parámetros claves:

- S tasa de síntesis de proteínas
- δ tasa de degradación de proteínas.
- δ' tasa de degradación de mRNA.

- β tasa máxima de transcripción.
- K_d^2 tasa de interacción del represor CopY con el *binding-site*.

Desde el punto de vista biológico, estos parámetros coinciden con los parámetros estructurales que sería esperable determinaran las concentraciones de las variables de estado a largo plazo.

En este caso, a diferencia del modelo ΣPII , no es posible obtener información de forma directa a partir de la linealización del sistema en torno al único equilibrio.

Proposición 4.9 *El Jacobiano $Jf(x) = \frac{\partial f}{\partial x}(x)$ asociado al sistema Σ es singular en $x = \bar{x}$.*

DEMOSTRACIÓN. Calculando el Jacobiano del sistema, se obtiene:

$$Jf(x) = \begin{pmatrix} -\frac{Unx_1^{n-1}}{O+x_1^n} + \frac{Unx_1^{n-1}x_1^n}{(O+x_1^n)^2} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{Unx_1^{n-1}}{O+x_1^n} - \frac{Unx_1^{n-1}x_1^n}{(O+x_1^n)^2} & -A_1x_3 & -A_1x_2 & 0 & 0 & D_1+d & 2d & 0 & 0 \\ 0 & -A_1x_3 & -4D_2x_3x_7 - A_1x_2 - d & \frac{Kcx_6}{Km+x_6} & 2A_2x_6^2 & 4A_2x_5x_6 + D_1 + \frac{Kcx_4}{Km+x_6} - \frac{Kcx_4x_6}{(Km+x_6)^2} & -2D_2x_3^2 & S & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -d & 0 & 0 & 0 & 0 & S & 0 \\ 0 & 0 & 2D_2x_3x_7 & 0 & -A_2x_6^2 - d & -2A_2x_5x_6 & D_2x_3^2 & S & 0 \\ 0 & A_1x_3 & 4D_2x_3x_7 + A_1x_2 & -\frac{Kcx_6}{Km+x_6} & -2A_2x_6^2 & -4A_2x_5x_6 - D_1 - d - \frac{Kcx_4}{Km+x_6} + \frac{Kcx_4x_6}{(Km+x_6)^2} & 2D_2x_3^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -2D_2x_3x_7 & 0 & A_2x_6^2 & 2A_2x_5x_6 & -D_2x_3^2 - d & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -\frac{2bx_5}{Kd^2\left(\frac{x_2^2}{Kd^2}+1\right)^2} & 0 & 0 & -d_1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{Kcx_6}{Km+x_6} & 0 & \frac{Kcx_4}{Km+x_6} - \frac{Kcx_4x_6}{(Km+x_6)^2} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

Se observa que la última columna asociada a x_9 es nula y además, si $x_1 = 0$, la primera columna es nula de modo que $Jf(\bar{x})$ es singular. \square

Esto último hará necesario usar otros métodos para estudiar la estabilidad y atractividad del sistema con respecto al único equilibrio \bar{x} .

4.3.0.3. Comportamiento asintótico.

A continuación se hará un análisis del sistema que permitirá, usando únicamente (3.1), concluir propiedades asintóticas del sistema. Usando como inspiración las ideas planteadas en [43], se demostrará que las trayectorias de solución del sistema Σ están acotadas (en particular, en virtud de [26, Teorema 3.1] definidas en todo tiempo $t \geq 0$) y se demostrará la convergencia al único equilibrio dado por (4.41).

Proposición 4.10 *Las variables asociadas al cobre:*

$$\begin{cases} x_1 = [Cu_{ext}], \\ x_2 = [Cu_{int}], \\ x_6 = [CopZCu], \\ x_7 = [CopYCu_2], \\ x_9 = [Cu_{ext}^*], \end{cases}$$

están uniformemente acotadas para todo $t \geq 0$.

DEMOSTRACIÓN. De las ecuaciones se deduce fácilmente que:

$$\dot{x}_1 + \dot{x}_2 + \dot{x}_6 + 2\dot{x}_7 + \dot{x}_9 = 0, \quad (4.43)$$

esto implica que $\forall t \geq 0$:

$$\begin{aligned} x_1(t) + x_2(t) + x_6(t) + 2x_7(t) + x_9(t) &= \mathcal{C}, \\ \mathcal{C} &= x_1(0) + x_2(0) + x_6(0) + 2x_7(0) + x_9(0). \end{aligned} \quad (4.44)$$

En particular, como todas las variables son positivas, se obtiene que $\forall t \geq 0$:

- $x_1 = [\text{Cu}_{\text{ext}}] \leq \mathcal{C}$.
- $x_2 = [\text{Cu}_{\text{int}}] \leq \mathcal{C}$.
- $x_6 = [\text{CopZCu}] \leq \mathcal{C}$.
- $x_7 = [\text{CopYCu}_2] \leq \mathcal{C}$.
- $x_9 = [\text{Cu}_{\text{ext}}^*] \leq \mathcal{C}$.

□

Proposición 4.11 *Existen $M_i > 0$ con $i \in \{3, 4, 5, 8\}$, tal que:*

$$0 \leq x_i(t) \leq M_i, \quad \forall t \geq T. \quad (4.45)$$

En particular, $x(t)$ está definida para todo tiempo $t \geq 0$.

DEMOSTRACIÓN. Sea el sistema escalar:

$$\dot{z} = \beta - \delta' z. \quad (4.46)$$

Dada una condición inicial $x_0 \in (\mathbb{R}^+)^9$, sea $I = [0, T)$ el máximo intervalo de solución asociado a $x(t)$. Para la condición inicial $z(0) = x_8(0)$, por (3.1), como $x_8(t) \leq \dot{z}(t)$, $\forall t \in I$, pues $\frac{\beta}{1 + \frac{x_8(t)}{K_d^2}} \leq \beta$, $\forall t \in I$, se tendrá que:

$$\forall t \in I, \quad x_8(t) \leq \frac{\beta}{\delta'} + K_1 \exp(-\delta' t). \quad (4.47)$$

En particular, existe $M_8 > 0$ tal que:

$$\forall t \in I, \quad 0 \leq x_8(t) \leq M_8.$$

Nuevamente, si se define el sistema escalar:

$$\dot{z} = SM_8 - \delta z, \quad (4.48)$$

se tendrá lo siguiente:

$$\forall t \in I, \quad \dot{x}_i \leq \dot{z}, \quad \text{para } i \in \{3, 4, 5\}.$$

Por lo que tomando $z(0) = x_i(0)$, se obtiene

$$\forall t \in I, x_i(t) \leq \frac{SM_8}{\delta} + K_2 \exp(-\delta t). \quad (4.49)$$

Y así,

$$\forall t \in I, 0 \leq x_i(t) \leq M_i. \quad (4.50)$$

□

Observación. Notar que el hecho que las trayectorias sean acotadas, implica que: $x(t)$ está definida como solución para todo $t \geq 0$, es decir $I = [0, \infty)$ (ver [26, Teorema 3.1]).

Proposición 4.12 *Existe un instante $T > 0$ a partir del que, independiente de las condiciones iniciales, se cumple:*

$$0 < m_i \leq x_i(t) \leq M_i, \quad \forall t \geq 0, \quad (4.51)$$

para ciertos $m_i, M_i > 0$.

DEMOSTRACIÓN. Se tiene de (4.47) que dado $\varepsilon > 0$ existirá $T > 0$ tal que:

$$0 \leq x_8(t) \leq \frac{\beta}{\delta'} + \varepsilon = M_8, \quad \forall t \geq T. \quad (4.52)$$

Repetiendo el argumento usado para demostrar la proposición anterior, comparando cada variable x_i respecto al sistema (4.46) con condición inicial $z(T) = x_i(T)$, es posible derivar nuevamente (4.49), pero ahora para todo tiempo $t \geq T$. Notar que ahora M_8 no depende de la condición inicial. Usando ésto se deduce la existencia de $T_0 > T$ a partir del cual se cumple:

$$0 \leq x_i(t) \leq M_i, \quad \forall t \geq T_0, \quad i \in \{3, 4, 5\}, \quad (4.53)$$

en donde M_i no depende de las condiciones iniciales.

Por otro lado, al considerar el sistema:

$$\dot{y} = \frac{\beta}{1 + \frac{M_5}{K_d^2}} - \delta' y, \quad (4.54)$$

éste último satisface $\dot{y} \leq x_8$ en todo $t \geq T_0$. Tomando $y(T_0) = x_8(T_0)$ se tiene:

$$y(t) = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{M_5}{K_d^2}} + K_3 \exp(-\delta' t) \leq x_8(t), \quad \forall t \geq T_0. \quad (4.55)$$

En particular, existen $T_1 > 0$ y $m_8 > 0$, tales que:

$$0 < m_8 \leq x_8(t) \leq M_8, \quad \forall t \geq T_1. \quad (4.56)$$

Usando nuevamente el principio de comparación respecto a la solución del sistema:

$$\dot{y} = Sm_8 - \delta y,$$

se tiene que existe $T_2 \geq T_1$, tal que:

$$0 < m_4 \leq x_4(t) \leq M_4, \quad \forall t \geq T_2. \quad (4.57)$$

Por otro lado, considerando que x_2, x_6 son uniformemente acotadas y se cumple (4.56), se tiene que para $t \geq T_1$ las soluciones de:

$$\begin{cases} \dot{y}_3 = Sm_8 - (A_1C + \delta)y_3, \\ \dot{y}_5 = Sm_8 - (A_2C^2 + \delta)y_5, \end{cases}$$

con condición inicial $y_3(T_1) = x_3(T_1)$ y $y_5(T_1) = x_5(T_1)$ acotan inferiormente a x_3 y a x_5 respectivamente, pues para todo $t \geq T_1$ se satisface:

$$\begin{cases} \dot{y}_3 \leq \dot{x}_3, \\ \dot{y}_5 \leq \dot{x}_5. \end{cases}$$

Por esto último, al igual que antes, existen m_3, m_5 , y $T_3, T_4 \geq T_1$, tales que:

$$\begin{aligned} 0 < m_3 &\leq x_3, \quad \forall t \geq T_3, \\ 0 < m_5 &\leq x_5, \quad \forall t \geq T_4. \end{aligned} \quad (4.58)$$

Tomando $T = \max\{T_2, T_3, T_4\}$ se concluye. □

Proposición 4.13 $x_6(t) \rightarrow 0$, cuando $t \rightarrow \infty$.

DEMOSTRACIÓN. Por la proposición anterior, se sabe que:

$$x_9(t) = x_9(0) + \int_0^t \frac{k_c x_6(s) x_4(s)}{K_m + x_6(s)} \leq C, \quad \forall t \geq 0.$$

Como las variables de estado son siempre no negativas (asumiendo una condición inicial no negativa), lo último implica que el siguiente límite existe:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} x_9(t) = x_9(0) + \int_0^\infty \frac{k_c x_6(s) x_4(s)}{K_m + x_6(s)} \leq C, \quad \forall t \geq 0.$$

Se hace notar lo siguiente:

- La segunda derivada temporal de x_9 , es decir, \ddot{x}_9 es acotada. En efecto, si se define:

$$f(x, y) = \frac{k_c xy}{K_m + x}, \quad (4.59)$$

entonces:

$$\ddot{x}_9 = \frac{\partial f}{\partial x}(x_6(t), x_4(t))\dot{x}_6 + \frac{\partial f}{\partial y}(x_6(t), x_4(t))\dot{x}_4. \quad (4.60)$$

Se tiene que:

$$\begin{aligned}\frac{\partial f}{\partial x} &= \frac{k_c y}{(K_m + x)^2}, \\ \frac{\partial f}{\partial y} &= \frac{k_c x}{K_m + x}.\end{aligned}\tag{4.61}$$

Por otro lado,

$$\begin{aligned}\dot{x}_6 &= -2A_2x_5x_6^2 + A_1x_2x_3 - D_1x_6 - \delta x_6 - \frac{K_c x_4 x_6}{K_m + x_6}, \\ \dot{x}_4 &= Sx_8 - \delta x_4.\end{aligned}\tag{4.62}$$

Por las proposiciones 4.10 y 4.12, se sabe que las variables del sistema están acotadas. Luego, en función de las igualdades anteriores, \dot{x}_6 , \dot{x}_4 y las derivadas parciales de f están acotadas en las trayectorias asociadas a soluciones positivas del sistema. Finalmente, \ddot{x}_9 está igualmente acotada.

- Como \dot{x}_9 tiene derivada acotada y $x_9(t)$ es suave, se tiene que \dot{x}_9 es uniformemente continua.

Aplicando el Lema de Barbalat (ver [34, Lema 8.2]) sobre \dot{x}_9 , se debe tener que:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_c x_6(t) x_4(t)}{K_m + x_6(t)} = 0.$$

Como por la Proposición 4.12 existe $T > 0$ tal que $x_4(t) \geq m_4 > 0$, $\forall t \geq T$ entonces,

$$0 \leq \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_c x_6(t) m_4}{K_m + x_6(t)} \leq \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_c x_6(t) x_4(t)}{K_m + x_6(t)} = 0.\tag{4.63}$$

Sea $\varepsilon > 0$. Por lo anterior existe $T > 0$, tal que :

$$\forall t \geq T, \frac{k_c x_6(t) m_4}{K_m + x_6(t)} \leq \varepsilon \frac{m_4 k_c}{K_m + C}.\tag{4.64}$$

De aquí se deduce que:

$$x_6(t) \leq \varepsilon, \forall t \geq T.\tag{4.65}$$

Lo que concluye la demostración. \square

Proposición 4.14 $x_1(t), x_2(t), x_7(t) \rightarrow 0$, cuando $t \rightarrow \infty$.

1. $x_1 \rightarrow 0$ cuando $t \rightarrow \infty$. Es claro que $x_1(t) \leq C$, $\forall t \geq 0$, donde C es la cota encontrada en la Proposición (4.10). Como $x_1(t) \geq 0$, $\forall t \geq 0$ (dada una condición inicial positiva), se tiene que $\int_0^t \dot{x}_1(s) ds \leq C$, $\forall t \geq 0$. En particular, el límite de la integral existe y es finito. Se tiene además que, $\ddot{x}_1 = -\frac{\theta n \tau x_1^{n-1}}{(\theta^n + x_1^n)^2} \dot{x}_1$, es uniformemente acotada, lo que usando nuevamente el Lema de Barbalat nos dice que $\dot{x}_1(t)$ es uniformemente continua. Ésto asegura que $\dot{x}_1(t) \rightarrow 0$ cuando $t \rightarrow \infty$. De aquí, es directo ver que, dado $\varepsilon > 0$, existe $T > 0$, tal que:

$$\frac{\theta n \tau x_1^n}{\theta^n + x_1^n} \leq \frac{\varepsilon^n \theta n \tau}{\theta^n + C^n}, \forall t \geq T,\tag{4.66}$$

con lo que:

$$x_1(t) \leq \varepsilon, \forall t \geq T.\tag{4.67}$$

2. $x_7 \rightarrow 0$. Para probar este resultado, se hace notar que:

$$\dot{x}_7 = A_2 x_5 x_6^2 - \delta x_7,$$

Sea $\varepsilon > 0$, por lo anterior se tiene que existen $T > 0$ y $M > 0$ tales que $\forall t \geq T$:

$$\begin{cases} x_5(t) \leq M. \\ x_6(t) \leq \sqrt{\frac{\varepsilon}{\delta M A_2}}. \end{cases}$$

Luego, si se compara la solución de la ecuación

$$\dot{z} = \frac{\varepsilon}{\delta} - \delta z,$$

(para $z(T) = x_7(T)$) con x_7 se tendrá que:

$$x_7(t) \leq \varepsilon + K \exp(-\delta t), \forall t \geq T. \quad (4.68)$$

Lo que permite concluir que para cierto $T^* > 0$ se tiene que:

$$x_7(t) \leq \varepsilon, \quad \forall t \geq T^*. \quad (4.69)$$

3. El caso $x_2 \rightarrow 0$ es completamente análogo y se usa que x_3 está acotado inferiormente por m_3 y que x_7, x_6, x_1 convergen a 0 cuando $t \rightarrow \infty$.

Observación. En vista de la Proposición 4.14, $x_9 \rightarrow \mathcal{C}$ cuanto $t \rightarrow \infty$.

A continuación se usará de forma recursiva el argumento de comparación usado en la Proposición 4.51 para obtener cotas más finas en las variables asociadas a las proteínas sin cobre y al mRNA. Además, se mostrará que estas cotas satisfacen un cierto tipo de ecuación polinomial, lo que entrega una condición suficiente sobre los parámetros para la convergencia global de las soluciones positivas del sistema.

Teorema 4.15 *Para todo $\varepsilon > 0$, existe un instante de tiempo $T > 0$ y constantes $u, l > 0$ tales que*

$$\begin{aligned} \frac{\frac{\beta}{\delta l}}{1 + \frac{u^2}{K_d^2}} - \varepsilon &\leq x_8(t) \leq \frac{\frac{\beta}{\delta l}}{1 + \frac{l^2}{K_d^2}} + \varepsilon, & \forall t \geq T, \\ l - \varepsilon &\leq x_i(t) \leq u + \varepsilon, & \forall t \geq T, \quad i \in \{3, 4, 5\}. \end{aligned} \quad (4.70)$$

Más aún, se cumple que l, u satisfacen la ecuación :

$$(x^3 + K_d^2 x - K_d^2 r)(x^2 - r x + K_d^2) = 0. \quad (4.71)$$

DEMOSTRACIÓN. Para demostrar el teorema, se construirán secuencias $(U_i^n)_{n \geq 1}$ decreciente y $(L_i^n)_{n \geq 1}$ creciente para $i = 3, 4, 5, 8$, tales que a partir de cierto $T > 0$ se cumpla:

$$L_i^n \leq x_i(t) \leq U_i^n, \quad \forall t \geq T \quad (4.72)$$

Con ese objeto, se iterará el argumento usado en la Proposición 4.51. La idea es, en cada paso, refinar las cotas superiores e inferiores para cada variable.

1. Sea $\varepsilon_1 > 0$. Usando el principio de comparación con respecto al sistema:

$$\dot{z} = \beta - \delta' z, \quad (4.73)$$

$$z(0) = x_8(0), \quad (4.74)$$

existe $T_8^1 > 0$ tal que:

$$x_8(t) \leq \frac{\beta}{\delta'} + \varepsilon_1 = U_8^1, \quad \forall t \geq T. \quad (4.75)$$

Sean $\varepsilon_3^1 > \varepsilon_4^1 > \varepsilon_5^1$ con $\varepsilon_8^1 > \varepsilon_3^1$. Comparando x_3, x_4, x_5 con respecto al sistema

$$\begin{cases} \dot{z} = \beta - \delta' z, \\ z(T_8^1) = x_i(T_8^1), \end{cases} \quad (4.76)$$

donde $i \in \{3, 4, 5\}$, se tiene que existen $T_3^1, T_4^1, T_5^1 > 0$ que se pueden tomar de modo que $T_5^1 > T_4^1 > T_3^1$, tales que:

$$x_3(t) \leq \frac{S}{\delta} U_8^1 + \varepsilon_3^1 = U_3^1, \quad \forall t \geq T_3^1, \quad (4.77)$$

$$x_4(t) \leq \frac{S}{\delta} U_8^1 + \varepsilon_4^1 = U_4^1, \quad \forall t \geq T_4^1, \quad (4.78)$$

$$x_5(t) \leq \frac{S}{\delta} U_8^1 + \varepsilon_5^1 = U_5^1, \quad \forall t \geq T_5^1. \quad (4.79)$$

2. Análogamente al paso anterior, se elige $0 < \varepsilon_8^2 < \varepsilon_5^1$. Para este último existirá $T_8^2 > T_5^1 > 0$ tal que:

$$x_8(t) \geq \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(U_5^1)^2}{K_d^2}} - \varepsilon_8^2 = L_8^1, \quad \forall t \geq T_8^2. \quad (4.80)$$

Ahora, se ajustan las cotas inferiores para las variables x_3, x_4, x_5 . Sean $\varepsilon_3^2 > \varepsilon_4^2 > \varepsilon_5^2$ con $\varepsilon_8^2 > \varepsilon_3^2$. Usando el principio de comparación, existen $T_3^2, T_4^2, T_5^2 > 0$ (que se pueden tomar de modo que $T_5^2 > T_4^2 > T_3^2$), tales que:

$$x_3(t) \geq \frac{S}{\delta + A_1 \varepsilon_3^2} L_8^1 - \varepsilon_3^2 = L_3^1, \quad \forall t \geq T_3^2, \quad (4.81)$$

$$x_4(t) \geq \frac{S}{\delta} L_8^1 - \varepsilon_4^2 = L_4^1, \quad \forall t \geq T_4^2, \quad (4.82)$$

$$x_5(t) \geq \frac{S}{\delta + A_2 \varepsilon_5^2} L_8^1 - \varepsilon_5^2 = L_5^1, \quad \forall t \geq T_5^2. \quad (4.83)$$

En donde se usó que: $x_2, x_6 \rightarrow 0$, cuando $t \rightarrow \infty$ para acotar por debajo x_3 y x_5 , en particular, el hecho que a partir de cierto instante x_2 y x_6 quedan acotadas superiormente por $\varepsilon_3^2, \varepsilon_5^2$.

Iterando este argumento se construyen secuencias: $(U_i^n)_{n \geq 1}$, $(L_i^n)_{n \geq 1}$ y $(\varepsilon_i^n)_{n \geq 1}$. De ellas, $(\varepsilon_i^n)_{n \geq 1}$ decrece a 0 y las otras cumplen:

$$L_i^n \leq x_i(t) \leq U_i^n, \quad \forall t \geq T_i^{n+1}, \quad (4.84)$$

y en su conjunto satisfacen las relaciones:

$$\begin{cases} U_8^{n+1} = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(L_5^n)^2}{K_d^2}} + \varepsilon_8^{2n+1}, n \geq 1, U_8^1 = \frac{\beta}{\delta'} + \varepsilon_8^1, \\ L_8^n = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(U_5^n)^2}{K_d^2}} + \varepsilon_8^{2n}, n \geq 1. \end{cases} \quad (4.85)$$

$$\begin{cases} U_i^n = \frac{S}{\delta} U_8^n + \varepsilon_i^{2n-1}, i = 3, 4, 5, \\ L_3^n = \frac{S}{\delta + A_1 \varepsilon_3^{2n}} L_8^n - \varepsilon_3^{2n}, \\ L_4^n = \frac{S}{\delta} L_8^n + \varepsilon_4^{2n}, \\ L_5^n = \frac{S}{\delta + A_2 \varepsilon_5^{2n}} L_8^n - \varepsilon_5^{2n}. \end{cases} \quad (4.86)$$

Se verifica que $(U_i^n)_{n \geq 1}$ es decreciente y que $(L_i^n)_{n \geq 1}$ es creciente. Esto se puede ver de forma fácil por inducción. Si $n = 1$, entonces:

$$U_8^1 = \frac{\beta}{\delta'} + \varepsilon_8^1, \quad (4.87)$$

$$U_8^2 = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(L_5^1)^2}{K_d^2}} + \varepsilon_8^2. \quad (4.88)$$

Como los ε_i^n son decrecientes es directo que $U_8^1 \geq U_8^2$. Por otro lado, de esto último es claro que $U_i^1 \geq U_i^2$. Además, se hace notar que:

$$L_8^1 = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(U_5^1)^2}{K_d^2}} - \varepsilon_8^2, \quad (4.89)$$

$$L_8^2 = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(U_5^2)^2}{K_d^2}} - \varepsilon_8^4. \quad (4.90)$$

Como $U_5^1 \geq U_5^2$ y $\varepsilon_3^2 > \varepsilon_4^8$, entonces $L_8^1 \leq L_8^2$. Se asume el resultado cierto para $n \geq 1$, es decir:

$$\begin{aligned} U_i^{n+1} &\leq U_i^n, \\ L_i^n &\leq L_i^{n+1}. \end{aligned}$$

Se demostrará que:

$$\begin{aligned} U_i^{n+2} &\leq U_i^{n+1}, \\ L_i^{n+1} &\leq L_i^{n+2}. \end{aligned}$$

Observar que:

$$U_8^{n+2} = \frac{\frac{\beta}{\delta'}}{1 + \frac{(L_5^{n+1})^2}{K_d^2}} + \varepsilon_8^{2n+1}. \quad (4.91)$$

Como $\varepsilon_8^{2n+2} < \varepsilon_8^{2n+1}$ y $L_5^{n+1} \geq L_5^n$ (por hipótesis inductiva), entonces $U_8^{n+2} \leq U_8^{n+1}$. Con ésto, al igual que en el caso base, en virtud de (4.86), se concluye $U_i^{n+2} \leq U_i^n$, con lo que usando (4.85), se finaliza la inducción obteniendo $L_8^{n+1} \leq L_8^{n+2}$. Con esto último se tiene que $(U_i^n)_{n \geq 1}$, $(L_i^n)_{n \geq 1}$ son sucesiones monótonas y acotadas, luego existen constantes l_i, u_i , tales que $U_i^n \searrow u_i$, $L_i^n \nearrow l_i$ cuando $n \rightarrow \infty$. Usando (4.85) y (4.86) se concluye que estas satisfacen las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} u_5 &= \frac{S}{\delta} u_8, \\ l_5 &= \frac{S}{\delta} l_8, \\ u_5 &= \frac{\frac{S\beta}{\delta\delta'}}{1 + \frac{(l_5)^2}{K_d^2}}, \\ l_5 &= \frac{\frac{S\beta}{\delta\delta'}}{1 + \frac{(u_5)^2}{K_d^2}}, \\ u_3 &= u_4 = u_5, \\ l_3 &= l_4 = l_5. \end{aligned}$$

Despejando para l_5 o u_5 , se tiene que éstas variables son soluciones de la ecuación:

$$x = \frac{rK_d^2(K_d^2 + x^2)^2}{(K_d^2 + x^2)^2 + r^2K_d^4}, \quad (4.92)$$

donde $r = \frac{S\beta}{\delta'\delta}$. Desarrollando se obtiene:

$$(x^3 + K_d^2x - K_d^2r)(x^2 - rx + K_d^2) = 0, \quad (4.93)$$

que es justamente la ecuación (4.71).

Notar que el polinomio cúbico en (4.71) es justamente la ecuación de la que α en (4.41) es la única solución real y se vió anteriormente que $\alpha > 0$. Por otro lado, las otras soluciones posibles de (4.71) son de la forma $x = \frac{r \pm \sqrt{r^2 - 4K_d^4}}{2}$ que son positivas, cuando $\Delta = r^2 - 4K_d^4 \geq 0$. En cualquier caso, (4.71) siempre tiene soluciones positivas. Finalmente, usando (4.84) se concluye la demostración. □

Corolario 4.16 *Si $r \leq 2K_d^2$, entonces el equilibrio (4.41) es un atractor global para el sistema Σ . Es decir, toda solución positiva $x(t)$ de Σ converge a (4.41) cuando $t \rightarrow \infty$, independiente de la condición inicial $x(0) = x_0 \in (\mathbb{R}^+)^9$.*

DEMOSTRACIÓN. Para que el sistema converja al único equilibrio es necesario que u, l en el teorema anterior cumplan $u = l = \alpha$, donde α define (4.41). Una condición suficiente es que la única solución posible de (4.71) sea α . Para esto último basta pedir $\Delta = r^2 - 4K_d^4 < 0$, que equivale a pedir $r < 2K_d$. Por otro lado, si $\Delta = 0$, se tendrá que $r = 2K_d$. No es difícil ver que en este caso (4.71) se puede escribir como:

$$(x^2 + K_dx + 2K_d^2)(x - K_d)^3 = 0, \quad (4.94)$$

cuya única solución real es $x = K_d$. En este caso, en virtud del Teorema 4.15, el sistema converge a este valor que coincide con el valor del único equilibrio.

Con esta última observación, se da por concluida la demostración. □

Observación. Se puede apreciar numéricamente, como muestra la Figura 4.8, que cuando existen 3 soluciones reales distintas, el único equilibrio se mantiene siempre entre las otras dos soluciones. Se puede ver como también en el caso límite estas dos colapsan en el único estado estacionario del sistema Σ .

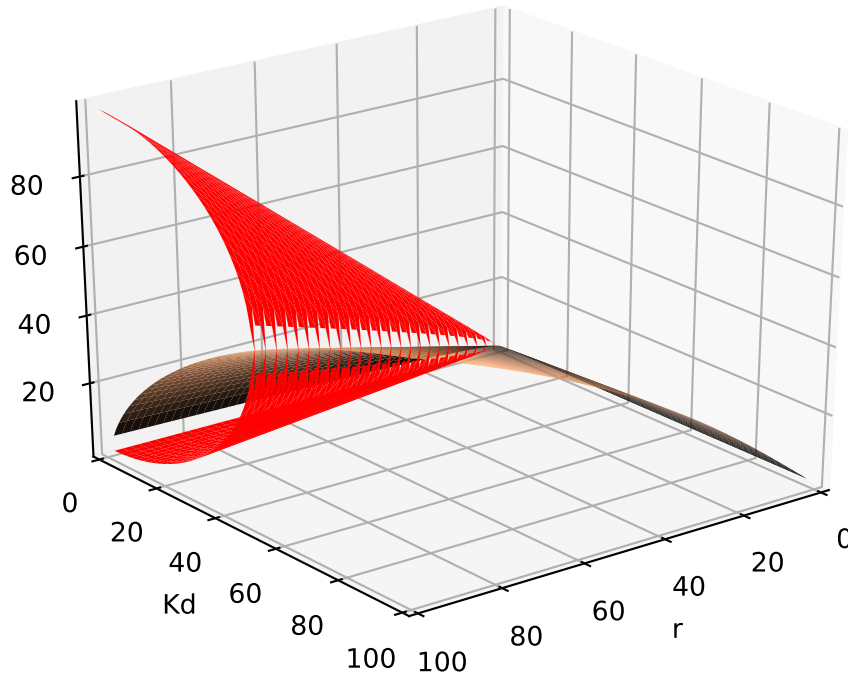


Figura 4.8: Soluciones de (4.71) para valores de $r = \frac{S\beta}{\delta\delta v}$ y K_d entre 0 y 100. En color gris se ve la solución asociada al único equilibrio (4.41) y en rojo las otras dos soluciones. Se ve como éstas están siempre por debajo y por sobre del estado estacionario.

Los últimos resultados expuestos en esta sección constituyen un avance para el estudio del comportamiento cualitativo de los sistemas homeostáticos. En primera instancia, dan cuenta de la homeostasis en el sentido que se viene discutiendo en los capítulos anteriores de este trabajo: el sistema a largo plazo, es capaz de mantener las concentraciones de las variables de estados entre un rango mínimo y máximo.

Por otra parte, significa un aporte respecto a otros trabajos como es el caso de [49], donde se estudia un modelo del operón *cop* de *E. hirae*, en el sentido que se dan condiciones sobre los parámetros del modelo para la convergencia a un único estado estacionario. Además, también constituye un aporte el hecho de basarse en técnicas que han servido para el estudio de otros modelos de sistemas homeostáticos como [43], pues evidencia la existencia de propiedades comunes a una estructura general de modelo homeostático. En este sentido, estos últimos resultados sirven como un primer paso hacia describir la homeostasis en modelos más generales.

Capítulo 5

Simulaciones.

5.1. Introducción.

El presente capítulo tiene por objetivo el análisis numérico de los modelos planteados en las secciones anteriores. En particular, se quiere estudiar numéricamente el alcance de los resultados teóricos obtenidos en los capítulos anteriores. Tal como se ha mencionado a lo largo de este documento, uno de las principales aspectos que se busca evaluar es la capacidad predictiva que tiene el modelo propuesto. Junto con esto, se quiere evaluar en un contexto más real, los resultados de convergencia y las condiciones suficientes recogidas en 4.15 y 4.6. A partir de las simulaciones numéricas de los modelos planteados, se observan elementos clave del sistema que no son medibles experimentalmente, además de estimar las escalas de tiempo en que ocurren las respuestas del sistema que se describen a partir de estos últimos. Esta información es clave en el estudio de una dinámica consistente con un comportamiento homeostático del sistema en alguno de los sentidos mencionados en los capítulos anteriores.

En concordancia con estos objetivos, este capítulo se divide en dos subsecciones: una dedicada al análisis de las propiedades de convergencia y al comportamiento general del modelo polinomial Σ_{PII} y otro al modelo Σ . La primera subsección a su vez está dividida en dos: a) una evaluación numérica del Teorema 4.6 y b) experimentos numéricos relacionados con teoría de perturbaciones (teoremas 3.45 y 3.44). Como este análisis está centrado principalmente en lo cualitativo, las unidades de los parámetros y de las concentraciones en las simulaciones son arbitrarias. Por otro lado, la sección dedicada a experimentos numéricos usando el modelo Σ se subdivide en: a) simulaciones que usan parámetros de la literatura en las que se utilizarán como referencia, datos experimentales obtenidos en [39] y b) un análisis asintótico de estas simulaciones, buscando evaluar las hipótesis del Teorema 4.15. A diferencia de la sección dedicada al modelo polinomial, todas las unidades de los parámetros y concentraciones en las simulaciones están especificadas.

Por último, todas las simulaciones se realizaron usando el método *ode23s* del paquete de resolución de ecuaciones diferenciales ordinarias de MATLAB. Para la realización de los gráficos de las simulaciones del modelo Σ se usó el paquete *seaborn* de Python.

5.2. Simulaciones modelo ΣP .

5.2.1. Estudio asintótico del modelo.

A continuación se analiza el resultado de simulaciones numéricas para distintos valores de parámetros, buscando estudiar numericamente el comportamiento del sistema respecto de la hipótesis requerida por el Teorema 4.6, para dar una estimación de la región atractora del único equilibrio asintóticamente estable que se ha encontrado para el sistema ΣPII . Se recuerda que este último está dado por:

$$\bar{x} = \left(0, 0, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, \frac{Sk_0}{\delta(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}, 0, 0, \frac{k_0}{(k_2\frac{S}{\delta} + \delta')}\right). \quad (5.1)$$

La hipótesis del Teorema 4.6 consiste en que los parámetros del modelo cumplan la relación: $\delta \geq S$ y $\delta' \geq k_2$. Se observa en las figuras 5.1, 5.2 y 5.3 que, si bien puede fallar la estimación de la región de invarianza cuando los parámetros no cumplen las hipótesis del Teorema 4.6, existe convergencia al único equilibrio del sistema contenido en la región invariante. Esto sugiere que Q_ε , es decir, la estimación de la región atractora que da el Teorema 4.6, resulta ser una sub estimación de la región de atracción asociada a \bar{x} .

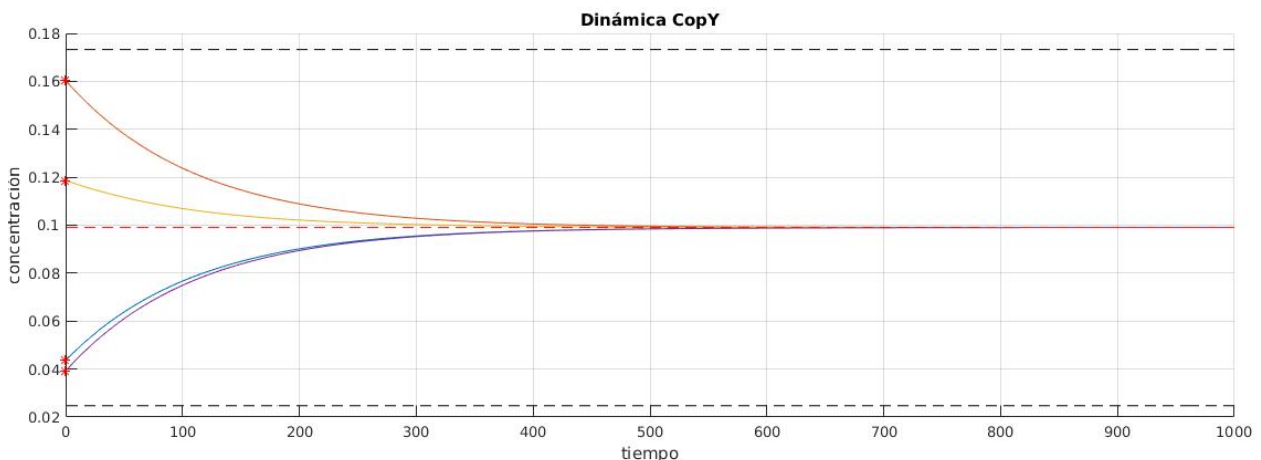


Figura 5.1: Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que satisfacen las condiciones del Teorema 4.6. Se muestra sólo esta dinámica porque las dinámicas del resto de las proteínas se comportan igual. En línea punteada negra se va la región Q_ε y se marcan con asteriscos rojos las distintas condiciones iniciales. Se observa cómo las trayectorias convergen al equilibrio \bar{x} representado con la línea punteada roja.

Por otro lado, se puede observar que hay una directa relación entre las hipótesis del Teorema 4.6 y el comportamiento oscilatorio de las trayectorias. En la Figura 5.2, en donde se tiene el caso límite en que $\delta = S$, $\delta' = k_2$, se observa una leve oscilación de las trayectorias.

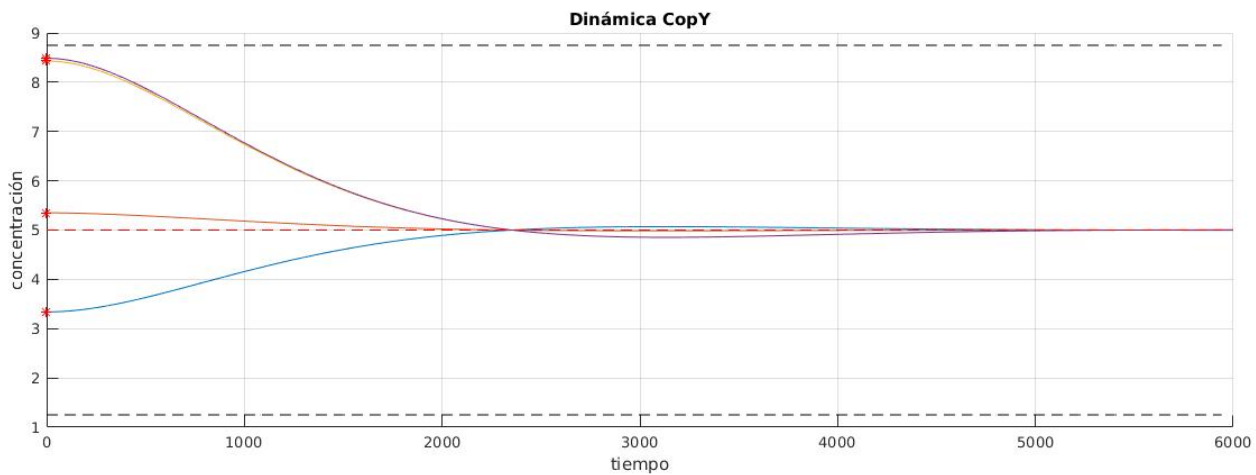


Figura 5.2: Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que satisfacen las condiciones del Teorema 4.6 con igualdad. Se observa cómo las trayectorias comienzan a oscilar, pero la región Q_ε sigue siendo invariante. Se mantiene la convergencia de las trayectorias al único equilibrio.

Finalmente en la Figura 5.3, se aprecia cómo las oscilaciones de las trayectorias que parten cerca del borde de la región Q_ε se escapan de esta, pero igualmente convergen al equilibrio.

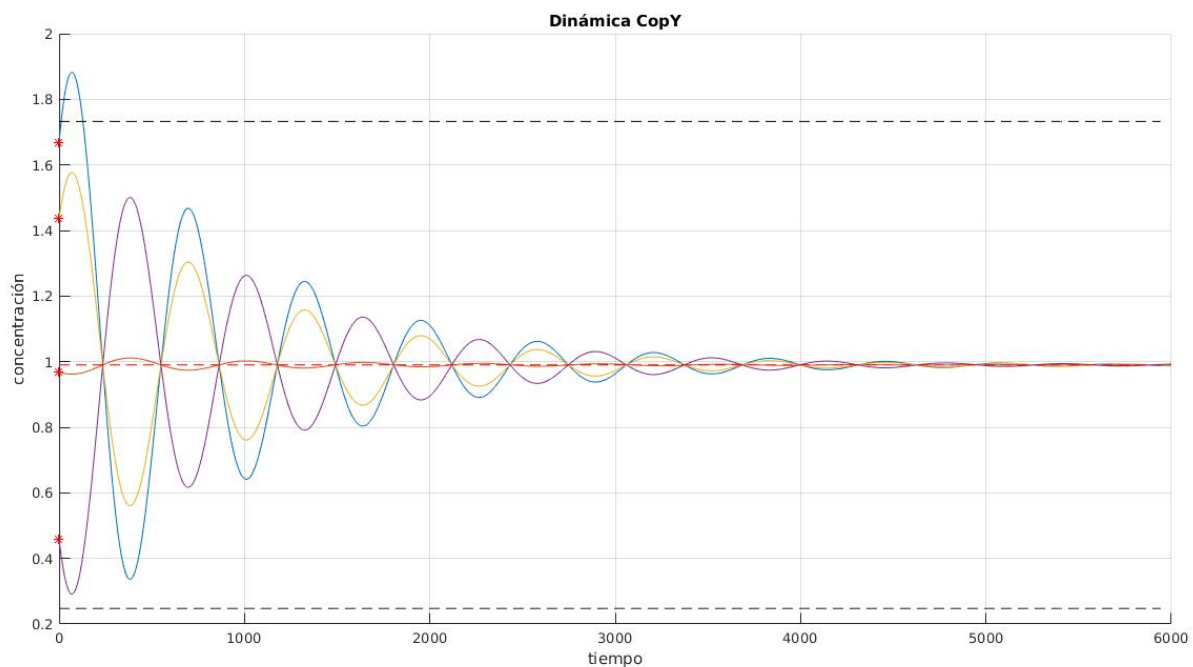


Figura 5.3: Dinámica de CopY para distintas condiciones iniciales y con parámetros que no satisfacen las condiciones del Teorema 4.6 . Se observa cómo las trayectorias oscilan y las que tienen condiciones iniciales cerca del borde se salen de la región invariante. Se mantiene la convergencia de las trayectorias al único equilibrio.

Por último, se observa que los tiempos de convergencia son menores en el caso de la Figura 5.1 que en el resto de los casos. La aparición de un comportamiento oscilatorio en el caso de la Figura 5.3, puede interpretarse como el resultado de un proceso de adaptación de la célula en donde la tasa basal de síntesis y la tasa de transcripción asociada a la regulación de CopY sobre el *binding site*, son mayores que la degradación y permiten que exista un proceso de ajuste hasta alcanzar el equilibrio.

5.2.2. Fuente de cobre y perturbaciones.

En esta sección, se realizan experimentos numéricos para distintos tipos de perturbaciones. El objetivo principal es observar la dinámica del sistema en presencia de una fuente de cobre, valiéndose del marco teórico en teoría de perturbaciones expuesto en los capítulos anteriores (ver sección 3.5). Se considera el sistema ΣPII como nominal, el que consiste en un sistema de EDO con un lado derecho polinomial y sin reciclaje de cobre, es decir, el cobre que es expulsado del sistema no puede volver a ingresar. Este modelo está dado por las ecuaciones (2.25). Para representar una fuente de cobre, se escoge una perturbación de la forma:

$$g(t, x, \varepsilon) = (\varepsilon\sigma(t), 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0)^T.$$

Es decir, se suma a la ecuación del cobre externo, un término dependiente del tiempo, representando la tasa a la que se le suministra cobre al sistema. Se escinde esta sección en dos: una dedicada al estudio de fuentes de cobre constantes y la otra destinada a fuentes periódicas.

5.2.2.1. Fuentes periódicas.

Para los experimentos de esta sección se considerará una fuente de cobre de la forma:

$$\sigma(t) = (1 + \sin(\omega t)).$$

Se fija $\omega = 10^{-3}$ y se toma de forma arbitraria el mismo valor para todos los parámetros del sistema. El objetivo de esto es estudiar la dinámica del modelo con distintos valores de ε . Según el Teorema 3.45, se espera que si la perturbación es pequeña, entonces existirá una única solución periódica exponencialmente estable. Las figuras 5.4 a 5.7 muestran el comportamiento del sistema para distintos valores de ε . Las condiciones iniciales fueron tomadas, sumando una perturbación del 50% del valor del equilibrio del sistema nominal en las coordenadas no nulas de éste último. Se constata que, a medida que el valor de ε aumenta, se induce una única trayectoria periódica aislada.

En la Figura 5.4, se observa que existe una variación mínima en los valores de las curvas que definen la dinámica de los distintos componentes con respecto al sistema nominal. La baja concentración de cobre que es añadido al sistema comienza a circular al interior de la célula para luego abandonar el sistema. Esto se evidencia en la dinámica de CopZCu y CopYCu₂.

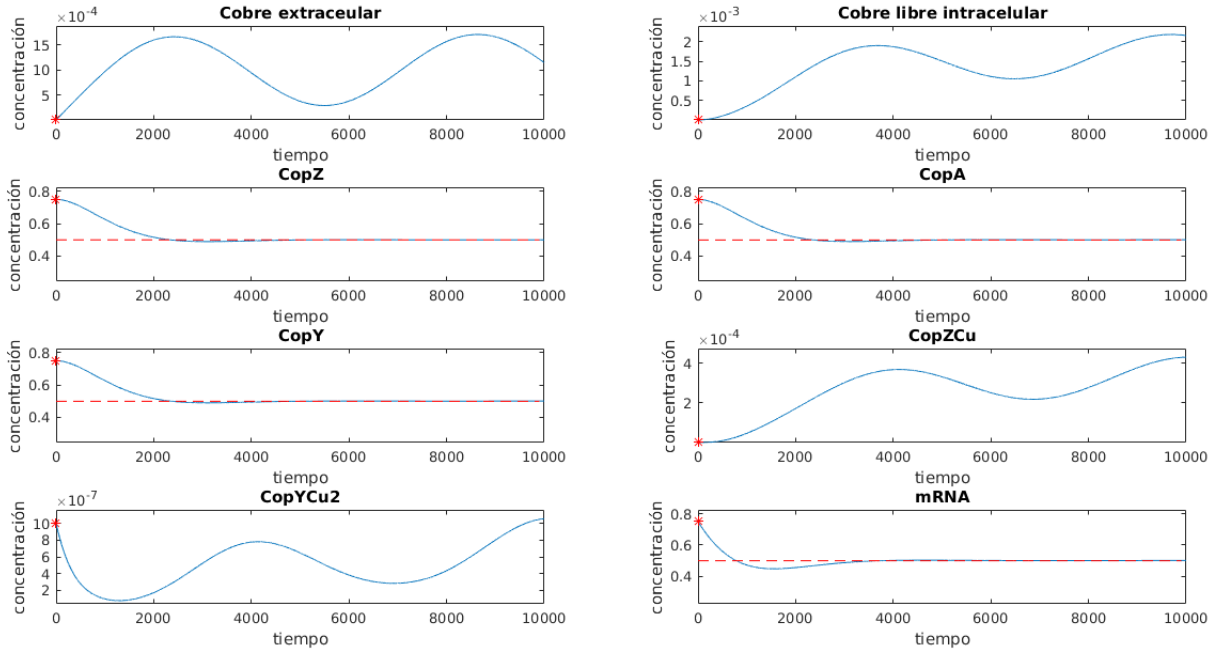


Figura 5.4: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-6}$. Se observa que existe una variación mínima en los valores de las curvas que definen la dinámica de los distintos componentes con respecto al sistema nominal.

Por otra parte, en la Figura 5.5, se asiste a un comportamiento similar al de la figura anterior. El cobre circula por el interior de la célula y sale del sistema. Sin embargo, se aprecia una única trayectoria periódica en todas las variables, cercana al equilibrio del sistema nominal. Esto último puede interpretarse como que la fuente de cobre suministra este metal en una concentración que empieza a inducir una respuesta del sistema, aumentando la concentración de las distintas proteínas codificadas por el operón.

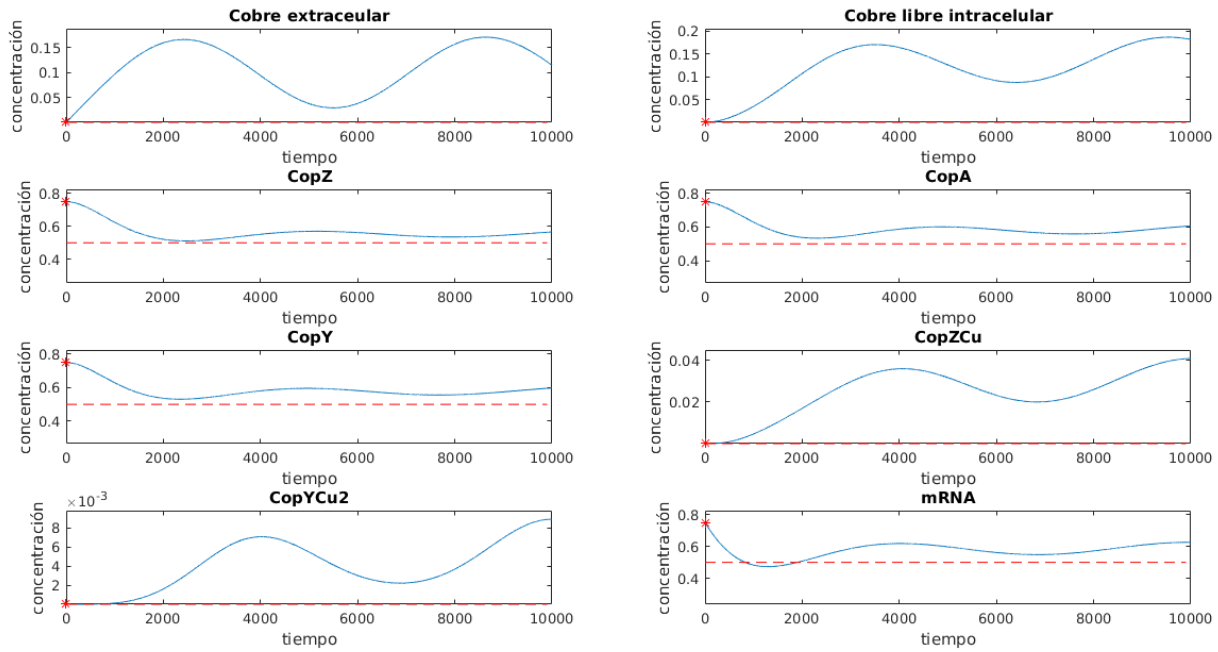


Figura 5.5: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-4}$. Se asiste a un comportamiento similar al de la figura anterior. Sin embargo, se aprecia una única trayectoria periódica, cercana al equilibrio del sistema nominal.

En ese mismo sentido, en la Figura 5.6 y en la Figura 5.7, en las que se aumenta la tasa de suministro de cobre dada por la magnitud de la perturbación, se constata cómo la trayectoria de los distintos componentes del sistema, se alejan del valor de equilibrio del sistema nominal a medida que el cobre ingresa.

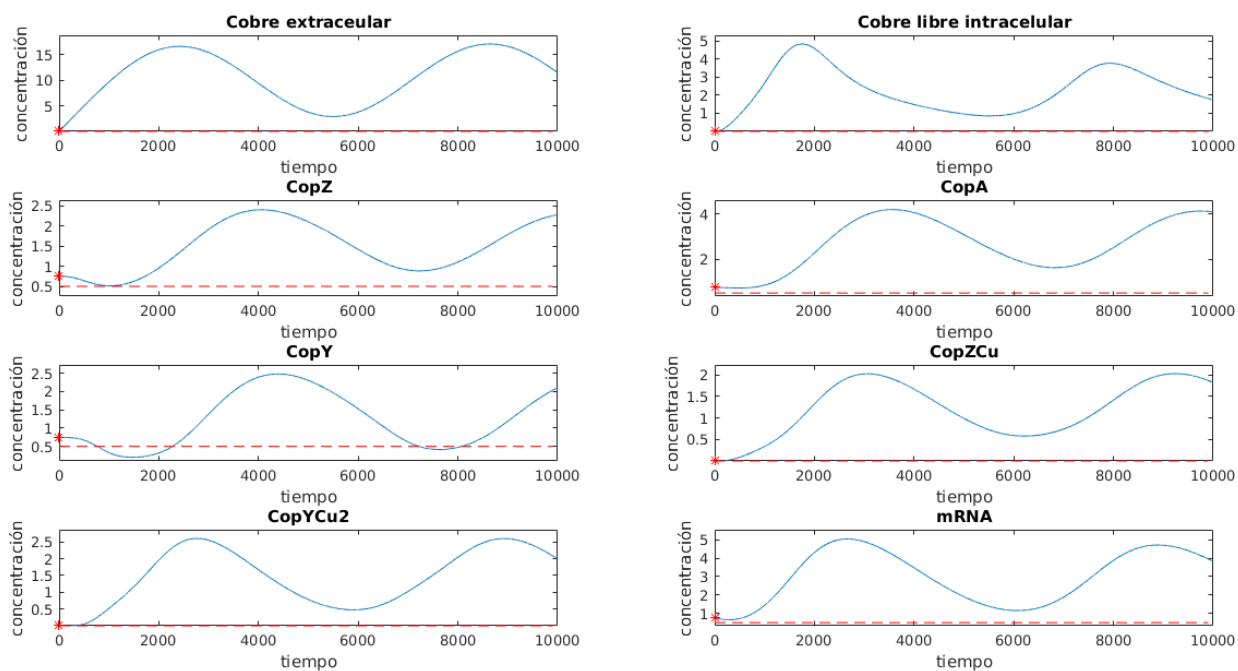


Figura 5.6: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-2}$. Se observa cómo, coherente con un aumento de orden en la perturbación, las órbitas se distancian del equilibrio del sistema nominal en mayor medida que en los casos anteriores. Al igual que en los otros casos, existe solo una trayectoria periódica aislada.

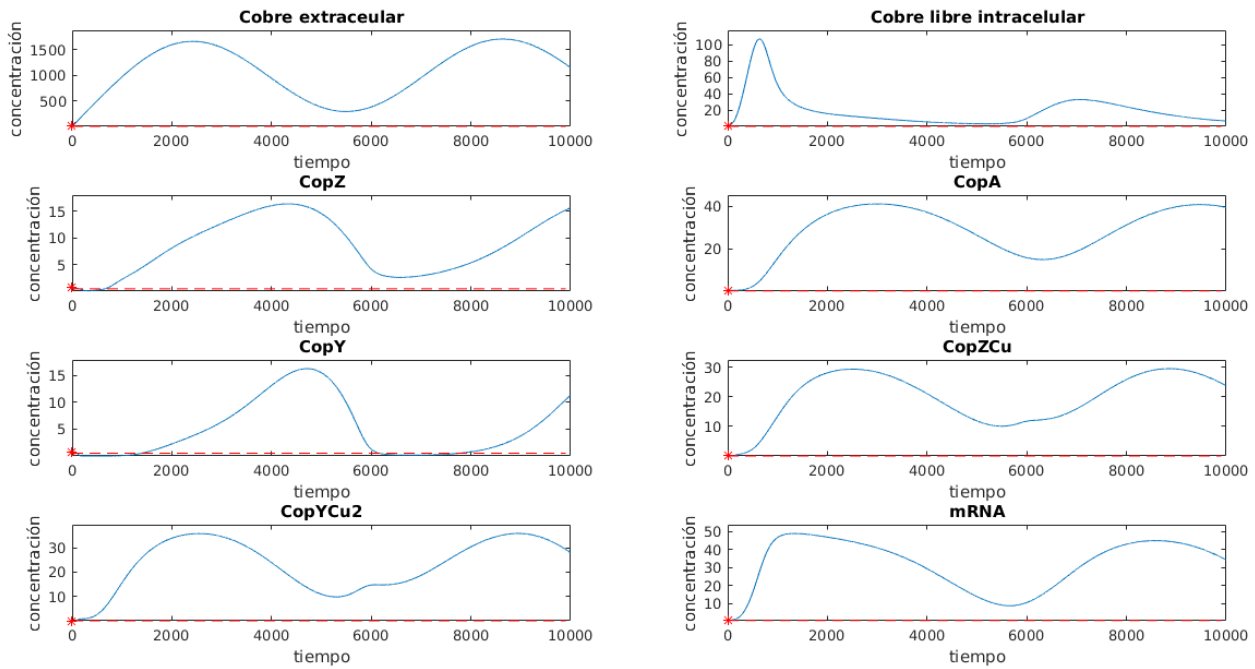


Figura 5.7: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 1$. Al igual que en los casos anteriores existe una única solución periódica aislada.

En general, se observa que la variación máxima entre los puntos de la trayectoria periódica y el equilibrio del sistema nominal es proporcional a la magnitud de la perturbación, evidenciándose este comportamiento principalmente para valores grandes de ε . En particular, se puede ver que es aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que esta última.

Adicionalmente, existe un acoplamiento desplazado con respecto al periodo de la señal. Si se interpreta cada máximo de la señal periódica como la adición de un pulso de cobre al sistema, este desfase puede explicarse como un tiempo de retraso en la respuesta del sistema frente a este pulso. Esto se evidencia, en general, en las figuras anteriores comparando la dinámica del cobre externo, con la del mRNA.

Por otro lado, además de la unicidad de la solución periódica cercana al equilibrio, el Teorema establece la estabilidad de ésta última. En la Figura 5.8, se observa como soluciones cercanas convergen a la solución periódica que se ve en la Figura 5.5, donde se aprecia la dinámica de [mRNA].

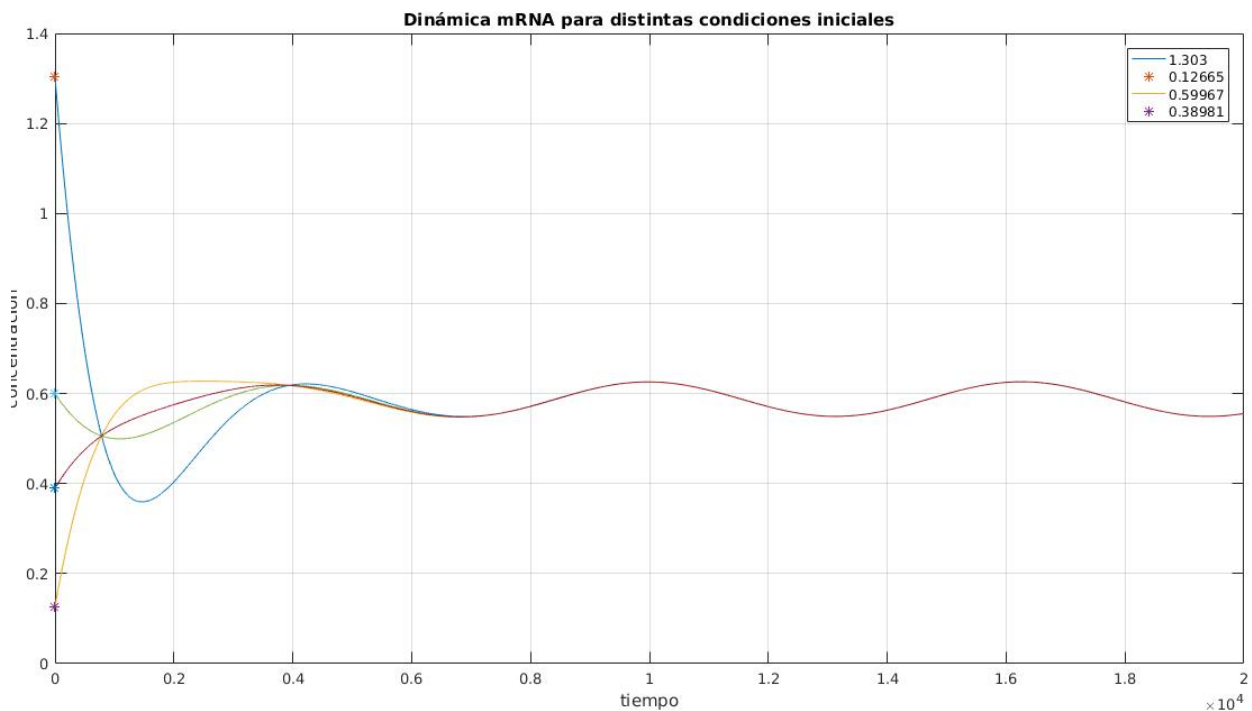


Figura 5.8: Dinámica de [mRNA] para $\varepsilon = 10^{-4}$. Se observa como las soluciones que parten cercanas al equilibrio del sistema nominal convergen a una única trayectoria periódica.

Estas últimas observaciones son de vital importancia. El comportamiento reflejado por el modelo frente a distintas fuentes periódicas de cobre evidencian la existencia de un equilibrio, dado en forma de una trayectoria periódica, es decir, el sistema mantiene las concentraciones de cobre entre un mínimo y un máximo, lo que describe un comportamiento homeostático en el sentido definido en los capítulos anteriores. Como se verá a continuación, esto será consistente con el comportamiento descrito por el sistema en presencia de una fuente que suministra cobre al sistema a una tasa constante. Sin embargo, en este caso, será posible deducir la existencia de un estado estacionario en lugar de una órbita periódica en concordancia con el tipo de fuente de cobre al que el sistema ha sido expuesto.

5.2.2.2. Perturbaciones constantes.

En esta sección se considera $\sigma(t) \equiv s$ y para los experimentos numéricos se repite la metodología de la sección anterior, es decir: a) todos los parámetros fijos en el mismo valor anterior y b) la variación de las trayectorias del sistema en función de la magnitud de la perturbación. Además, se toman los mismos valores para las condiciones iniciales. En este caso, según el Teorema 3.44, las soluciones que parten de condiciones iniciales cercanas al punto de equilibrio del sistema nominal, debiesen, eventualmente, permanecer cerca de éste último a medida que $t \rightarrow \infty$.

En la Figura 5.9, se aprecia una leve variación con respecto a los valores de equilibrio de las variables del sistema. Al igual que en el caso periódico, esto evidencia el tránsito del cobre a través del medio extracelular, pasando por el interior de la célula y volviendo a salir del sistema. No obstante, la abundancia de cobre es tan baja, que el sistema se mantiene prácticamente en estado estacionario.

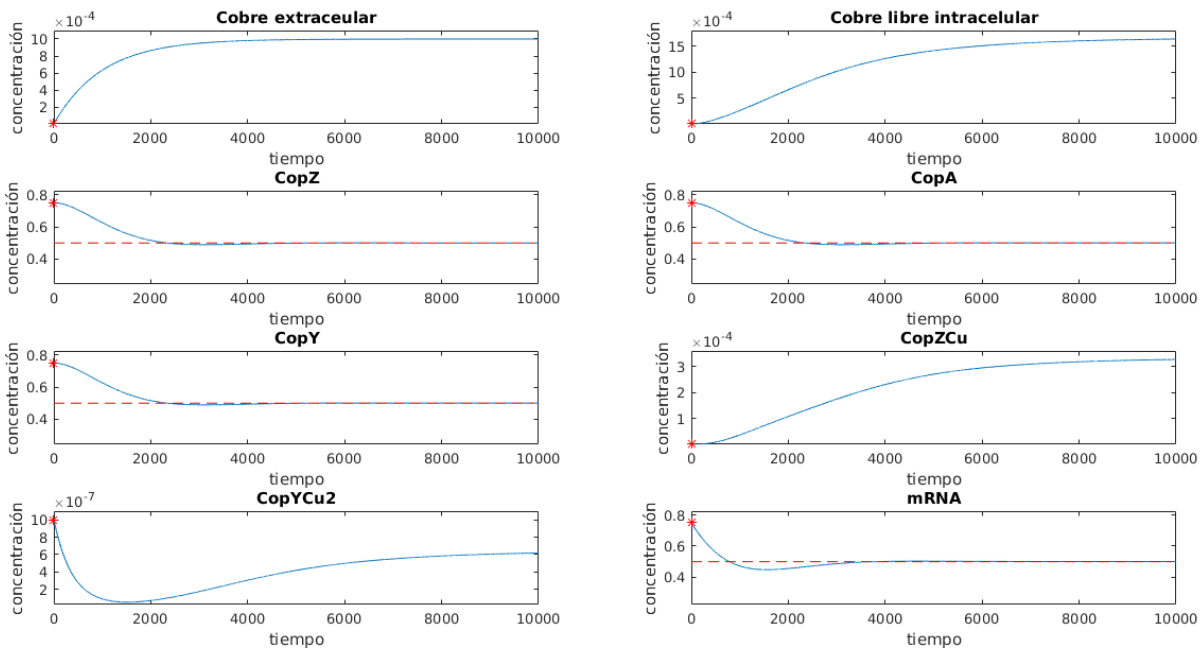


Figura 5.9: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-6}$. Al igual que en el caso periódico, la variación, respecto al equilibrio del sistema nominal, es casi nula.

Por otra parte, en la Figura 5.11, se observa una respuesta por parte del sistema, que consiste en un aumento de la concentración de transcrito por sobre la concentración basal determinada a partir del equilibrio encontrado para el sistema ΣPII . En la misma figura, se observa que la concentración de cobre extracelular se mantiene constante a partir de $t = 4000$. Esto último, sumado a la estabilización en las concentraciones de los otros elementos del sistema, sugiere la inducción de un equilibrio en el sistema que se encuentra desplazado con respecto al estado estacionario original. Notar que este desplazamiento es proporcional a ε , que representa en este caso la tasa con la que se suministra cobre al sistema.

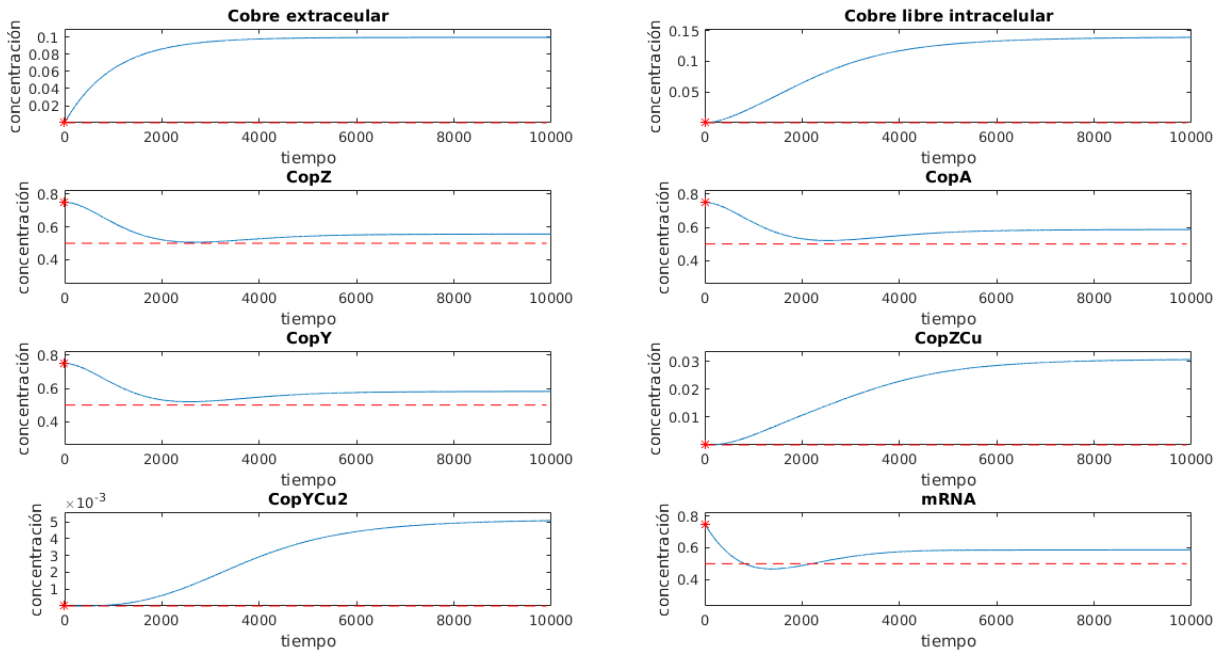


Figura 5.10: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-4}$. Se observa que la perturbación induce un nuevo equilibrio a distancia proporcional a la magnitud de la perturbación.

Un comportamiento similar se observa en las figuras 5.11 y 5.12.

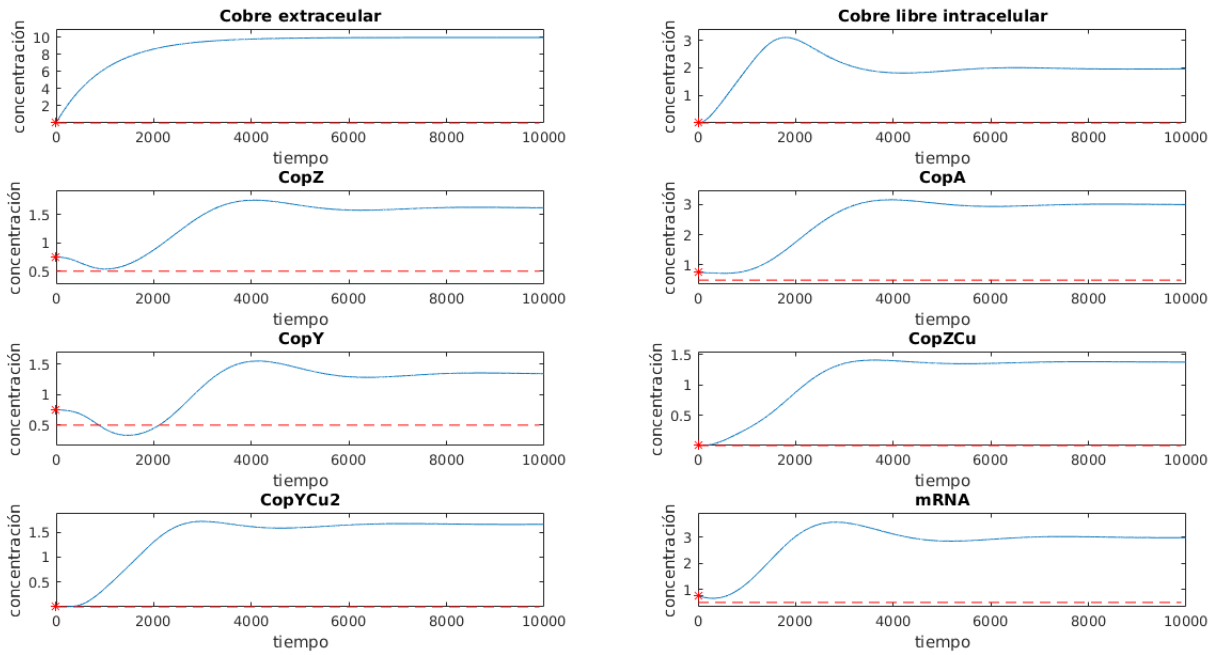


Figura 5.11: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 10^{-2}$.

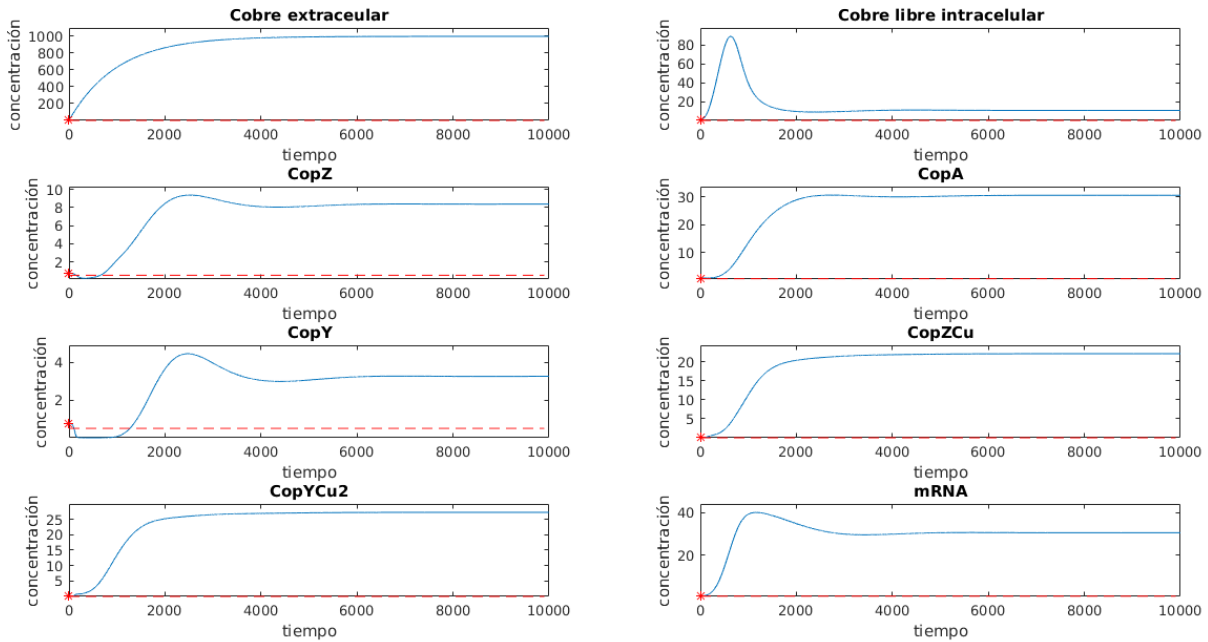


Figura 5.12: Dinámica del sistema para $\varepsilon = 1$.

En general, en las figuras 5.9 a 5.12, se aprecia que la perturbación induce un nuevo equilibrio en el sistema. Este último se mantiene a una distancia que depende de la magnitud de la perturbación (a lo más dos ordenes de magnitud en algunas variables), es decir, depende de la tasa con que se suministra cobre al sistema. Esta observación es importante, desde el punto de vista que, en todas las figuras en general, cuando se añade una fuente de cobre y por tanto, se elimina la variable del reciclaje del cobre en el modelo, siempre se evidencia el establecimiento de un equilibrio o estado estacionario. Esto quiere decir que, en una situación más realista, en donde el cobre no se agota, el sistema es capaz de mantener las concentraciones de cobre en un nivel fijo. Más aún, existe cierta robustez del modelo, en el sentido que, este equilibrio se aleja, en forma consistente con la magnitud de la perturbación, del equilibrio del sistema ΣPII encontrado de forma analítica. Esto entrega una intuición fundamental, en el cálculo y determinación de un equilibrio en el modelo ΣS en el que se mantiene una cierta abundancia de cobre a lo largo del tiempo (existe reciclaje) que constituye un aporte en el desafío de caracterizar este equilibrio de forma analítica.

5.3. Simulaciones modelo Σ .

5.3.1. Experimentos numéricos.

La presente sección realizará un estudio numérico de las soluciones del sistema Σ , es decir, aquel en el que se han considerado funciones de regulación en el modelamiento además de la ley de acción de masa (ver Sección 2.2.3.3). Usando los datos existentes en la literatura, se busca explorar las capacidades predictivas del modelo, contrastadas con datos reales obtenidos en [39].

Una vez correlacionado los resultados de las simulaciones del modelo con un escenario real, se busca explotar las potencialidades del este último en dos sentidos: a) el estudio de los alcances de la convergencia del modelo a un único estado estacionario y b) la capacidad informativa que tiene el modelo para dar cuenta de elementos del sistema que no son posibles de cuantificar experimentalmente. En este sentido, las simulaciones planteadas a continuación buscan contestar tres preguntas fundamentales: 1) ¿cómo varía la respuesta del sistema con respecto a la situación experimental frente a una intensificación del estímulo aplicado?; 2) ¿depende la respuesta del modelo de su estado previo a la aplicación del estímulo? y 3) ¿retorna el sistema al estado estacionario inicial?, ¿cómo y en cuánto tiempo se lleva a cabo esta convergencia?.

La sección siguiente estará organizada de la siguiente forma: en primer lugar se definirá el diseño de los experimentos numéricos efectuados y luego, cada uno de estos experimentos tendrá un apartado en donde se discutirán los principales resultados y conclusiones obtenidos a partir de éstos.

5.3.1.1. Diseño de las simulaciones.

Se realizan los siguientes experimentos numéricos:

1. Pulso 0,5 mM por 3 hrs.
2. Pulso 1 mM por 3 hrs.
3. Pulso 0,5 mM por 6 hrs.
4. Tren de 3 pulsos de 0,5 mM, cada una hora por 3 hrs.

El punto 1 de la lista anterior corresponde a la validación del modelo respecto de las condiciones experimentales expuestas en [39]. En el desarrollo de todas las simulaciones siguientes, se utilizará el set de parámetros descrito en la tabla 5.1:

Parámetro	Valor-Rango.		Referencia
Tasa de producción de proteínas por mRNA (1/min).	6.7	6.7	[25]
Tasa de degradación de proteínas (1/min).	8.33E-04	3.33E-03	[33]
Tasa de asociación CopY-CopZCu.(1/uM ² × min)	1.00E-01	1.00E-01	
Tasa de asociación CopZ-Cu (1/uM × min).	6	60	[15]
Tasa de disociación CopZCu-Cu.(1/min).	6.00E-01	6.00E+00	[15]
Tasa máxima de entrada cobre (uM/min).	1.17E-01	2.20E-01	[30]
Constante de Michaelis-Menten entrada (uM).	4.10E-02	1.29E+00	[30]
Constante catalítica CopA (1/min).	1E-03	1E+00	
Constante de Michaelis-Menten salida (uM).	6.50E+00	1.03E+01	[54]
Tasa de transcripción basal (uM/min).	6.23E-06	6.23E-02	[37]
Tasa de degradación de mRNA (1/min).	1.00E-01	1.00E+02	[66]
Coefficiente de represión. (uM).	1.70E-04	1.70E-04	[51]

Tabla 5.1: Parámetros usados en los experimentos numéricos.

Los valores presentados en la tabla que muestran referencias dan cuenta de valores experimentales concretos y validados. En particular, los parámetros a los que no se les ha asignado una referencia, a la fecha no fue posible encontrar literatura asociada para poder asignar un valor estricto, por lo tanto basado en rangos propuestos en diversos modelos bacterianos se estimaron de forma arbitraria con el objetivo de buscar que el resultado de las simulaciones esté lo más cercano posible a los valores experimentales de contenidos de cobre y proteínas.

5.3.1.2. Pulso 0,5 mM por 3 hrs.

La primera parte de la presente sección, tiene como objetivo la validación de las simulaciones anteriores mediante la comparación con los datos obtenidos a través de experimentos in vivo en la bacteria [39]. El ensayo consistió en el tratamiento de la célula en un medio con una concentración de 0,5 mM de CuSO_4 emulando exactamente las condiciones experimentales previas. Se midió la abundancia de cobre y la cantidad de transcrito correspondiente a cada gen del operón *cop* en distintos tiempos (0, 15, 45, 90 y 135 minutos posteriores a la adición del pulso de cobre), con el objetivo de estudiar los incrementos en las concentraciones de cobre con respecto a cada uno de los tiempos de medición. En la Figura 5.13, se encuentran contrastados los incrementos porcentuales en las concentraciones de cobre para los distintos tiempos de medición entre los datos declarados experimentales y las simulaciones.

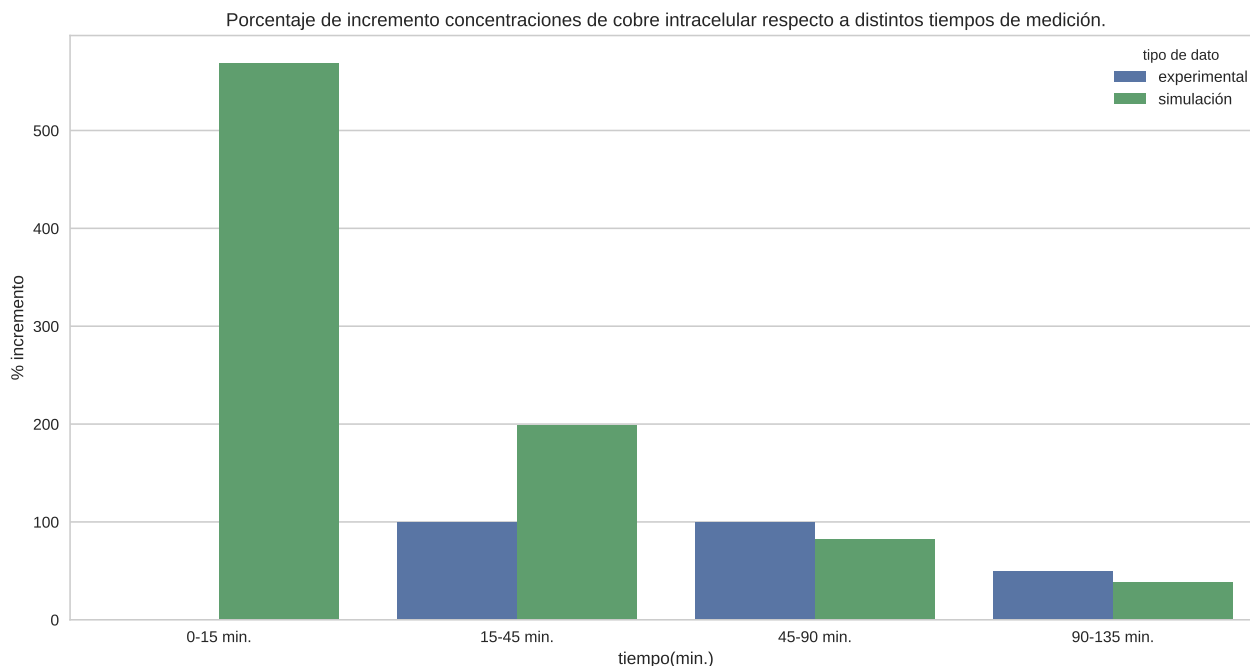


Figura 5.13: Incrementos porcentuales de las concentraciones de cobre intracelular experimentales y simuladas a partir del modelo Σ en distintos tiempos: 0, 15, 45, 90 y 135 min después de aplicado 0.5 mM de cobre.

A partir de la Figura 5.13, se pueden inferir dos conclusiones: a) existe una tendencia a la disminución en el incremento de la concentración intracelular de cobre, tanto en el caso experimental como en el caso de las simulaciones del modelo Σ y b) los incrementos porcentuales en la concentración de cobre intracelular, tanto en el caso simulado como en el caso experimental están en los mismos rangos a partir de los 15 minutos de aplicado el pulso de 0,5 mM de cobre.

En particular, en los instantes inmediatos a la adición del pulso (en el rango de tiempo 0-15 min), donde hay una diferencia de incremento por sobre el 500 % entre la simulación y el dato experimental, se explica dado que al momento de aplicar el pulso de cobre, dentro del modelo existe una ausencia completa de cobre intracelular, puesto que se considera una condición inicial igual al estado estacionario calculado en la secciones anteriores (ver (4.41)), situación que no ocurre dentro de la bacteria en el ensayo experimental. Se recuerda que el modelo Σ no considera reciclaje de cobre, es por esto que es esperable que el estado estacionario del sistema tenga esta particularidad previa a la adición del pulso de cobre.

Respecto a la respuesta del sistema al estímulo aplicado, en la Figura 5.14, se muestra una comparación entre los incrementos aproximados en la concentración de mRNA respecto al tiempo inicial reportados en [39] y el mismo dato obtenido a partir de la simulación del modelo Σ .

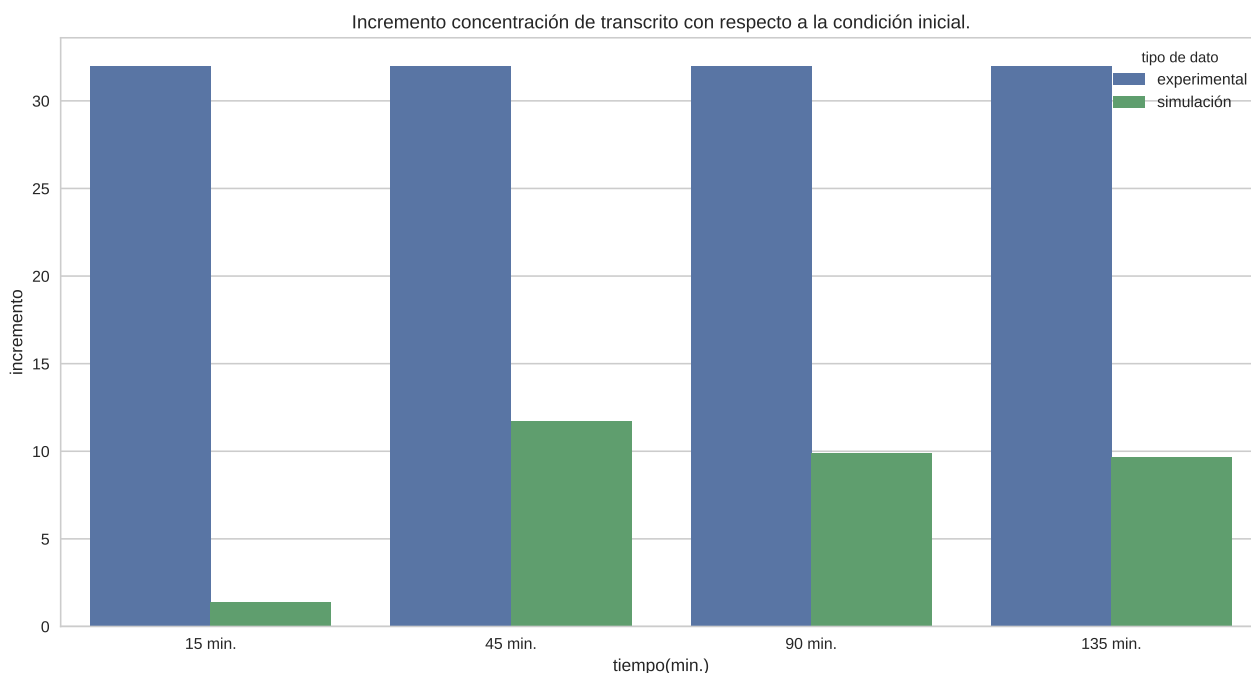


Figura 5.14: Incrementos en concentraciones de mRNA experimentales y simuladas a partir del modelo Σ en distintos tiempos: 0, 15, 45, 90 y 135 min después de aplicado 0,5 mM de cobre.

Como se observa en la Figura 5.14, los datos experimentales (barras azules) muestran una respuesta máxima del sistema desde los 15 minutos de agregado el pulso, en el sentido que, desde este tiempo, se alcanza el máximo incremento en la concentración de transcrito. Esto último, sugiere en la bacteria un umbral de respuesta bajo ante un incremento en las concentraciones internas de cobre. Por el contrario, los datos de la simulación sugieren una respuesta más lenta, manifestando un crecimiento en los incrementos de la concentración de cobre intracelular con respecto al tiempo inicial, hasta llegar a un incremento constante a partir de los 45 minutos de aplicado el pulso. Sin embargo, estos incrementos se encuentran aproximadamente en el mismo orden de magnitud que los datos experimentales (en el orden de 10 veces la concentración de transcrito con respecto al tiempo inicial).

Adicionalmente, teniendo en consideración la comparación de las concentraciones de cobre intracelular expuesta en la Figura 5.13, que sugieren una tendencia de crecimiento similar en las concentraciones de cobre intracelular, tanto en los datos de las simulaciones como en los datos experimentales, se puede pensar que la elección de los valores de los parámetros del modelo podría estar produciendo una respuesta del sistema más lenta de lo esperable.

Esta última observación, establece un nuevo desafío consistente en identificar cuáles son los parámetros que podrían estar impactando en este fenómeno. Una metodología para ajustar el modelo hacia el comportamiento experimental de la bacteria podría consistir en efectuar un análisis de sensibilidad de parámetros. Entre las técnicas tradicionales que se usan en este tipo de análisis, se destaca el estudio temporal de la sensibilidad del sistema con respecto a los parámetros. Esto último, se lleva a cabo encontrando la derivada de las variables de estado con respecto a cada parámetro, como una solución de un sistema de EDO, relacionado con el sistema original [7].

Como se mencionaba en la introducción de esta sección, una vez contrastado el comportamiento del sistema con respecto a una situación real, el análisis se centra en las capacidades informativas que tiene el modelo respecto de los componentes relevantes involucrados y que no son reportados experimentalmente. En la Figura 5.15, se evidencia la simulación de la evolución de las concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA descritas por la solución numérica del modelo Σ .

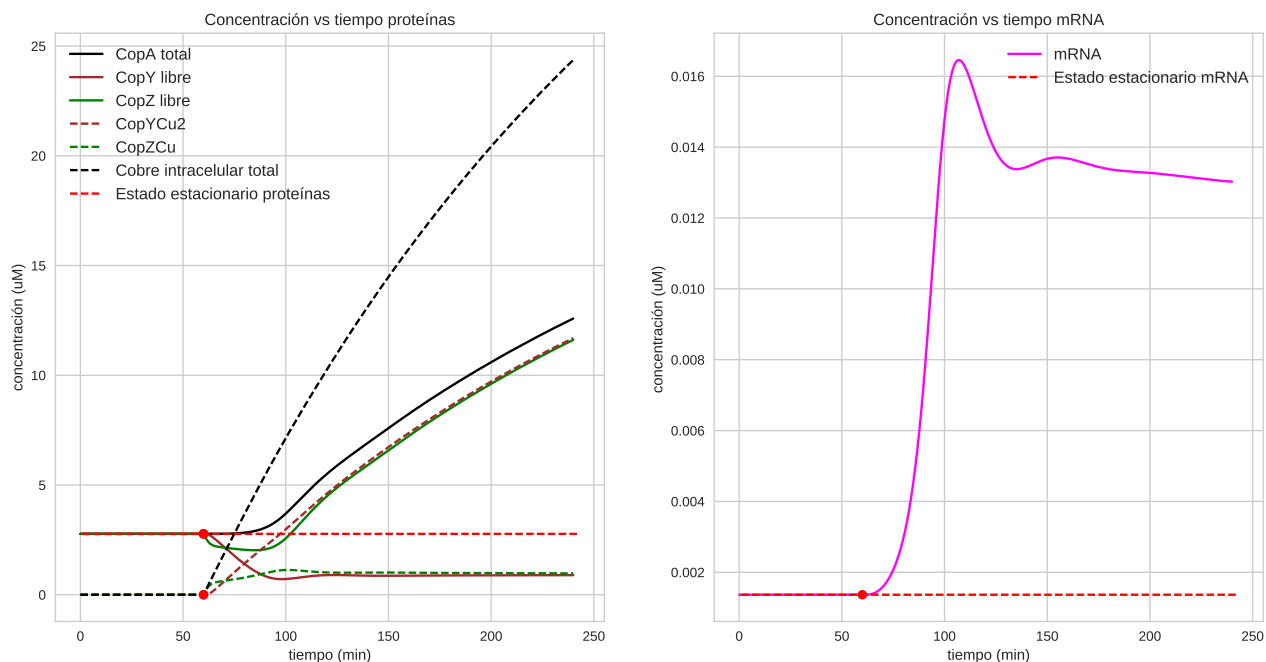


Figura 5.15: Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un de pulso 0,5 mM por 3 hrs. En rojo se expone el tiempo en el que se aplica el pulso.

En ésta última figura, se muestra en rojo el instante ($t = 60\text{min}$) en el que se aplica el pulso de 0,5 mM. Por otro lado, se evidencia cómo a partir de la adición del pulso, el sistema se desplaza hacia un estado transiente caracterizado por un aumento de la concentración intracelular total de cobre y, por el consecuente aumento en la concentración de transcrito y proteínas.

Finalmente, se estudió la variación en el tiempo de las concentraciones de cobre y la dinámica de los componentes del operon *cop* a partir de los resultados obtenidos de la simulación del modelo. Estos últimos se pueden apreciar en la Figura 5.16, que declara la evolución de la concentración total intracelular de cobre así como la del cobre externo y del cobre expulsado, y la Figura 5.17, que describe el comportamiento conjunto de todas las variables de estado del modelo Σ .

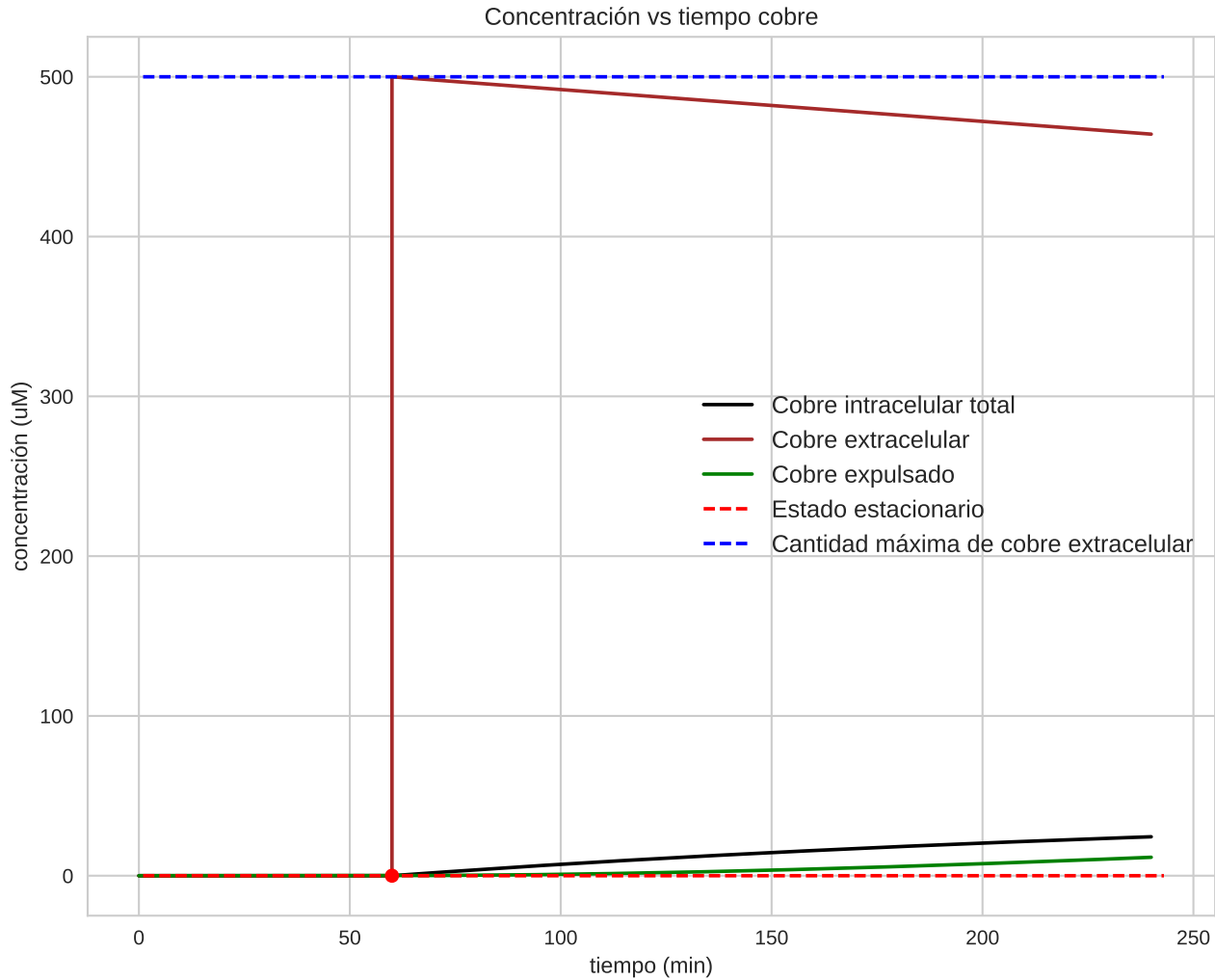


Figura 5.16: Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 0,5 mM por 3 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

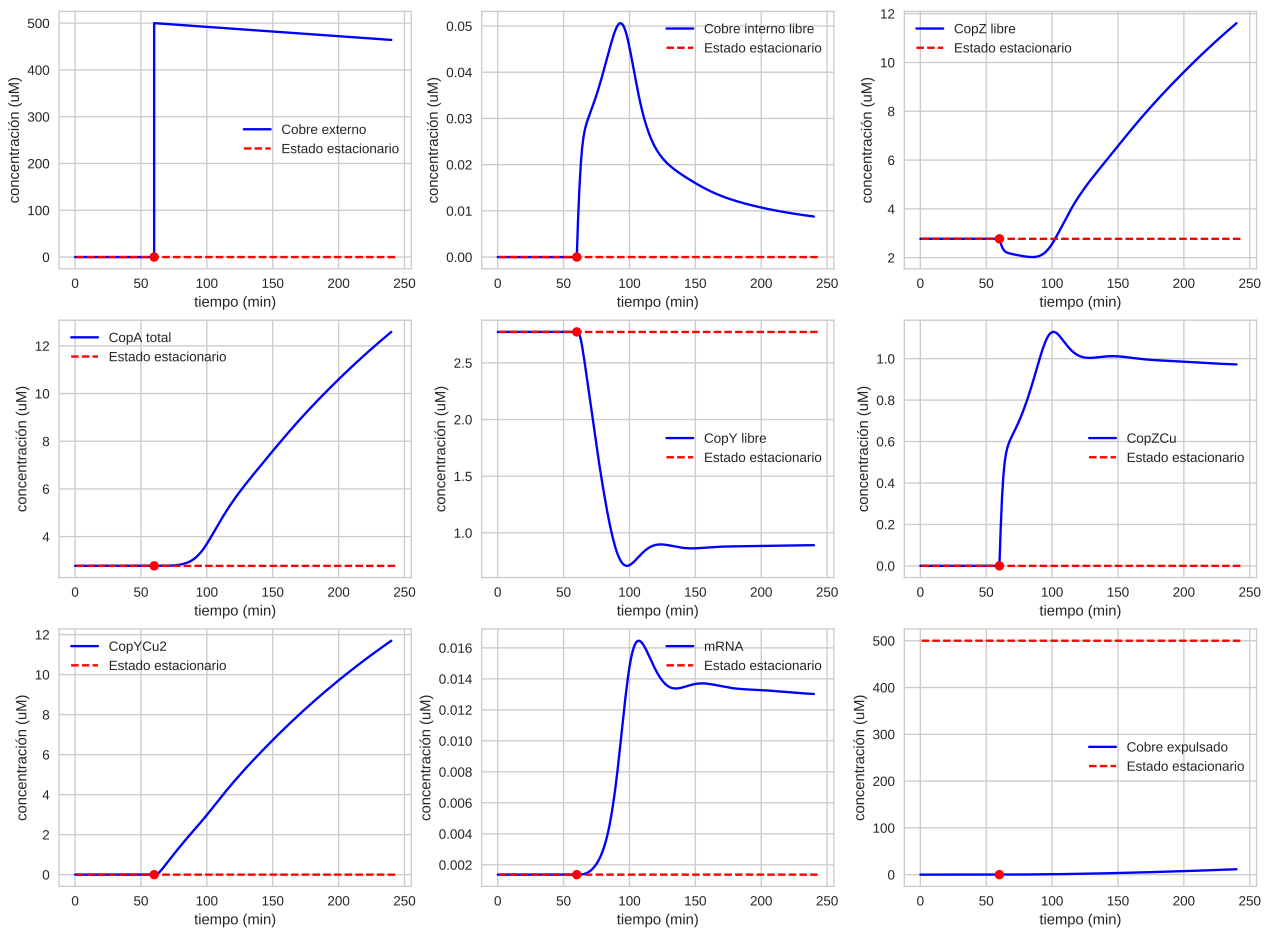


Figura 5.17: Concentraciones variables de estado bajo un pulso 0,5 mM por 3 hrs. En rojo se da cuenta del tiempo en donde se aplica el pulso.

Las dos figuras anteriores sugieren que se ha puesto en marcha la respuesta del sistema frente a un aumento de las concentraciones de cobre intracelular. Principalmente, en la Figura 5.16 se puede observar cómo lentamente el medio intracelular se va cargando de cobre y simultáneamente comienza la expulsión del mismo. Por su parte, la Figura 5.17 muestra que existe un máximo en la concentración de cobre intracelular libre así como de la concentración de CopZCu aproximadamente a los 40 minutos desde la aplicación del pulso de cobre. Esto es esperable, dado que en el sistema no había abundancia de cobre en un tiempo anterior a los 60 min. Sin embargo, el comportamiento posterior está caracterizado por una consecuente disminución en la concentración de cobre intracelular libre y estabilización en la concentración de CopZCu.

Estas observaciones indican que se estaría llegando a un máximo en la cantidad de cobre en tránsito en el interior de la célula. Por otra parte, en la misma figura, se observa cómo la cantidad de CopZ libre sigue aumentando, junto con un incremento sostenido en la concentración de CopA total y CopYCu₂. Esto se puede interpretar como que el cobre en circulación al interior de la célula está interactuando con el regulador transcripcional y con los mecanismos de eflujo. Esto es consistente con la estabilización en la producción de transcrito.

Todo lo dicho, indica que a partir de los 40 minutos, la célula ha logrado estabilizar las concentraciones intracelulares de cobre y se ha sobrepasado el umbral de respuesta del operón.

En conclusión, la dinámica conjunta de los elementos del sistema sugiere que se ha alcanzado una máxima respuesta por parte del operón, pero a su vez, el sistema necesita más tiempo para expresar por completo la funcionalidad de ésta.

5.3.1.3. Pulso 1 mM por 3hrs.

Una de las preguntas que naturalmente surgen en el análisis de un sistema homeostático es qué tan robustas son las respuestas de este último cuando se cambia la magnitud de un determinado estímulo. Con el objetivo de responder esta interrogante, valiéndose de la ventaja que plantea el modelo de realizar experimentos numéricos o simulaciones, se analiza una situación análoga a la del caso experimental anterior, pero se añade el doble de cobre como un pulso en $t = 60$ min.

En la Figura 5.18, se evidencia un comportamiento cualitativo y cuantitativo similar al de la simulación de la situación experimental. Esto sugiere saturación en la velocidad de entrada de cobre al medio intracelular.

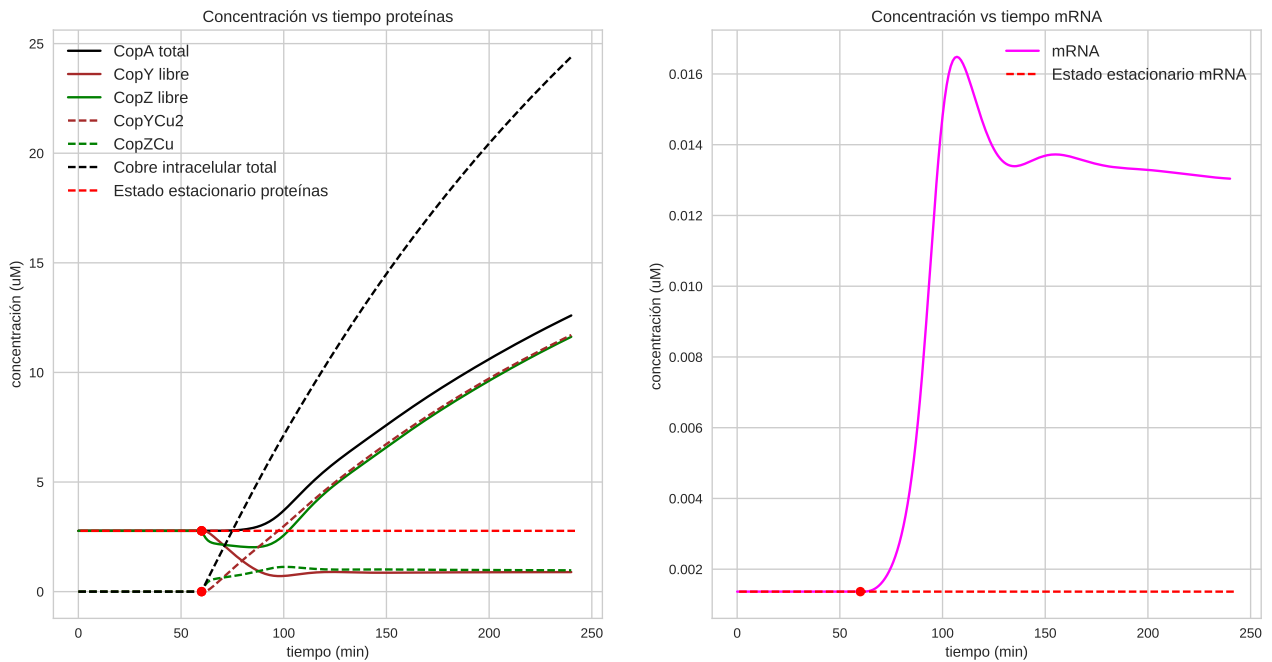


Figura 5.18: Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso 1 mM por 3 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

Finalmente, en las figuras 5.19 y 5.20 se puede apreciar el comportamiento del cobre y de todas las variables asociadas al modelo.

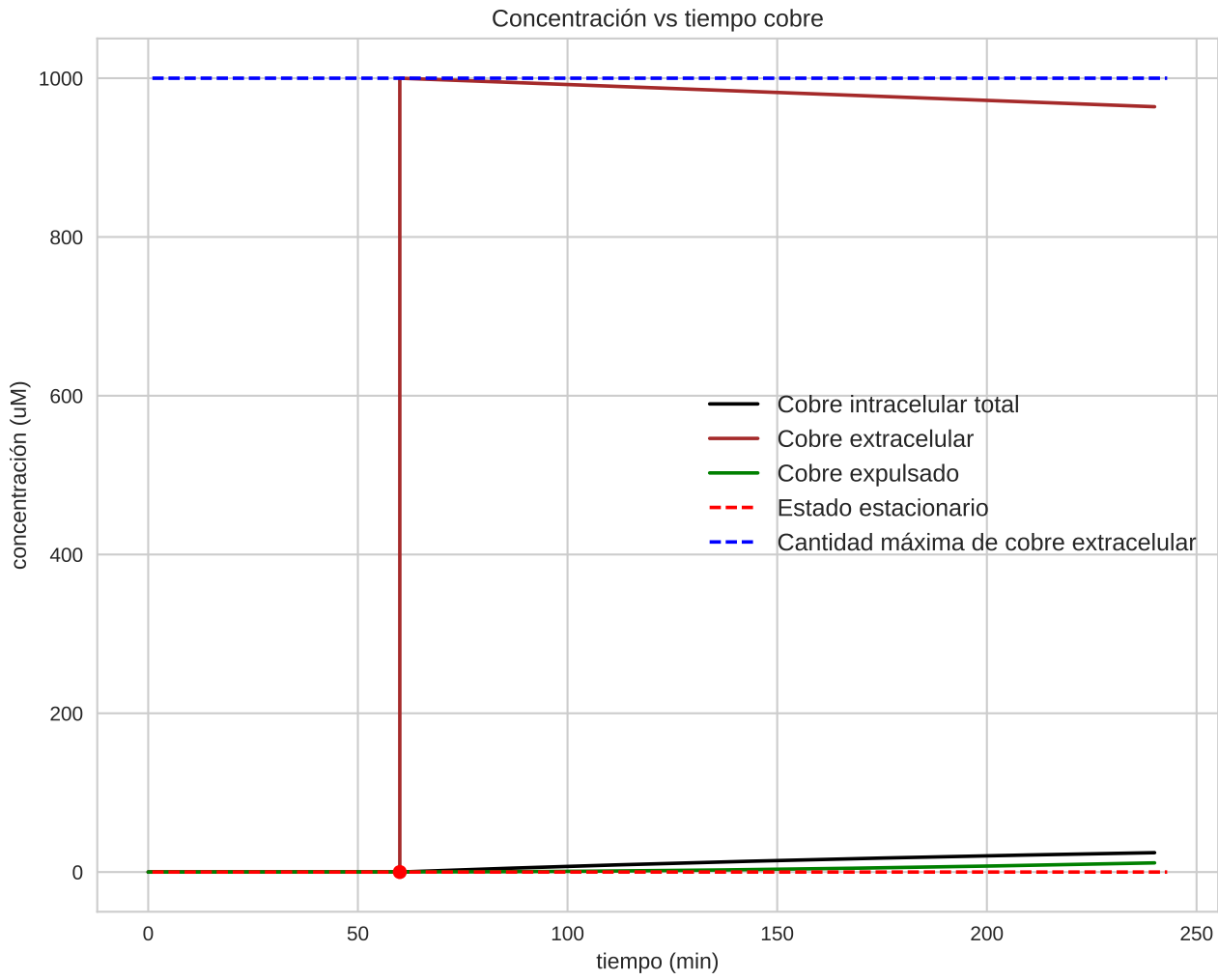


Figura 5.19: Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 1 mM por 3 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

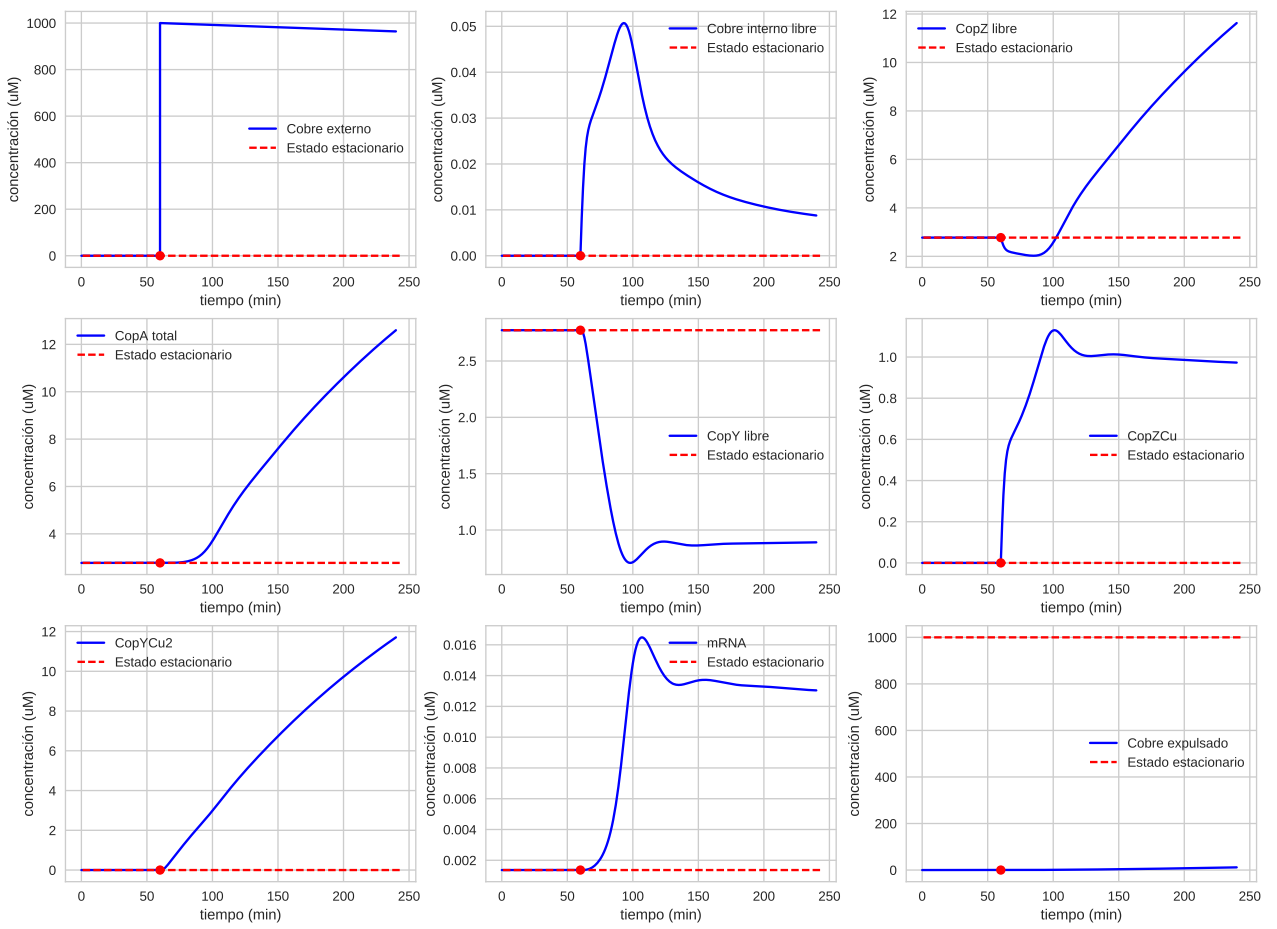


Figura 5.20: Concentraciones de las variables de estado del sistema bajo un pulso 1 mM por 3 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

En términos generales, la respuesta del sistema obtenida en este ensayo cuando se aplicó un pulso de 1,0 mM es similar a la del caso anterior cuando se adicionó la mitad del pulso. Esto da cuenta de la eficiencia de los mecanismos de transporte y expulsión de cobre regulados por el operón *cop* en el modelo, capaces de lidiar con un incremento del doble de la concentración extracelular de cobre sin afectar la homeostasis de la bacteria en términos de su capacidad de respuesta.

Cabe la posibilidad de exponer al modelo a concentraciones superiores de cobre con el propósito de determinar el límite de capacidad de respuesta de la bacteria, no obstante, el presente trabajo buscó mantener un contexto de realidad a los experimentos numéricos para estos ensayos. En [57], se establece experimentalmente que la concentración de 0,5 mM de cobre en el medio no afecta mayormente el crecimiento de las bacterias. Por otro lado, en el mismo trabajo, se reporta inhibición en el crecimiento en medios con concentraciones de entre 2 a 4 mM de cobre.

Dado estos antecedentes, aplicar pulsos superiores se encuentra fuera de una realidad biológica, pues el organismo no enfrenta esta tipo de estímulos extremos en condiciones naturales. No obstante, como opción de desafío del modelo, es posible probar la respuesta del sistema frente a pulsos de cobre mucho más grades en orden de magnitud, buscando un comportamiento límite de capacidad teórica de la homeostasis en esta bacteria.

5.3.1.4. Pulso 0,5 mM por 6 hrs.

Una de las ventajas que reporta la simulación de modelos predictivos con respecto a una situación experimental, es la posibilidad de un estudio detallado en el tiempo del comportamiento del sistema. En ese sentido, considerando las observaciones realizadas en la primera simulación que duró 3 horas, se busca en esta sección, estudiar el comportamiento del modelo durante un tiempo de 6 horas. En la Figura 5.21 se muestra cómo las concentraciones de las variables asociadas a proteínas libres y con cobre tienden a alcanzar una concentración fija. Por su parte la concentración de mRNA también se estabiliza.

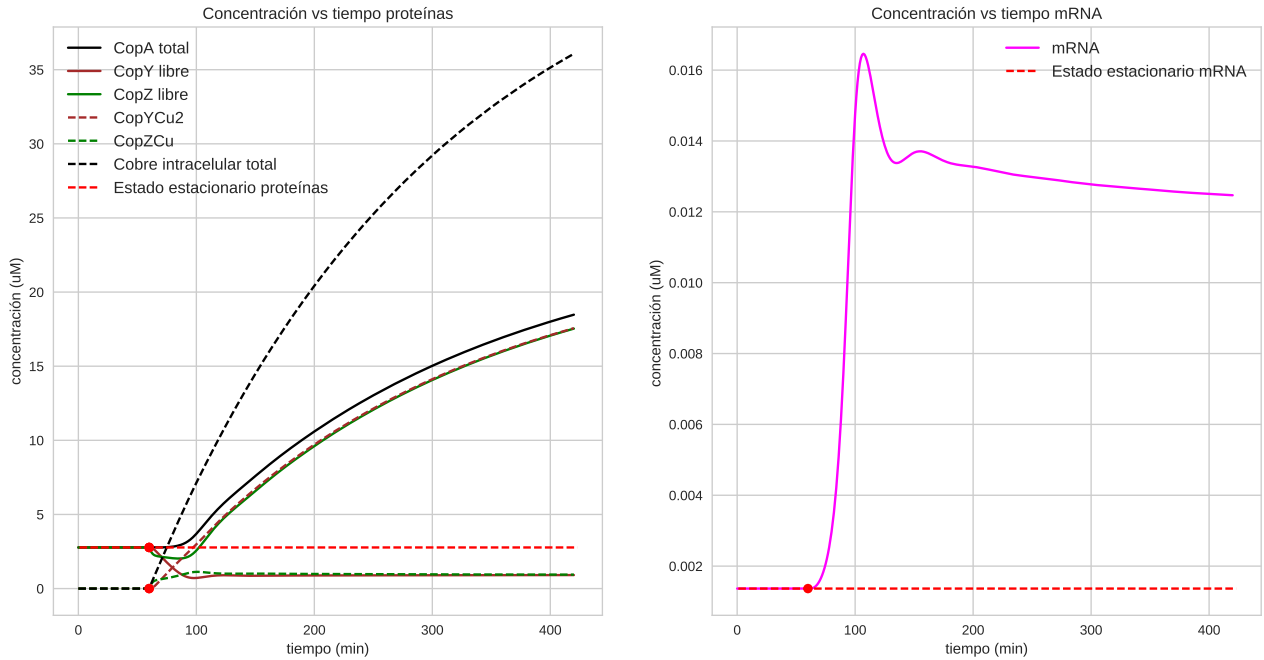


Figura 5.21: Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso 0,5 mM por 6 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

Esta tendencia se verifica también en las otras variables del sistema en la Figura 5.23. Por otra parte, la Figura 5.22 indica que no se ha consumido el cobre del medio y tampoco se ha expulsado todo el cobre intracelular.

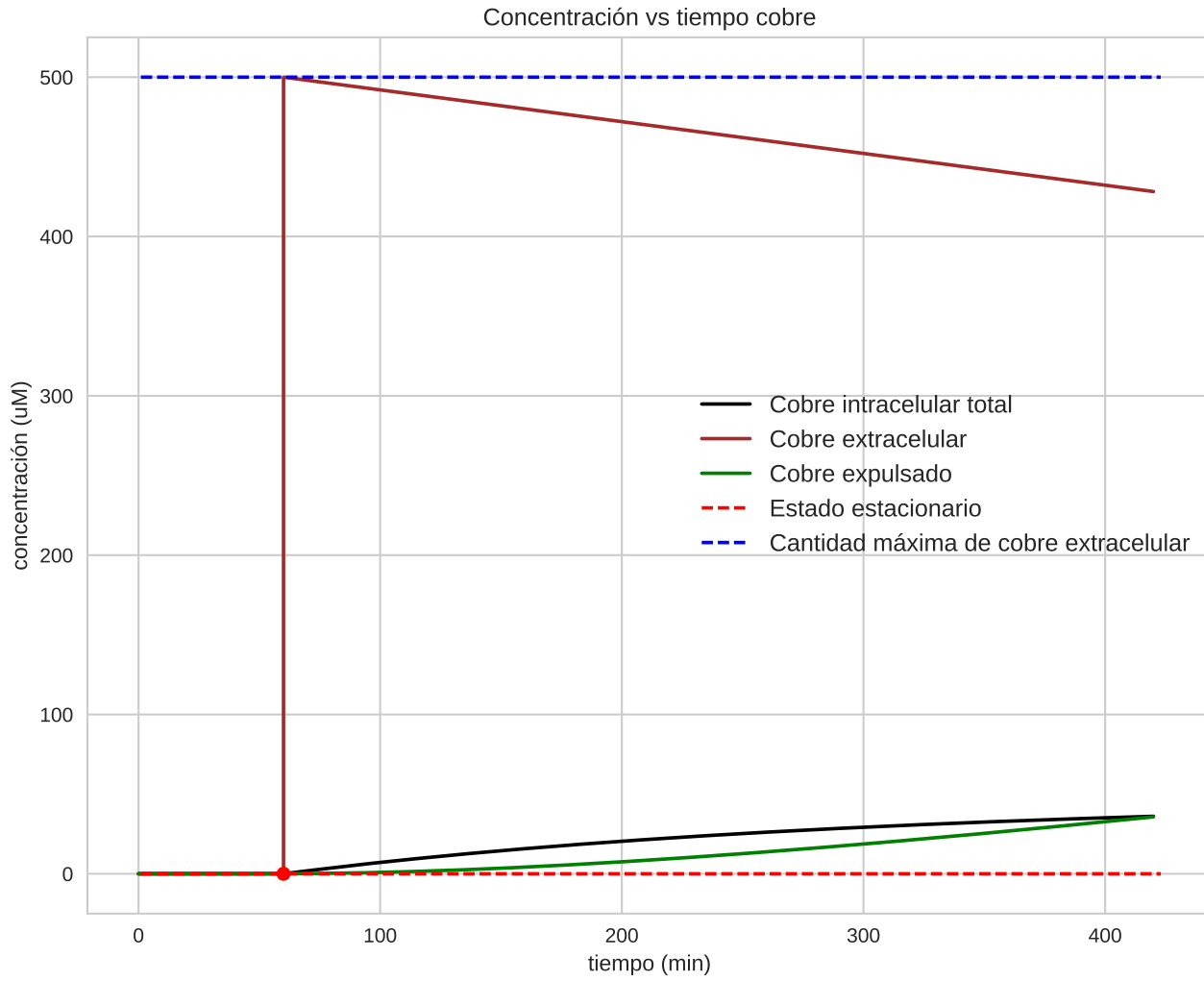


Figura 5.22: Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso de 0,5 mM por 6 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

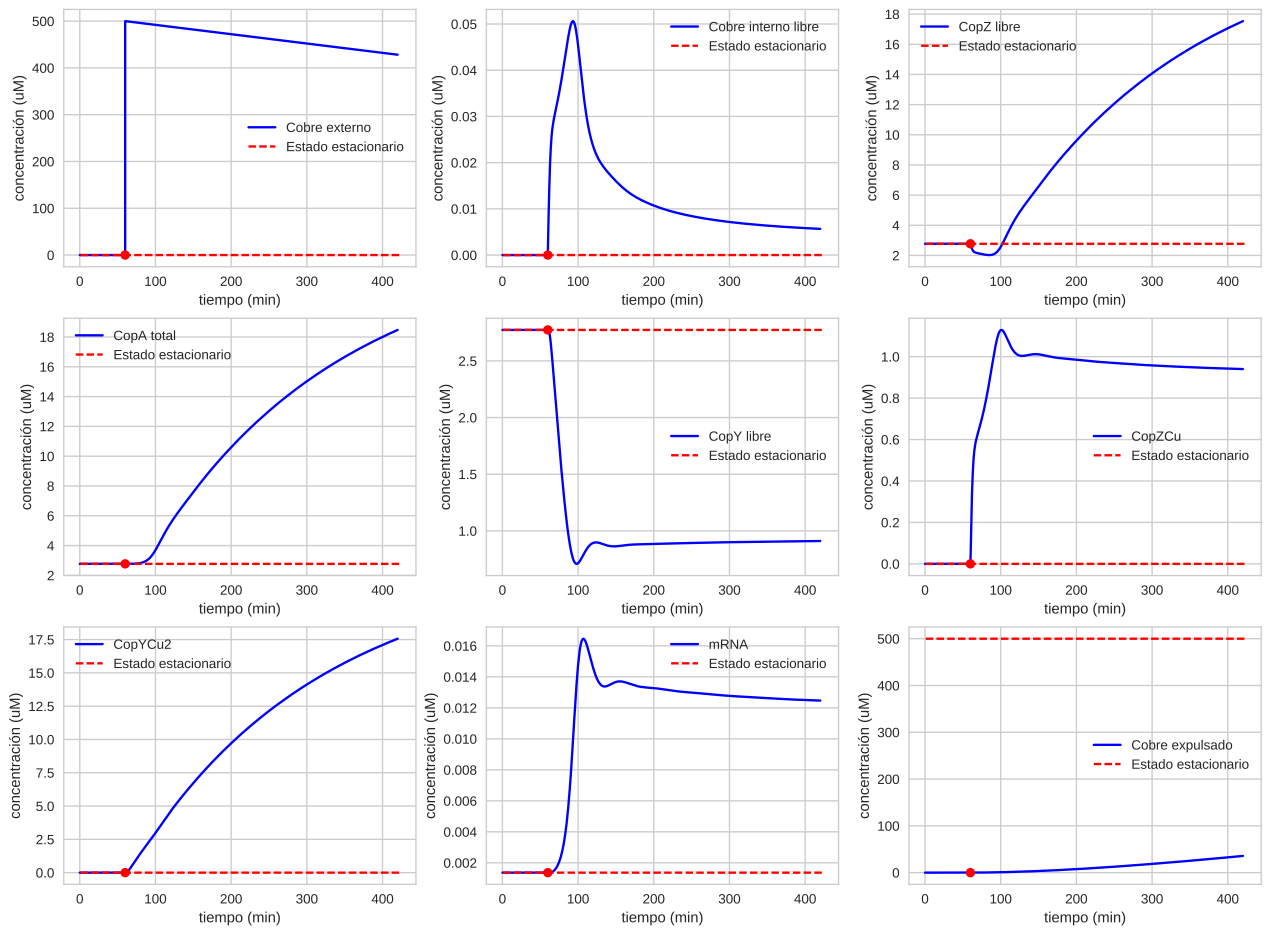


Figura 5.23: Concentraciones de variables de estado bajo un pulso 0,5 mM por 6 hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

Como se aprecia en la Figura 5.23, la estabilización de las concentraciones de algunas variables de estado del sistema podría sugerir el establecimiento de un estado de equilibrio que se mantiene en presencia de cobre. Esto se refleja a partir de los 150 minutos, cuando las concentraciones comienzan a estabilizarse, sin embargo, la expulsión de cobre se mantiene.

Se recuerda que este modelo no contempla reciclaje de cobre, por lo que, como se verá más adelante, el sistema se mueve hacia la condición de equilibrio inicial cuando se agota el cobre extracelular. El fenómeno anterior aporta valiosa información sobre el comportamiento homeostático del modelo en una situación más realista donde el cobre puede re-ingresar al sistema.

Por otro lado, en la misma figura, se observa que las únicas variables que no se han estabilizado, mostrando un incremento en su concentración, son CopA y CopYCu₂. Es decir, el flujo y la inducción del cobre sobre el regulador transcripcional se encuentran todavía activos.

5.3.1.5. Tren de 3 pulsos de 0,5 mM cada una hora por 3 hrs.

Finalmente, se efectúan simulaciones repitiendo un pulso de 0,5 mM cada 60 minutos, por tres veces. El objetivo de este análisis es estudiar la dependencia de la respuesta del sistema frente a una condición previa. Es decir, si el sistema se encontraba iniciando una respuesta a un determinado estímulo, entonces ¿la irrupción de un estímulo similar en magnitud, inducirá el mismo tipo de respuesta? o bien, ¿la exposición al primer estímulo, significará que el sistema estaba preparado para enfrentar el segundo, al exhibir una respuesta de menor magnitud?. En la Figura 5.24, se ve cómo las concentraciones de las variables asociadas a proteínas libres y con cobre exhiben el mismo comportamiento que el de la Figura 5.15, lo que da un indicio de la alta adaptación en que se encuentra el sistema en el estado de equilibrio para hacer frente a variaciones periódicas en las condiciones externas del medio. Por otro lado, en la misma figura, se puede apreciar que la dinámica del transcrito mantiene igualmente esta tendencia.

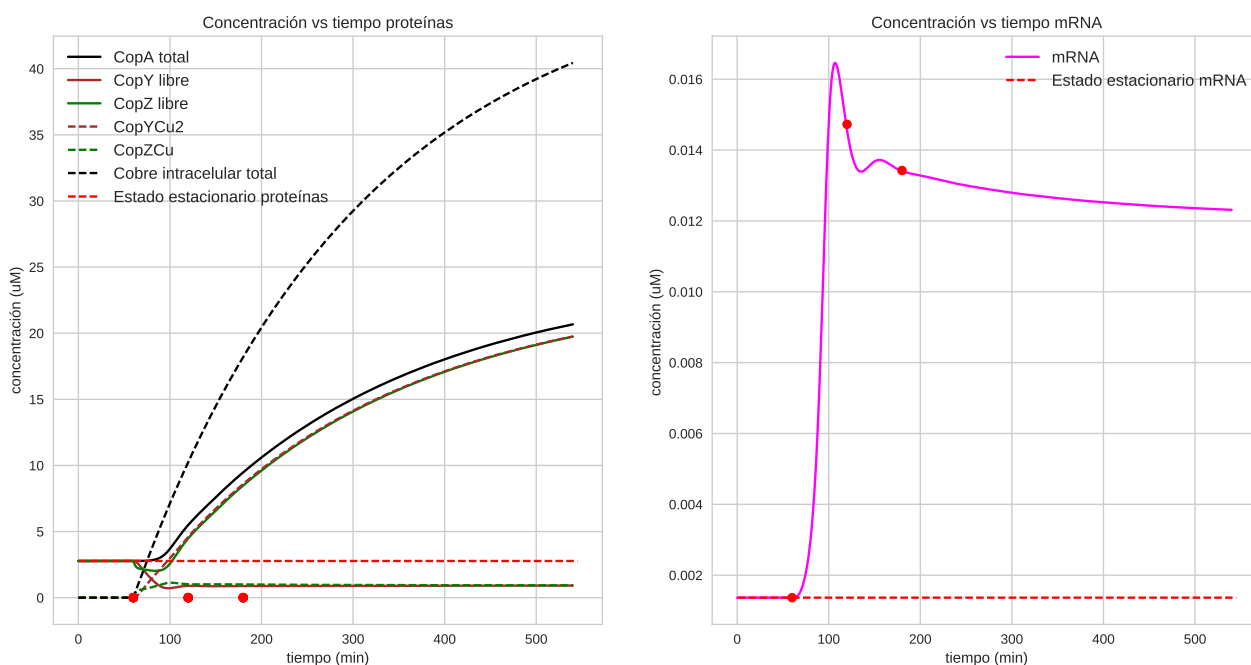


Figura 5.24: Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un tren de pulsos de 0,5 mM cada 1hr. En rojo se muestran los tiempos en los que se aplican los distintos pulsos.

Por otra parte, el resto de las variables del modelo guardan el mismo comportamiento. Esto se pone en evidencia en las Figura 5.26. Por otra parte, la Figura 5.25 sugiere la saturación en la entrada de cobre a la célula.

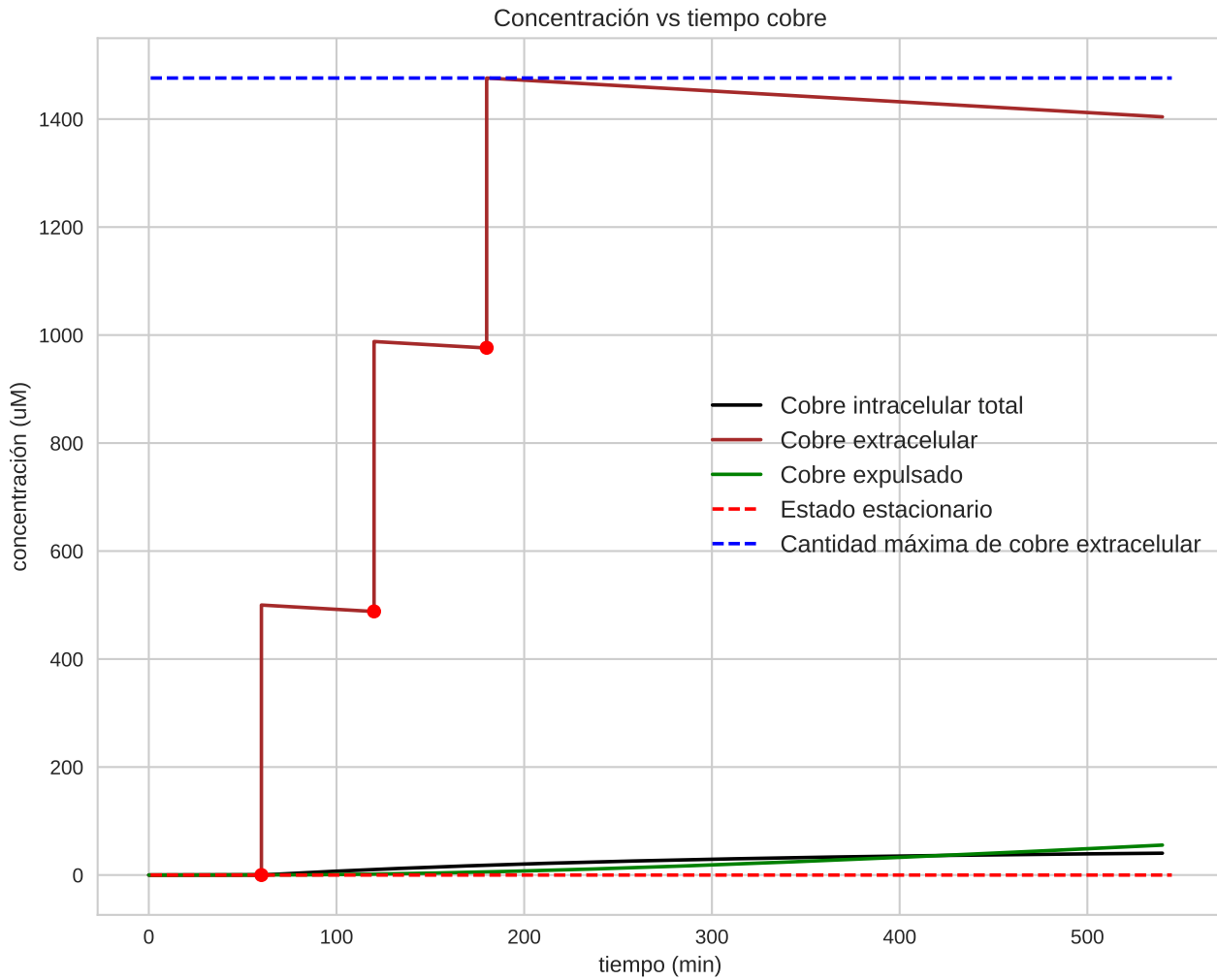


Figura 5.25: Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un tren de pulsos de 0.5 mM cada 1hr. En rojo se muestran los tiempos en los que se aplican los distintos pulsos.

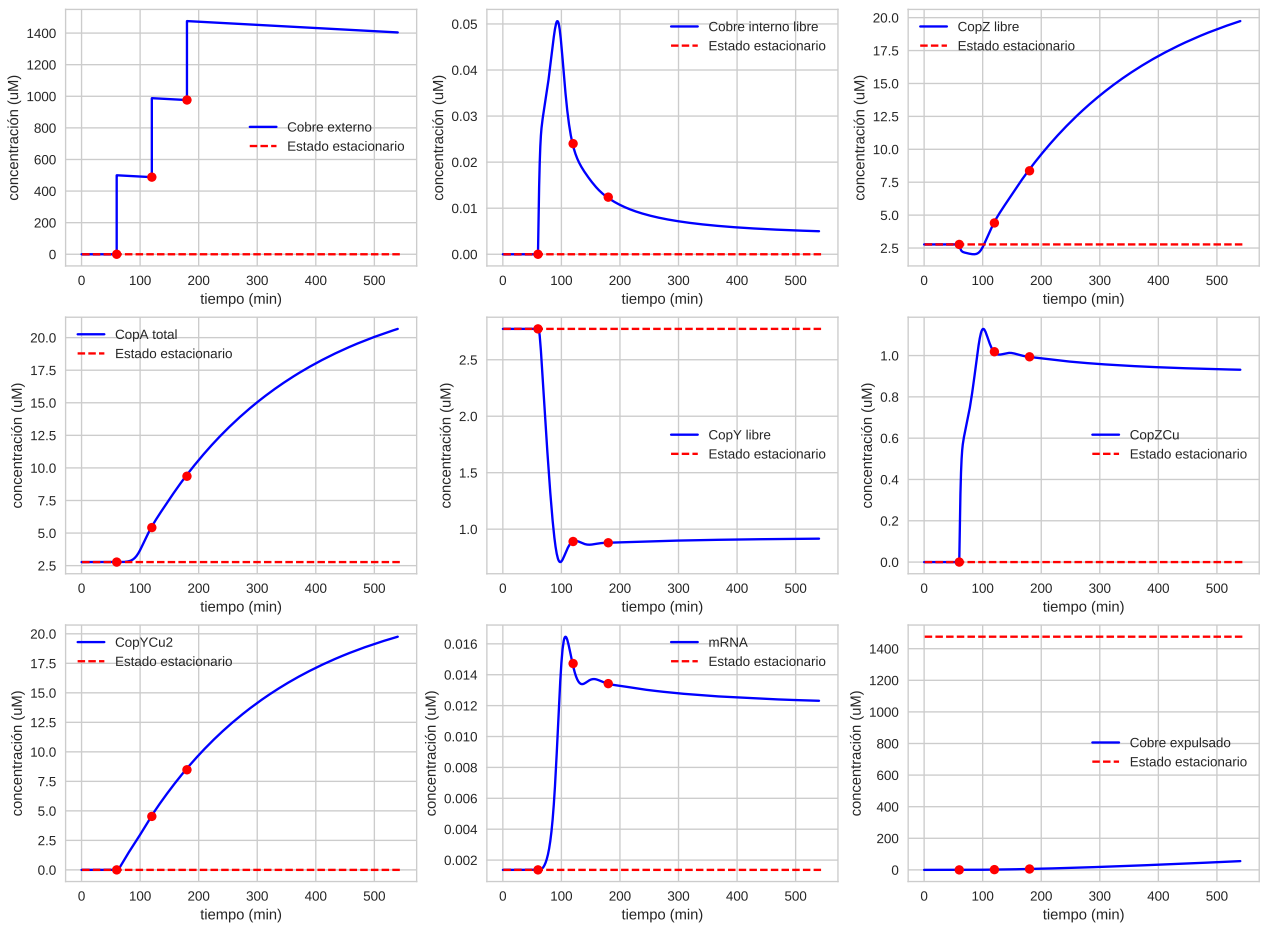


Figura 5.26: Concentraciones variables de estado bajo un tren de pulsos de 0.5 mM cada 1hr. En rojo se muestran los tiempos en donde se aplican los distintos pulsos.

Respecto al comportamiento del sistema observado en las figuras anteriores, es posible pensar en dos interpretaciones:

1. El alto grado de adaptación que muestra el sistema. Esto se evidencia en la Figura 5.26. Si se analizan los primeros 250 minutos, mientras las concentraciones de cobre extracelular aumentan con respecto a las simulaciones anteriores, las concentraciones de proteínas y transcrito no varían significativamente. Esto induce a pensar que el estado de equilibrio encontrado para el sistema es un estado de preparación para adaptarse a distintas condiciones de estrés dadas por cambios en las condiciones externas.
2. La saturación en la velocidad de entrada de cobre. Observando la Figura 5.25, se infiere que la tasa de entrada de cobre a la célula es la misma que en la simulación con un pulso de 0,5 y de 1 mM. Adicionalmente, se observa que la pendiente de disminución del cobre extracelular luego de 60 minutos de aplicado cada pulso, es aproximadamente la misma. Esto último, sumado al análisis realizado en la simulación consistente en la adición de un pulso de 1 mM durante 3 horas, sugiere la saturación en la entrada de cobre a la célula.

Como una estrategia para profundizar el análisis, sería interesante, en un futuro trabajo, repetir la simulación anterior, usando un pulso de menor concentración de cobre para ver si se evidencian cambios en las concentraciones intracelulares. Se hace notar, que en este análisis, respetó la elección de las condiciones experimentales establecidas en [39], es decir, la concentración de 0,5 mM para el pulso añadido.

5.3.2. Estudio numérico del comportamiento asintótico.

La presente sección repetirá el experimento de control expuesto en la sección anterior, pero observando en una ventana de tiempo mayor para apreciar el comportamiento asintótico de la solución numérica de Σ . Se hace notar que una condición suficiente para verificar la convergencia es que la ecuación (4.71) tenga una única solución.

Observación. Se constata que para los parámetros de la tabla 5.1, la condición suficiente sobre las raíces de la ecuación (4.71) para que exista convergencia, no se satisface (ver tabla 5.2).

Tabla 5.2: Tabla de valores estado estacionario calculados a partir de 5.1.

Parámetro	Valor
r	1.2649E+03
Cota superior	1.2649E+03 uM
Cota inferior	1.3443E-05 uM
Estado estacionario proteínas	2.7790 uM
Estado estacionario mRNA	1.4E-03 uM

A pesar de esta última observación, en la Figura 5.27 se aprecia que las trayectorias de la solución, igualmente convergen al único equilibrio del modelo Σ .

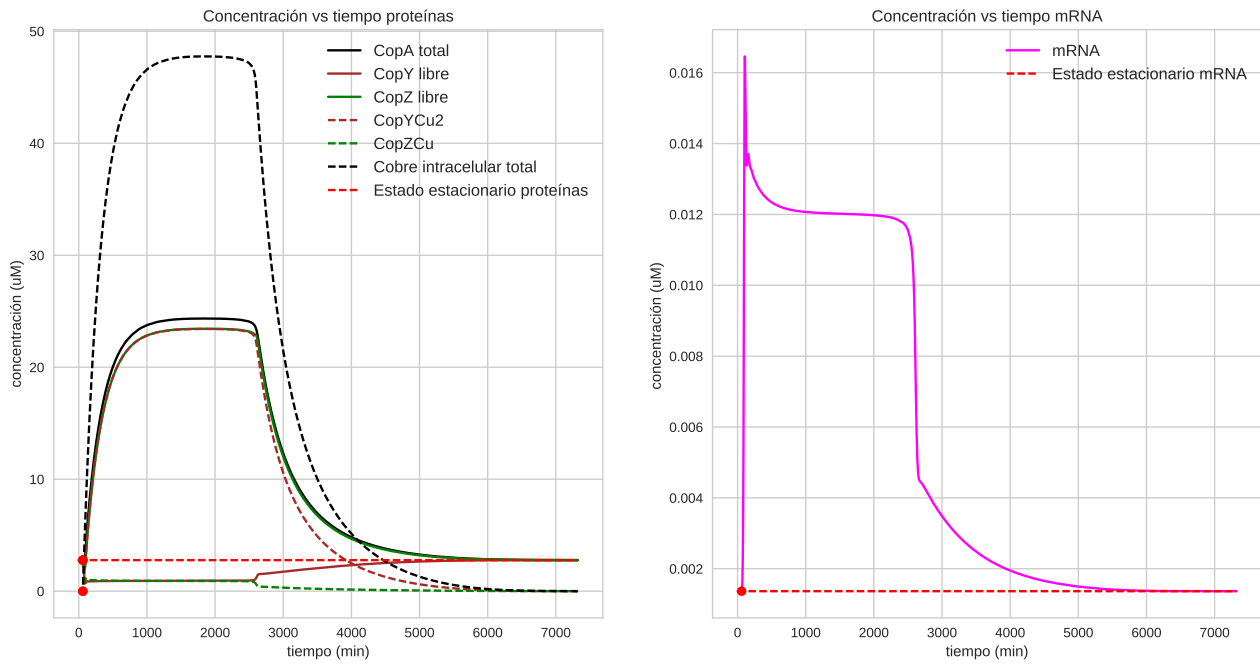


Figura 5.27: Concentraciones de proteínas, complejos cobre-proteínas y mRNA bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

Por otra parte, en la Figura 5.28, se muestra cómo la célula absorbe completamente el cobre extracelular, aproximadamente en $t = 3000$ minutos y para expulsarlo completamente en $t = 4000$ minutos aprox.

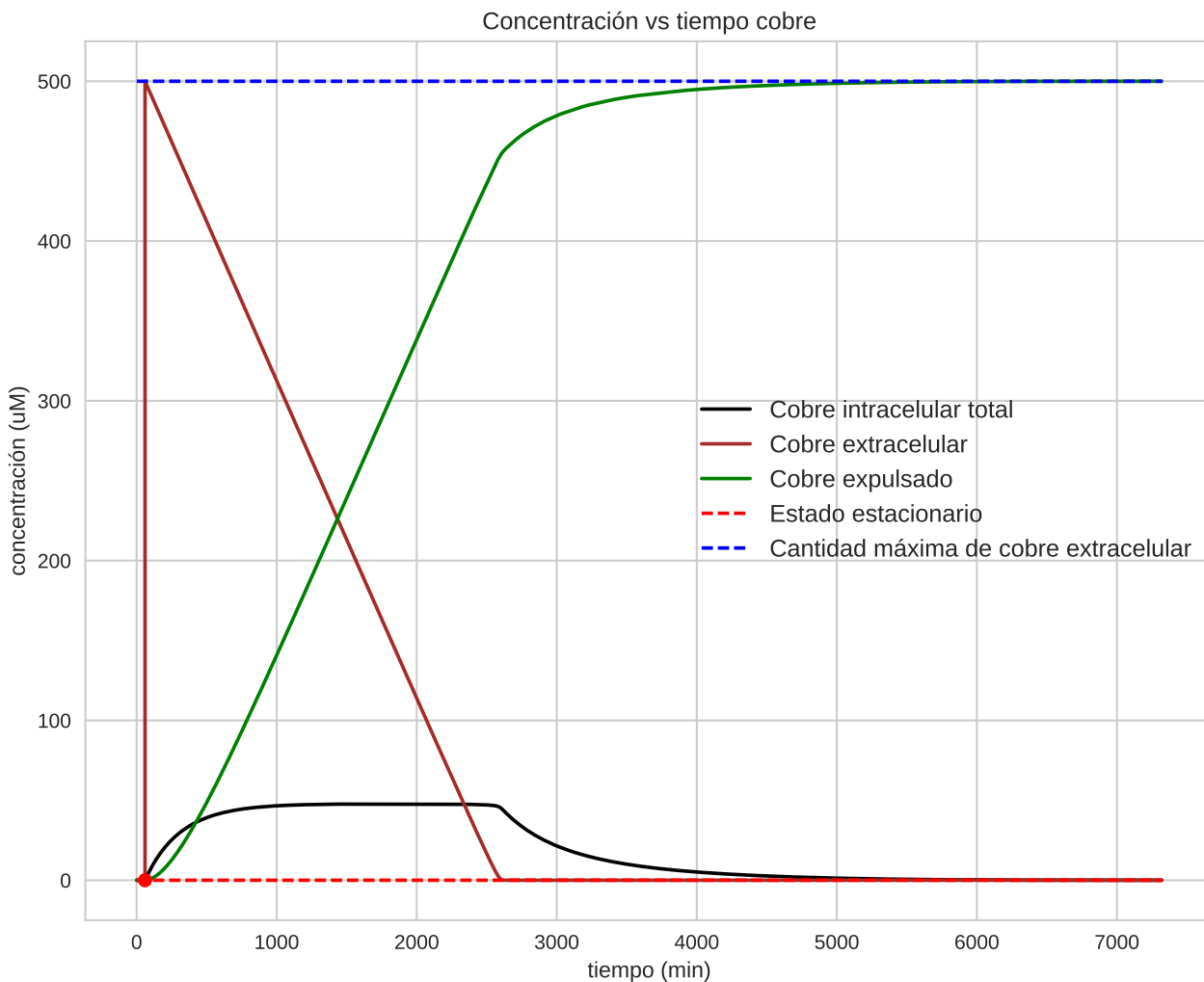


Figura 5.28: Concentraciones de cobre externo, cobre interno y cobre expulsado bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

En este mismo sentido, la Figura 5.29, revela que el resto de las variables se acerca a estado estacionario, a medida que se agota el cobre intracelular.

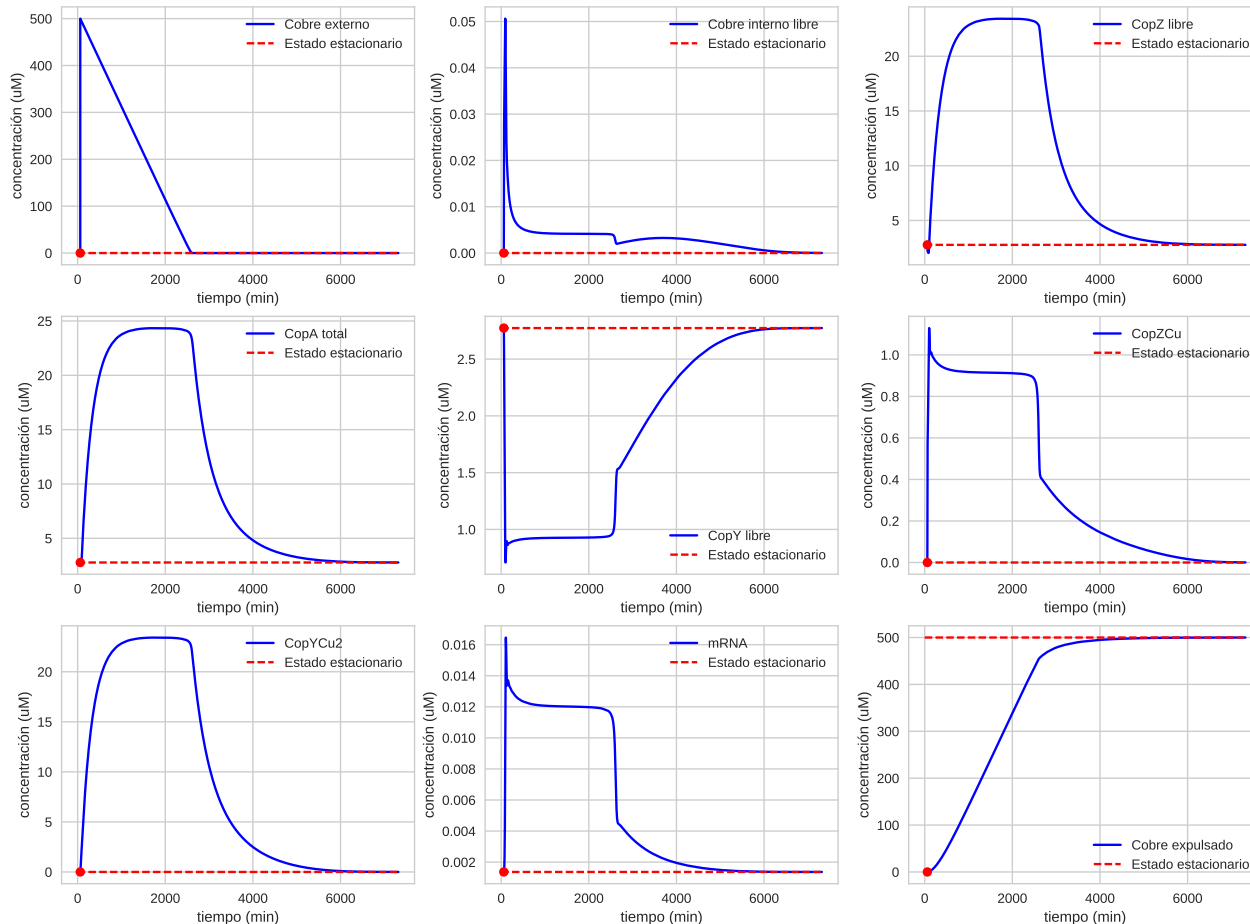


Figura 5.29: Concentraciones variables de estado, bajo un pulso 0.5 mM por 120hrs. En rojo se muestra el tiempo en donde se aplica el pulso.

En general, en todas las figuras anteriores se ve que entre $t = 1000$ y $t = 3000$, las concentraciones tienden a mantenerse estables, sugiriendo la existencia de un equilibrio en presencia de cobre. Si bien el cobre que sale del sistema no puede volver a incorporarse, la relación entre las tasas de entrada y salida, crea, en este intervalo de tiempo, las condiciones de abundancia interna de cobre como si se tratase de un sistema que posee siempre disponibilidad de este mineral. Al agotarse el cobre extracelular, el sistema tiende al estado estacionario.

Lo dicho anteriormente, es de vital importancia para diseñar modelos que permitan centrarse en las relaciones fundamentales que suceden en este intervalo de tiempo, donde coexiste un equilibrio en presencia de cobre en el sistema. Si bien la complejidad y no linealidad de los modelos significan un desafío para la caracterización explícita de este equilibrio tal cuál se realizó, para el caso sin reciclaje de cobre, estas simulaciones aportan intuición en la búsqueda de desarrollar modelos más específicos que permitan acercarse a esta meta.

Conclusión

Como resultado del desarrollo de este trabajo, se ha estudiado y diseñado un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) con el objetivo de entender los elementos principales de un cierto tipo de sistema homeostático: la dinámica de la regulación de las concentraciones intracelulares de cobre en *E. faecalis*. El análisis estuvo dividido en dos partes: a) el análisis de un sistema con lado derecho polinomial que recogía todas las interacciones elementos del modelo biológico construido a partir de la evidencia experimental [51, 56, 57] y b) el análisis de un sistema que incluía funciones de regulación y que buscaba describir con mayor detalle algunos aspectos relevantes del modelo surgidos en el trabajo anterior. Respecto a la primera etapa de la memoria, se logró demostrar que existían relaciones que cumplían las variables de estado en los equilibrios del sistema cuando se le permitía al cobre re-ingresar al sistema, después de haber sido expulsado y se demostró la existencia de un único equilibrio asintóticamente estable en el caso en que el cobre no podía re-ingresar. En este último caso, usando principalmente herramientas relacionadas con la teoría de control y del análisis de sistemas de dinámicos [22, 21], se estudió la existencia de regiones atractoras. Usando lo aprendido a partir de este primer modelo y en un esfuerzo por entender el comportamiento global del sistema, se propuso, en una segunda etapa, un modelo más realista que incluye funciones de regulación, para hacerse cargo de fenómenos relacionados con la saturación y la cooperatividad. Basándose en técnicas utilizadas para estudiar las propiedades de estabilidad de un modelo del operón lac [43], se demostró la existencia de un mecanismo que mantiene las condiciones internas de todos los elementos del sistema en un cierto rango, dependiendo de los parámetros de éste. Bajo ciertas hipótesis, se ha demostrado que el único equilibrio del modelo que incluía funciones de regulación, es un atractor global. Mediante simulaciones, usando parámetros adaptados de la literatura, se corroboró numéricamente la existencia de un atractor global de las trayectorias de solución del modelo.

A la luz de estos resultados, surge la interrogante respecto a la generalidad de los resultados obtenidos: ¿es posible definir una clase general de sistemas en los que, se puedan demostrar los resultados anteriores usando las mismas técnicas?. Esta interrogante abre una línea de investigación para las que tanto la revisión bibliográfica como los resultados anteriores constituyen un aporte. Por otra parte, queda abierta la posibilidad de la aplicación de estas ideas al desarrollo de áreas productivas que involucren procesos biológicos, por ejemplo, el caso de la biolixiviación en la minería del cobre. En ese mismo sentido, de la mano del refinamiento de las técnicas experimentales de recolección de datos, es posible pensar en abordar el problema de encontrar rangos de valores precisos para los parámetros desconocidos que constituyen el modelo, dando la posibilidad de construir modelos predictivos.

Bibliografía

- [1] Biolixiviación, publicación web. https://www.codelco.com/biolixiviacion/prontus_codelco/2011-08-04/111346.html. Accessed: 2017-07-25.
- [2] Biolixiviación, tecnología para la nueva minería, publicación web. https://www.codelco.com/biolixiviacion-tecnologia-para-la-nueva-mineria/prontus_codelco/2011-02-17/092512.html. Accessed: 2017-07-25.
- [3] Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Cells As Experimental Models. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9917/>. Accessed: 2017-08-07.
- [4] Uri Alon. *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. CRC press, 2006.
- [5] David Angeli. An almost global notion of input-to-state stability. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 49(6):866–874, 2004.
- [6] David Angeli and Eduardo D Sontag. Monotone control systems. *IEEE Transactions on automatic control*, 48(10):1684–1698, 2003.
- [7] HT Banks, Sava Dediu, and Stacey L Ernstberger. Sensitivity functions and their uses in inverse problems. *Journal of Inverse and Ill-posed Problems jip*, 15(7):683–708, 2007.
- [8] HT Banks and JM Mahaffy. Global asymptotic stability of certain models for protein synthesis and repression. *Quarterly of Applied Mathematics*, 36(3):209–221, 1978.
- [9] HT Banks and JM Mahaffy. Stability of cyclic gene models for systems involving repression. *Journal of Theoretical Biology*, 74(2):323–334, 1978.
- [10] J. R. Beckwith. The lactose operon. In F. Neidhard, editor, *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology volume 2*, pages 1444–1452. ASM, Washington, D.C, 1987.
- [11] Jonathan R Beckwith, David Zipser, et al. *The lactose operon*, volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York:, 1970.
- [12] JM Berg, JL Tymoczko, and L Stryer. Biochemistry fifth edition, 2002.

- [13] Silpa Bhaskaran, P Umesh, and Achuthsankar S Nair. Hill equation in modeling transcriptional regulation. In *Systems and Synthetic Biology*, pages 77–92. Springer, 2015.
- [14] George Edward Briggs and John Burdon Sanderson Haldane. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical journal*, 19(2):338, 1925.
- [15] Jeffrey C Buchsbaum and Jeremy M Berg. Kinetics of metal binding by a zinc finger peptide. *Inorganica Chimica Acta*, 297(1):217–219, 2000.
- [16] J Chifman, A Kniss, P Neupane, I Williams, B Leung, Z Deng, P Mendes, V Hower, FM Torti, SA Akman, et al. The core control system of intracellular iron homeostasis: a mathematical model. *Journal of theoretical biology*, 300:91–99, 2012.
- [17] George P Chrousos and Philip W Gold. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267(9):1244–1252, 1992.
- [18] Emmanuel Curis, Ioannis Nicolis, Jalil Bensaci, Patrick Deschamps, and Simone Bénazeth. Mathematical modeling in metal metabolism: overview and perspectives. *Biochimie*, 91(10):1238–1254, 2009.
- [19] Hidde De Jong. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *Journal of computational biology*, 9(1):67–103, 2002.
- [20] Barbara Di Ventura, Caroline Lemerle, Konstantinos Michalodimitrakis, and Luis Serrano. From in vivo to in silico biology and back. *Nature*, 443(7111):527, 2006.
- [21] German A Enciso, Hal L Smith, and Eduardo D Sontag. Nonmonotone systems decomposable into monotone systems with negative feedback. *Journal of Differential Equations*, 224(1):205–227, 2006.
- [22] Germán A Enciso and Eduardo D Sontag. Global attractivity, i/o monotone small-gain theorems, and biological delay systems. *Discrete and Continuous Dynamical Systems*, 14(3):549, 2006.
- [23] Brian C Goodwin. Temporal organization in cells. 1963.
- [24] Brian C Goodwin. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Advances in enzyme regulation*, 3:425IN1429IN3431–428IN2430IN6437, 1965.
- [25] Călin C Guet, Luke Bruneaux, Taejin L Min, Dan Siegal-Gaskins, Israel Figueroa, Thierry Emonet, and Philippe Cluzel. Minimally invasive determination of mrna concentration in single living bacteria. *Nucleic acids research*, 36(12):e73–e73, 2008.
- [26] Ph Hartman. Ordinary differential equations [russian translation], mir, moscow (1970). *Google Scholar*.
- [27] Leland H Hartwell, John J Hopfield, Stanislas Leibler, Andrew W Murray, et al. From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402(6761):C47, 1999.

- [28] Morris W Hirsch and Hal Smith. Monotone dynamical systems. *Handbook of differential equations: ordinary differential equations*, 2:239–357, 2006.
- [29] Andrew J Holloway, Ryan K van Laar, Richard W Tothill, and David DL Bowtell. Options available—from start to finish—for obtaining data from dna microarrays ii. *Nature genetics*, 32(Supp):481, 2002.
- [30] Arthur HF Hosie, D Allaway, MA Jones, DL Walshaw, AWB Johnston, and Philip S Poole. Solute-binding protein-dependent abc transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Molecular microbiology*, 40(6):1449–1459, 2001.
- [31] Philip Hunter. The paradox of model organisms. *EMBO reports*, 9(8):717–720, 2008.
- [32] François Jacob and Jacques Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3):318–356, 1961.
- [33] Karthik P Jayapal, Siguang Sui, Robin J Philp, Yee-Jiun Kok, Miranda GS Yap, Timothy J Griffin, and Wei-Shou Hu. Multitagging proteomic strategy to estimate protein turnover rates in dynamic systems. *Journal of proteome research*, 9(5):2087–2097, 2010.
- [34] Hassan K Khalil. *Nonlinear Systems*. Prentice-Hall, New Jersey, 1996.
- [35] Hiroaki Kitano. Looking beyond the details: a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology. *Current genetics*, 41(1):1–10, 2002.
- [36] Hiroaki Kitano. Systems biology: a brief overview. *Science*, 295(5560):1662–1664, 2002.
- [37] Stefan Klumpp and Terence Hwa. Growth-rate-dependent partitioning of rna polymerases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51):20245–20250, 2008.
- [38] Mauricio Latorre, María Paz Cortés, Dante Travisany, Alex Di Genova, Marko Budinich, Angélica Reyes-Jara, Christian Hödar, Mauricio González, Pilar Parada, Roberto A Bobadilla-Fazzini, et al. The bioleaching potential of a bacterial consortium. *Bioresource technology*, 218:659–666, 2016.
- [39] Mauricio Latorre, Felipe Olivares, Angélica Reyes-Jara, Guadalupe López, and Mauricio González. Cutc is induced late during copper exposure and can modify intracellular copper content in enterococcus faecalis. *Biochemical and biophysical research communications*, 406(4):633–637, 2011.
- [40] Adelheid Lempradl, J Andrew Pospisilik, and Josef M Penninger. Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis. *Nature Reviews. Genetics*, 16(11):665, 2015.
- [41] Mitchell Lewis. The lac repressor. *Comptes rendus biologiques*, 328(6):521–548, 2005.
- [42] Sara Linse and Walter J Chazin. Quantitative measurements of the cooperativity in an ef-hand protein with sequential calcium binding. *Protein Science*, 4(6):1038–1044, 1995.

- [43] Joseph M Mahaffy and Emil Simeonov Savev. Stability analysis for a mathematical model of the lac operon. *Quarterly of Applied Mathematics*, 57(1):37–53, 1999.
- [44] Leonor Menten and MI Michaelis. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49:333–369, 1913.
- [45] Charles M Moore, Ahmed Gaballa, Monica Hui, Rick W Ye, and John D Helmann. Genetic and physiological responses of bacillus subtilis to metal ion stress. *Molecular microbiology*, 57(1):27–40, 2005.
- [46] Nathan Nelson. Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal*, 18(16):4361–4371, 1999.
- [47] Hans G Othmer. The qualitative dynamics of a class of biochemical control circuits. *Journal of mathematical biology*, 3(1):53–78, 1976.
- [48] Elisabeth Pécou. Mathematical comments on basic topics in systems biology. *Mathematical and computational methods in biology: proceedings CIMPA-UNESCO summer school*, 2006.
- [49] Elisabeth Pécou, Alejandro Maass, Daniel Remenik, Julien Briche, and Mauricio Gonzalez. A mathematical model for copper homeostasis in enterococcus hirae. *Mathematical biosciences*, 203(2):222–239, 2006.
- [50] Carole Peyssonnaud, Annelies S Zinkernagel, Reto A Schuepbach, Erinn Rankin, Sophie Vaultont, Volker H Haase, Victor Nizet, and Randall S Johnson. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (hifs). *Journal of Clinical Investigation*, 117(7):1926, 2007.
- [51] Reto Portmann, David Magnani, Jivko V Stoyanov, Ariane Schmechel, Gerd Multhaup, and Marc Solioz. Interaction kinetics of the copper-responsive copy repressor with the cop promoter of enterococcus hirae. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9(4):396–402, 2004.
- [52] John Quackenbush. Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics*, 32(Supp):496, 2002.
- [53] TD Rae, PJ Schmidt, RA Pufahl, VC Culotta, and TV O’halloran. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284(5415):805–808, 1999.
- [54] Daniel Raimunda, Manuel González-Guerrero, Blaise W LEEBER, and José M Argüello. The transport mechanism of bacterial cu⁺-atpases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals*, 24(3):467–475, 2011.
- [55] Christopher Rensing and Sylvia Franke McDevitt. The copper metallome in prokaryotic cells. In *Metallomics and the Cell*, pages 417–450. Springer, 2013.
- [56] Angélica Reyes, Andrea Leiva, Verónica Cambiazo, Marco A Méndez, and Mauricio

- Gonzalez. Cop-like operon: structure and organization in species of the lactobacillale order. *Biological research*, 39(1):87–93, 2006.
- [57] Angélica Reyes-Jara, Mauricio Latorre, Guadalupe López, Agathe Bourgoigne, Barbara E Murray, Verónica Cambiazo, and Mauricio González. Genome-wide transcriptome analysis of the adaptive response of enterococcus faecalis to copper exposure. *Biometals*, 23(6):1105–1112, 2010.
- [58] Adrien Richard and Jean-Paul Comet. Stable periodicity and negative circuits in differential systems. *Journal of mathematical biology*, 63(3):593–600, 2011.
- [59] Michael A Savageau. Power-law formalism: a canonical nonlinear approach to modeling and analysis. In *World Congress of Nonlinear Analysts*, volume 92, pages 3323–3334, 1996.
- [60] Michael A Savageau. Design principles for elementary gene circuits: Elements, methods, and examples. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 11(1):142–159, 2001.
- [61] Szabolcs Semsey, Anna MC Andersson, Sandeep Krishna, Mogens Høgh Jensen, Eric Masse, and Kim Sneppen. Genetic regulation of fluxes: iron homeostasis of escherichia coli. *Nucleic acids research*, 34(17):4960–4967, 2006.
- [62] Marc Solioz and Jivko V Stoyanov. Copper homeostasis in enterococcus hirae. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3):183–195, 2003.
- [63] Eduardo D Sontag. Lecture notes on mathematical systems biology, 2005.
- [64] Eduardo D Sontag. Monotone and near-monotone biochemical networks. *Systems and synthetic biology*, 1(2):59–87, 2007.
- [65] Christophe Soulé. Graphic requirements for multistationarity. *ComplexUs*, 1(3):123–133, 2003.
- [66] Yuichi Taniguchi, Paul J Choi, Gene-Wei Li, Huiyi Chen, Mohan Babu, Jeremy Hearn, Andrew Emili, and X Sunney Xie. Quantifying e. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *science*, 329(5991):533–538, 2010.
- [67] William J Terrell. *Stability and stabilization: an introduction*. Princeton University Press, 2009.
- [68] René Thomas. On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations. In *Numerical methods in the study of critical phenomena*, pages 180–193. Springer, 1981.
- [69] Dante Travisany, María Paz Cortés, Mauricio Latorre, Alex Di Genova, Marko Budinich, Roberto A Bobadilla-Fazzini, Pilar Parada, Mauricio González, and Alejandro Maass. A new genome of acidithiobacillus thiooxidans provides insights into adaptation to a bioleaching environment. *Research in microbiology*, 165(9):743–752, 2014.

- [70] Ferdinand Verhulst. *Nonlinear differential equations and dynamical systems*. Springer Science & Business Media, 2006.
- [71] Nicolas Vita, Gianpiero Landolfi, Arnaud Baslé, Semeli Platsaki, Jaeick Lee, Kevin J Waldron, and Christopher Dennison. Bacterial cytosolic proteins with a high capacity for cu (i) that protect against copper toxicity. *Scientific reports*, 6, 2016.
- [72] Eberhard O Voit, Harald A Martens, and Stig W Omholt. 150 years of the mass action law. *PLoS computational biology*, 11(1):e1004012, 2015.
- [73] Kevin J Waldron, Julian C Rutherford, Dianne Ford, and Nigel J Robinson. Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, 460(7257):823, 2009.
- [74] David Whitford. *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons, 2013.