

**SIMULACIÓN DEL CICLO DE KREBS EN *Aspergillus niger* Y MEJORA EN LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR DINÁMICA DE SISTEMAS**

JUAN SEBASTIÁN SANDOVAL CABEZAS

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
CALI, VALLE
2014**

**SIMULACIÓN DEL CICLO DE KREBS EN *Aspergillus niger* Y MEJORA EN LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR DINÁMICA DE SISTEMAS**

JUAN SEBASTIÁN SANDOVAL CABEZAS

**Proyecto de grado para optar al título de
INGENIERO INDUSTRIAL y QUÍMICO**

ASESOR: ARAM JOEL PANAY, Ph.D
Profesor tiempo completo departamento ciencias químicas

CO-ASESOR: CARLOS ARTURO DELGADO, Ph.D
Profesor tiempo completo departamento de Ingeniería Industrial

CO-ASESOR: FERNANDO ANTONIO ARENAS, Ph.D
Profesor tiempo completo departamento de Ingeniería Industrial

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
CALI, VALLE
2014**

CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN DEL PROYECTO	1
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	2
4. MARCO TEÓRICO	3
4.1 Dinámica de Sistemas	4
4.2 Cinética enzimática	7
4.3 Difusión	8
5. ESTADO DEL ARTE	9
6. OBJETIVOS.....	12
6.2 Objetivo General.....	12
6.3 Objetivo del Proyecto	12
6.4 Objetivos Específicos.....	12
7. SUPUESTOS	13
8. METODOLOGÍA	14
8.1 Identificación de procesos a considerar en el modelo de simulación	14
8.2 Descripción del sistema de estudio	17
8.3 Construcción del Diagrama causal e Hipótesis Dinámica	22
8.4 Modelo de Flujos y Niveles	29
8.4.1 Variables de flujo	31
8.5 Condiciones iniciales	42
8.6 Parámetros cinéticos correspondientes a las ecuaciones de velocidad reportadas	42
9. RESULTADOS	44
9.1 Arquetipos.....	44
9.2 Estado inicial	44
9.2.1 Ciclo de Krebs.....	45
9.2.2 Variables extra-mitocondriales.....	47
9.2.3 Fosforilación oxidativa	49

9.3	Análisis de sensibilidad	49
9.4	Diseño de experimentos	56
10.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	61
10.1	Ciclo de Krebs.....	61
10.2	Medio extra-mitocondrial.....	66
10.3	Análisis de sensibilidad	69
10.4	Soluciones propuestas	71
10.5	Convergencias y Divergencias con el Diagrama Causal	76
11.	CONCLUSIONES.....	78
12.	RECOMENACIONES	79
13.	REFERENCIAS.....	80
14.	ANEXOS	84



APROBADO POR:

Aram Joel Panay Escobar
Director del Proyecto.

Fernando Antonio Arenas Guerrero
Co-Director del Proyecto.

Carlos Alberto Arango Mambuscay
Evaluador.

Ana Lucía Gómez Schouben
Evaluador.

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Debido a la importancia del ácido cítrico a nivel industrial se han realizado un gran número de avances para dilucidar el mecanismo por el cual *Aspergillus niger* acumula una mayor cantidad de éste compuesto, comparado con otras especies (Papagianni, 2007). Hasta la fecha se han reportado numerosos artículos que buscan aumentar la tasa de acumulación de ácido cítrico en la especie mencionada, ya sea por vía experimental o a través de modelos matemáticos y de simulación.

Los avances en tecnología del ADN recombinante y técnicas de biología molecular permiten llevar a cabo modificaciones y alteraciones específicas que cambien el metabolismo de un organismo en particular, sin embargo, debido a la complejidad del mismo, se debe contar con un estudio que determine los genes que deben ser modificados (Sthephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998).

En este trabajo se empleó Dinámica de Sistemas, uno de los tres mayores paradigmas en simulación (Borshchev & Filippov, 2004), para estudiar los procesos metabólicos implicados en la producción de ácido cítrico, entre ellos el ciclo de Krebs en *A. niger*, con el fin de mejorar la acumulación de éste ácido. Para su construcción se siguió el proceso de modelamiento presentado por Sterman (2000).

Con el modelo de simulación se identificó que la principal restricción para aumentar la acumulación de ácido cítrico corresponde a la baja concentración en la que se encuentra el oxaloacetato, uno de los dos sustratos empleados en su síntesis. Por tal razón los procesos que llevan a la producción de oxaloacetato, limitan la capacidad con la que se genera ácido cítrico en el sistema, por lo que se consideran recursos *cuellos de botella*.

Por otro lado, se observó que los procesos bioquímicos que ocurren en el ciclo de Krebs no llevan a una mejora en la producción de ácido cítrico, para lograrlo se deben modificar los transportadores simporte protón/citrato, antiporte citrato/malato y la enzima piruvatocarboxilasa. Sin embargo, es necesario que ocurra un bloqueo en dicho ciclo para que se dé el proceso de acumulación de ácido cítrico.

Finalmente se encontró que la enzima piruvatocarboxilasa, la cual cataliza la formación de oxaloacetato, y el transportador antiporte citrato/malato pueden, en conjunto, aumentar la cantidad de citrato citosólico en un 11,5 % en relación al estado inicial, bajo las mismas condiciones de acumulación.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los métodos tradicionales de mejora sobre las cepas empleadas en la producción de ácido cítrico, considerados métodos aleatorios (Sthephanopoulos et al., 1998), no permiten identificar cuáles son los cambios en el metabolismo que llevan a una mayor producción de ácido cítrico en el hongo *A. niger*.

Con el fin de mejorar la producción de ácido cítrico en éste organismo, se busca construir un modelo de simulación, con Dinámica de Sistemas, para brindar a la industria una herramienta que permita determinar las reacciones bioquímicas que logren éste propósito. Esto conducirá a la identificación de blancos para que a través de técnicas de biología molecular, tecnología de ADN recombinante e ingeniería de proteínas, se induzca una mayor producción.

3. JUSTIFICACIÓN

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) es el ácido orgánico de mayor producción en tonelaje a nivel mundial (Socco et al., 2006), siendo usado ampliamente en la medicina, la industria alimenticia, la industria farmacéutica, entre otras; es conocido también por ser un aditivo alimenticio universal (Karaffa & Kubicek, 2003). Su importancia se debe principalmente a tres propiedades: acidez, sabor y la formación de diferentes sales metálicas (Kristiansen, Matthey, & Linden, 2002). En el 2009 la producción de ácido cítrico fue de 1'500.000 toneladas a un precio de 0.80 €/Kg (Grunwald, 2009).

Para impulsar el desarrollo del sector industrial encargado de la producción de ácido cítrico, que cuenta con un amplio mercado a nivel mundial, se propone desarrollar una herramienta para mejorar la productividad del proceso.

Tradicionalmente, las mejoras en este campo se han logrado empleando agentes mutagénicos y técnicas de selección que identifican cepas superiores para un objetivo buscado. Sin embargo, a pesar del éxito de estas técnicas, los perfiles genéticos y metabólicos de cepas mutantes están pobremente caracterizados, siendo aún un método aleatorio (Sthephanopoulos et al., 1998). Con la construcción de un modelo y su simulación, se podrá establecer un perfil metabólico que lleve a la mejora en la acumulación de ácido cítrico por *A. niger*.

Al abordar el problema desde una perspectiva diferente, y al contar con información sobre el comportamiento metabólico del organismo *A. niger*, se esperará aportaren la comprensión del mecanismo que lleva a la acumulación de ácido cítrico en el organismo mencionado, el cual, hasta la fecha, no está completamente dilucidado.

4. MARCO TEÓRICO

Actualmente la principal forma de obtener ácido cítrico (AC) es a través del uso de microorganismos, principalmente el *Aspergillus niger*, sin embargo esto no siempre fue así (Soccol et al., 2006). Inicialmente se producía a partir del jugo de limón, pero debido a diferentes factores económicos y políticos se hizo necesario otro medio para su obtención. Se abordó la opción de realizar síntesis orgánica, para la producción de AC, principalmente a partir de 1,3-dicloro-2-propanona o de glicerol, sin embargo el producto tenía un menor precio que las materias primas (Kristiansen et al., 2002).

El primer reporte de síntesis de AC por microorganismos fue observado por Wehmer en 1893 en un cultivo de *Penicillium glaucum* (Socco et al., 2006), lo que llevó a posteriores estudios, donde se encontraron diferentes organismos con la capacidad de acumular AC. De todas los organismos, se encontró que *A. niger* presentaba el mayor rendimiento, mayor facilidad de manejo y además la habilidad de emplear diferentes fuentes de carbono (Soccol et al., 2006).

El AC es un ácido orgánico (figura 1.a) formado principalmente durante el ciclo de Krebs (figura 1.b), presente en prácticamente todos los organismos animales y vegetales. De forma general el ciclo de Krebs es una serie de ocho reacciones químicas que llevan a la formación de moléculas con alto potencial de reducción, a partir de moléculas carbonadas. Es la vía final para la oxidación completa de las moléculas orgánicas, ya sean carbohidratos, lípidos o aminoácidos. (Stryer et al., 2008; Bruice, 2008). Se considera que es el eje central del metabolismo celular, porque adicionalmente es una fuente de moléculas orgánicas precursoras en otros procesos biosintéticos como aminoácidos, nucleótidos y porfirinas. Por lo anterior se considera una vía anfibólica, pues cumple funciones catabólicas y anabólicas (Stryer et al., 2008).

A pesar de estar descrito el funcionamiento y los puntos de control del ciclo de Krebs para organismos eucariotas, su comportamiento, distribución espacial de enzimas y regulación, presentan diferencias en *A. niger*, las cuales deben ser

estudiadas para hacer una correcta simulación del ciclo. Más adelante, en el estado del arte, se resume tal información. A continuación se presentan conceptos que permitan explicar la razón de la metodología de simulación empleada.

4.1 Dinámica de Sistemas

Para empezar, un *modelo* es una abstracción hecha de un sistema del mundo real, con la que se pretende obtener predicciones y formular estrategias de control, al igual que entender cómo diferentes factores influyen en éste (Rubinstein & Melamed, 1998). Los modelos deben ser realistas y simplistas, siendo capaces de integrar los aspectos más importantes del mundo, sin llegar a ser complejos al sobrecargarse con detalles que harían más difícil la solución e interpretación de los mismos (Lema & Roca, 2005).

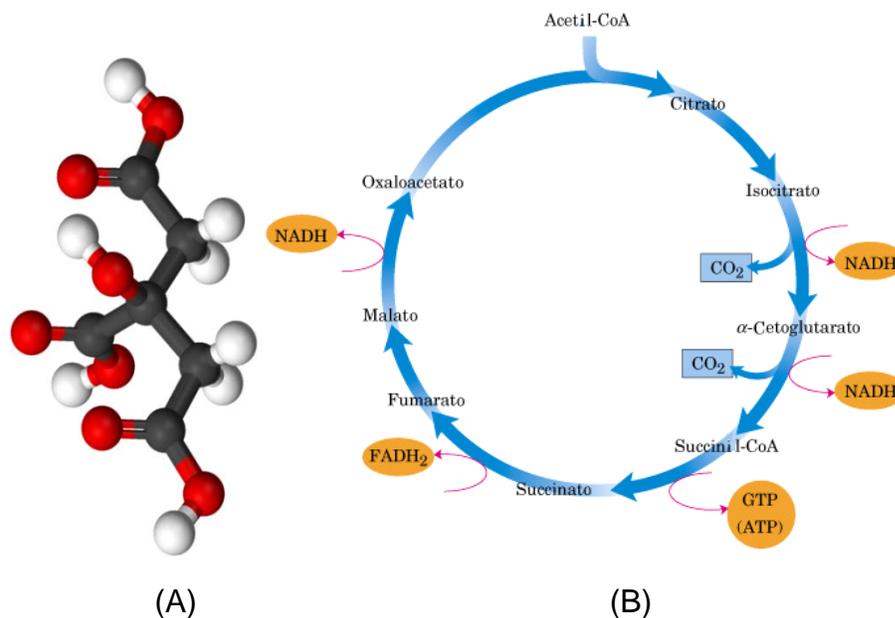


Figura 1. (A) Molécula de ácido cítrico. (B) Ciclo de Krebs.

Otro concepto es *simulación*, que se refiere a la evaluación del modelo construido en cada diferencial o intervalo de tiempo, sea continuo o discreto. En otras palabras se puede predecir el futuro del sistema dadas las condiciones iniciales. A través de las reglas de comportamiento definidas en el modelo se puede (i) entender el comportamiento del sistema, (ii) usar el modelo para hacer

experimentos de simulaciones cambiando las condiciones evaluadas e identificar las variables más importantes, lo que permite (iii) optimizar del modelo antes de llevarlo a una implementación en el mundo real (Lema & Roca, 2005).

Uno de los tres mayores paradigmas en simulación es la *dinámica de sistemas* o SD, por sus siglas en inglés (Borshchev & Filippov, 2004). Forrester (1958), su creador, la define como “*el estudio de la retroalimentación de la información característica de la actividad industrial para mostrar cómo la organización estructural, políticas y demoras en los tiempos, interactúan para determinar el destino de la empresa*”. Sin embargo SD también se ha empleado para modelar y simular diferentes sistemas biológicos (Hannon & Ruth, 1997).

Simular con SD implica abordar los problemas desde una perspectiva *sistémica*, lo opuesto a lo que Morecroft (2007) define como *pensamiento orientado a eventos*. Este último se identifica cuando se abordan los problemas o eventualidades con una acción correctiva, sin tener en cuenta lo que pueda desencadenar, es una visión lineal problema-solución, una visión miope de la realidad (Morecroft, 2007). Para modelar por SD debe haber un “cambio en la mentalidad” (*shift of mind*) (Senge P. , 1997), entender la dinámica a través de un enfoque diferente, entendiendo todo el sistema y no solo las partes, donde las “eventualidades” que surgen son realmente el resultado de decisiones y acciones acumulativas y no del azar.

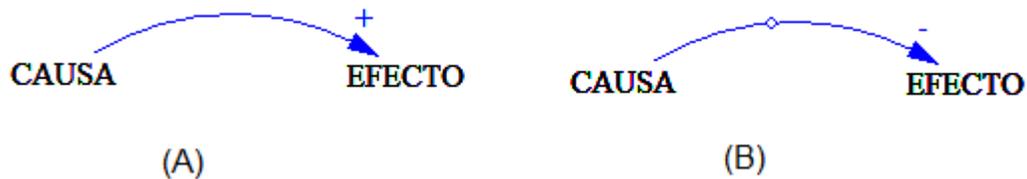


Figura2. (A) Relación causa efecto polaridad positiva, (B) Relación causa efecto polaridad negativa

El lenguaje del pensamiento sistémico son los ciclos de realimentación formados por relaciones causa-efecto (representados con una flecha) entre las variables, formando relaciones circulares (Senge P. , 1997). Dada una relación causa-efecto entre la variable 1 (x_1) sobre la variable 2 (x_2), ésta solo puede ser de 2 tipos: si un aumento (disminución) sobre x_1 lleva a un aumento (disminución) sobre x_2 hay una *polaridad positiva* (+), ver figura 2.A. Si ocurre lo contrario, es decir, un aumento (disminución) sobre x_1 lleva a una disminución (aumento) sobre x_2 hay una *polaridad negativa* (-), ver figura 2.B (Sterman, 2000). Formalmente la polaridad se representa por el signo de la derivada parcial de la variable causa (x_1) respecto a la variable efecto (x_2):

$$Polaridad = Signo\left[\frac{\partial x_1}{\partial x_2}\right]$$

Donde la instrucción “Signo” retorna +1 si la derivada es positiva o -1 si es negativa (Sterman, 2000)

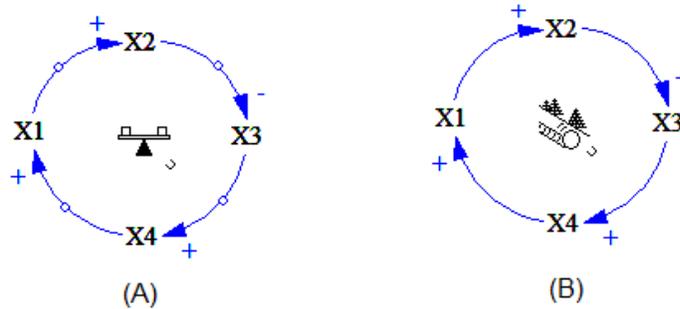


Figura 3. (A) Ciclo de balance, (B) ciclo de refuerzo.

A partir de la relación establecida entre las variables del sistema estudiado, se construyen ciclos de realimentación, los cuales pueden presentar 2 y solo 2 tipos de comportamientos, de balance y de refuerzo (Figura 3.A y 3.B, respectivamente). Toda dinámica surge de las interacciones de estos 2 tipos de ciclos de realimentación (Sterman, 2000). Los primeros generan fuerza de resistencia al crecimiento, manteniendo al sistema dentro del rango normal de operación. Estos surgen de actividades auto-correctivas y están vinculados con la búsqueda de un objetivo, del balance o equilibrio (Senge, 1997). Por otro lado, los ciclos reforzadores corresponden a un crecimiento exponencial, que ocurre a un paso acelerado y generan su propio crecimiento (Senge, 1997; Sterman, 2000). Empleando la notación mencionada y el pensamiento sistémico, se genera un esquema que representa la dinámica del sistema-problema estudiado, llamado *diagrama causal*.

Un diagrama causal explica en palabras las relaciones y procesos de realimentación, sin embargo no se puede simular. Para ello se crea un modelo de flujos y niveles, que permite, según Senge (1997), darle vida al diagrama causal. En este tipo de modelo existen principalmente dos (2) variables, como su nombre lo indica, flujos y niveles. Los niveles son reservorios o contenedores, mientras que los flujos son las únicas variables que modifican los niveles (Senge P. , 1997). En un entorno químico un nivel se puede definir como los reactantes o productos, mientras que, los flujos corresponden a la velocidad de la reacción (Sterman, 2000). Formalmente se definen como:

$$Nivel(t) = \int_{t_0}^t [Flujos_{entrada}(s) - Flujos_{salida}(s)] ds + Nivel(t_0),$$

$$\frac{d(Nivel)}{dt} = Flujos_{entrada}(t) - Flujos_{salida}(t).$$

Por último, en Dinámica de Sistemas se buscan explicaciones endógenas, lo cual hace referencia a una explicación en términos de interacciones de las variables representadas en el modelo, a partir de la definición de las leyes de interacción definidas.

Hasta ahora se mostraron los temas de forma acorde a los pasos para simular en dinámica de sistemas, desde el cambio de mentalidad para abordar los problemas, hasta la construcción del diagrama de flujos y niveles. *“El arte del modelamiento por dinámica de sistemas se representa con ciclos de realimentación que, a través de una estructura de flujos y niveles y relaciones no lineales, determina la dinámica del sistema estudiado”* (Sterman, 2000).

Las variables de flujo para el modelo biológico a simular corresponden a ecuaciones de velocidad enzimática, procesos de transporte y de difusión.

4.2 Cinética enzimática

El mecanismo más simple para representar la catálisis enzimática se presenta como,



Figura 4. Mecanismo de catálisis enzimática

Donde E es la enzima libre, S el sustrato, ES el complejo enzima sustrato y P el producto. La reacción catalizada es $S \rightarrow P$, donde la enzima E nose consume y se regenera después de la reacción.

$$v_o = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]_o}{[S]_o + K_s}; \quad (1)$$

El primer modelo para la ecuación de velocidad enzimática lo propuso Henri en 1903 y luego fue confirmado por Michaelis y Menten diez años después (Segel, 1993). En este modelo se asume que la enzima, el sustrato y el complejo enzima sustrato se encuentran en equilibrio termodinámico, es decir que la velocidad a la que se disocia ES en $E+S$, es mucho más rápido que la ruptura del complejo en $E+P$ (Segel, 1993), este supuesto se conoce como equilibrio rápido. Adicional al anterior, el modelo presenta los siguientes supuestos: (i) la concentración de sustrato es mucho mayor a la concentración de enzima, la concentración del

complejo ES se mantiene constante; (ii) la formación de producto está limitada por la ruptura del complejo ES y (iii) solo se mide la velocidad en etapas tempranas de la reacción, luego la velocidad del proceso inverso es insignificante. El mecanismo y la correspondiente ecuación de velocidad presentada por Michaelis y Menten, en base al trabajo de Henri se presentan en la figura 1.

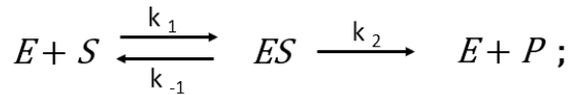


Figura 5. Mecanismo propuesto por Henri-Michaelis-Menten.

Posteriormente Briggs y Haldane presentan una deducción bajo el supuesto de estado estacionario, el cual es más robusto y general (Purich, 2010). Se obtiene una ecuación de la misma forma, sin embargo la ecuación de velocidad inicial está en función de la constante de Michaelis (K_m) y no de la constante de disociación (k_s) como lo presenta el modelo de Henri-Michaelis-Menten.

$$v_o = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]_o}{[S]_o + K_m}; \quad (2)$$

Los estudios para determinar la velocidad inicial (v_o) de una enzima están destinados a conocer mecanismos de reacción, estructura del sitio activo, la posible regulación *in vivo*, parámetros cinéticos y efecto de inhibidores que permiten construir una ecuación cinética acorde a un modelo propuesto que puede ser verificado por datos experimentales (Segel, 1993; Purich, 2010). La determinación de la velocidad inicial se realiza en ausencia de producto o cuando su concentración es despreciable, permitiendo determinar la velocidad al momento de comenzar la reacción (v_o), cuando $[S]=[S]_o$ y no en un tiempo t de iniciada la reacción (Levine, 2004). En la practica, se usan tiempos cortos despues de iniciada la reaccion, donde la velocidad de la misma es lineal respecto a la concentración de sustrato.

4.3 Difusión

El proceso de difusión ocurre por el movimiento macroscópico de los componentes de un sistema, generado por la diferencia de concentración espacial. En este modelo se asume que el movimiento de las moléculas de los componentes es al azar, sin embargo la dirección de la difusión ocurre en mayor cantidad hacia la región de menor concentración, ocasionando un caudal neto. Finalmente, después

del movimiento ocasionado por la diferencia de concentraciones, se alcanza un estado de equilibrio, donde la concentración es la misma en todo el sistema.

Experimentalmente se sabe que el flujo (caudal) es directamente proporcional al gradiente de concentración, y se relacionan a través del coeficiente de difusión. Esto corresponde a la primera ley de Fick, la cual se escribe como:

$$J_x = \frac{dn_x}{dt} = -DA \frac{dC}{dx}; \quad (3)$$

Donde D (cm^2/s) es el coeficiente de difusión, dC/dx es el cambio de la concentración respecto a la coordenada x y A es el plano donde ocurre la difusión (cm^2), el cual es perpendicular al eje x .

El metabolismo se define como las reacciones químicas acopladas, interconectadas y organizadas, que ocurren dentro de un sistema vivo para poder cumplir sus funciones vitales, sintetizando diferentes compuestos químicos y formando redes altamente integradas y reguladas, que responden a sus necesidades (Stryer et al., 2008). No son reacciones aisladas, ni se deben estudiar individualmente, por el contrario se requiere un enfoque sistémico para estudiar el metabolismo como sistemas de reacciones interdependientes (Sthephanopoulos et al., 1998). De esta manera se propone construir un modelo de simulación del ciclo de Krebs en *A. niger* para encontrar las condiciones que lleven a una mayor producción de AC.

5. ESTADO DEL ARTE

Se presentan los avances hechos en relación a la acumulación de AC en *A. niger*, tanto los resultados de ensayos experimentales como aquellos logrados por modelos *in silico*¹. Los hallazgos experimentales son de gran importancia para éste proyecto, serán tomados en cuenta en la construcción del modelo y permitirán evaluar alternativas no estudiadas hasta la fecha.

Entre los principales hallazgos experimentales, estala identificación de los eventos más importantes que llevan a la acumulación de AC en *A. niger*: (i) toma de glucosa por difusión simple, (ii) flujo glicolítico ilimitado, (iii) desacople en re-oxidación de NADH produciendo menos ATP y disminuyendo el anabolismo (Legiša & Matthey, 2006). Respecto al primer tópico mencionado, se han reportado transportadores de baja y alta afinidad para glucosa, sin embargo, se

determinó que su entrada al interior del organismo corresponde a un proceso controlado únicamente por difusión simple, ya que se obtuvo un comportamiento lineal respecto a la concentración de glucosa (Legiša & Matthey, 2006).

Un descubrimiento importante fue realizado por Cleland y Johnson (1954), afirmando que un rendimiento superior al 66% solo puede ocurrir cuando la molécula de dióxido de carbono liberada por la piruvato deshidrogenasa no se pierde, siendo capturada por la piruvatocarboxilasa para sintetizar oxaloacetato. Como ésta enzima se encuentra en el citosol, el oxaloacetato se reduce a malato vía malato deshidrogenasa, luego entra a la mitocondria por el transportador antiportemalato/citrato. Al ingresar al ciclo de Krebs, se oxida en oxaloacetato siendo sustrato de la citrato sintasa (Kubicek C. P., 1988). Por este motivo procesos de excesiva aireación a nivel industrial, pueden disminuir el rendimiento (Papagianni, 2007).

En cuanto a la organización de las enzimas del ciclo de Krebs, se determinó que la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -CGDH) es nula, generando un bloqueo, lo que podría explicar parte del mecanismo de acumulación de AC en *A. niger* (Röhr & Kubicek, 1978). También se reportó la importancia entre la afinidad del transportador de citrato hacia el citosol, ya que existe una competencia entre éste transportador y la aconitasa, luego una mejor afinidad implicaría un aumento en la acumulación de AC sin necesidad de haber un cuello de botella. (Torres et al., 2000) (Karaffa & Kubicek, 2003). El hecho de que exista un bloqueo en el ciclo de Krebs y que haya cantidades de metabolitos después de éste, indica que su formación corresponde a la reversibilidad de los pasos posteriores al catalizado por la α -CGDH (Röhr & Kubicek, 1978). También es un indicio de que todo el fumarato y malato se produce a partir de oxaloacetato (Röhr & Kubicek, 1978).

Otra vía a considerarse es la Pentosas fosfato en *A. niger*. En estado inicial de crecimiento, ésta vía está más activa que la glicólisis, pero luego al llegar a la fase de acumulación de AC ocurre lo contrario, la vía de la glicólisis predomina. Este intercambio comienza a las 24 horas de cultivado y se acelera después de 40-50 horas para *A. niger* (Legiša & Matthey, 1986). Por otra parte Cleland y Johnson (1954), determinaron que en la fase de crecimiento la proporción del flujo de glicólisis frente al flujo de la vía de PP es de 2:1, mientras que en la fase de acumulación de AC se llega a una proporción de 4:1. Aunque los dos resultados divergen al determinar la vía predominante en la fase de crecimiento, coinciden al afirmar que durante la fase de acumulación de ácido cítrico la glicólisis es la vía metabólica de mayor actividad.

Otro aspecto importante es la ubicación, regulación y actividad de la enzima ATP: citrato oxalacetatoliasa (ATP citrato sintasa), la cual cataliza la conversión del citrato citosólico, en oxaloacetato. Esta reacción produce acetil-CoA y requiere la hidrólisis de una molécula de ATP.

Esta reacción es de importancia en la síntesis de lípidos, ya que es la principal responsable de la síntesis de acetil-CoA (Pfitzner et al., 1987). Esta enzima está ligada fuertemente al estado energético del organismo y de la cantidad de ácidos grasos acil-coA presentes. Es inhibida por AMP y fuertemente por palmitol-CoA (Pfitzner et al., 1987). Por otro lado, se reporta que el complejo 1 (NADH: Ubiquinonaoxidoreductasa) no está activo en la fase de acumulación de AC, oxidándose NADH por una vía alterna, sin generar un gradiente de protones que lleve a la síntesis de ATP en *A.niger*(Prömper C, 1993; Wallrath, Schmidt, & Weiss, 1991).

Durante la fase de acumulación de ácido cítrico hay una baja tasa de síntesis de lípidos, un proceso que demanda una alta cantidad de ATP, que es ocasionado por la disminución en la actividad del ciclo de Krebs, como por la presencia de una vía alterna para la oxidación de NADH que no lleva a sintetizar ATP.

Paralelamente, se tienen avances a partir de la construcción de modelos *in silico*. Un importante avance fue realizado por Torres *et al.* (2000), formulando un sistema de ecuaciones diferenciales que surgen del balance de masas hecho sobre los diferentes compuestos del ciclo de Krebs, a partir de esto se optimiza y encuentran las condiciones que lleven a maximizar el AC, sin embargo, en el estudio no se toma en cuenta el metabolismo de ácidos grasos ni la vía alterna para la oxidación de NADH. Por otro lado no se aborda el problema desde una perspectiva sistémica, y no se puede observar la dinámica del sistema a partir del modelo construido.

David *et al.* (2003) realizó un modelo del metabolismo del carbono empleando un modelo de programación lineal que predice el comportamiento metabólico del *A. niger*, sin embargo no buscaba una maximización del AC. También se reporta la simulación del ciclo de Krebs empleando DCA (DynamicCellularAutomata)(Wishart *et al.*, 2004), para ello se usó un modelo simplificado en términos de cinética enzimática. De la simulación del modelo se obtiene una correspondencia parcial con datos experimentales, al igual que predicciones razonables de cepas mutantes.

Con dinámica de sistemas se han simulado modelos biológicos y bioquímicos, como por ejemplo el modelo presa-depredador de Lotka-Volterra y la cinética de una reacción enzimática. Otros modelos tratados son: dinámica de poblaciones, selección natural, modelos de infección, detección del olor, crecimiento vegetal, movimiento de población de monos, entre otras (Hannon & Ruth, 1997). Abordar problemas bioquímicos con dinámica de sistemas no es nuevo, sin embargo no se ha reportado un modelo sobre el ciclo de Krebs, ni el mejoramiento de la acumulación de AC usando éste paradigma en la simulación.

6. OBJETIVOS

6.2 Objetivo General.

Contribuir a la comprensión del mecanismo de acumulación de ácido cítrico en el hongo *Aspergillus niger* al abordar el problema desde una perspectiva sistémica.

6.3 Objetivo del Proyecto

Construir un modelo de simulación por Dinámica de Sistemas para estudiar el comportamiento del ciclo de Krebs en el hongo *A. niger* encontrar las condiciones que lleven a una mayor producción de ácido cítrico.

6.4 Objetivos Específicos

- Identificar los principales eventos bioquímicos que intervienen en la acumulación de ácido cítrico dentro del ciclo de Krebs en *A. niger*.
- Construir el *diagrama causal* del problema estudiado y definir la *hipótesis dinámica*.
- Elaborar el modelo de *flujos y niveles* a partir del *diagrama causal* que describa la dinámica del ciclo de Krebs.
- Identificar los procesos de transporte y flujos metabólicos más importantes en la acumulación de ácido cítrico.
- Definir los parámetros en los procesos identificados que lleven a la mayor acumulación de ácido cítrico a partir del modelo de simulación.

7. SUPUESTOS

1. Se emplearan ecuaciones diferenciales de primer orden no lineales para representar los cambios presentes en el sistema bioquímico. Al ser un modelo determinístico no se puede representar diferentes fuentes de variabilidad, como cambios de temperatura, cambios en el ambiente y diferencia entre célula y célula.
2. Aunque *A. niger* es un organismo eucariota que presenta diferentes organelos y compartimentos, se asume que los metabolitos e iones presentes se distribuyen rápidamente, de forma tal que su concentración es uniforme.
3. Aunque *in vivo* el tamaño de la célula varía por el crecimiento, durante la simulación se asume un volumen constante.
4. La temperatura es constante durante el tiempo de simulación, dada la alta relación superficie/volumen la energía de los procesos exotérmicos se intercambia con el entorno rápidamente, alcanzando el equilibrio térmico.
5. En toda la célula y los compartimentos se debe cumplir la electroneutralidad. No se consideran cambios de pH.
6. La presión interna y externa están en equilibrio. Equilibrio mecánico.
7. La variable correspondiente a la concentración de AMP se define en función de las concentraciones de ATP y ADP. La hidrólisis del ATP en AMP se consideró equivalente a la hidrólisis del ATP en ADP.
8. La suma de las cantidades de ATP y ADP son constantes en todo momento de la simulación, no se considera el AMP. Esto también se asume para las cantidades de NADH y NAD⁺, e igual para FAD y FADH₂.

8. METODOLOGÍA

8.1 Identificación de procesos a considerar en el modelo de simulación

Para la construcción del modelo de simulación, en primer lugar se determinaron los límites del sistema, se identificaron las variables que tienen importancia entorno a la problemática estudiada (Stermán, 2000). A continuación se presentan las principales vías metabólicas que tienen lugar en un organismo eucariota y los argumentos para considerarla o no en el modelo de simulación:

- Ciclo de Krebs (Ciclo del ácido cítrico)
- Vía de las pentosas fosfato
- Ciclo del glioxilato
- Glicólisis
- Gluconeogénesis
- Anabolismo y catabolismo de los aminoácidos
- Metabolismo de los ácidos grasos
- Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa

Ciclo de Krebs: el ciclo del ácido cítrico es el eje central del metabolismo celular (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2008). En condiciones aerobias, los carbohidratos ingresan a esta vía y son oxidados, siendo el primer paso la síntesis de citrato a partir de oxaloacetato y acetyl-CoA por la enzima citrato sintasa. Diferentes autores explican el proceso de acumulación de ácido cítrico a partir de sus estudios. Por ejemplo Kubicek *et al.* (1978) concluyen que la acumulación de ácido cítrico ocurre por un bloqueo en el ciclo de Krebs en la reacción catalizada enzimáticamente por la α -cetoglutarato deshidrogenasa, mientras que Lockwood (1975) argumenta que este proceso se da por una inhibición de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitasa.

Adicional a esto, han ocurrido otros hallazgos que pueden ayudar a comprender el proceso de acumulación de ácido cítrico. Maet *et al.* (1981) muestran que la acumulación de ácido cítrico es precedido por una acumulación de malato, mientras que Ahmed *et al.* (1972) afirman que todas las enzimas del ciclo se encuentran presentes cuando ocurre la etapa de acumulación.

Se reporta que el hongo *A. niger* presenta dos etapas de crecimiento, la primera corresponde a un crecimiento y la segunda a una etapa de producción de ácido cítrico. Dado que existe evidencia de que todas las enzimas del ciclo de Krebs están presentes durante la etapa de acumulación de ácido cítrico y que a su vez, diferentes autores explican este proceso en función de estas enzimas, el ciclo de Krebs será considerado en el modelo de simulación.

Vía de las pentosas fosfato: en estado inicial de crecimiento, ésta vía está más activa que la glicólisis, pero al llegar a la fase de acumulación de AC ocurre lo contrario, la vía de la glicólisis predomina. Este intercambio comienza a las 24 horas de cultivado y se acelera después de 40-50 horas para *A.niger*(Legiša & Matthey, 1986). Por otra parte Cleland y Johnson (1954), determinaron que en la fase de crecimiento la proporción del flujo de glicólisis frente al flujo de la vía de PP es de 2:1, mientras que en la fase de acumulación de AC se llega a una proporción de 4:1. Aunque los dos resultados divergen al determinar la vía predominante en la fase de crecimiento, coinciden al afirmar que durante la fase de acumulación de ácido cítrico la glicólisis es la vía metabólica de mayor actividad.

La simulación se realiza mientras el organismo se encuentra en la etapa de acumulación de AC, cuando la glicólisis predomina, y no durante la fase de crecimiento. No se reporta que ésta vía sea de alta importancia para el proceso de acumulación de AC, por lo que la vía de las pentosas fosfato solo se considera como un parámetro que disminuye el flujo de la vía de la glicólisis.

Ciclo del Glioxilato: este proceso tiene compuestos en común con el ciclo de Krebs, como el isocitrato, malato, oxalacetato y el citrato. Sin embargo, ocurre en un lugar diferente a donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs, en los glioxisomas (Sthephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998).

Kubiceket *al.* (1988) han reportado que la enzima isocitratoliasa, no se encuentra expresada durante la fase de acumulación de ácido cítrico, periodo a simular. Adicional a esto se requiere información cinética de las enzimas y transportadores involucrados que no se encuentra disponible, lo que dificulta la elaboración del modelo. Por lo anterior este ciclo metabólico no se considera.

Glicólisis y gluconeogénesis: la glicólisis lleva a la formación directa de piruvato, la entrada principal de moléculas de carbono al ciclo de Krebs. La influencia de esta vía metabólica sobre la acumulación de ácido cítrico ha sido ampliamente discutida y estudiada por Torres *et al.* (2000) a través de la formulación de un modelo matemático de ecuaciones diferenciales de primer orden. A partir del modelo se concluye que deben modificarse siete de las diez enzimas que están presentes en esta vía para lograr una mejora sobre la acumulación de ácido cítrico.

La gluconeogénesis y la glicólisis son procesos que no ocurren de forma simultánea, cuando una vía se encuentra en funcionamiento se genera la inhibición de la otra (Stryer *et al.*, 2008). Entre los requerimientos para generar un proceso de acumulación de ácido cítrico está la formación de un flujo de glicólisis casi ilimitado. La fosfofructoquinasa 1 (*pfk1*) es una enzima reguladora de la glicólisis, sin embargo en las condiciones de acumulación de ácido cítrico esta se ve afectada por diferentesefectores, que en conjunto generan un flujo no regulado (Papagianni, 2007). Se sabe que la concentración de citrato y ATP tienen un

impacto negativo sobre la actividad de la *pfk1*, mientras que el ion amonio (NH_4^+) tiene un efecto contrario; esto lo confirmó experimentalmente Papagianni (2007), quien encontró que la acumulación de ácido cítrico ocurre cuando se alcanza una concentración determinada de amonio. No se encontró información sobre la actividad o importancia de la gluconeogénesis en el proceso de acumulación de ácido cítrico. Por lo anterior se considera la glicólisis y no la gluconeogénesis en el modelo de simulación.

Metabolismo de los ácidos grasos: respecto a esta vía metabólica, se reporta que no presenta un flujo considerable durante la etapa de acumulación de ácido cítrico (Torres *et al.*, 2000). Sin embargo, dado que la oxidación de los ácidos grasos genera moléculas de acetil-CoA en la mitocondria, se espera que al ser considerado en el modelo se pueda lograr una mejora significativa en el objetivo buscado y del cual no se ha reportado algún estudio previo.

El producto de la oxidación de los ácidos grasos al condensarse con el oxalacetato es ácido cítrico, de tal forma que las reservas de ácido graso y carbohidratos serían empleadas en la formación de ácido cítrico, llevando probablemente a un aumento en su producción. Según Pfitzner *et al.* (1987), el proceso es regulado por la enzima ATP:citratoliasa, la cual ha sido caracterizada cinéticamente. Por lo anterior este proceso será considerado en forma de variables de Nivel y de Flujo sujetas a las reglas de comportamiento definidas para el modelo, variables endógenas.

Fosforilación Oxidativa y Cadena de Transporte de Electrones (CTE): este proceso acopla la oxidación de moléculas obtenidas en el ciclo de Krebs con alto potencial de reducción, NADH y FADH_2 , con la síntesis de ATP y la reducción de oxígeno (Stryer *et al.*, 2008). Los estudios realizados por Wallrath *et al.* (1991) y Prömper *et al.* (1993) convergen en presentar la actividad del *complejo 1* (NADH ubiquinona oxidoreductasa) y la relación NADH/NAD^+ como las principales causas del proceso de acumulación de ácido cítrico.

A partir de la información anterior se considera relevante estudiar en detalle el ciclo de Krebs y su acople con la Fosforilación Oxidativa como vía final de oxidación de diferentes moléculas orgánicas. Este proceso será considerado como variables endógenas del sistema.

Finalmente, a partir de los anteriores argumentos se presentan los procesos metabólicos considerados en el modelo de simulación, de igual forma se especifica si se toman como variables endógenas o exógenas (Tabla 1).

Tabla1. Vías metabólicas consideradas en el modelo de simulación.

Vía metabólica	Variable(s) endógena(s)	Variable exógena	No se considera
Ciclo de Krebs	X		
Vía Pentosas Fosfato		X	
Metabolismo de aminoácidos			X
Metabolismo de los ácidos grasos	X		
Glicólisis		X	
Gluconeogénesis		X	
Cadena de transporte de electrones	X		
Síntesis de porfirinas			X
Ciclo del glioxilato			X

8.2 Descripción del sistema de estudio

Una vez identificados los eventos a considerar, el siguiente paso es estudiarlos y encontrar la forma como se relacionan.

En las condiciones de acumulación de ácido cítrico se emplean diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, manosa, fructosa, maltosa) (Papagianni, 2007), estos carbohidratos entran a la vía de la glicólisis, un proceso catabólico. La glicólisis o vía Embden-Meyerhof-Parnas, es una vía metabólica presente en la mayoría de grupos de organismos, incluyendo los hongos filamentosos. En general consta de 10 reacciones catalizadas enzimáticamente que ocurren en el citoplasma de forma anaerobia o aerobia, las cuales convierten la glucosa (molécula de 6 carbonos) en dos moléculas de piruvato, suministrando energía libre para la producción neta de dos moléculas de ATP (Waites, Morgan, Rockey, & Higton, 2001). El último compuesto de dicha vía es el piruvato, el cual es un punto de ramificación (Branchpoint) (Melo & Cuamatzi, 2007).

Las tres enzimas claves para la regulación de la glicólisis son la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. Sin embargo Ruijter *et al* (1996) encontró que el sobre expresar las dos últimas enzimas mencionadas, bien de forma independiente o combinada, no conducen a una mayor producción de ácido cítrico.

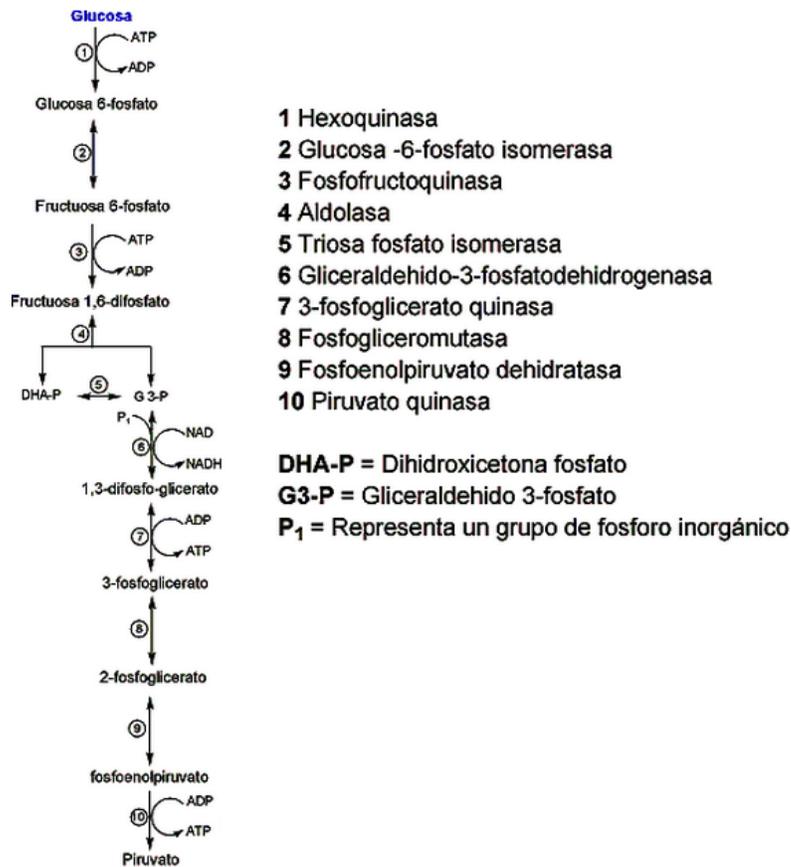


Figura 6. Glicólisis o vía Embden-Meyerhof-Parnas (Fuente: [http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/viewer.aspx?path=dorland&name=pathway Embden-Meyerhof.jpg](http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/viewer.aspx?path=dorland&name=pathway+Embden-Meyerhof.jpg))

Torres *et al* (2000) presenta un modelo de optimización lineal, donde concluye que las enzimas que catalizan siete de las diez reacciones de la glicólisis, deben aumentar su expresión de forma conjunta para llevar a un aumento considerable de ácido cítrico. Como el anterior grupo de investigación encontró el efecto de esta vía metabólica sobre la producción de ácido cítrico, se toma la glicólisis como un parámetro del sistema, una variable exógena. Dado que el objetivo general del presente trabajo es contribuir a la comprensión del mecanismo de acumulación de ácido cítrico desde una perspectiva sistémica, se busca aportar y complementar los estudios realizados al proponer una explicación en términos de las variables endógenas del modelo a construir, mas no recrear los resultados obtenidos previamente por Torres *et al* (1994) y Torres *et al* (2000).

Otro proceso metabólico a considerar en el modelo es el ciclo de Krebs. En forma general, es la vía final de oxidación para las moléculas orgánicas (aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos), lo que conduce a la formación final de moléculas reducidas (NADH y FADH₂), dióxido de carbono e intermediarios para procesos anabólicos. Existe amplia información sobre la regulación presente en el ciclo de

Krebs para el hongo *A. niger*, a continuación se presenta de forma resumida lo reportado para cada enzima de este ciclo:

La enzima citrato sintasa es la encargada de catalizar la formación de citrato a partir de oxaloacetato y acetil-CoA. Se reporta que esta enzima sufre inhibición competitiva por parte de la coenzima, la cual es similar al sustrato origina de esta enzima, acetil-CoA. También ocurre inhibición no competitiva del oxaloacetato, sin embargo no parece tener un impacto importante sobre su actividad, la cual se encuentra regulada por la disponibilidad de los sustratos (Kubicek, 1988). Esta enzima mitocondrial presenta un mecanismo secuencial ordenado y no se reporta que juegue un papel regulatorio en la acumulación de ácido cítrico (Punekar, Vaidyanathan, & Appaji, 1984).

La aconitasa, enzima que cataliza la isomerización del ácido cítrico y el isocitrato, aunque se encuentra activa durante la fase de acumulación de ácido cítrico, disminuye a medida que se aumenta la cantidad de éste ácido orgánico. No se reporta inhibición (Szczo drak, 1981). Se concluye que la función de esta enzima es catalizar el equilibrio entre el citrato y el isocitrato (Kubicek & Röhr, 1985).

Se encontraron dos tipos de isocitrato deshidrogenasa, la primera usa NAD^+ (NAD^+ -IDH) y la segunda NADP^+ (NADP^+ -IDH) como sustrato. La primera enzima es muy lábil y difícil de manejar, por eso se caracterizó a partir de la NAD^+ -IDH de *N. crassa* ya que presenta un comportamiento similar (Kubicek C. , 1988), y se reportan parámetros cinéticos necesarios para su modelamiento. Adicionalmente se encontró que es inhibida por ATP, coenzima A (Kubicek C. , 1988) y α -cetoglutarato (Kubicek & Röhr, 1978). Por otro lado la NADP^+ -IDH presenta un comportamiento michaeliano para ambos sustratos y es inhibida por NADPH, citrato, oxaloacetato y α -cetoglutarato siendo su actividad ocho veces, en promedio, mayor que la primera (Szczo drak, 1981).

Varios estudios presentan a la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -CDH) como la causante de la acumulación de ácido cítrico en *A. niger*. Se afirma que esta enzima ocasiona un bloqueo en el ciclo de Krebs, lo que inhibe el catabolismo del citrato y lleva a su acumulación y expulsión de la mitocondria. Del estudio realizado Meixner-Monoriet *al* (1984) sobre la α -CDH de *A. niger*, se encontró:

- Presenta una cinética michaelina respecto a sus sustratos.
- Es inhibida por la concentración de oxaloacetato, NADH (inhibición por producto), y succinato.
- No se encontró que la relación AMP/ATP tenga un efecto sobre su actividad.
- Presenta un mecanismo hexa-Uni Ping-Pong
- Se determinaron todos los parámetros cinéticos y constantes de inhibición.

La enzima Succinil-CoAsintasa no se reporta que haya sido aislada, por lo cual no se encontró información sobre parámetros cinéticos.

Respecto a la succinato deshidrogenasa, no se encontró información que la relacione de forma directa con la acumulación de ácido cítrico. El succinato se encuentra en baja concentración durante la fase de acumulación (Kubicek & Röhr, 1978) lo que indica que la reacción en mayor proporción ocurre *hacia adelante*. Esta enzima es inhibida por oxaloacetato

La última enzima del ciclo de Krebs es la malato deshidrogenasa, que se encuentra bien caracterizada, reportándose sus parámetros cinéticos. Es regulada por la relación NADH/NAD⁺, no por inhibición sobre la actividad de la enzima sino por su disponibilidad de sustrato (Ma, Kubicek, & Röhr, 1981). Existen dos isoenzimas, la primera ubicada en la mitocondria y la segunda en el citosol, para ambas, a nivel experimental se encontró que están muy desplazadas hacia la formación de malato y NAD⁺. Respecto al mecanismo, este se define como un mecanismo bi-bi ordenado.

Volviendo a la glicólisis, el último paso de esta vía es la formación de piruvato, el cual, como se había mencionado, es un punto de ramificación (branchpoint). Este compuesto puede ser usado para sintetizar oxaloacetato, reacción catalizada por la piruvatocarboxilasa, o puede ser transportado a la mitocondria donde es usado como sustrato por el complejo piruvato deshidrogenasa, formando acetil-CoA.

El oxaloacetato formado en el citoplasma a partir del piruvato, no es permeable a la mitocondria, por ello debe primero reducirse a malato, reacción catalizada por la malato deshidrogenasa citoplasmática, para poder entrar. Una vez dentro de la mitocondria, se oxida para formar nuevamente oxaloacetato que junto con acetil-CoA forma citrato (base conjugada del ácido cítrico). En otros organismos, el camino que toma el piruvato depende de la relación acetil-CoA / CoA, cuando hay gran cantidad del primero se indica que no hay oxaloacetato suficiente (sustrato para la enzima citrato sintasa) para reaccionar, por dicho motivo se favorece la actividad de la piruvatocarboxilasa. Sin embargo en *A. niger* no se presenta este tipo de regulación y se encuentra activa en todo momento del proceso de acumulación de ácido cítrico (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2008).

El metabolismo de los ácidos grasos permite acumular el exceso de energía almacenada como intermediarios del ciclo de Krebs, esto a través del citrato transportado al citoplasma que permite la síntesis de acetil-CoA. Por otro lado se pueden obtener moléculas de acetil-CoA mitocondrial a partir de la oxidación de los ácidos grasos (en la mitocondria), las cuales entran al Ciclo de Krebs. Este proceso es completamente regulado por la ATP-Citrato liasa, una enzima constitutiva (Pfitzner *et al.*, 1987), la cual cataliza la siguiente reacción:



Figura 7. Reacción catalizada por la enzima ATP citrato liasa

La ATP-Citrato Liasa no es la única enzima que forma Acetil-CoA en el citosol, sin embargo es la principal responsable, al estar en mayor proporción y contar con

8.3 Construcción del Diagrama causal e Hipótesis Dinámica

En la figura 8 se presentó el sistema de estudio, sin embargo tal representación no permite entender los procesos de retroalimentación y relaciones causales. Para obtener esta información se decidió agrupar variables que presentan un comportamiento similar en la dinámica estudiada.

Lo anterior se hace con el objetivo de representar de forma sencilla los procesos de realimentación, sin entrar en detalle con los diferentes componentes del sistema, como productos, sustratos y enzimas. La figura 8, aunque útil para entender los diferentes procesos químicos, no permite tener una idea sobre el comportamiento dinámico del sistema, y menos generar una estrategia para resolver la problemática planteada, identificar los procesos bioquímicos que incrementen la acumulación de ácido cítrico en *A. niger*.

Para empezar, el ciclo de Krebs se puede dividir en dos grupos, el primero corresponde a los compuestos que se oxidan para obtener NADH o FADH₂, (isocitrato, α -cetoglutarato y succinil-CoA), y el segundo corresponde a los compuestos que permiten la regeneración del oxaloacetato lo que lleva a la continuidad del ciclo (succinato, fumarato, malato y oxaloacetato).

Con base a lo anterior, se presenta el primer aglomerado de variables, *Precursores de Ácido Cítrico*. Aeste primer grupo, aparte de los compuestos encargados de regenerar oxaloacetato en el ciclo de Krebs, pertenece el malato y oxaloacetatocitosólico y piruvato mitocondrial.

Otro aglomerado de variables son los *Compuestos precursores de NADH*. Para el sistema de estudio, son los compuestos mencionados como la primera división del ciclo de Krebs.

De igual forma en la representación de la Fosforilación oxidativa, la Cadena de Transporte de Electrones se representa como un solo proceso denominado CTE. Por último, para representar el proceso de síntesis y oxidación de los ácidos grasos en el diagrama causal, no se entra en detalle en las enzimas ni los componentes.

Después de las anteriores aclaraciones, se pasa a estudiar la causalidad de las diferentes variables identificadas en el sistema.

La vía de la glicólisis y su efecto en la acumulación de ácido cítrico, como se mencionó, fue estudiada en detalle por Torres *et al* (2000) y Torres *et al* (1994), tomándose como un parámetro del modelo. El producto final de esta vía es el piruvato (en citosol) y la generación neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que entra en la vía. Se mencionó que la glicólisis y la

gluconeogénesis no ocurren de forma simultánea en organismos eucariotas, donde la condición básica de regulación se basa en el estado energético, cuyo indicador es la carga energética (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2008), definida como:

$$Cargaenergética(CE) = \frac{ATP + 0.5 ADP}{ATP + ADP + AMP} \quad (4)$$

Si éste indicador es alto, prevalece la gluconeogénesis, de lo contrario será la glicólisis la vía predominante. El ATP es un nucleosidotrifosfato, el cuál es usado como “*divisa de energía*” (Stryer, Berg, & Tymoczko, 2008), esta molécula actúa como dador de energía libre en diferentes procesos que la requieran. Dicha energía se obtiene con su hidrólisis y la equivalencia entre estos tres compuestos (ATP, ADP y AMP) se presentó en la sección de supuestos. La relación causal entre la glicólisis, ATP y gluconeogénesis se presenta en la figura 9.

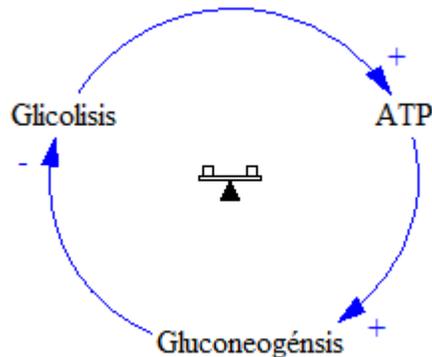


Figura 9. Regulación de glicólisis y gluconeogénesis

A partir de las relaciones mencionadas se obtiene un ciclo de balance. Por definición éste busca el equilibrio, no crece de forma incontrolada. Sin embargo, el ciclo de balance de la figura 9, no ocurre en el organismo estudiado, ya que como se ha mencionado, la glicólisis ocurre de forma no regulada. Por otro lado, no se encontró reporte alguno de la actividad de la gluconeogénesis, por lo que se supone que no tiene relevancia en la acumulación de ácido cítrico y se asume como nulo. Como no ocurre un ciclo de balance, la carga energética no tiene impacto alguno sobre la velocidad a la que ocurre la glicólisis, figura 10 a.

El piruvato es el último compuesto de la glicólisis, que posteriormente entra a la mitocondria a través de su transportador, figura 10 b. Una vez dentro de la mitocondria, el piruvato mitocondrial es un *Precursor de ácido Cítrico*. De esta forma al haber mayor flujo de glicólisis mayor será la cantidad de piruvato y mayor será la cantidad de precursores de ácido cítrico.

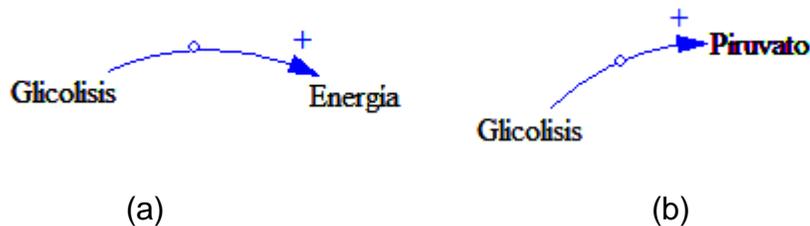


Figura 10. Relación causal de la glicólisis con la (a) carga energética y (b) piruvato

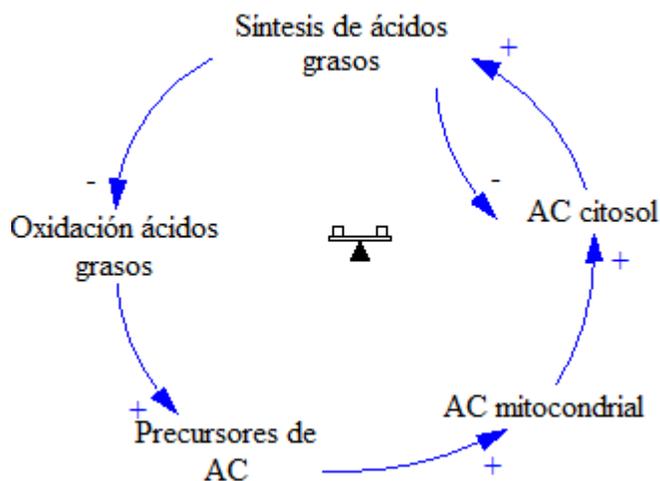


Figura 11. Metabolismo de ácidos grasos en el proceso de acumulación de AC

Otra vía a analizar es el metabolismo de los ácidos grasos, que en forma general se divide en dos: la síntesis y la oxidación. La primera es una forma de acumular energía en forma más concentrada y ocurre en el citosol, mientras que la segunda permite hacer uso de esta energía previamente almacenada y sucede en la mitocondria.

La síntesis ocurre cuando la *carga energética* es alta y abundan los carbohidratos, lo cual se mide por la cantidad de citrato en el citoplasma. En la primera etapa de éste proceso se genera malonil-CoA, el cual evita que los ácidos grasos ingresen a la mitocondria para su oxidación, al inhibir la aciltransferasa I. De esta forma la oxidación se restringe a partir del control empleado en la disponibilidad de los ácidos grasos en la mitocondria.

En la figura 11 se presentan las relaciones causales mencionadas. Al aumentar la cantidad de citrato mitocondrial, aumenta su cantidad en el citoplasma, favoreciendo la síntesis de ácidos grasos que evita la oxidación de estos ácidos en la mitocondria. Finalmente al haber menos oxidación hay menos cantidad de

precursores de ácido cítrico y en consecuencia menor cantidad de éste ácido. En conclusión, el proceso de oxidación hacer parte de un ciclo de balance.

El ciclo de Krebs genera energía no en forma de moléculas de ATP sino en forma de moléculas con un potencial de reducción alto, FADH_2 o NADH . Estas moléculas se oxidan en los diferentes complejos (I y II) de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), la cual acopla la energía libre de la oxidación con la energía libre requerida para fosforilar el ADP en ATP (Fosforilación oxidativa).

Si hay un aumento en la cantidad de *precursores de NADH*, ocurre un aumento de NADH , lo cual disminuye la disponibilidad de NAD^+ . El NAD^+ es usado como sustrato por enzimas que consumen a estos precursores, por lo que una menor cantidad de NAD^+ lleva a un aumento de los precursores de NADH , cerrando así el único ciclo de refuerzo R2 mostrado en la figura 12.

Por otro lado, si aumenta la cantidad de moléculas de NADH o FADH_2 , aumenta la actividad de la CTE. Una mayor actividad de la CTE lleva a un aumento de la cantidad de NAD^+ , lo que disminuye la cantidad de precursores de NADH y de NADH , cerrando así el ciclo de balance B1. Por simplicidad en el diagrama causal el NADH y FADH_2 se representan solamente como NADH , lo mismo aplica para NAD^+ y FAD , que se representan sólo como NAD^+ .

Al examinar el balance entre ATP, ADP y la actividad de la CTE, se obtiene un ciclo de balance B3. Un aumento en la actividad de la CTE lleva a un aumento de ATP, lo que disminuye la cantidad de ADP. Como ADP es necesario para la actividad de la CTE, esta también disminuye.

Como las cantidades de ATP y ADP en cualquier momento dado son igual a una constante, una mayor cantidad de ATP implica necesariamente una disminución en la cantidad de ADP. De igual forma, una mayor cantidad de NADH (FADH_2) implica una menor cantidad de NAD^+ (FAD).

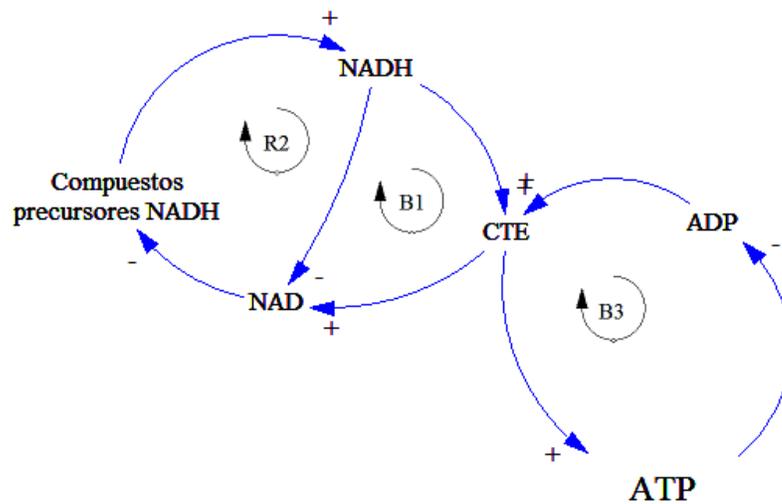


Figura 12. Fosforilación Oxidativa

Al momento de analizar la dinámica completa, considerando la CTE, se obtiene la conversión de energía (Fosforilación Oxidativa). Se hace énfasis en que se requiere tanto de ADP como de NADH para que haya una formación continua de energía en forma de ATP (Stryer *et al.*, 2008). El aceptor final de electrones es el oxígeno, sin embargo este factor no se tiene en cuenta en el modelo estudiado ya que se asume que está en alta concentración.

El organismo de estudio, *Aspergillus niger*, tiene la particularidad de contar con un complejo NADH deshidrogenasa alternativo al complejo 1 de la CTE. Esto quiere decir que puede recuperar NADH sin necesidad de contar con la disponibilidad de ADP. Este proceso alternativo de oxidación ocurre solo cuando se tiene una cantidad de NADH elevada y no está acoplado con la fosforilación de ADP en ATP. Una mayor cantidad de NADH lleva a una mayor actividad de la vía de oxidación alterna (NADH deshidrogenasa), lo cual aumenta la cantidad de NAD⁺ que disminuye la cantidad de *Precursores de NADH*. Por último al ser menor la cantidad de precursores, menor será la cantidad de NADH, cerrando así el ciclo de balance B2. Ver figura 13.

El NADH se forma a partir de la reducción de NAD⁺ y oxidación de moléculas carbonadas del Ciclo de Krebs. Al haber más NAD⁺, mayor será la cantidad de *precursores de NADH* aumentando la formación del mismo. En este punto existe una divergencia, pues una mayor cantidad de NADH implica una menor cantidad de NAD⁺, pero a la vez genera una mayor velocidad en el proceso de la CTE que llevan a su oxidación y posterior formación de NAD⁺.

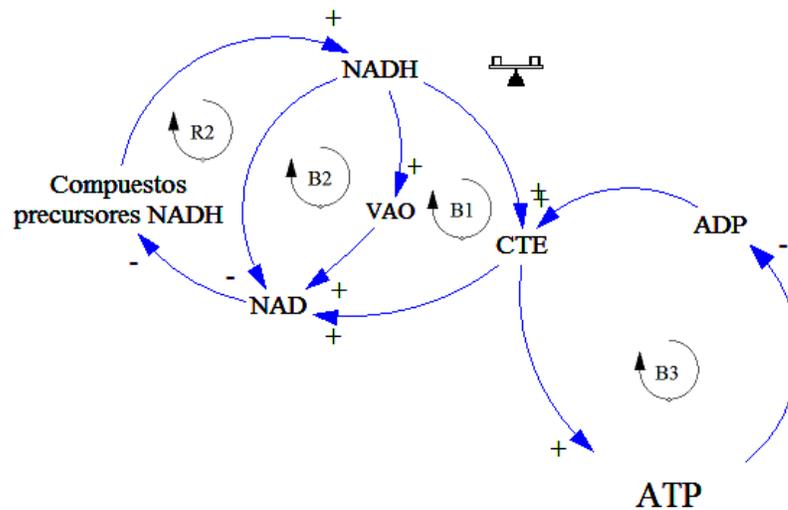


Figura 13. Fosforilación Oxidativa y vía de oxidación alterna de NADH. Donde VAO es la Vía de Oxidación Alterna.

En general, se obtiene que las variables NADH, NAD⁺ y *Precursores de NADH* se encuentra en dos ciclos de balance (B1 y B2) y uno de refuerzo (R1).

Como se ha mencionado, el ciclo de Krebs se encuentra acoplado a la Fosforilación oxidativa, ya que oxida los compuestos *Precursores de NADH* para obtener NADH a partir de NAD⁺. En la figura 14 se representa el ciclo de Krebs, de una forma simplificada y agregada, acoplado con la Fosforilación Oxidativa. A partir de esta figura se puede observar que éste ciclo de refuerzo R1 (ciclo de Krebs) esta acoplado con dos ciclos de balance.

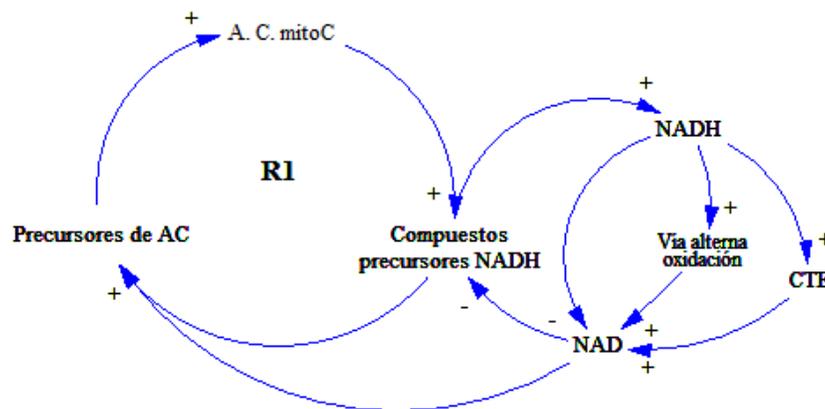


Figura 14. Ciclo de Krebs y Fosforilación Oxidativa.

El ciclo de Krebs de forma aislada es un proceso de crecimiento exponencial, sin embargo la formación de *precursores de ácido cítrico* (precursores de AC) se encuentra limitada por la disponibilidad de NAD^+ que depende de la actividad de la CTE, entre mayor sea su actividad menor será la cantidad de precursores de NADH y mayor la cantidad de precursores de citrato mitocondrial (Precursores de AC).

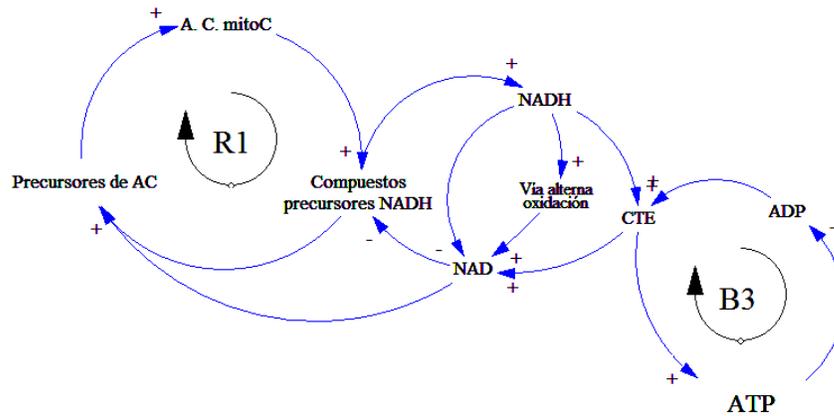


Figura 15. Ciclo de Krebs y Fosforilación Oxidativa.

A partir de lo mencionado, finalmente se presenta el diagrama causal completo del sistema de estudio. Figura 16.

Una explicación endógena para la acumulación de ácido cítrico puede surgir a partir de lo presentado en el diagrama causal. En primer lugar el Ciclo de Krebs, la vía que lleva a la síntesis de ácido cítrico (citrato mitocondrial), está limitada por la velocidad en la cual se oxida NADH . Si se oxida a menor velocidad (menor actividad de la CTE), el gasto de citrato mitocondrial es menor. Por otro lado si se favorecen los procesos de glicólisis y oxidación de ácidos grasos se espera contar con mayor cantidad de *Precursores de AC*. En otras palabras, si se aceleran los procesos de construcción de moléculas que llevan a la síntesis de AC y se evita su oxidación dentro del ciclo de Krebs se obtiene una mayor acumulación de ácido cítrico.

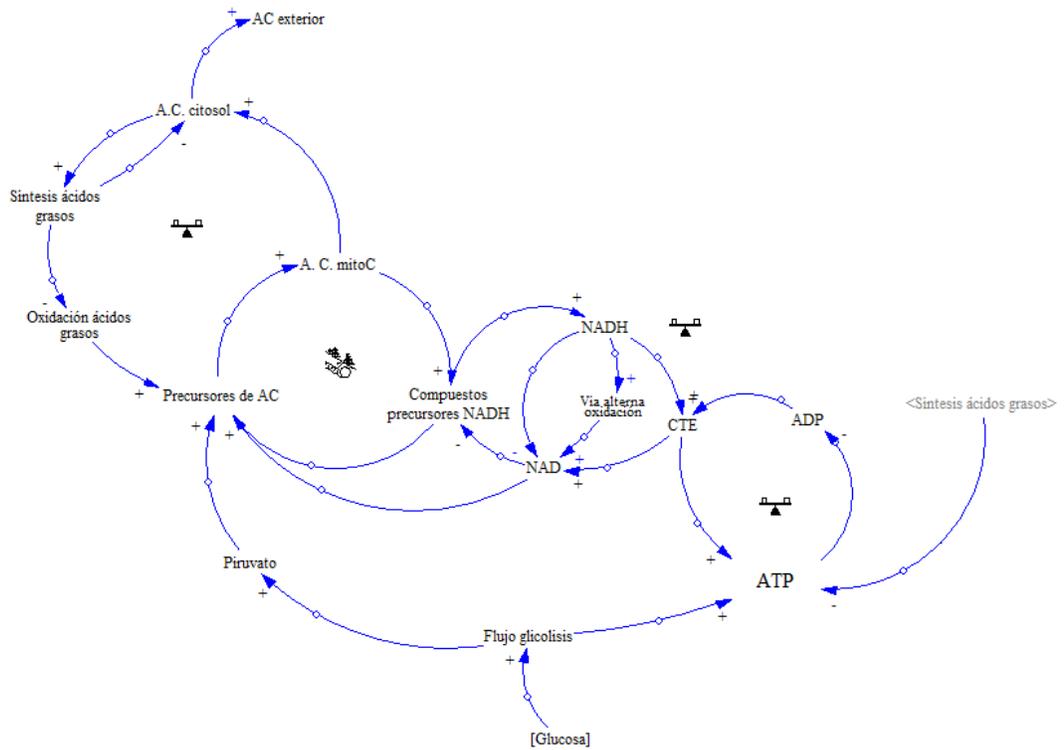


Figura 16. Diagrama causal del sistema estudiado.

8.4 Modelo de Flujos y Niveles

Anteriormente se presentó un diagrama causal agregado, el cual permite de forma cualitativa plantear una posible explicación al comportamiento dinámico del sistema entorno a la problemática planteada (hipótesis dinámica), sin embargo para tener una interpretación más acertada del sistema a simular se debe adicionar relaciones cuantitativas.

Al desagregar el diagrama causal se pasa a clasificar las variables en *Flujos* y *Niveles*, éstas se presentan en la tabla 2. Esta clasificación se hace en base a lo presentado en la definición de las mismas en el marco teórico.

Posteriormente se pasa a establecer las relaciones no lineales para cada una de las variables de flujo. A continuación se presenta el tratamiento realizado para aplicar leyes de velocidad, procesos de transporte y difusión en el sistema de estudio.

El modelo de *Flujos y Niveles* se realizó utilizando el programa Vensim ® PLE - Ventana SystemsInc, Versión 5.10e.

Tabla2. Variables de nivel y flujo identificadas en el sistema

Variables de nivel
Piruvato-m
Piruvato-c
Acetil-CoA-m
Acetil-CoA-c
Citrato-m
Citrato-c
Isocitrato
a-Cetoglutarato
Succinil-CoA
Succinato
Fumarato
Malato-m
Malato-c
Oxaloacetato-m
Oxaloacetato-c
Ácidos grasos
NADH
NAD ⁺
FAD
FADH ₂
ATP
ADP

Variables de flujo
Entrada de glucosa
Transportador de piruvato
Piruvato deshidrogenasa
Citrato sintasa
Aconitasa
Isocitrato deshidrogenasa
a-cetoglutarato deshidrogenasa
Succinil-CoAsintetasa
Succinato deshidrogenasa
Fumarasa
Malato deshidrogenasa
Piruvatocarboxilasa
Enzima málica o piruvato malato carboxilasa
ATP: citrato liasa
Transportador citrato/malato
Tasa de síntesis de lípidos
Tasa de oxidación de lípidos
Fosforilación oxidativa y CTE
Vía de oxidación alterna
Gasto de energía para mantenimiento

8.4.1 Variables de flujo

8.4.1.1 Reacción reversible

En un sistema biológico, donde las enzimas están no solo en presencia de sustrato sino también de producto, la ecuación 2 no permiten calcular apropiadamente las concentraciones del sustrato en el tiempo, ya que fueron deducidas cuando $[P]=0$ y $[S] = [S]_0$.

Para obtener una ecuación de velocidad que exprese los cambios en el tiempo de los sustratos y productos, acorde al mecanismo de la figura 4, se debe considerar el proceso reversible y un valor de concentración de producto diferente de cero. Como la velocidad *hacia adelante* depende la concentración del complejo ES , y el proceso *hacia atrás* depende de la concentración del producto y la enzima libre (Segel, 1993), se tiene:

$$v = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] \quad (5)$$

Usando el supuesto de estado estacionario, se obtiene una ecuación explícita en términos del sustrato y producto:

$$v = \frac{V_f \frac{[S]}{K_S} - V_r \frac{[P]}{K_P}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} \quad (6)$$

Donde K_S y K_P son las constantes de Michaelis para el sustrato y el producto, respectivamente, V_f y V_r son las velocidades máximas para el proceso *hacia adelante* y *hacia atrás*. La ley de velocidad de la ecuación 6 también se puede separar de la siguiente forma:

$$v = v_f - v_r; \quad (7)$$

Donde $v_f = V_f \frac{[S]}{K_S} / D$, $v_r = V_r \frac{[P]}{K_P} / D$ y $D = 1 + [S]/K_S + [P]/K_P$.

En el equilibrio la velocidad neta del proceso es cero, luego $v = 0$ y $v_f = v_r$. Despejando $[P] / [S]$ en el equilibrio, se obtiene:

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{V_f K_P}{V_r K_S} = \frac{k_2 K_P}{k_{-1} K_S} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} K_{-2}}; \quad (8)$$

La ecuación 8 corresponde a la relación de Haldane(Purich, 2010). Con base al supuesto de estado estacionario, esta relación demuestra que los parámetros cinéticos están restringidos por constantes termodinámicas (Purich, 2010), es decir, los parámetros cinéticos en un sentido se relacionan con los parámetros cinéticos en el sentido inverso. Al reorganizar la ecuación de velocidad (ecuación 6) y la relación de Haldane(ecuación 8) se obtiene una ecuación derivada de la ecuación 5.

$$v = \frac{\frac{V_f}{K_S} ([S] - \frac{[S]}{K_{eq}})}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[P]}{K_P}} ; \quad (9)$$

De esta manera se puede expresar, en términos de constantes cinéticas en sentido *hacia adelante* y la constante de equilibrio (parámetro termodinámico), el proceso reversible sin necesidad de conocer dichas constantes (Sauro, 2013).

Para determinar la dirección en que se dirige una reacción, en presencia de sustrato y producto, catalizada o no, se debe conocer la distancia al equilibrio (Segel, 1993). Por este motivo se reorganiza la ecuación 9, de tal forma que pueda tenerse un indicador en todo tiempo t que permita determinar dicho valor. Para esto se define Γ como una razón entre los reactivos y los productos en un tiempo t (no en el equilibrio), y ρ como el cociente entre Γ y la constante de equilibrio (K_{eq}). La forma como se obtiene la expresión 11 a partir de 9, 10.a y 10.b se explica en la sección de anexos.

$$\Gamma = \frac{[P]_t}{[S]_t} \quad (10.a) \quad \rho = \frac{\Gamma}{K_{eq}} = \frac{[P]_t [S]_{eq}}{[S]_t [P]_{eq}} \quad (10.b)$$

$$v = \frac{\frac{V_f}{K_S} ([S]_t - \rho[S]_t)}{D} = \frac{\frac{V_f[S]}{K_S} (1 - \rho)}{D} \quad (11)$$

De esta forma se presenta la ecuación 11, la cual permite expresar una ecuación de velocidad del proceso reversible bajo el supuesto de estado estacionario y donde la concentración de sustrato no es necesariamente la concentración inicial. En el apéndice A se muestra como al remplazar la ecuación 10.b en la ecuación 9 se obtiene 11.

8.4.1.2 Leyes de velocidad para reacciones multi-sustrato.

La mayoría de los procesos a simular son de dos sustratos, por lo que las leyes de velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente también deben de serlo. Para esto se emplea el supuesto de equilibrio rápido, el cual permite obtener una expresión que requiere menos parámetros cinéticos (Sauro, 2013).

Empleando los mismos pasos mostrados para una reacción catalizada enzimáticamente de un solo sustrato y reversible, se puede obtener las leyes de velocidad en función de ρ para un proceso de dos sustratos (excepto para un mecanismo ping pong). La ecuación de velocidad depende del mecanismo de la enzima, el cual puede ser un mecanismo ping-pong, un mecanismo ordenado aleatorio o un mecanismo secuencial ordenado.

Mecanismo ordenado secuencial (equilibrio rápido):

$$v = \frac{V_f(AB - \frac{PQ}{K_{eq}})}{D} = \frac{V_f AB(1 - \rho)}{D} \quad (12)$$

$$\text{Donde } D = K_{IA}K_B + K_B A + AB + \frac{K_{IA}K_B Q}{K_{IQ}} + \frac{K_{IA}K_B PQ}{K_{IQ}}$$

Mecanismo ordenado aleatorio (equilibrio rápido):

$$v = \frac{V_f(AB - \frac{PQ}{K_{eq}})}{D} = \frac{V_f AB(1 - \rho)}{D} \quad (13)$$

$$\text{Donde } D = K_{IA}K_B + K_B A + K_A B + AB + \frac{K_Q K_{IA} K_B P}{K_P K_{IQ}} + \frac{K_{IA} K_B Q}{K_{IQ}} + \frac{K_{IA} K_B PQ}{K_P K_{IQ}}$$

Mecanismo ping-pong (equilibrio rápido):

$$v = \frac{V_f V_r (AB - \frac{PQ}{K_{eq}})}{D} \quad (14)$$

$$\text{Donde } D = V_r K_{IA} K_B + V_r K_B A + V_r AB + \frac{V_f K_P Q}{K_{eq}} + \frac{V_f PQ}{K_{eq}}$$

Se escoge la ecuación de velocidad en función de ρ porque en todo tiempo se cuenta con la concentración de los sustratos y productos, además aporta información sobre la distancia del equilibrio en un tiempo t determinado.

Debido a que en la literatura no se reportan todos los parámetros cinéticos requeridos para cada ecuación de velocidad presentada (ecuaciones 12,13 y 14), el denominador D no se puede expresar de forma completa. Además, como los ensayos de cinética enzimática se realizan normalmente bajo condiciones de estado estacionario solo se reportan constantes de Michaelis y valores de actividad para la reacción irreversible (*hacia adelante*). Por lo anterior, se deben incluir las siguientes aproximaciones:

En primer lugar la ecuación 14, correspondiente al mecanismo ping-pong, no puede ser aplicada ya que la velocidad del proceso hacia atrás (V_r) no se puede expresar en función de K_{eq} y V_f (velocidad *hacia adelante*). La única enzima reportada con un mecanismo ping-pong corresponde a la α -cetoglutarato deshidrogenasa (ACGDH), la cual al catalizar una reacción con un cambio en energía libre muy alto en condiciones estándar ($\Delta G^\circ = -40,01$ kJ/mol), se asume como irreversible.

Segundo, al no reportarse constantes de disociación para los sustratos o los productos, sino constantes de Michaelis y valores de V_f , el denominador D solo se puede encontrar de forma aproximada pero no exacta. Por lo anterior se asume que $K_A = K_{iA}$.

8.4.1.3 *Energía libre estándar de las reacciones catalizadas enzimáticamente consideradas en el modelo*

Como se mencionó, se usa un parámetro termodinámico (K_{eq}) para sustituir el uso de parámetros cinéticos del proceso *hacia atrás* las cuales no se encuentran en la literatura. Para esto se determinó la energía libre estándar (ΔG°) de todas las reacciones consideradas en el modelo de estudio, a partir de la energía libre de formación para los productos y reactivos reportados.

$$\Delta G^\circ = \sum_i v_i \Delta_f G^\circ_{T,i} \quad (15)$$

Donde ν_i son los coeficientes estequiométricos de los productos y reactivos y $\Delta_f G^\circ_{T,i}$ corresponde a la energía libre de formación en condiciones estándar del compuesto i (temperatura 298 K y presión de 1 bar). A partir de lo anterior se calcula la constante de equilibrio K_{eq} para cada reacción.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}, \quad (16.a) \text{ luego } K_{eq} = e^{-\Delta G^\circ/RT} \quad (16.b)$$

Como se mencionó Γ corresponde al cociente de la concentración de los productos y reactivos en un tiempo t dado, mientras K_{eq} corresponde al mismo cociente en el equilibrio. Luego la razón ρ (Γ/K_{eq}) se expresa como:

$$\rho = \frac{\Gamma}{K_{eq}} = \frac{[P]_t [S]_{eq}}{[S]_t [P]_{eq}}; \quad (17)$$

Al aplicar logaritmo natural y multiplicar ambos lados de la ecuación por RT se obtiene

$$\ln(\rho) = \ln(\Gamma) - \ln(K_{eq}) \quad (18.a) \quad RT \ln(\rho) = RT \ln(\Gamma) - RT \ln(K_{eq}) \quad (18.b)$$

Donde $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$, luego ΔG en un tiempo t determinado dado por la concentración de los productos y reactivos, se expresa como

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(\Gamma) \quad (19)$$

La ecuación 19 muestra porque la relación Γ permite conocer en qué sentido se desplaza la reacción, sin embargo al ser una función de estado termodinámica y no cinética, no da información sobre la velocidad a la que ocurre este proceso.

8.4.1.4 Inhibición enzimática

Existen diferentes moléculas capaces de aumentar o disminuir la tasa de recambio de una enzima, activadores e inhibidores, respectivamente. Los inhibidores se clasifican en dos grupos, los inhibidores reversibles y los inhibidores irreversibles. En el sistema de estudio se reportan dos tipos de inhibición competitiva y no-competitiva.

Para representar la inhibición se usa el esquema derivado por Botts y Morales (1953) usando el supuesto de equilibrio rápido.

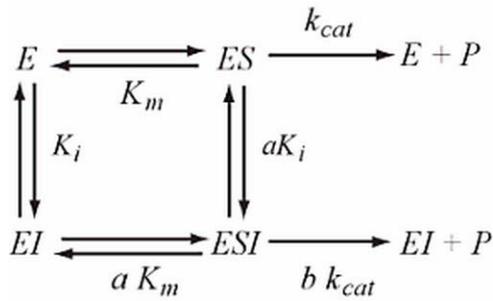


Figura 17. Modelo general de inhibición

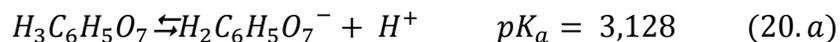
Donde k_i es la *constante de disociación del inhibidor*, ES el *complejo enzima sustrato*, ESI el *complejo enzima sustrato inhibidor*, b es un factor que indica si la catálisis puede ocurrir o no. Si $b=0$ solo ES puede llevar a la formación de producto, si $b=1$ ambos complejos pueden llevar a la formación de producto con la misma actividad. Si $0 < b < 1$, el complejo ES es más activo que el complejo ESI .

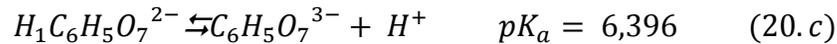
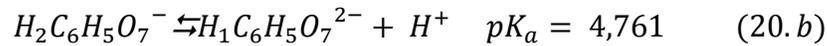
Por último el factor que representa la diferencia entre las afinidades de unión entre el sustrato y el complejo corresponde a EI . Si $a=0$, solo hay unión entre el inhibidor y la enzima libre, si $a=1$ no hay diferencia entre la afinidad del inhibidor por el sustrato o por el complejo enzima sustrato.

8.4.1.5 Proceso de transporte.

Los procesos metabólicos implicados en la acumulación de ácido cítrico incluyen reacciones en el citosol y la mitocondria (Karaffa & Kubicek, 2003), por tal motivo el modelo se divide de igual forma en dos compartimentos. El ácido cítrico (citrato) se sintetiza en la mitocondria por la citrato sintasa, dicha enzima sólo se encuentra ubicada en este compartimento (Jaklitsch, Kubicek, & Scrutton, 1991). El citrato es excretado de la mitocondria al citosol, se ha reportado la presencia de un transportador antiporte citrato/malato (Kubicek, 1988), indicando que la salida de citrato de la mitocondria está acompañada de un ingreso de malato y viceversa.

En condiciones de acumulación de ácido cítrico, el medio extracelular se encuentra a un $pH=2$ y el citoplasma presenta un valor de $pH=7,6$ (Hesse *et al.*, 2002). Dadas estas condiciones, en el citoplasma el citrato se encuentra en mayor proporción como $C_6H_5O_7^{3-}$.





Burgstaller (2006) encontró que el transporte de citrato hacia el espacio extracelular ocurre sin necesidad de un gasto de energía, sin embargo a un pH=7,6 se encuentra en su forma ionizada ($C_6H_5O_7^{3-}$), lo cual hace necesario la presencia de una proteína de membrana que permita el transporte facilitado. Aunque no se conoce en detalle como ocurre el proceso (Burgstaller, 2006), este debe mantener el equilibrio de cargas, es decir, la salida de citrato debe estar acompañada del ingreso de otra molécula cargada negativamente o la salida de cargas positivas. Una posibilidad es la presencia de un transportador protón/citrato simporte (Burgstaller, 2006), el cual también se observa en *Escherichiacoli* (Koningset *al.*, 1992).

8.4.1.6 Transporte facilitado

Para representar el transporte a través de la membrana mitocondrial sólo se considera la diferencia del gradiente de concentración como la fuerza conductora del proceso de difusión.

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_1}{C_2} \quad (21)$$

Donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en Kelvin y C_1 y C_2 son las concentraciones de los compuestos en diferentes compartimentos de la célula en μM , en este caso, en el citosol y la mitocondria, respectivamente. Si la concentración es mayor en la mitocondria ($C_2 > C_1$), ocurrirá de forma espontánea el transporte del compuesto *i* fuera de la mitocondria ($\Delta G < 0$). Si por el contrario es mayor la concentración en el citosol del compuesto ($C_1 > C_2$), el transporte hacia fuera de la misma no será espontáneo ($\Delta G > 0$) pero si lo será el proceso inverso. Si las concentraciones en ambos compartimentos en un tiempo *t* son iguales ($C_1 = C_2$), no habrá transporte ($\Delta G = 0$).

De manera similar al tratamiento de las ecuaciones cinéticas, se usará la distancia al equilibrio para guiar la velocidad del proceso y la información cinética reportada de los transportadores. Dado que el equilibrio ocurre cuando la concentración del compuesto *i* es igual en ambos compartimentos, la constante de equilibrio es igual

a la unidad ($K_{eq} = 1$). A partir de la ecuación 17 se puede determinar la distancia al equilibrio y la dirección del transporte.

El primer proceso corresponde al representado por el transportador antiporte citrato/malato, bajo los supuestos mencionados. De acuerdo a lo reportado por Kubicek (1988), el intercambio ocurre de la siguiente forma

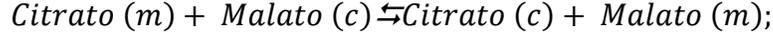


Figura 18. Proceso facilitado por transportador citrato malato antiporte

Donde las letras “m” y “c” representan la ubicación de los compuestos, ya sea en la mitocondria o en el citoplasma, respectivamente. De acuerdo a la anterior representación, la energía libre que guía dicho proceso se representa así:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[\text{Citrato}_c][\text{Malato}_m]}{[\text{Citrato}_m][\text{Malato}_c]}; \quad (22)$$

En este caso, cuando el producto del denominador es mayor que el producto del numerador, ocurrirá una salida del citrato hacia el citosol. Rescribiendo la ecuación 17 y el valor de la constante de equilibrio para los procesos de transporte, se obtiene:

$$\rho = \frac{\Gamma}{K_{eq} = 1} = \left(\frac{[\text{Citrato}_c][\text{Malato}_m]}{[\text{Citrato}_m][\text{Malato}_c]} \right); \quad (23)$$

Por último el transportador de piruvato permite el ingreso de éste a la mitocondria. No se encontraron datos específicos para éste transportador en *A. niger*, sin embargo Torres *et al* (2000), para modelar bajo un enfoque diferente una problemática similar, toman parámetros cinéticos para dicho transportador a partir de lo reportado por Briquet (1977), quién caracteriza el transportador de piruvato mitocondrial en levadura lo que corresponde a un transporte facilitado. El proceso se representa de la siguiente forma:

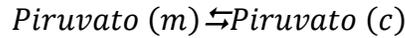


Figura 19. Proceso facilitado por el transportador de citrato mitocondrial

$$\Delta G = RT \ln \rho = RT \ln \frac{[\text{Piruvato}_c]}{[\text{Piruvato}_m]}; \quad (24)$$

Para representar las leyes de velocidad asociada a los transportadores, se emplean las ecuaciones presentadas para procesos enzimáticos. El proceso de transporte se encuentra limitado por la disponibilidad de la proteína de transporte, al igual que la velocidad de catálisis por la concentración de enzima, por lo anterior se puede aproximar y representar por una ecuación de Michaelis-Menten (Hurst, 1992). La ecuación empleada para representar el transporte de

piruvatocorresponde a la ecuación 11, mientras que el proceso facilitado por el transportador antiportecitrato/malato se aproxima a través de la ecuación 13.

8.4.1.7 Difusión simple

El ingreso de glucosa al organismo se modela de acuerdo a lo reportado por dos estudios diferentes. En el primero, Wayman y Matthey (2000) concluyen que el ingreso de éste compuesto durante la idiofase se ajusta a un proceso de difusión simple más que a un modelo Michaelis –Menten de transporte. Por otro lado Torres *et al* (2000), afirman que a pesar de haber transportadores estos no se inhiben o se saturan por la presencia de glucosa, sino que el flujo de glucosa es ilimitado, correspondiendo a un proceso de difusión.

Para representar el ingreso de glucosa al sistema se trabaja con la primera ley de Fick(Levine, 2004):

$$J_x = \frac{dn_x}{dt} = -DA \frac{dC}{dx}; \quad (25)$$

Wayman y Matthey (2000) modelan el ingreso de glucosa en *A. niger* bajo condiciones de acumulación de ácido cítrico, y lo contrastan contra datos de fermentación publicados. Para realizar el modelo se hacen cuatro supuestos, (i) la hifa de *A niger* se puede representar como un cilindro, (ii) la concentración de glucosa en el organismo es cero, pues es fosforilada al momento de ingresar y (iii) se asume que solo en una fracción de la hifa ingresa glucosa del medio. El último supuesto corresponde a lo presentado por Kristiansen y Sinclair (1979), quienes afirman que no toda la hifa se encuentra en una etapa de producción de ácido cítrico, ocasionado probablemente por la pérdida de actividad de las enzimas mitocondriales.

A partir de los datos presentados en la tabla 3 se calcula la tasa de ingreso de glucosa y el cambio sobre la concentración de la misma en el organismo.

Una aproximación a la primera ley de Fick se presenta a continuación. Se asume que la difusión ocurre en una distancia δ determinada y la variación de concentración depende del estado inicial y final del proceso de transporte, en este caso particular, la concentración de glucosa dentro y fuera de la hifa.

Tabla 3. Parámetros para determinar la razón de ingreso de glucosa a la hifa de *A. niger*

Parámetro	Valor
Radio	1,25 μm
Longitud	100 μm
Densidad	1,1 g/mL
Biomasa activa	18%
Coefficiente de permeabilidad (P)	1×10^{-7} cm/s

$$J_x = \frac{-D}{\delta} (C_{out} - C_{in})A = P(C_{in} - C_{out})A \quad (26)$$

Donde $C_{in} = 0$, ya que se asume que la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato al momento de entrar. La concentración empleada de glucosa fuera de la hifa corresponde a la reportada por Xuet *al.* (1989), quienes encontraron que la mayor producción de ácido cítrico ocurre a una concentración de 7.5% p/v, por lo que $C_{out} = 417\text{mM}$. Empleando los datos reportados en la tabla 1 y la anterior ecuación se obtiene

$$J = 40.521,2 \mu\text{M}/\text{min} ;$$

El tercer supuesto empleado por Wayman y Matthey (2000) consiste en representar la parte del micelio activa como una fracción del mismo, reportándolo como 18% (X_A). Por otro lado, en un estudio diferente, Cleland y Johnson (1954) determinaron que en la fase de crecimiento la proporción del flujo de glicólisis frente al flujo de la vía de pentosas fosfato en la fase de acumulación de AC llega a una proporción de 4:1. De esta forma:

$$J = (X_A)(4/5)(29.152,6 \mu\text{M}/\text{min}) = 5.835 \mu\text{M}/\text{min};$$

8.4.1.8 Fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones

Para representar la cadena de transporte de electrones y la Fosforilación Oxidativa, se propone un modelo simplificado que conserve la estequiometría de la reacción sin entrar en detalle sobre el mecanismo. Se hace esto porque no es el

objetivo del proyecto hacer una representación de estos procesos sino evaluar su importancia en la acumulación de ácido cítrico.

Para lo anterior se asume que la oxidación de moléculas como NADH y FADH₂ en el complejo 1 y 3, respectivamente, lleva directamente a la síntesis de ATP, H₂O y NAD⁺ o FAD en un solo paso. Esto sin la necesidad de generar un gradiente electroquímico entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana.

La reacción propuesta se muestra a continuación:

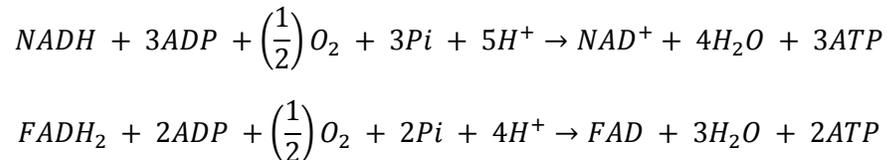


Figura 20. Reacción propuesta para representar la Fosforilación Oxidativa y la Cadena de Transporte de Electrones.

La energía libre asociada a estos procesos en condiciones estándar es de -108,55 kJ/mol y -76,53kJ/mol. Debido a esto se consideran procesos irreversibles.

8.4.1.9 Vía alterna de oxidación, NADH oxido-reductasa no acoplada a bombeo de protones

Aparte de la NADH: ubiquinonaoxidoreductasa (Complejo I), el hongo *A. niger* cuenta con dos NADH deshidrogenasas: la primera ubicada en la matriz mitocondrial oxidando NADH, y la segunda se encuentra en el espacio intermembrana oxidando NADPH y NADH citosólico. Además presenta una ubiquinol oxidasa como alternativa al transporte de electrones, lo que permite la reducción directa de oxígeno sin ocasionar un bombeo de electrones o estar acoplado a la fosforilación de ADP (Walirath, Schmidt, & Weiss, 1991).

La afinidad de la NADH deshidrogenasa alterna mitocondrial es menor que la del complejo 1, y la información cinética que describe este paso se presenta en la tabla 4.

8.5 Condiciones iniciales

El hongo *A. niger* se modela durante la fase de producción de ácido cítrico, que corresponde al inicio de la idiofase (Kubicek, 1988). Por tal motivo, el modelo comienza en un estado donde la concentración de los metabolitos no es cero, sino que después de haber ocurrido un proceso de crecimiento, estos alcanzan una concentración basal. Por lo anterior, se emplean las concentraciones reportadas para la idiofase (Torres, Gonzalez, & Alvarez, 2000).

Para los casos en que no se reporte la concentración de un metabolito en la idiofase, se emplea un valor estimado para la concentración de diferentes compuestos en una célula. Palson (2011) muestra que el porcentaje en peso de los componentes químicos entre células son similares, aún entre una célula animal y una bacteria. Empleando un promedio del número de metabolitos presentes en una célula (1000), su peso promedio (312 g/mol) y la fracción en peso seco que representa cada uno (0.01), estimó que la concentración de un metabolito en una célula, es aproximadamente 32 μM .

8.6 Parámetros cinéticos correspondientes a las ecuaciones de velocidad reportadas

Los parámetros cinéticos e información de inhibición usados en el modelo corresponde a información reportadas en la literatura por diferentes autores, en la tabla 4 se presentan los artículos empleados. Por otro lado las actividades enzimáticas son convertidas en tasas de recambio a partir de la siguiente expresión reportada por Purich (2010).

$$sp \left(\frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \right) \left(\frac{PM}{1 \mu\text{mol}} \right); \quad (27)$$

Donde sp es la *actividad específica* (specificactivity) en $\mu\text{mol producto}/(\text{min} * \text{mgE})$ y PM es el *peso molecular* en mg.

Tabla4. Parámetros cinéticos y constantes termodinámicos, con sus respectivas referencias, usados en el modelo.

Enzima / Transportador	Energía libre de reacción catalizada	Constantes cinéticas		Referencia
Piruvato carboxilasa	-5,89	K_m (Piruvato)	0,28	Steven A. OSMANI <i>et al</i> 1981
		K_m (ATP)	0,23	Jaklitschet <i>al</i> 1991
Transportador piruvato mitocondrial	0	K_m (piruvato)	6,2	M. Briquet 1997
Actividad Complejo 1 ^a	-108,55	K_m (NADH)	0	Wallrathet <i>al</i> (1991) y Prömperet <i>al</i> (1993)
Transportador antiporte citrato/malato	0	K_m (Citrato)	0,8	Kubicek 1988
Transportador simporte protón/citrato	0	K_m (Citrato)	0,72	(Burgstaller, 2006)
Aconitasa	6,65	K_m (Citrato)	2,3	Muller y Frosch (1975)
		K_m (isocitrato)	0,42	
Isocitrato deshidrogenasa	-7,38	K_m (Isocitrato)	0,08	Meixner-Monoriet <i>al</i> 1986
		K_m (NADP ⁺)	0	
α -Cetoglutarato deshidrogenasa	-40,01	K_m (a-CG)	0,4	Meixner-Monoriet <i>al</i> 1985
		K_m (NAD ⁺)	0,25	
		K_m (CoA)	0,02	
Succinato deshidrogenasa	0,04	K_m (Fumarato)	0,93	King <i>et al.</i> , 1960
		K_m (Succinato)	3	
Fumarasa	-3,31	K_m (Malato)	0,05	Kubicek y Röhr 1978
Malato deshidrogenasa mitocondrial	28,53	K_m (Oxaloacetato)	0,05	Kubicek y Röhr 1978
Citrato Sintasa	-44,77	K_m (Oxaloacetato)	5	Punekaret <i>al</i> 1984
		K_m (Acetil-CoA)	10	Ramakrishnan y Martin 1954
ATP Citrato Liasa	8,74	K_m (Citrato)	2,5	Pfitzneret <i>al</i> 1987
		K_m (ATP)	0,1	
Complejo piruvato deshidrogenasa	-33,40	K_m (Piruvato)	0,04	Kohnet <i>al</i> 1979
		K_m (CoA)	0,01	
		K_m (NAD ⁺)	0,06	

Km se expresa en mM

Energía libre se expresa en kJ/mol

^a Se toma el complejo 1 para representar el modelo simplificado de la Fosforilación Oxidativa presentado

9. RESULTADOS

9.1 Arquetipos

En la figura 12 se muestra un arquetipo con estructura similar al de límites de crecimiento. En general este arquetipo representa que un proceso de refuerzo no puede continuar por siempre, existe siempre un límite o capacidad de carga, que eventualmente hace retardar el avance del sistema a medida que se aproxima a la capacidad del mismo (Braun, 2002).

La tasa a la que se forma el ácido cítrico dentro del ciclo de refuerzo, no ocurre de forma ilimitada, a medida que otro componente necesario para su formación (NAD^+) se consume, la velocidad de su formación debe disminuir lentamente a medida que se acaba éste recurso.

Un arquetipo similar se puede también identificar entre el proceso de oxidación de lípidos, figura 11, y el ciclo de Krebs (ciclo de refuerzo). El ciclo de refuerzo mencionado requiere de varios precursores o varios recursos para su funcionamiento, uno de estos puede provenir de la oxidación, un ciclo de balance. Dado que el recurso se consume a medida que se lleva a cabo la síntesis de ácido cítrico, éste ciclo de balance disminuirá con el tiempo la velocidad de formación de los componentes del ciclo de Krebs.

9.2 Estado inicial

A continuación se presentan los datos obtenidos de la simulación, usando los parámetros cinéticos y termodinámicos reportados en la literatura, junto con las ecuaciones cinéticas y supuestos descritos en este trabajo.

En primer lugar se muestran los comportamientos de los metabolitos (variables de nivel) en el tiempo de simulación. Las variables de nivel se dividen en tres grupos: variables que están presentes en el (i) ciclo de Krebs, (ii) variables extra-mitocondriales y variables involucradas en la oxidación y fosforilación de NADH o FADH_2 y ADP en ATP , respectivamente, o (iii) Fosforilación Oxidativa.

9.2.1 Ciclo de Krebs

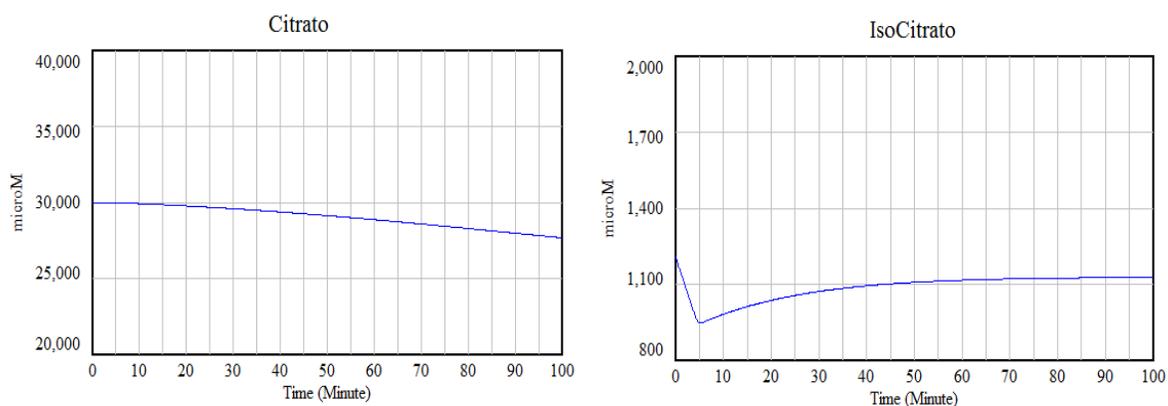


Figura 21. Comportamiento de citrato mitocondrial e isocitrato durante la simulación

En la figura 21 se puede observar que durante el tiempo de simulación no se presentó una estabilización del citrato mitocondrial (citrato-m), sin embargo el isocitrato sí alcanza un estado estacionario a partir del minuto 70 de la simulación.

De igual forma se presentan los demás componentes del ciclo de Krebs (ver figura 22). El succinil-CoA, succinato y fumarato son los compuestos con los valores más pequeños durante el tiempo de simulación, dado que no existe información de su concentración inicial en la fase de acumulación de ácido cítrico, se empleó la aproximación usada por Palson (2011) que corresponde a $32\mu\text{M}$. Por otro lado, el α -cetoglutarato alcanza un estado estacionario tras un aumento acelerado en su concentración al principio de la simulación. La concentración de éste último metabolito en dicho estado corresponde a $150\mu\text{M}$.

Continuando con el orden de reacciones en el ciclo de Krebs, se presenta la concentración de malato y oxaloacetato en el tiempo en la figura 23. Estos dos compuestos están presentes tanto fuera como dentro de la mitocondria, correspondiendo a dos variables de nivel diferente. En primer lugar el malato, al igual que el citrato, no alcanza un estado estacionario. Por otro lado, el oxaloacetato se encuentra en una proporción muy baja, sin llegar a ser cero.

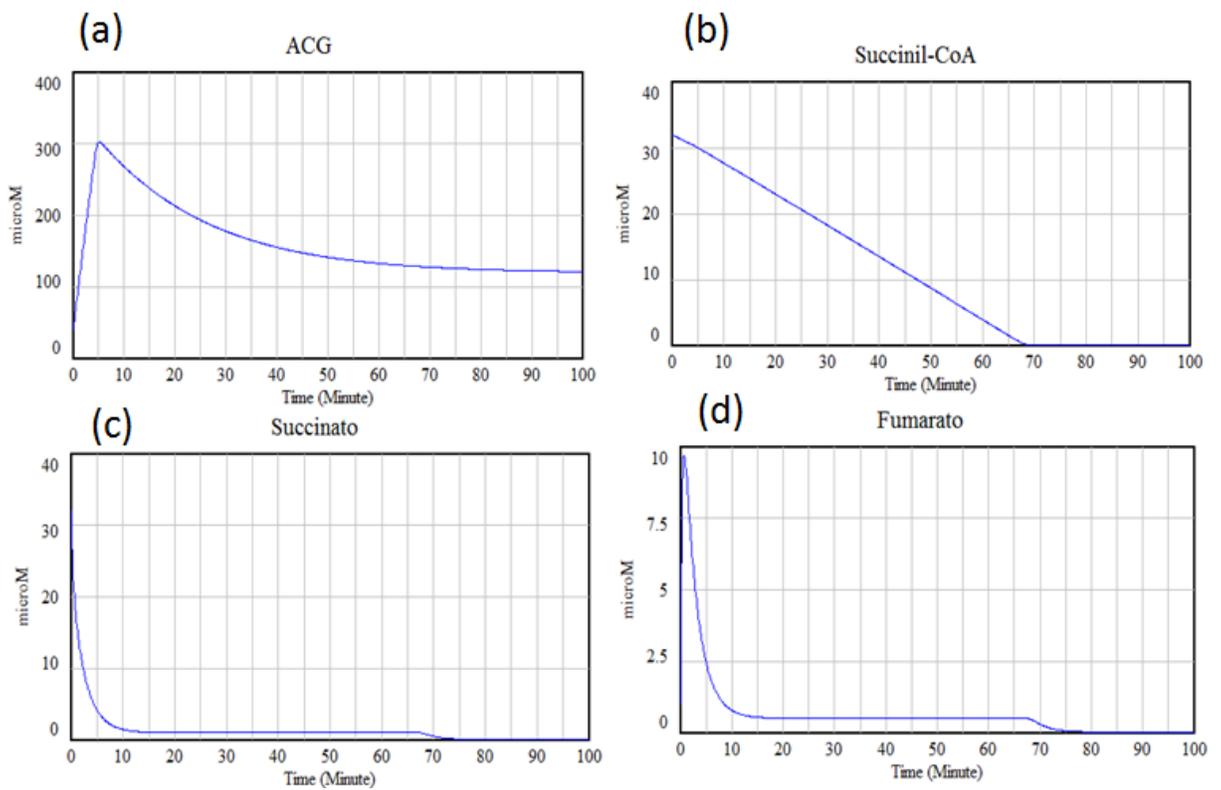


Figura 22. Comportamiento de diferentes compuestos durante la fase de acumulación de ácido cítrico. (a) α -cetoglutarato (ACG), (b) succinil-CoA, (c) succinato y (d) fumarato.

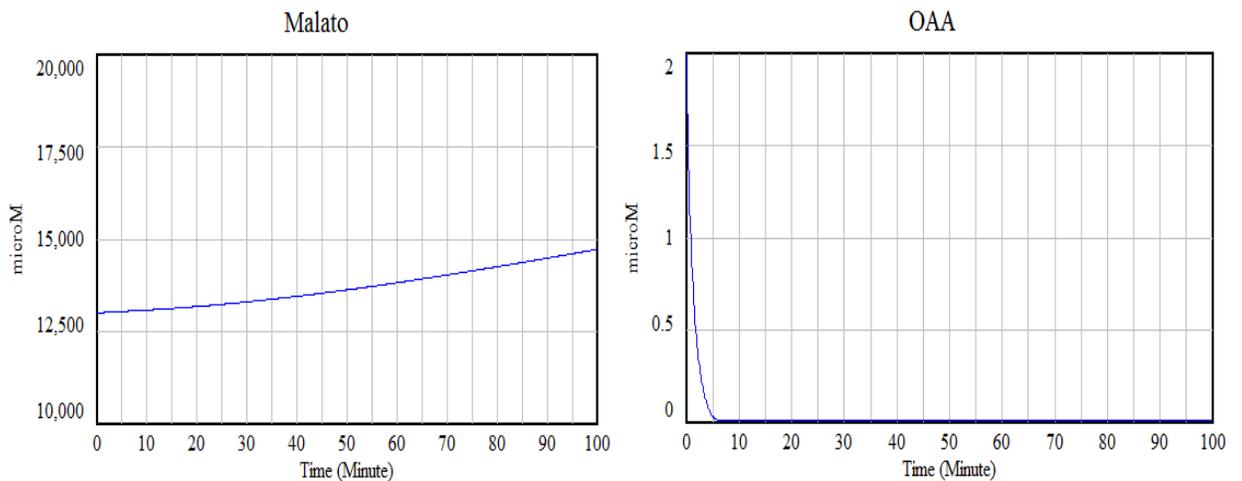


Figura 23. Comportamiento de malato y oxaloacetato mitocondrial durante la simulación

9.2.2 Variables extra-mitocondriales

A continuación se presenta las variables de nivel más relevantes ubicadas fuera de la mitocondria.

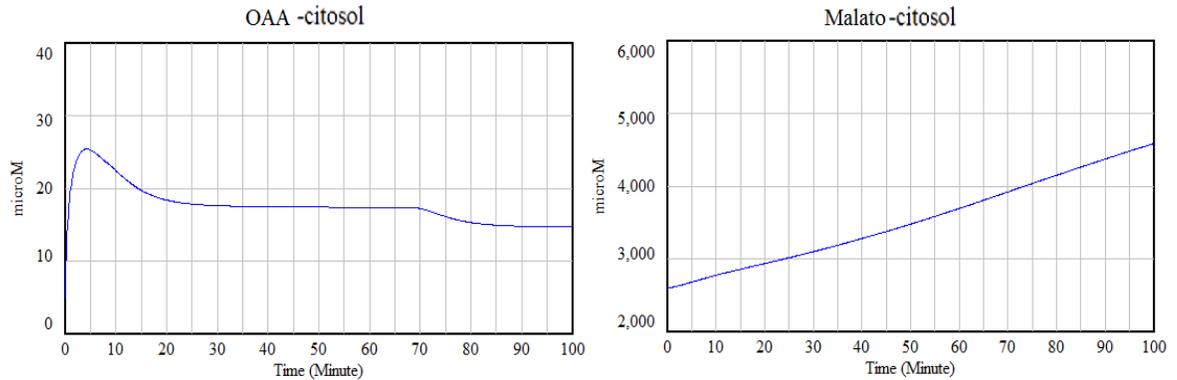


Figura 24. Comportamiento de malato en citosol y oxaloacetato en citosol (OAA-citosol) durante la simulación

Como se observa en la figura 24, afuera de la mitocondria la concentración de oxaloacetato es mayor y alcanza un estado estacionario, pero en términos relativos su cantidad sigue siendo baja respecto al malato. Por otro lado, éste último compuesto nuevamente presenta un crecimiento continuo sin llegar a estabilizarse en el tiempo.

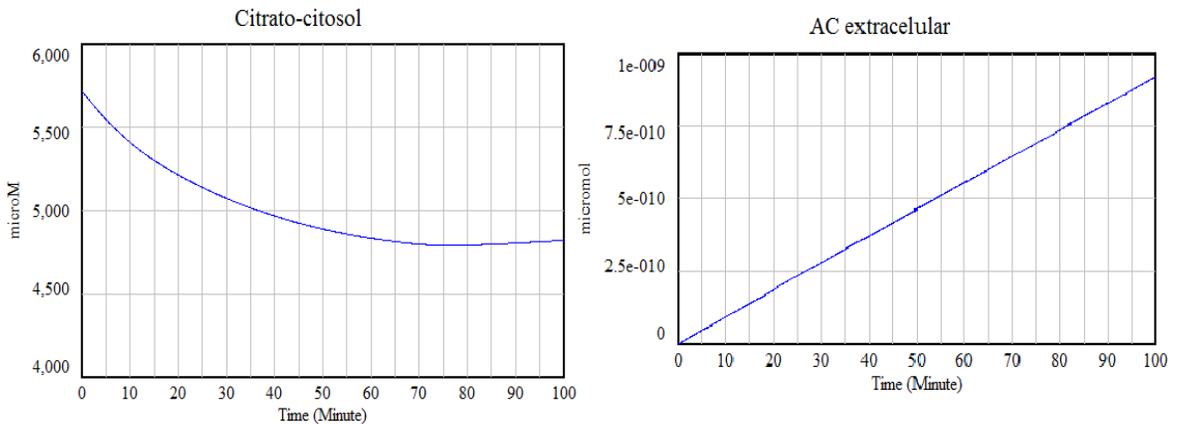
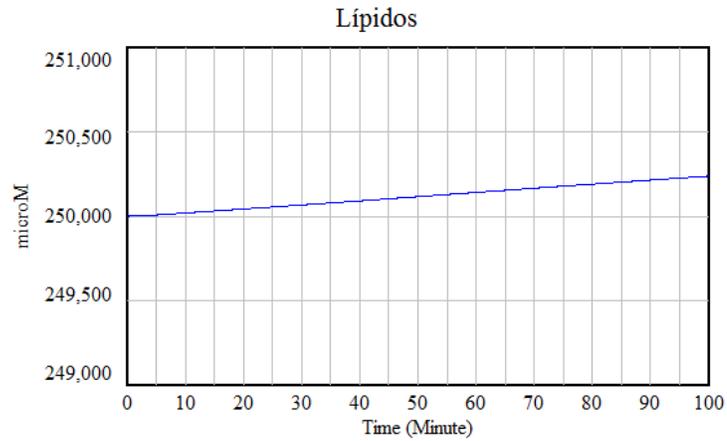


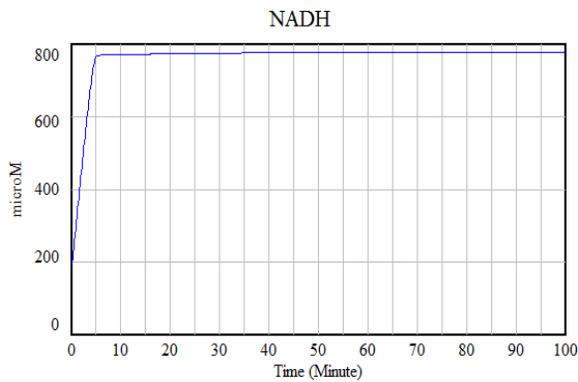
Figura 25. Citrato en citosol y ácido cítrico (AC) extracelular en el tiempo de simulación

El citrato en citosol (citrato-c) alcanza un estado estacionario a diferencia del comportamiento mostrado por el citrato-m (ver figura 21 y 25), donde el segundo se

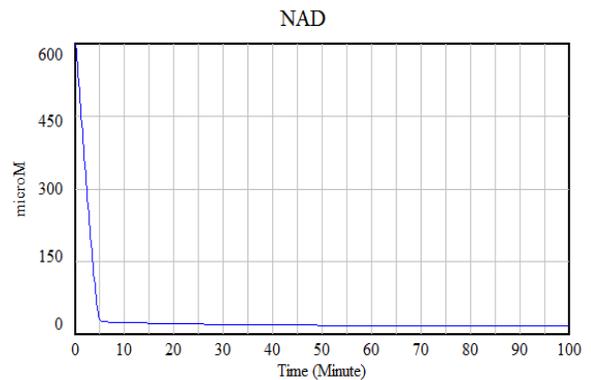
encuentra, en promedio, en una proporción seis veces en mayor respecto al primero.



(a)



(b)



(c)

Figura 26. Comportamiento de la concentración de (a) lípidos, (b) NADH y (c) NAD⁺ durante la simulación

Por último, en la figura 26.a se observa que los lípidos muestran un leve proceso de acumulación, lo que indica que predominó la síntesis de éstos sobre la oxidación durante la fase de acumulación de ácido cítrico en el periodo simulado.

9.2.3 Fosforilación oxidativa

En la figura 26.b y 26.c se presenta el comportamiento de NADH y NAD⁺ durante la fase de acumulación de ácido cítrico. Dado que la suma de las cantidades de NAD⁺ y NADH en todo tiempo debe ser constante, una disminución del primero lleva a un aumento del segundo. Se observa en la figura 27 que rápidamente se alcanza un estado estacionario, donde la cantidad de NADH es 45 veces mayor que NAD⁺.

9.3 Análisis de sensibilidad

Existen dos formas para evaluar el comportamiento de un modelo, el primero es el cambio sobre las condiciones iniciales y el segundo es modificando el valor de los parámetros (Palsson, 2011). Dado que las condiciones iniciales corresponden a las concentraciones en el momento inicial de cada uno de los metabolitos, que dependen del proceso de crecimiento, se optará por la segunda estrategia para evaluar y mejorar el desempeño del modelo.

De acuerdo a la ley de velocidad de los procesos enzimáticos, la velocidad depende de: (i) la concentración de los sustratos y los productos, (ii) la concentración de enzima, (iii) la tasa de recambio y (iv) las constantes de Michaelis para cada sustrato y producto.

La relación entre la concentración de enzima y la velocidad de la reacción catalizada es lineal (Sauro, 2013), aumentar la primera lleva a un aumento proporcional de la segunda, asumiendo que no ocurra inhibición por sustrato. La misma relación se presenta entre la constante catalítica y la velocidad (para reacciones multi-sustrato, la tasa de recambio es el producto de una serie de constantes cinéticas).

De acuerdo a las leyes de velocidad reversibles mostradas para reacciones multi-sustrato bajo el supuesto de equilibrio rápido, el efecto de las constantes de Michaelis sobre la velocidad de la reacción no es directo, como si ocurre en ecuaciones de velocidad irreversible de un sustrato (ecuación 1). De acuerdo a lo encontrado en la literatura y lo obtenido en el modelo de simulación, solo dos enzimas presentan valores de K_m superiores o iguales a la concentración de sus respectivos sustratos, las cuales son la enzima ACGDH y la ATP Citrato liasa. Más

adelante, en la sección de *Análisis de Resultados* se discute el efecto de las constantes de Michaelis para un proceso catalizado enzimáticamente que requiere dos sustratos.

Adicional a esto, la falta de reportes en la literatura sobre las constantes de disociación no permite cuantificar con exactitud el efecto de cambiar las constantes de Michaelis para reacciones de dos sustratos, y se debe asumir lo presentado en la sección de *VARIABLES DE FLUJO*. De forma general y de acuerdo a las ecuaciones 12, 13 y 14, aumentar una o las dos constantes de Michaelis incrementara el valor del denominador, luego la velocidad disminuye; si por el contrario disminuyen las constantes de Michaelis la velocidad aumenta.

En el modelo de simulación se observó que la variación del ácido cítrico extracelular solo depende de la disponibilidad del transportador simporte protón/citrato, cualquier incremento hecho sobre la concentración de citrato citosólico no tiene efecto importante en la cantidad de esta variable al final del tiempo de simulación. Esto sugiere que el proceso se encuentra restringido por la capacidad del transportador de citrato al exterior (transportador simporte protón/citrato). Esto se puede evidenciar en la figura 27, donde no ocurre un cambio sobre la cantidad de ácido cítrico extracelular al modificar la actividad de diferentes enzimas y transportadores. De igual forma se evaluó el efecto de las enzimas del Ciclo de Krebs pero el resultado es el mismo (dato no mostrado). Por otro lado, en la figura 32 es evidente que una variación sobre el transportador simporte protón/citrato genera un cambio directo en la salida de ácido cítrico extracelular.

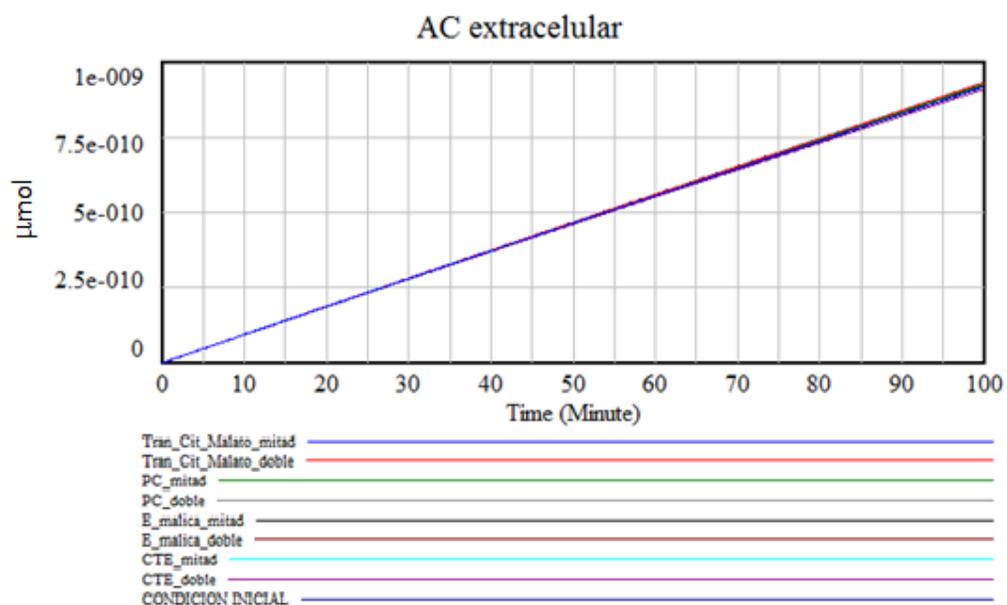


Figura 27. Cantidad de ácido cítrico (AC) extracelular durante el periodo de simulación. Se duplicó y disminuyó a la mitad la actividad del transportador antiporte citrato/malato, la piruvato carboxilasa, la enzima málica, y la cadena de transporte de electrones.

Por lo anterior, la variable de respuesta para las variables de flujo correspondientes al ciclo de Krebs y al espacio extra-mitocondrial, es el citrato-c. El ácido cítrico extracelular, en primera instancia solo depende de la capacidad del transportador.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos al modificar el parámetro de concentración (enzima o transportador) de cada variable de flujo. Se evaluó el cambio sobre la variable de respuesta (citrato-c) al reducir a la mitad y al duplicar la concentración del parámetro mencionado respecto a su estado inicial. En esta tabla se observa que las actividades de todas las enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs tienen un efecto despreciable sobre la acumulación de citrato-c. Por otro lado la CTE, la piruvatocarboxilasa, la enzima málica y los transportadores (antiporotecitrato/malato y piruvato) presentan el mayor efecto sobre el citrato-c.

Tabla 5. Cambio en la concentración de citrato citosólico al variar el parámetro de concentración de enzima (o proteína de transporte) para cada variable de flujo al finalizar el tiempo de simulación.

Enzima / Proteína de transporte	Cambio en la concentración de citrato citosólico al variar la concentración de enzima / proteína de transporte			
	Reducción a la mitad (μM)	Duplicación (μM)	Reducción relativa	Duplicación relativa
Actividad CTE	487,43	-1066,57	10,11%	-22,12%
Transportador citrato/malato	-654,12	411,26	-8,29%	5,16%
Piruvatocarboxilasa	-67,22	130,16	-1,39%	2,63%
Enzima málica	-259,03	98,33	-5,60%	1,54%
Transportador piruvato	-20,14	35,46	-0,42%	0,74%
Succinil-CoAsintasa	9,76	14,19	0,20%	0,29%
ACGDH	5,05	-10,75	0,10%	-0,22%
ATP Citrato Liasa	-7,07	-4,5	-0,13%	-0,08%
Malato DH-m	-0,21	0,44	0,00%	0,01%
Isocitrato-DH	0,53	0,25	0,01%	0,01%
Aconitasa	0,05	-0,08	0,00%	0,00%
Fumarasa	0,05	-0,08	0,00%	0,00%
Succinato DH	0,14	0	0,00%	0,00%
Citrato Sintasa	0	0	0,00%	0,00%
Malato DH-c	0	0	0,00%	0,00%
Síntesis de lípidos	0	0	0,00%	0,00%
Oxidación de lípidos	0	0	0,00%	0,00%

A partir de la información de la tabla 5 se identifican las variables de flujo con mayor impacto sobre la acumulación de citrato-c. A continuación se presenta el comportamiento de ésta variable en el tiempo frente a los cambios hechos sobre las variables de flujo identificadas en los dos escenarios mencionados, contrastándola con el estado inicial obtenido en el modelo.

En primer lugar se evalúa el efecto de la piruvatocarboxilasa. En la figura 27 se observa que al momento de duplicar la concentración de esta enzima se logra un aumento de la concentración de citrato-c de $140 \mu\text{M}$. No se observa un aumento sobre la cantidad de ácido cítrico extracelular (dato no mostrado).

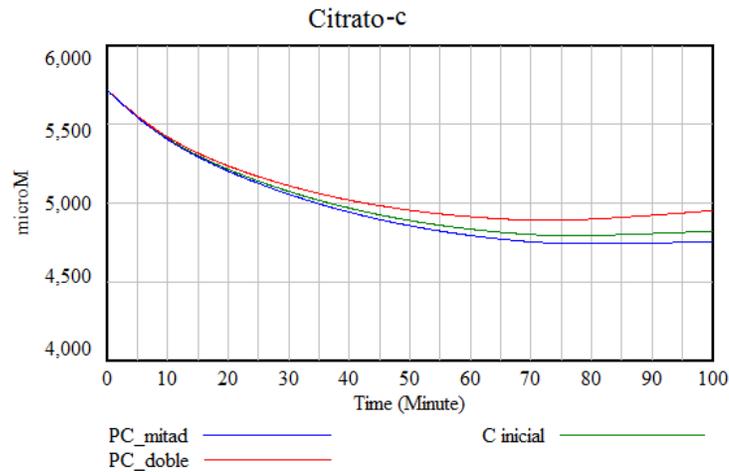
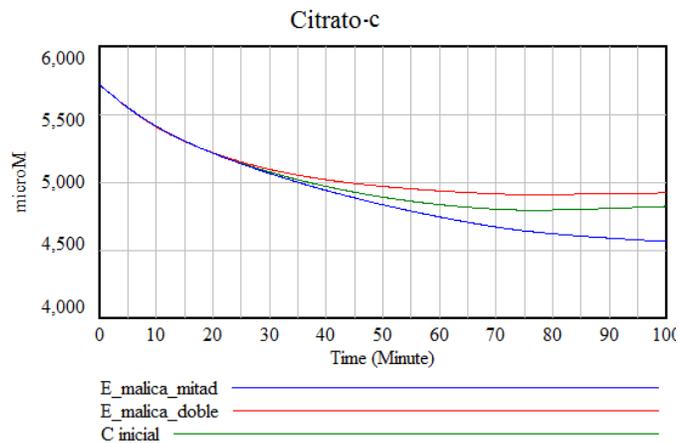
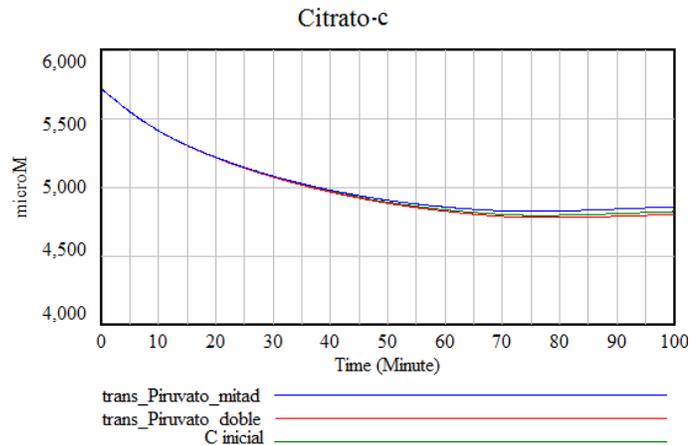


Figura 28. Aumento en la cantidad de AC en el citosol al duplicar la concentración de la piruvatocarboxilasa.



(a)



(b)

Figura 29. (a) Aumento en citrato citosólico por aumento en la concentración de la enzima málica, (b) aumento en citrato citosólico por aumento en la concentración del transportador de piruvato mitocondrial

La enzima málica presenta también un efecto importante sobre el nivel de citrato-c (ver figura 28). El aumento en la enzima málica ocasiona un incremento en la concentración de la variable mencionada, el aumento por duplicar la enzima mencionada es de 98 μM en el tiempo de la simulación. Al igual que la piruvatocarboxilasa, la enzima málica tiene un efecto sobre el nivel de citrato-c, pero éste no es excretado por el transportador.

Otra variable de flujo que tiene un impacto sobre la concentración de citrato-c es el transportador de piruvato. A partir de la figura 29 se puede decir que el efecto de la concentración de esta proteína es el menor de todas las variables de flujo identificadas. El efecto al duplicar la concentración del transportador mencionado es de 45,52 μM .

A continuación se presenta el efecto de la Fosforilación Oxidativa y la cadena de transporte de electrones (CTE) (Ver figura 30). Ocurre una disminución de citrato-c si se aumenta la concentración del complejo I, y lo contrario al disminuirse la concentración del complejo 1.

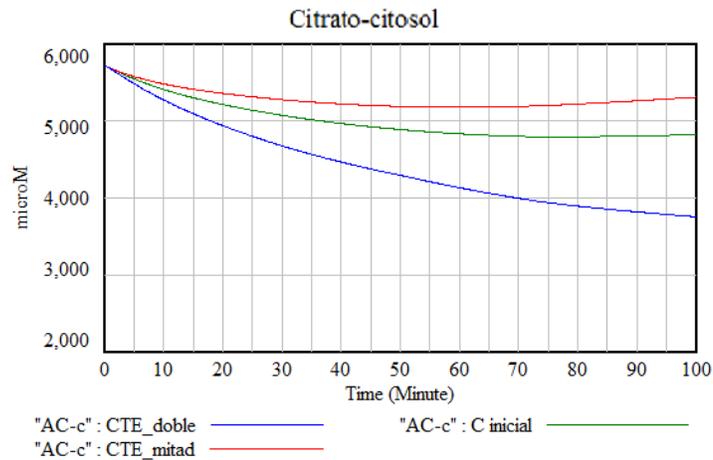


Figura 30. Aumento en citrato citosolico por aumento en la concentración de la enzima málica.

Al duplicar la cantidad del complejo I la concentración de citrato-c disminuye en 1,06 mM. Al reducir a la mitad la concentración de dicho complejo el aumento en la variable de respuesta es de 487,43 μ M.

Finalmente, se evalúa el efecto de la cantidad de transportador antiporte citrato/malato presente en la membrana mitocondrial, descrito previamente. En la figura 31 se observa que el cambio en la concentración del transportador es proporcional al cambio sobre la variable de respuesta, la concentración de citrato-c. De igual forma, una disminución en la expresión de este transportador disminuye la concentración de citrato-c.

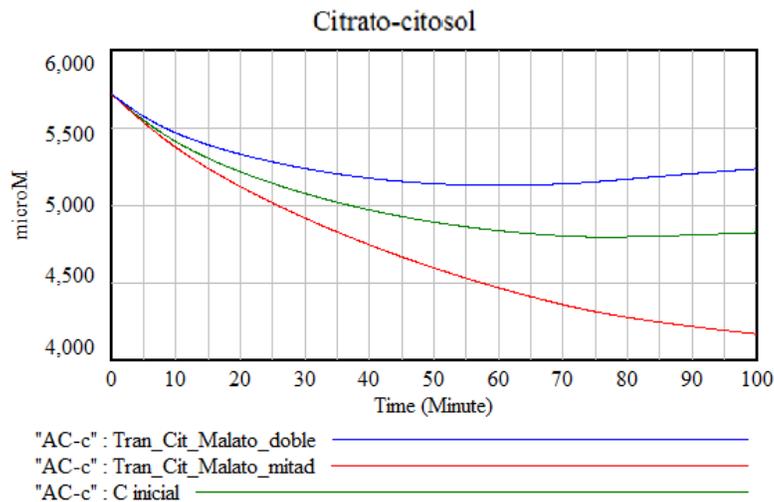


Figura 31. Aumento en citrato en citosol por aumento en la concentración del transportador antiportecitrato/malato.

Otro proceso de importancia corresponde al asociado con el transportador de citrato hacia el exterior. Para evaluar el efecto se mide la cantidad en el medio extra-celular.

En la figura 32 se muestra el cambio sobre la cantidad de ácido cítrico extra celular en μmol . El aumento en el tiempo final de la simulación, entre el estado inicial y el aumento de la cantidad del transportador, fue del doble. En este caso se observa una relación lineal entre la obtención de ácido cítrico y la concentración de transportadores en la membrana celular.

El ácido cítrico extra-mitocondrial solo varía por la concentración del transportador del citrato-c al exterior (transportador protón/citrato simporte), lo cual sugiere que la salida de citrato está restringido por la disponibilidad de este transportador. Por este motivo cualquier aumento en la acumulación de citrato citosólico debe estar acoplada a un aumento en la expresión de dicho transportador.

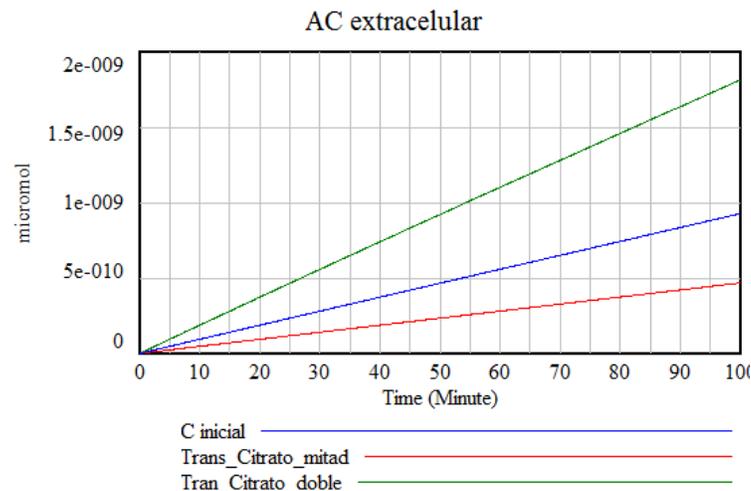


Figura 32. Aumento en citrato citosólico por aumento en la concentración del transportador de citrato al exterior de la célula.

La actividad de la CTE presenta el mayor efecto sobre las variables estudiadas, su disminución aumenta en 10 % la cantidad de citrato citosólico respecto a las condiciones iniciales, mientras que una duplicación de su actividad lleva a una reducción del 22% respecto al estado inicial.

9.4 Diseño de experimentos

A partir de los anteriores resultados se presenta un diseño factorial para determinar las variables que presentan un efecto significativo sobre la acumulación de ácido cítrico. Para esto se toman las cinco variables de flujo identificadas en el análisis de sensibilidad sobre tres diferentes variables de respuesta: citrato mitocondrial (citrato-m), citrato citosólico (citrato-c) y ácido cítrico extra-celular.

Para ellos se realizó un experimento 2^k , donde $k = 5$ (32). Anteriormente se mencionó que el parámetro a modificar para evaluar el efecto de una variable de flujo sobre la variable de respuesta era la concentración de la enzima (o proteína de transporte).

Tabla6. Variables independientes

Factor	Nivel bajo (μM)	Nivel alto (μM)
Concentración transportador citrato/malato antiporte	2,16	8,64
Concentración transportador de citrato citosólico	2,16	8,64
Concentración complejo I (Actividad CTE)	2,16	8,64
Concentración piruvatocarboxilasa	2,16	8,64
Concentración enzima málica.	2,16	8,64

Se asume que las enzimas presentan una concentración inicial de $4.32 \mu\text{M}$ en la célula a partir de la aproximación hecha por Palsson (2011). Así el nivel alto para cada factor corresponde a $8,64 \mu\text{M}$ y el nivel baja corresponde a $2,16 \mu\text{M}$.

Usando Minitab® 16Statistical Software, (MinitabInc,)se obtuvo el diseño experimental presentado y se analizaron los datos obtenidos del modelo de simulación. Las variables de respuesta son citrato mitocondrial, citrato-c y ácido cítrico extracelular. En primer lugar se determinaron los factores con un efecto significativo a partir del valor p .

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Transportador C/M	1	10488463	10488463	10488463	115,605	0,000000
CTE	1	20301017	20301017	20301017	223,761	0,000000
Trans_Citrato_C	1	31104613	31104613	31104613	342,840	0,000000
E_málica	1	656271	656271	656271	7,234	0,012329
PC	1	140020	140020	140020	1,543	0,225213
Error	26	2358886	2358886	90726		
Total	31	65049269				

Figura 33. Análisis de varianza. Variable de respuesta, citrato mitocondrial

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Transportador C/M	1	11934910	11934910	11934910	109,856	0,000000
CTE	1	21022587	21022587	21022587	193,505	0,000000
Trans_Citrato_C	1	4147128	4147128	4147128	38,173	0,000002
E_málica	1	711595	711595	711595	6,550	0,016653
PC	1	46826	46826	46826	0,431	0,517262
Error	26	2824668	2824668	108641		
Total	31	40687713				

Figura 34. Análisis de varianza. Variable de respuesta, citrato citosólico

Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Transportador C/M	1	1,13	1,13	1,13	12,2	0,001732
CTE	1	1,65	1,65	1,65	17,8	0,000262
Trans_Citrato_C	1	1397,51	1397,51	1397,51	15103,9	0,000000
E_málica	1	0,03	0,03	0,03	0,3	0,593094
PC	1	0,01	0,01	0,01	0,1	0,771047
Error	26	2,41	2,41	0,09		
Total	31	1402,72				

Figura 35. Análisis de varianza. Variable de respuesta, ácido cítrico extra-celular

De acuerdo a lo presentado, se puede afirmar que la piruvatocarboxilasa no presenta un efecto significativo sobre las variables de respuesta estudiadas (figura 33 a 35). La enzima málica sólo presenta un efecto significativo sobre el nivel de citrato citosolico y mitocondrial más no para el ácido cítrico extracelular. En contraste, los transportadores y la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) presentan un efecto significativo en todos los casos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.

Tabla7. Variables independientes con efecto significativo sobre las variables de respuesta

Variable de respuesta	Variabes independientes
Citrato mitocondrial	Concentración transportador Citrato/Malato
	Concentración Complejo 1 (Actividad CTE)
	Concentración transportador citrato citosólico
Citrato citosólico	Concentración transportador Citrato/Malato
	Concentración Complejo 1 (Actividad CTE)
	Concentración transportador citrato citosólico
	Concentración enzima málica
Ácido cítrico extra-celular	Concentración transportador Citrato/Malato
	Concentración Complejo 1 (Actividad CTE)
	Concentración transportador citrato citosólico

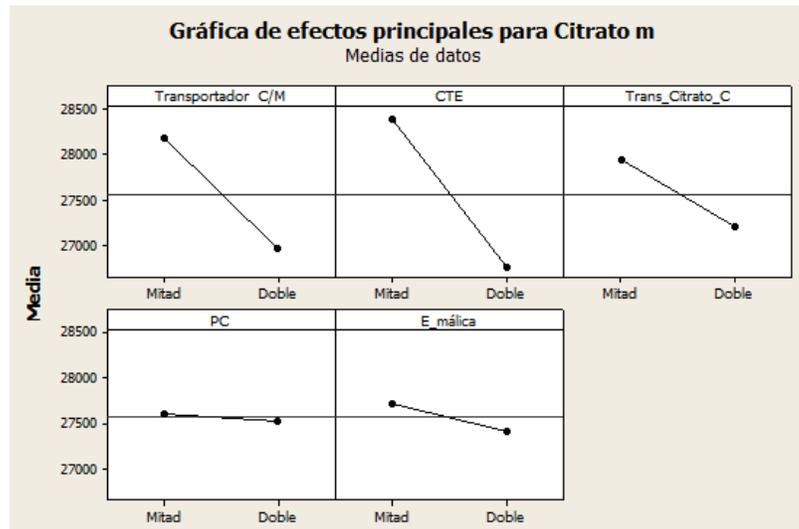


Figura 36. Gráfica de efectos principales. Variable de respuesta, citrato mitocondrial. Variables independientes Transportador antiporte citrato/malato (Transportador C/M), actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), transportador simporte protón/citrato (Trans. Citrato-C), actividad de la enzima piruvatocarboxilasa (PC) y la actividad de la enzima málica (E málica).

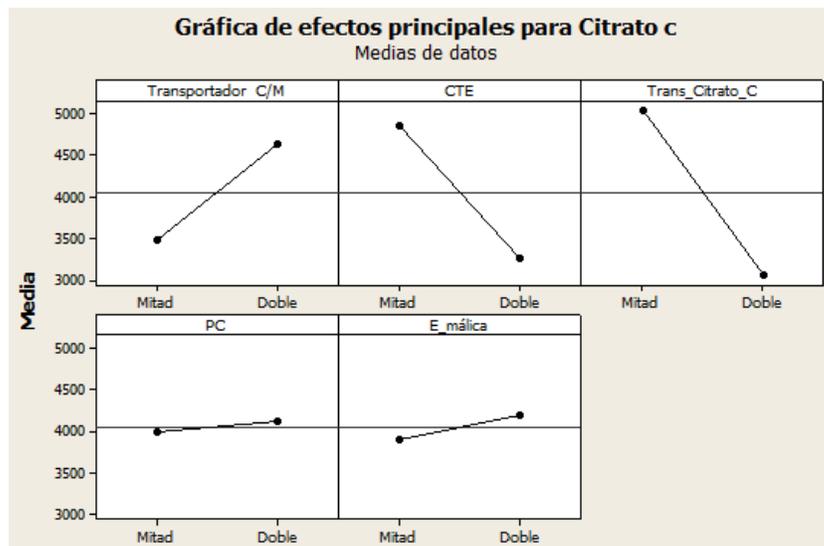


Figura 37. Gráfica de efectos principales. Variable de respuesta, citrato citosólico. Variables independientes: Transportador antiporte citrato/malato (Transportador C/M), actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), transportador simporte protón/citrato (Trans. Citrato-C), actividad de la enzima piruvatocarboxilasa (PC) y la actividad de la enzima málica (E málica).

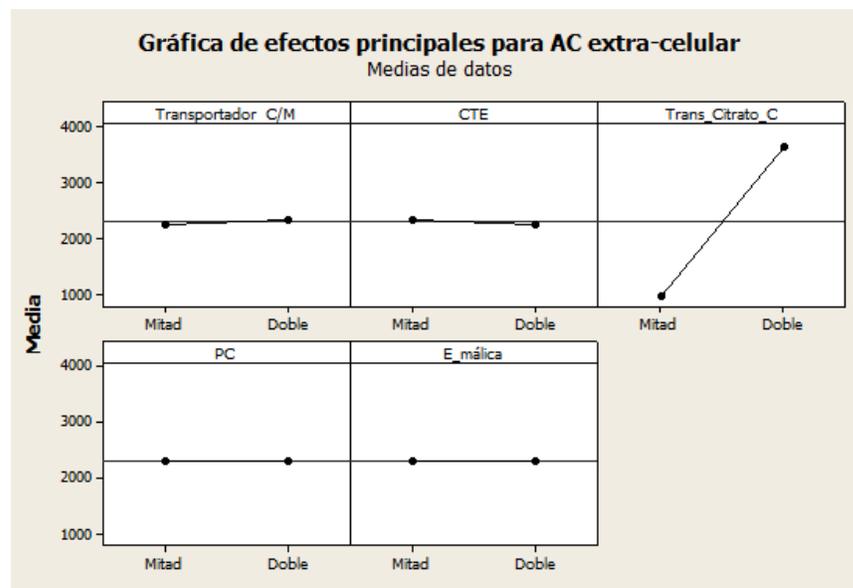


Figura 38. Gráfica de efectos principales. Variable de respuesta, ácido cítrico extracelular. Variables independientes Transportador antiporte citrato/malato (Transportador C/M), actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), transportador simporte protón/citrato (Trans. Citrato-C), actividad de la enzima piruvatocarboxilasa (PC) y la actividad de la enzima málica (E málica).

Aunque la figura 34 muestra que la actividad de la CTE y el transportador antiportecitrato/malato presentan un efecto significativo sobre el ácido cítrico extracelular, en la figura 38 se observa que dicho efecto sobre el ácido cítrico extra celular es muy pequeño en comparación con el efecto del transportador de citrato citosólico.

En todos los casos se observa un efecto de la variable correspondiente al transportador de citrato citosólico al exterior. Las variables con mayor efecto sobre cada una de las variables de respuesta son la actividad de la CTE, el transportador antiportecitrato/malato y el transportador de simporte protón/citrato.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1 Ciclo de Krebs

Primero se evaluará el estado inicial, luego se pasará a explicar el comportamiento de cada una de las variables de flujo con mayor impacto en la acumulación de ácido cítrico, identificadas y mostradas en los resultados

Para empezar, en las condiciones iniciales, el citrato-m presenta una disminución en su concentración, es decir que su tasa de formación es menor que su degradación y expulsión de la mitocondria. Al observar el nivel de los sustratos utilizados por la enzima citrato sintasa para catalizar la formación de dicho compuesto, se encontró que el oxaloacetato mitocondrial (OAA-m) siempre se encuentra en una concentración muy baja. Así, durante la mayor parte del tiempo de simulación, la relación citrato/OAA-m fue mayor a 2 millones.

La reacción catalizada por la enzima citrato sintasa es:



Figura 39. Reacción catalizada por la enzima citrato sintasa.

Donde el cambio de energía libre en condiciones estándar (ΔG°) es de -44.77 kJ/mol, es decir, la concentración en el equilibrio de los productos es cerca de 70 millones de veces mayor a la de los reactivos. Adicionalmente, la concentración de agua en una célula es de 70 %p/v (Palsson, 2011), lo que corresponde a una concentración de 38,8 M. Por lo anterior, se espera que el sistema se encuentre completamente desplazado a la formación de productos (citrato y Coenzima A).

Por otro lado, el segundo sustrato requerido para la reacción catalizada por la enzima citrato sintasa es el acetil-CoA mitocondrial (figura 40) que, a diferencia del OAA-m, se acumula con el transcurso del periodo de simulación. Dado que el OAA-m se encuentra en una concentración muy baja, actúa como reactivo límite en la formación de citrato-m, llevando a la acumulación periódica de acetil-CoA.

A partir de lo anterior, es posible explicar la razón por la cual un aumento en la enzima citrato sintasa no lleva a un incremento en la cantidad de citrato mitocondrial, citosólico o extracelular. Es de esperarse que cualquier evento que lleve a una mayor concentración de acetil-CoA tenga el mismo efecto, como se

observó para el complejo piruvato deshidrogenasa, encargado de catalizar la formación de éste compuesto a partir de piruvato mitocondrial.

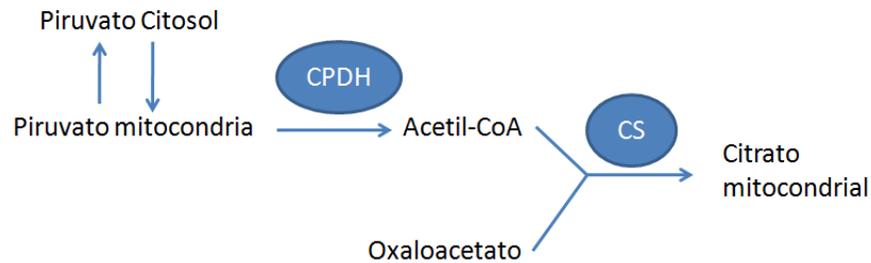


Figura 40. Formación de citrato a partir de oxaloacetato y acetil-CoA. Se muestra la enzima citrato sintasa (CS) y el complejo piruvato deshidrogenasa (CDPH)

Esto corresponde a lo reportado por Ratledge (2000), quien concluye que al aumentar la expresión del gen *citA*, el cual codifica para la enzima citrato sintasa, no se obtiene un aumento en la cantidad de ácido cítrico.

El siguiente paso en el ciclo de Krebs corresponde a la isomerización de citrato en isocitrato y la descarboxilación de éste último. Para empezar el isocitrato alcanza un nivel estable cerca de 1127 μM , lo que indica que la tasa de consumo es similar a la tasa de ingreso.

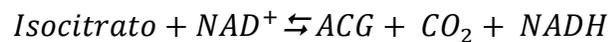


Figura 41. Reacción catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa, ACG: α -cetoglutarato

El equilibrio termodinámico en condiciones estándar de la razón citrato/isocitrato es de 14,65 mientras que la constante de equilibrio de la reacción catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa es de 19,63 en condiciones estándar.

$$K_{eq} = \frac{[\text{ACG}][\text{NADH}][\text{CO}_2]}{[\text{Isocitrato}][\text{NAD}^+]} = 19,63$$

Figura 42. Constante de equilibrio para reacción catalizada por enzima isocitrato deshidrogenasa

Dado que el sistema de estudio no es un sistema aislado, sino que es un sistema abierto, las concentraciones en el equilibrio no se alcanzan. Las constantes de equilibrio empleadas remplazan las constantes cinéticas de procesos reversibles no reportados en la literatura. Por lo tanto, el valor de la constante de equilibrio para cada proceso no se puede tomar como un valor objetivo a alcanzar por cada grupo de compuestos involucrados en una reacción.

En un sistema abierto las concentraciones en estado estacionario se definen en función de las constantes cinéticas de todos los procesos, sin ser igual al valor en el equilibrio químico. De forma general, un *estado estacionario* al igual que estado de equilibrio presentan concentraciones invariables en el tiempo, sin embargo, en

el primero existe un flujo constante de materia y requiere de energía para mantenerse en dicho estado, a diferencia del estado de equilibrio, el cuál corresponde al estado de mínima energía ($\Delta G = 0$) y no requiere un flujo de materia o energía para mantenerse. Si un estado estacionario llega al equilibrio, en el proceso se libera energía.

En la figura 43 se presenta la reacción más simple que puede ocurrir en un sistema abierto.

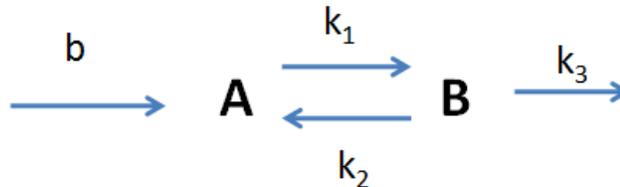


Figura 43. Reacción más simple en un sistema abierto

Con el objetivo de encontrar una expresión matemática que permita conocer la concentración en el equilibrio (sistema cerrado) y en estado estacionario (sistema abierto), se plantean las ecuaciones de balance de masa para los dos componentes del sistema.

$$\frac{d[A]}{dt} = b + k_2[B] - k_1[A],$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] - k_3[B].$$

Si $b=k_3=0$, se tiene un sistema cerrado, luego para encontrar la relación de productos sobre reactivos en el equilibrio ($[B]/[A]$) $d[A]/dt = d[B]/dt = 0$,

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{k_1}{k_2};$$

Si por el contrario b y k_3 son diferentes de cero, la solución del estado estacionario ($d[A]/dt = d[B]/dt = 0$) es

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{k_1}{(k_2 + k_{-1})};$$

De esta forma se quiere mostrar que los valores de los compuestos que alcanza un estado estacionario no tienen que coincidir necesariamente con la relación entre productos y reactivos en el equilibrio.

Retomando el resultado observado en la variable de nivel correspondiente al isocitrato, aunque alcanza un valor invariable en el tiempo, no corresponde a las

concentraciones en el equilibrio ya que no es un sistema cerrado. Sin embargo las leyes de velocidad que describen estos procesos cinéticos, están escritos también en función de la constante de equilibrio para suplir la falta de información de parámetros cinéticos.

El proceso catalizado por la enzima isocitrato deshidrogenasa es un proceso reversible, y presenta una tasa de recambio alta (tabla 5). Esto permite que se alcance un estado estacionario durante el tiempo de simulación.

La reacción catalizada por la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (ACGDH), figura 44, se asumió como un proceso irreversible, ya que $\Delta G^\circ = -40,01$ kJ/mol, sin embargo esta enzima presenta la tasa de recambio más pequeña entre todos los componentes del sistema. Aunque es un proceso termodinámicamente favorable está restringido cinéticamente.

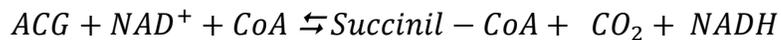


Figura 44. Reacción catalizada por la enzima ACGDH

La variable correspondiente a α -cetoglutarato (ACG), presenta una acumulación inicial para luego alcanzar un estado estacionario. Esto sucede porque, aunque existe un proceso irreversible, ocurre a una tasa muy pequeña comparada con la velocidad de los procesos reversibles catalizados por la enzima isocitrato deshidrogenasa.

Los siguientes compuestos, succinil-CoA, succinato y fumarato presentan una concentración muy pequeña durante el tiempo de simulación, decreciendo exponencialmente. Las enzimas de estos procesos no mostraron tener un impacto significativo durante el proceso de acumulación de ácido cítrico, lo que corresponde a lo reportado por Röhr y Kubicek (1978) y Kubicek (1988).

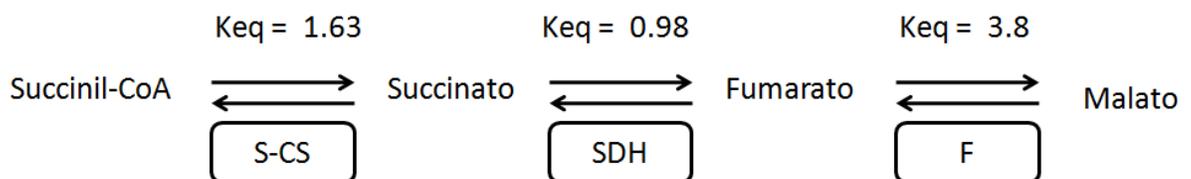


Figura 45. Metabolitos del ciclo de Krebs con un comportamiento similar en el tiempo de simulación. Se presentan las enzimas encargadas de catalizar cada una de las reacciones, succinil-CoAsintasa (S-CS), succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarasa (F). También se muestra la constante de equilibrio para cada proceso en condiciones estándar.

Los pasos catalizados por las enzimas succinil-CoAsintasa (S-CS), succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarasa, presentan un cambio en energía libre menor a -3.31 kJ/mol, donde las concentraciones en el equilibrio corresponden a los valores mostrados en la figura 45.

De acuerdo a lo presentado por Kubicek y Röhr (1978), las concentraciones de succinato y fumarato son bajas. Aunque no se encontró reporte sobre la concentración de succinil-coA, a partir de lo obtenido se puede afirmar que este compuesto disminuye durante la fase de acumulación de ácido cítrico.

Por otro lado, al evaluarse la relación entre la velocidad de los procesos *hacia adelante* y *hacia atrás* de las enzimas S-CS, SDH y fumarasa, fue mayor en todos los casos el proceso *hacia atrás*, es decir, prevaleció el flujo de los procesos que llevan al malato hacia succinil-CoA respecto a la formación de succinil-CoA a malato. Con lo anterior se afirma que la formación de estos compuestos es debido a la alta concentración en la que se encuentra el malato durante la fase de acumulación de ácido cítrico, y a la reversibilidad de las reacciones, y no como consecuencia del catabolismo del citrato.

En último lugar se encuentra la formación de oxaloacetato a partir de malato. Esta reacción, catalizada por la enzima malato deshidrogenasa, se encuentra desplazada hacia la formación de reactivos ya que la energía libre de este proceso en condiciones estándar es de +28,53 kJ/mol, lo que corresponde a una relación de reactivos sobre productos en el equilibrio cercana a 99 mil. En la figura 46 se presenta la reacción catalizada por ésta enzima

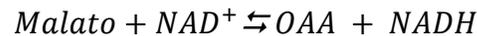


Figura 46. Reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa, donde OAA corresponde a la concentración de oxaloacetato.

En el modelo la relación $[\text{Malato}][\text{NAD}] / [\text{OAA}][\text{NADH}]$ fue muy alta, favoreciendo a los reactivos, sin embargo no corresponde a la relación reportada en el equilibrio, como era de esperarse. El malato y el oxaloacetato no llega a una concentración constante en el tiempo, el primero tiene un crecimiento continuo mientras que el segundo presenta una disminución. A pesar de esto, la relación ρ para esta reacción alcanza un nivel constante durante todo el tiempo de simulación, ver figura 47.

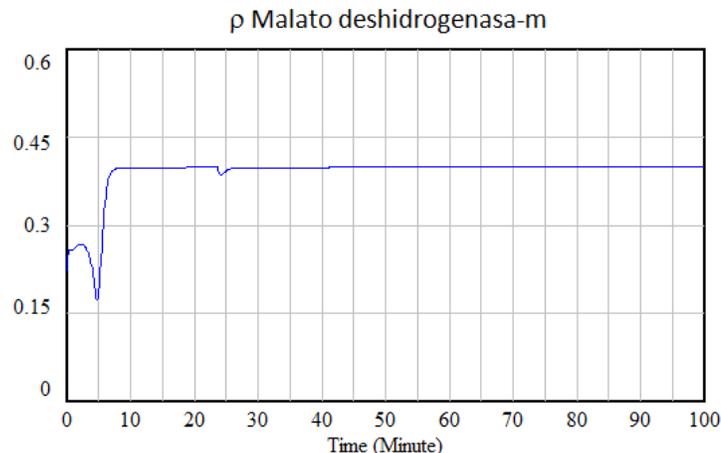


Figura 47. Relación de reactivos y productos en el tiempo t sobre la constante de equilibrio.

Lo encontrado para este proceso sugiere que aunque los compuestos no alcanzan una concentración invariable en el tiempo, llegan a una relación entre productos y reactivos (ρ) que sí se mantiene invariante y lejos del equilibrio termodinámico, que correspondería a un valor de $\rho=1$, de acuerdo a la definición presentada. Esto sugiere que el flujo *hacia adelante* y *hacia atrás* de esta reacción está siendo guiado por el mantenimiento de esta relación ρ , sin embargo nunca se llegan a valores constantes de concentración para cada metabolito.

La razón por la que, a pesar de alcanzar un valor de ρ (para la reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa) constante, no se llega a valores de concentración invariantes en el tiempo, se puede explicar a partir de procesos que involucran factores intra y extra mitocondriales. Para esto primero se presentan los resultados observados para el citrato citosólico y su eliminación hacia el medio celular.

10.2 Medio extra-mitocondrial

La salida de citrato-c al exterior ocurre a través de un transportador simporte protón/citrato (Burgstaller, 2006). Este proceso se considera irreversible, ya que el medio extracelular (pH=2) existe en mayor proporción la forma protonada, mientras en el interior de la célula (pH=7.6) está en mayor proporción la forma ionizada $C_6H_5O_7^{3-}$. Como son especies diferentes se asume que la salida de citrato-c no debe estar limitada por la relación de las concentraciones de ácido cítrico (exterior) y citrato-c ($C_6H_5O_7^{3-}$). Esto es coherente a lo encontrado en las condiciones de crecimiento, pues se requiere un medio ácido para la acumulación de ácido cítrico.

Como la salida de citrato-c es irreversible su concentración disminuye de forma continua, luego la salida de citrato mitocondrial se ve favorecida porque la relación $[Citrato-c]/[Malato-m]$ decrece (ecuación 23).

Un sistema abierto alcanza un estado estacionario si la velocidad de los procesos internos es mayor que la de los procesos externos (entradas y salidas del sistema) (Palsson, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior y que el flujo de salida de citrato tiene una magnitud comparable a los procesos internos modelados, no se alcanza un estado estacionario para las variables directamente relacionadas con la salida de citrato del sistema.

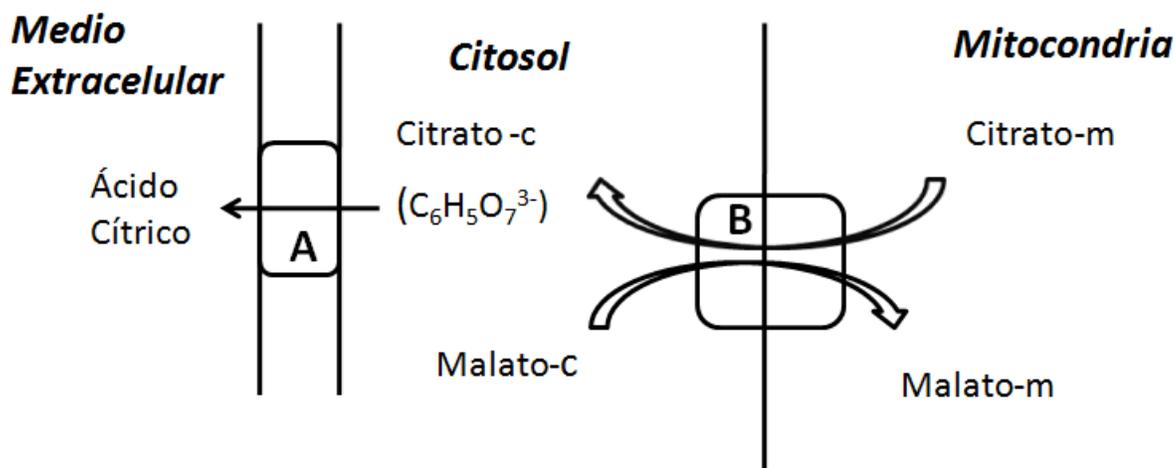


Figura 48. (A) Transportador de simporteprotón/citrato y (B) transportador antiporte citrato/malato

La razón por la que ciertos compuestos del ciclo de Krebs alcanzan un estado estacionario, se debe a que la primera reacción (figura 39) catalizada por la citrato sintasa (entrada del ciclo), tiene un flujo muy pequeño comparado con los procesos internos de este ciclo. De igual forma la actividad de la ACGDH al ser tan pequeña permite que compuestos como el isocitrato y ACG alcancen un estado estacionario.

Ahora se presenta lo encontrado sobre las variables involucradas en la síntesis de los ácidos grasos en estado inicial con el modelo. La ATP citrato liasa es el principal punto de control del metabolismo de los ácidos grasos (Pfitzner *et al.*, 1987), la cual cataliza la reacción mostrada en la figura 7.

La relación entre productos y reactivos de la reacción de la figura 7 alcanza en el equilibrio, en condiciones estándar, un valor de 0.029, lo que indica que está desplazada hacia la formación de reactivos (citrato, ATP y Coenzima A). Aunque esta enzima está directamente relacionada con la formación de citrato citosólico, no tuvo un efecto significativo sobre la producción de este al momento de realizar el análisis de sensibilidad. También se encontró que la variable de nivel de ácidos grasos aumenta, correspondiendo a la alta carga energética que se presenta en las condiciones de acumulación, donde se favorece la síntesis sobre la oxidación de estos ácidos.

Por último las variables de nivel correspondientes a NADH y NAD⁺, muestran un cambio acelerado hasta llegar a un estado estacionario. En la figura 26.b y 26.c se observa que el nivel de NADH se mantiene constante en el tiempo de simulación al igual que el NAD⁺, sin embargo la concentración del primero es siempre mayor.

El aumento de NADH coincide a lo encontrado por Diano *et al* (2009) dadas las condiciones de acumulación de ácido cítrico.

El nivel tan alto de NADH y bajo de NAD⁺ durante el tiempo de simulación, resultó ser el factor limitante de la velocidad de las reacciones, los procesos de inhibición reportados para el ciclo de Krebs (competitiva, por producto y no competitiva) no mostraron tener un impacto importante sobre la velocidad. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos de Wallrath *et al* (1991) y Prömper *et al* (1993), que afirman que la principal causa de la acumulación de ácido cítrico ocurre por la relación NADH/NAD⁺.

Los resultados obtenidos llevan a suponer que un aumento en la concentración o tasa de recambio de las enzimas que requieren NAD⁺ como sustrato, no altera el catabolismo de citrato, ya que la concentración en la que se encuentra el NAD⁺ es muy baja. Adicionalmente, el nivel de ACG durante la simulación presentó valores de concentración similares o menores a los dos valores de K_m reportados para la enzima ACGDH.

A partir de lo encontrado con el modelo se propone que el proceso de acumulación ocurre por la baja relación NAD⁺/NADH y los altos valores de K_m para la enzima ACGDH. De acuerdo a las ecuaciones multi-sustrato (ecuaciones 12,13 y 14), el denominador D es la suma de producto K_m, lo que conlleva a una disminución sobre la velocidad neta del proceso. A continuación se muestra un poco más en detalle el efecto de las constantes de Michaelis para una reacción de dos sustratos

En la ecuación 2 se presentó la expresión de velocidad inicial para una reacción irreversible catalizada enzimáticamente de un sustrato. En esta ecuación se observa que cuando la concentración de sustrato inicial [S]₀ es igual a K_m, se alcanza la mitad de la velocidad máxima.

$$v_o = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]_o}{[S]_o + K_s}, \quad [S]_o = K_m, \quad v_o = \frac{V_{m\acute{a}x}K_m}{K_m + K_m} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{2};$$

Para una reacción de dos sustratos irreversible bajo un mecanismo secuencial ordenado, la velocidad inicial se define como:

$$v_o = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{iA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]};$$

Donde K_A y K_B son constantes de Michaelis y K_{iA} es la constante de disociación. Bajo un tratamiento similar al realizado en la ecuación de velocidad inicial para un sustrato y asumiendo K_{iA} = K_A, se obtiene

$$[A] = K_A, \quad [B] = K_B, \quad \text{luego} \quad v_o = \frac{V_{max}K_AK_B}{K_AK_B + K_BK_A + K_AK_B + K_AK_B},$$

$$v_o = \frac{V_{max}K_AK_B}{4K_AK_B} = \frac{V_{max}}{4};$$

Luego para una reacción de dos sustratos irreversible la velocidad inicial, cuando los sustratos son iguales a sus valores de K_m , es cuatro veces menor a la velocidad máxima. El proceso catalizado por la enzima ACGDH se aproximó a una reacción similar a la presentada, dada la energía libre del proceso que cataliza, el cual puede asumirse como irreversible.

En resumen, el proceso catalizado por la enzima ACGDH muestra la menor tasa de recambio y valores de K_m similar o mayor a la concentración reportada en la simulación, lo cual hace que su velocidad sea al menos cuatro veces menor respecto a la velocidad máxima, que ya en un principio es muy baja.

En conclusión, la baja actividad de la enzima ACGDH en las condiciones de acumulación de ácido cítrico, la baja relación NADH/NAD⁺ y los altos valores de K_m hacen que éste proceso sea la causa por la cual no ocurre un catabolismo del citrato, permitiendo su acumulación.

Adicional a lo anterior, se puede explicar la razón por la cual enzimas como la aconitasa e isocitrato deshidrogenasa no tienen un impacto importante en la concentración de ácido cítrico, ya que no son el paso que restringe la acumulación de citrato. A pesar de esto, en la sección de resultados se mostró que la enzima ACGDH no tiene importancia en la acumulación de citrato; esto se debe a que un incremento en la actividad de esta enzima requiere un aumento drástico de su tasa de recambio y una considerable disminución de las constantes de Michaelis.

10.3 Análisis de sensibilidad

Todas las variables de flujo que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de citrato citosólico y ácido cítrico extracelular pertenecen a enzimas ubicadas en el citosol, a transportadores y por último la actividad de la CTE.

En primer lugar, se estudiarán los resultados obtenidos por los transportadores. El transportador citrato/malato antiporte permite que el producto de las concentraciones de citrato y malato en cada compartimento sea la misma. Dado que el citrato-c sale a una tasa continua, este debe ser sustituido con citrato-m como fue mencionado. Si se permite que la salida de este compuesto, acoplado con un ingreso de malato, ocurra más rápido a través del aumento de

transportadores, se obtiene una mayor acumulación de citrato-c, el cual será expulsado por el transportador protón/citrato simporte.

La acumulación de ácido cítrico en el exterior, de acuerdo a lo obtenido en el diseño experimental, depende del transportador de citrato hacia el exterior (transportador simporteprotón/citrato), la actividad de la CTE y el transportador antiportecitrato/malato (figura 35). Sin embargo, en la figura 38 se muestra que el efecto sobre la variable ácido cítrico extracelular es generada principalmente por el primer transportador mencionado, lo cual lleva a plantear que el proceso expulsión de citrato al exterior está restringido por la disponibilidad de éste transportador. Cualquier aumento en la concentración de citrato-c debe estar acoplado a un aumento en la expresión de los transportadores protón/citrato simporte, sino solo se obtendrá citrato-c y no ácido cítrico extracelular.

La cadena de transporte de electrones (CTE) presenta un efecto estadísticamente significativo sobre las variables de nivel correspondientes a de citrato-c y citrato-m (figuras 33 y 34). Para estas variables ocurre una disminución al momento de aumentarse la actividad de la CTE y lo contrario al disminuirla. Para explicar esto se debe recordar que el proceso mencionado permite la oxidación de NADH en NAD^+ , que es el sustrato para las reacciones de oxidación del ciclo de Krebs que llevan al catabolismo del citrato-m, si ocurre un aumento en la actividad de la CTE se obtiene un aumento en la disponibilidad de NAD^+ y al disminuirla ocurre lo contrario, favoreciendo su catabolismo.

Finalmente, las enzimas extra-mitocondriales que presentan un efecto significativo son la piruvatocarboxilasa y la enzima málica. En primer lugar se muestra de forma esquemática el papel que desempeñan en el medio extra-mitocondrial.

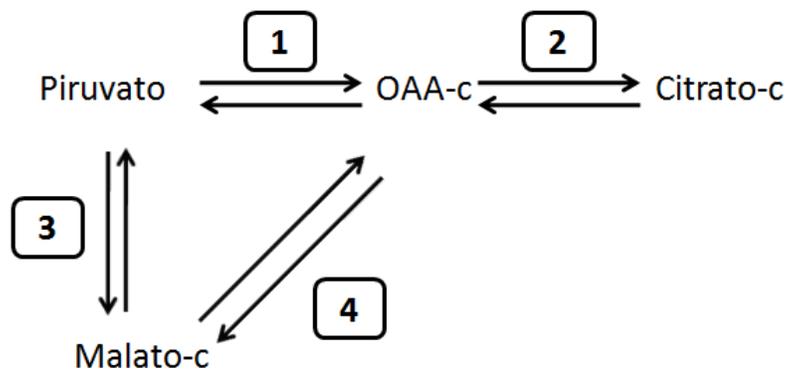


Figura 49. Se muestran algunos de los eventos extra mitocondriales modelados (1) piruvatocarboxilasa, (2) ATP Citrato liasa, (3) Enzima málica (4) malato deshidrogenasa-c.

A partir de la figura 49 se puede explicar la razón por la cual las enzimas mencionadas presentan el mayor efecto en el análisis de sensibilidad. En primer lugar la piruvatocarboxilasa lleva directamente a la formación de OAA-c, lo que desplaza hacia la formación de citrato la reacción catalizada por la enzima ATP

Citrato liasa. La razón por la que ésta última enzima no tiene un efecto considerable al momento de realizar el análisis de sensibilidad, aunque lleve a la síntesis directa de citrato-c, es porque su actividad está limitada por la disponibilidad de OAA-c, el cual se encuentra en muy baja concentración. Aunque la tasa de recambio, concentración o las constantes de Michaelis para esta enzima sean modificadas, no se tiene un incremento a menos que se aumente la concentración de éste compuesto.

Por otro lado, un aumento en la enzima málica incrementa la conversión de piruvato en malato-c, ya que en el modelo se observa que el flujo hacia malato es mayor respecto al proceso inverso. Al haber una mayor cantidad de malato-c, se favorece el transporte de citrato-m hacia el citosol, por lo que ocurre un aumento en la razón $\frac{[\text{Malato-c}]}{[\text{Citrato-m}]}$ haciendo más favorable la salida de citrato y entrada de malato a la mitocondria.

10.4 Soluciones propuestas

Aunque es necesario que ocurra un bloqueo en el ciclo de Krebs, modificar la actividad de estas enzimas, en particular la ACGDH, no representaría por sí solo, un aumento significativo sobre la acumulación de citrato-c y menos de ácido cítrico. Se encontró en el modelo de simulación que es necesario considerar otros procesos extra-mitocondriales.

Una disminución en la actividad de la CTE puede llevar a un aumento de citrato-c, sin embargo esto podría tener efectos negativos durante la fase de crecimiento del organismo estudiado. Al tener una fase de crecimiento mayor, la suma del tiempo empleado en crecimiento y acumulación de ácido cítrico sería mayor, lo que ocasionaría que el proceso de producción de ácido cítrico pueda llegar a ser menos eficiente. En otras palabras, aunque se genere mayor cantidad de ácido cítrico durante la fase de acumulación, producirlo tardaría más tiempo, como consecuencia de una fase de crecimiento más lenta. Esto se presenta en base a los estudios realizados por Wallrath *et al* (1991).

En el trabajo que realizaron muestran que en condiciones de no-acumulación y acumulación de ácido cítrico, la cepa silvestre presenta un mayor crecimiento respecto a un mutante que tiene el complejo 1 inhibido (figura 50).

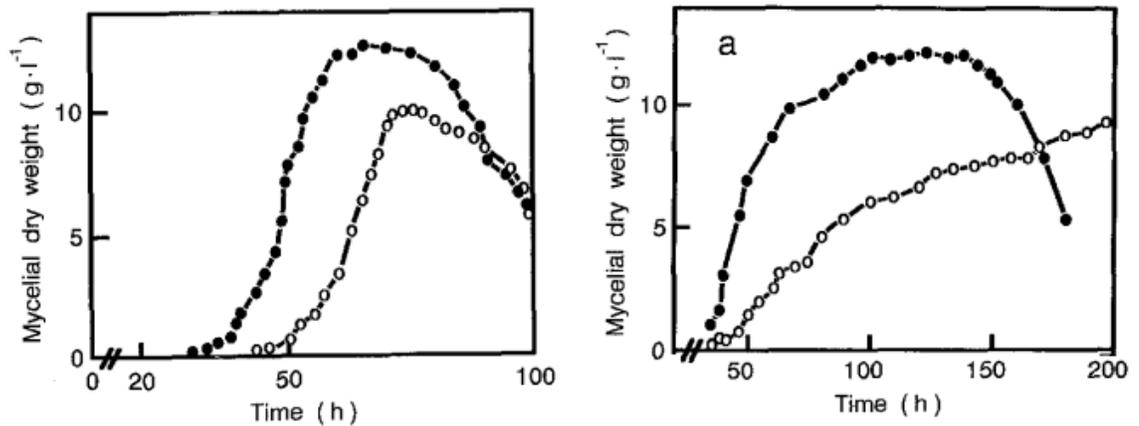


Figura 50. Crecimiento de *A. niger* en condiciones de (a) acumulación de ácido cítrico y en (b) condiciones de no acumulación. Círculos rellenos representan la cepa silvestre mientras que los círculos vacíos la cepa mutante. (Fuente: Walirath, Schmidt, & Weiss, Concomitant loss of respiratory chain NADH: ubiquinone reductase (complex I) and citric acid accumulation in *Aspergillusniger*, 1991)

Por esta razón, modificar la CTE no será considerado como parte una solución final para la problemática estudiada. Ahora se presenta cuatro soluciones a partir de los resultados obtenidos del modelo, sin embargo primero se debe aclarar lo siguiente. Dado que la expulsión de citrato-c está limitado por el transportador protón/citrato simporte, se debe aumentar la expresión de este transportador para que cualquier evento enfocado en mejorar la concentración de citrato-c tenga efecto sobre la cantidad de ácido cítrico en el exterior, incluso en condiciones iniciales.

A partir del análisis de sensibilidad y el diseño experimental, se logró identificar los procesos que de manera independiente llevan a una mayor acumulación de ácido cítrico, sin embargo aumentar uno solo de estos componentes no lleva a una mejora superior del 10% (Sin tener en cuenta la actividad de la CTE) respecto al estado inicial. Para aumentar este porcentaje se combinan las variables de mayor impacto junto con un hallazgo importante identificado en el modelo de simulación, explicado a continuación.

Las variables de nivel correspondientes a piruvato extra e intra mitocondrial (piruvato -c y piruvato-m, respectivamente), se acumulan en el tiempo de simulación, lo que corresponde a lo encontrado por Kubicek y Röhr (1978). Este compuesto que representa un punto de ramificación, es utilizado por dos enzimas, complejo piruvato deshidrogenasa y piruvatocarboxilasa, para formar acetil-CoA (mitocondrial) y oxaloacetatocitosólico (OAA-c) respectivamente. Ambos compuestos son sustratos para enzimas que llevan directamente a la formación de citrato-c y citrato-m, la ATP Citrato liasa y la citrato sintasa, respectivamente.

La estrategia general para aumentar la producción de ácido cítrico consiste en aumentar el citrato-c, generado a partir de la enzima ATP Citrato liasa, y el obtenido en el ciclo de Krebs por la enzima citrato sintasa. Se observó en el modelo que para ambas enzimas, la velocidad está limitada por la disponibilidad de oxaloacetato, luego las estrategias a presentar consisten en mejorar la concentración de este metabolito, ya sea su concentración intra o extra mitocondrial (OAA-m y OAA-c). Para esto se propone re-distribuir el exceso del flujo de glicólisis, acumulado como piruvato, hacia la formación directa de citrato modificando el menor número de componentes (enzimas o transportadores).

Como fue mencionado, la actividad de la enzima ATP Citrato liasa está limitada por la disponibilidad de oxaloacetatocitosólico (OAA-c), al igual que la citrato sintasa, luego al aumentar la cantidad de éste compuesto, de forma directa se genera un aumento de citrato. Dado que la enzima piruvatocarboxilasa se encuentra en el citosol, un aumento de su actividad lleva directamente a una mayor formación de OAA-c, que desplaza la reacción catalizada por la ATP Citrato liasa hacia la formación de citrato (figura 49).

Aunque la enzima ATP Citrato liasa presenta valores de K_m mucho mayores a la concentración de OAA-c, al tener una actividad reducida no fue significativo disminuir estos valores, tuvo un mayor impacto aumentar su tasa de recambio o concentración. Por este motivo solo se aumenta la actividad de esta enzima a partir de su concentración, acoplado con el aumento de la actividad en la enzima piruvatocarboxilasa. Por lo tanto, la primera propuesta de solución (solución 1) consiste en aumentar la velocidad de los procesos catalizados por las enzimas ATP Citrato liasa y piruvatocarboxilasa a partir de duplicar su concentración en el modelo.

Adicional al comportamiento observado para las variables piruvato-c y piruvato-m durante la simulación, también se usa la evidencia presentada al principio del análisis, en donde se argumenta que la formación de citrato-m está limitada por la disponibilidad de OAA-m (reactivo límite), lo que implica que el segundo sustrato necesario para la síntesis de citrato (acetil-CoA), se está acumulando al ser mayor la tasa de ingreso que de consumo (figura 39).

Como el acetil-CoA, sustrato para la enzima citrato sintasa, se genera a partir de piruvato-m, éste compuesto también se acumula, lo que quiere decir que parte de la “materia prima” necesaria para obtener citrato no está siendo utilizada en la mitocondria. Por lo anterior, se propone usar el piruvato-c y piruvato-m acumulado para favorecer la formación de citrato-c.

La segunda solución propuesta consiste en aumentar la actividad de la enzima citrato sintasa al aumentar la concentración de OAA-m. Para lo anterior se debe expresar la enzima piruvatocarboxilasa en la mitocondria, la cual normalmente se encuentra ubicada solo en el citosol en *A. niger* (Jaklitsch, Kubicek, & Scrutton, 1991). Como se espera aumentar la concentración de citrato-m, la solución

propuesta también involucra un aumento en la disponibilidad del transportador antiportecitrato/malato.

En tercer lugar se propone una suma de las anteriores propuestas de solución, esperando tener un efecto acumulativo. A continuación se presenta la mejora lograda con cada una de las soluciones en términos relativos y la gráfica de citrato-c.

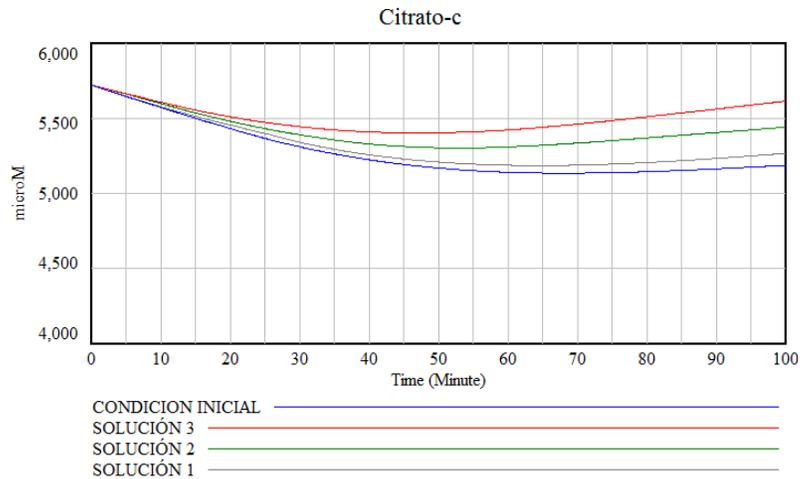


Figura 51. Diferentes estrategias enfocadas en mejorar la concentración de citrato-c. Se presenta cada una de las soluciones y el estado inicial del sistema.

Después de evaluar diferentes escenarios de las enzimas mencionadas, se encontró que la mejor opción (de acuerdo a la estrategia presentada) ocurre cuando se mejora la concentración y tasa de recambio de la enzima piruvatocarboxilasa, intra y extra mitocondrial. Al incrementar la actividad de la ATP Citrato liasa, se genera un aumento muy pequeño sobre el escenario descrito, por lo cual la propuesta de solución final solo toma en cuenta la enzima piruvatocarboxilasa y el transportador citrato/malato antiporte.

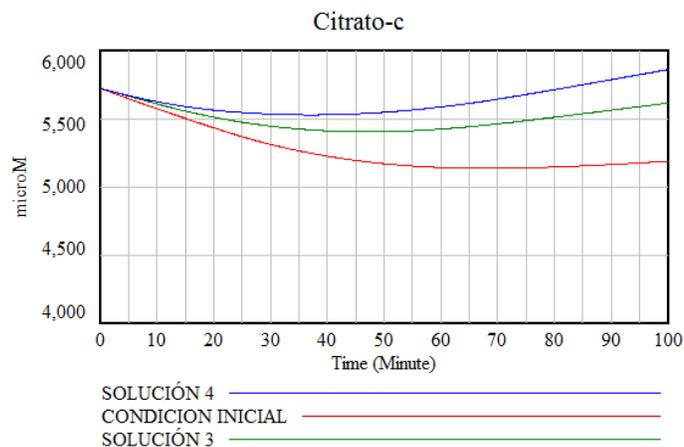


Figura 52. Diferentes estrategias enfocadas en mejorar la concentración de citrato-c. Se presenta cada una de las soluciones y el estado inicial del sistema.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8. De esto se concluye que el mayor aumento en la acumulación de citrato-c, modificando el menor número de componentes (enzimas y transportadores), ocurre al incrementar la tasa de recambio y expresión de la enzima piruvatocarboxilasa y la expresión del transportador antiportecitrato/malato. Lo anterior debe combinarse con un aumento en la expresión del transportadoresimporte protón/citrato que lleva a una mayor cantidad de ácido cítrico en el medio extracelular, si hay mayor citrato-c, mayor será la actividad de estos transportadores.

Tabla 8. Aumento en la concentración de citrato citosólico logrado con cuatro escenarios diferentes.

Condiciones	Mejora relativa
Propuesta de solución 1	1,76%
Propuesta de solución 2	4,67%
Propuesta de solución 3	7,61%
Propuesta de solución 4	11,48%

A partir de lo hasta ahora presentado se puede concluir que, aunque el bloqueo generado en el ciclo de Krebs por la relación $NAD^+/NADH$ y la baja actividad de la enzima ACGDH son necesarias para permitir la acumulación de ácido cítrico, no se mejora su producción a partir de la modificación de ésta enzima u otra ubicada en el ciclo de Krebs. La obtención de ácido cítrico extracelular solo depende de la concentración de citrato-c y la cantidad de transportadoresimporte protón/citrato, por lo que el aumento en la expresión de estos transportadores debe estar acoplado al aumento del citrato-c.

Respecto al citrato-c, se identificó que los pasos que limitan su producción son (i) su propia síntesis por la enzima ATP Citrato liasa (citosol), (ii) la síntesis del citrato-m por la enzima citrato sintasa (mitocondrial) y (iii) la cantidad de transportadores antiporte citrato/malato en la membrana mitocondrial. Los pasos enzimáticos mencionados representan una restricción no por la tasa de recambio inherente de cada enzima sino por la disponibilidad de oxaloacetato, uno de sus sustratos. Por lo anterior los procesos que lleven a su obtención son los recursos *scuellos de botella* y de acuerdo a la teoría de Restricciones, cualquier evento enfocado a mejorar dichos procesos (producción de OAA) aumenta la salida del sistema (ácido cítrico) (Goldratt, 2005).

Al eliminar la restricción causada por el transportadores importe protón/citrato al aumentar su tasa de expresión, se hace relevante la disponibilidad de

oxaloacetato que lleva a la formación de citrato-c. Para solucionar esta última restricción se aumentó la expresión de la enzima piruvatocarboxilasa, la cual sintetiza este compuesto a partir de piruvato. Sin embargo el incremento en citrato-c no ocurre de forma ilimitada ya que existe una restricción termodinámica que no se puede superar. La restricción mencionada corresponde a la magnitud que alcanza la relación malato/oxaloacetato en el equilibrio termodinámico, la cual es un poco mayor a 99 mil, es decir que la reacción está muy desplazada hacia la formación de malato (ver figura 46). En el organismo estudiado están presentes ambos compuestos tanto en la mitocondria como en el citosol, lo que favorece la formación de malato y una baja concentración de oxaloacetato en todo el periodo de simulación (figura 23 y 24). Ésta restricción termodinámica impide lograr una mejora constante con el solo aumento de la enzima piruvatocarboxilasa.

En conclusión, la solución propuesta se resume en la ampliación del *cuellos de botella* encontrados en el sistema al aumentar la expresión y tasa de recambio de transportadores y enzimas. Sin embargo la concentración de OAA representa una restricción imposible de superar a pesar del aumento en la expresión de la enzima piruvatocarboxilasa.

10.5 Convergencias y Divergencias con el Diagrama Causal

A partir de los resultados obtenidos con el modelo de *Flujos y Niveles* hasta ahora descrito, a continuación se presenta una comparación entre lo anterior y lo que se esperaba encontrar a partir del diagrama causal mostrado en la figura 16.

Al momento de plantear la hipótesis dinámica se encontró que el ciclo de Krebs es un ciclo de refuerzo acoplado a dos ciclos de balance: la Fosforilación Oxidativa y la oxidación de los lípidos (gasto de energía). En el primero, se restringe la disponibilidad de NAD^+ , sustrato necesario para la degradación de citrato-m (base conjugada del ácido cítrico), y formación de precursores de *ácido cítrico*, a partir de la actividad de la CTE. El segundo también restringe la disponibilidad de otros precursores necesario para la formación de citrato-m.

Aunque se encontró que modificar la actividad de las enzimas dentro del ciclo de Krebs no genera un cambio importante sobre la acumulación de ácido cítrico, es necesario que enzimas como la ACGDH generen un bloqueo que permita dicha acumulación. Este bloque ocurre gracias a la baja actividad de esta enzima y a la baja disponibilidad de NAD^+ , de esta forma el primer ciclo de balance regula el proceso de acumulación de ácido cítrico. Esto corresponde al arquetipo identificado y mostrado en la sección de resultados, "*Límites de Crecimiento*".

Por otro lado el proceso de gasto de energía, oxidación de lípidos, es un proceso que se encuentra regulado y restringe de forma similar el crecimiento del ciclo de Krebs. Si este proceso no fuera un ciclo de balance, el crecimiento sería exponencial, al igual que el gasto de energía. Dada la naturaleza del sistema estudiado, es de esperarse que los procesos de regulación (ciclo de balance) sean muy fuertes y no permitan que las variables involucradas en el ciclo de refuerzo alcancen valores elevados.

Lo anterior ocurre porque los procesos mostrados en el diagrama causal no consideran a todas las variables de entrada al mismo tiempo. Una relación causal de X a Y de polaridad positiva, indica que al aumentar (disminuir) la variable X , la variable Y aumenta (disminuye) en alguna medida asumiendo que todos los demás componentes son constantes (Sterman, 2000). Para darle vida al diagrama causal (Sengel, 1997) y observar la dinámica del sistema estudiado, se debe construir el modelo de *Flujos y Niveles*, y solo a partir de éste se puede ver la interacción de todas las variables de forma simultánea, llevando a plantear estrategias de mejora al sistema-problema estudiado.

La primera estrategia trabajada y ya discutida fue mejorar la disponibilidad de los *Precusores de Ácido Cítrico* en el ciclo de Krebs, sin embargo al modificar variables dentro de alguno de los *ciclo de balance*, no se observó un crecimiento importante en la variable citrato-m. Esto llevó a proponer una solución dirigida al uso de un recurso cuya formación no está siendo regulada en el organismo, es decir, no pertenece a un ciclo de balance. Solo a partir del modelo de *Flujos y Niveles* se pudo evaluar las diferentes estrategias y evidenciar el efecto tan fuerte de los procesos de regulación (ciclos de balance).

A partir del modelo de *Flujos y Niveles* se decidió usar el piruvato, producto final de la glicólisis y que no se encuentra regulado o no pertenece a algún ciclo de balance (ver figura 9 y 10). Al favorecer el uso de este compuesto se logró la mejor solución, presentada y discutida anteriormente.

Se concluye que aunque el diagrama causal permite explicar en palabras los procesos de realimentación y proponer soluciones cualitativas, es solo en el modelo de *Flujos y Niveles* donde se puede observar la verdadera dinámica y cuantificar el efecto de los ciclo de balance sobre las variables de respuesta, lo que permite finalmente proponer estrategias de mejoramiento.

11. CONCLUSIONES

- Las ecuaciones de cinética enzimática que consideran irreversibles las reacciones catalizadas, no son adecuadas para representar el comportamiento *in vivo* de los sustratos y los productos; se deben ajustar en función de su distancia con el equilibrio termodinámico. Solo de esta forma fue posible el desplazamiento de las reacciones modeladas en función de las concentraciones de los diferentes compuestos o variables de Nivel.
- No se encontró que las enzimas del ciclo de Krebs tuvieran un efecto significativo sobre el aumento de la concentración de citrato-m. A pesar de esto, el comportamiento cinético de estas enzimas es necesario para que ocurra el proceso de acumulación de citrato-m.
- El ciclo de Krebs y la Fosforilación Oxidativa muestran una estructura similar al arquetipo de “Límites de Crecimiento”, donde la velocidad del ciclo se encuentra limitado por la disponibilidad de NAD^+ , compuesto que se genera durante la Fosforilación Oxidativa.
- No se encontró que el metabolismo de los ácidos grasos tuviera un efecto significativo sobre la acumulación de ácido cítrico.
- La acumulación de ácido cítrico extra-celular depende de citrato-c y los transportadores simporte protón/citrato. Para generar un aumento en la eficiencia del proceso se deben ampliar estas restricciones.
- A medida que se eliminaban restricciones, se encontró que la producción de citrato-c y citrato-m se encuentra limitado por la baja concentración de oxaloacetato, sin embargo para aumentar la concentración de éste último se debe superar una restricción termodinámica del sistema, lo cual no es posible.
- Se explicó el resultado obtenido por Ratledge (2000) en función de las restricciones encontradas en el modelo de simulación.
- La formación de oxaloacetato es el recurso *cuello de botella*, por lo que cualquier evento enfocado en aumentarlo tendrá el mismo efecto sobre la salida del sistema. Por esta razón los procesos catalizados por la enzima piruvatocarboxilasageneraron el mayor aumento sobre la obtención de citrato-c, que tiene un impacto directo sobre la concentración de ácido cítrico extra-mitocondrial.

12. RECOMENACIONES

Con el modelo de simulación fue posible identificar aquellos procesos metabólicos que tienen el mayor impacto sobre el proceso de acumulación de ácido cítrico. De igual forma fue posible identificar las restricciones presentes en el sistema de estudio.

A partir de los resultados y el análisis presentado, se recomienda:

- No invertir en proyectos de investigación destinados a modificar las enzimas ubicadas en el ciclo de krebs. No se encontró que alguna de estas tuviera un impacto significativo sobre el proceso de acumulación de ácido cítrico. El comportamiento cinético de las enzimas mencionadas permite que se lleve a cabo el proceso, mas no lo mejoran.
- La Fosforilación Oxidativa presentó el mayor efecto sobre la acumulación de ácido cítrico, sin embargo reducir su actividad para incrementar la cantidad de este compuesto puede ocasionar una disminución de la eficiencia del proceso completo. Una menor actividad de la FosforilaciónOxidativa aumenta la cantidad de ácido cítrico obtenido, pero el tiempo de crecimiento se hace mayor como se reporta en la literatura,por lo que no se recomienda modificar este proceso.
- El proceso bioquímico que lleva a la producción de ácido cítrico presenta diferentes restricciones que limitan el flujo que lleva a su obtención,la propuesta final está basada en aumentar dichas restricciones.Se recomienda concentrar el esfuerzo investigativo experimental en los procesos enzimáticos y de transporte identificados, presentados y discutidos.
- La enzima piruvatocarboxilasa, el transportador antiporte citrato/malato y el transportador simporte protón/citrato logran un aumento importante en la acumulación de ácido cítrico, por ello se recomienda que a nivel experimental sean estas proteínas un blanco importante de diferentes estudios enfocadas en aumentar su actividad y/o expresión.
- Los estudios experimentales dirigidos a aumentar la producción de ácido cítrico, no deben estar encaminados a dilucidar procesos de inhibición o modificar el nivel de expresión y/o tasas de recambio en enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs, ya que no generan un aumento en esta variable.

13. REFERENCIAS

- Borshchev, A., & Filippov, A. (2004). From system dynamics and discrete event to practical agent based modeling: reasons, techniques, tools. 1-3.
- Bruice, P. (2008). *Química orgánica*. Atlacomulco: Pearson Educación.
- Burgstaller, W. (2006). Thermodynamic boundary conditions suggest that a passive transport step suffices for citrate excretion in *Aspergillus* and *Penicillium*. *MICROBIOLOGY*, 887-893.
- Cleland, w., & Johnson, M. (1954). Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*, 679-692.
- David, H., Akesson, M., & Nielsen, J. (2003). Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. 4243-4253.
- Grunwald, P. (2009). *Biocatalysis: biochemical fundamentals and applications*. London: Imperial College.
- Hannon, B., & Ruth, M. (1997). *Modeling dynamic biological systems*. New York: Springer Verlag.
- Hurst, C. (1992). *Modeling the metabolic and physiologic activities of microorganisms*. John Wiley & Sons.
- Jaklitsch, W., Kubicek, C., & Scrutton, M. (1991). Intracellular organisation of citrate production in *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 823-827.
- Jernejc, K., & Legisa, M. (2002). The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger*. *Microbiology letters*, 185-190.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol*, 189-196.
- Kristiansen, B., Matthey, M., & Linden, J. (2002). *Citric Acid Biotechnology*. Taylor & Francis.
- Kubicek, C. ..., & Röhr, M. (1978). The role of the tricarboxylic Acid Cycle in Citric Acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 263-271.
- Kubicek, C. P. (1988). The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations. 113-126.

- Kubicek, C. (1988). REGULATORY ASPECTS OF THE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE IN FILAMENTOUS FUNGI -A REVIEW. *Abteilung fur Mikrobielle Biochemie* , 339-349.
- Kubicek, C. (1988). The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations. *Biochemical Society Symposium* , 331-373.
- Kubicek, C., & Röhr, M. (1985). Aconitase and Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* , 1336-1338.
- Legiša, M., & Matthey, M. (2006). Changes in primary metabolism leading to citric acid. 181-190.
- Legiša, M., & Matthey, M. (1986). Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions. *Enzyme Microb Technol* , 258-259.
- Lema, J. M., & Roca, E. (2005). *Ingeniería bioquímica*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Levine, I. N. (2004). *Fisicoquímica*. Madrid: McGraw-Hill.
- Ma, H., Kubicek, C., & Röhr, M. (1981). Malate dehydrogenase isoenzymes in *Aspergillus niger*. *Microbiology Letters* , 147-151.
- Melo, V., & Cuamatzi, O. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Morecroft, J. (2007). *Strategic modeling and business dynamics*. Wiley.
- Palsson, B. O. (2011). *Systems biology: simulation of dynamic network states*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *ScienceDirect* , 244-263.
- Pfützner, A., Kubicek, C. P., & Röhr, M. (1987). Presence and regulation of ATP: citrate lyase from the citric acid producing fungus *Aspergillus niger*. 88-91.
- Prömper C, S. R. (1993). The role of the proton-pumping and alternative respiratory chain NADH:ubiquinone oxidoreductases in over flow catabolism of *Aspergillus niger*. 223-230.
- Punekar, N., Vaidyanathan, C., & Appaji, N. (1984). Mechanism of Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*. *Journal of scientific and Industrial Research* , 398-404.
- Purich, D. L. (2010). *Enzyme Kinetics: Catalysis and control*. San Diego: Elsevier.

- Röhr, M., & Kubicek, C. P. (1978). The role of the tricarboxylic acid cycle in citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 263-271.
- Rubinstein, R., & Melamed, B. (1998). *Modern simulation and modeling*. Wiley.
- Sauro, H. M. (2013). *Enzyme kinetics for systems biology*. Lexington, Kentucky : Ambrosius Publishing.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York: John Wiley & Sons.
- Senge, P. (1997). *La quinta disciplina en la práctica*. Granica.
- Senge, P. (1990). *The fifth discipline: the art and practice of the learning organization*. New York: Doubleday.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. 141-149.
- Sterman, J. (2000). *Business dynamics: System thinking and modeling for a complex world*. The McGraw-Hill.
- Sthephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering*. Academic Press.
- Stryer, L., Berg, J. M., & Tymoczko, J. (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté.
- Szczodrak, J. (1981). Biosynthesis of Citric Acid in Relation to the Activity of Selected Enzymes of the Krebs Cycle in *Aspergillus niger* Mycelium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107-112.
- Torres, N., Gonzalez, C., & Alvarez, F. (2000). Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: Model definition, Steady-state Analysis and constrained optimization of citric acid production rate. 81-102.
- Waites, M., Morgan, N., Rockey, J., & Higton, G. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. Londres: Blackwell Science.
- Walirath, J., Schmidt, M., & Weiss, H. (1991). Concomitant loss of respiratory chain NADH: ubiquinone reductase (complex I) and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76-81.
- Walirath, J., Schmidt, M., & Weiss, H. (1991). *Concomitant loss of respiratory chain NADH: ubiquinone reductase (complex I) and citric acid accumulation in Aspergillus niger*. Applied Microbiology Biotechnology.

Wallrath, J., Schmidt, J., & Weiss, H. (1991). Concomitant loss of respiratory chain NADH:ubiquinone reductase (complex I) and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76-81.

Wishart, D., Yang, R., Arndt, D., Tang, P., & Cruz, J. (2004). Dynamic cellular automata: An alternative approach to cellular simulation. *In silico Biology*, 139-161.

Xu B D, B. D., Madrit, C., Röhr M, M., & Kubicek, C. P. (1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 553-558.

14. ANEXOS

$$v = \frac{\frac{V_f}{K_s} \left([S]_t - \frac{[P]_t}{K_{eq}} \right)}{D} = \left(\frac{\frac{V_f}{K_{eq}} ([S]_t)}{D} \right) - \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} \left(\frac{[P]_t}{K_{eq}} \right)}{D} \right);$$

$$= \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} ([S]_t)}{D} \right) - \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} \left(\frac{[P]_t}{K_{eq}} \right)}{D} \right) \frac{[P]_t [S]_t}{[P]_t [S]_t} = \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} ([S]_t)}{D} \right) - \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} \left(\frac{1}{K_{eq}} \right)}{D} \right) \frac{[S]_t ([P]_t)}{1 ([S]_t)};$$

$$v = \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} ([S]_t)}{D} \right) - \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} \left(\frac{1}{K_{eq}} \right)}{D} \right) \frac{[S]_t}{1} (\Gamma) = \left(\frac{\frac{V_f}{K_s} ([S]_t)}{D} \right) - \left(\frac{\frac{V_f^* [S]_t \left(\frac{\Gamma}{K_{eq}} \right)}{K_s}}{D} \right);$$

$$v = \frac{\frac{V_f}{K_s} ([S]_t - \rho [S]_t)}{D} = \frac{\frac{V_f [S]}{K_s} (1 - \rho)}{D}.$$