

MODELOS MATEMATICOS PARA LA EVALUACION DE HIPOTESIS EN LA ENDOCITOSIS VIA RECEPTORES

Héctor Echavarría Heras
Elena Solana Arellano
Depto. de Ecología
CICESE

km 107 carr. Tijuana-Ensenada. Apdo Postal 2732 Ensenada, B. C. México.
Fax Nacional (91-617) 44880.

1 Introducción

Las células del tejido animal requieren de una gran variedad de proteínas y otras macromoléculas del fluido extracelular. Esto facilita su nutrición y regulación de funciones básicas. En la membrana celular existen familias de moléculas conocidas como receptores superficiales, las cuales le permiten reconocer las diferentes moléculas de importancia biológica y distinguirlas entre sí. Los receptores realizan sus funciones combinándose con otras moléculas extracelulares específicas llamadas ligandos. Por ejemplo, en las membranas de los fibroblastos, células del tejido conectivo humano, podemos encontrar receptores que interactúan con la hormona insulina, otros que se acoplan con lipoproteínas de baja densidad (LBD) portadoras de colesterol, y algunos otros receptores que se acoplan a otro tipo de moléculas. (Maxfield et al., 1978; Goldstein et al, 1979). En algunos casos, el ligando deberá ser transportado al interior de la célula para proporcionar alguna sustancia necesaria, o para garantizar el funcionamiento celular. En otros casos, aparentemente el solo acoplamiento ligando receptor es suficiente para provocar una determinada respuesta en la célula.

En virtud de la importancia de los receptores superficiales en el mantenimiento y la coordinación de los procesos celulares muchos, problemas en biología celular requieren de un entendimiento adecuado de su comportamiento y de la mecánica de las interacciones ligando-receptor. En la mayoría de los problemas planteados, es necesario calcular el tiempo promedio de captura para una partícula en difusión por una estructura celular de absorción, en la cual los acoplamientos ligando-receptor son atrapados antes de ser internados mediante invaginación. Dichas regiones de absorción se manifiestan en la superficie celular como pequeñas depresiones con un recubrimiento proteínico que facilita la agregación de los referidos acoplamientos. Las depresiones recubiertas

son regiones de alta especialización y aparecen en las membranas de la mayoría de las células animales. En lo sucesivo las llamaremos también simplemente "trampas". Las partículas en difusión que consideraremos son los llamados receptores para lipoproteínas de baja densidad (LBD). Las partículas de LBD proveen a la célula del colesterol requerido para su funcionamiento. También juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de dicho compuesto.

El conocimiento de la trayectoria de las partículas LBD proporciona elementos para entender el metabolismo adecuado del colesterol y sus aberraciones las cuales generan padecimientos cardíacos. En un contexto más general, el estudio de la internación de la LBD nos permite entender el proceso conocido como "Endocitosis Vía Receptores" (EVR), mecanismo mediante el cual la célula transporta a su interior ligandos acoplados a receptores superficiales.

Debido a las razones arriba expuestas el proceso de internación de la LBD se encuentra sometido a intensas investigaciones experimentales. Uno de los aspectos de la EVR para la LBD que han recibido más atención es el que trata de caracterizar el movimiento de los receptores hacia las trampas. Algunos biólogos celulares (Goldstein y Brown, 1977) suponen que su movimiento en la superficie celular es únicamente por difusión. Otros, (Bretscher, 1980) sugieren que los receptores oajo consideración poseen un coeficiente de difusión tan bajo, que el transporte por difusión sería insuficiente para explicar las tasas de agregación que se han observado. Ilustraremos la manera en la cual el uso de modelos matemáticos permite investigar la viabilidad de hipótesis sobre el movimiento de los receptores hacia las trampas. Nuestro trabajo está basado en resultados preliminares presentados en Goldstein Wofsy y Bell (1981).

En la sección 2 discutiremos el sistema biológico con más detalle, en la sección 3 presentaremos modelos matemáticos para el caso en el cual las trampas permanecen fijas en la membrana celular, como preámbulo al tratamiento del problema en el cual las trampas poseen un comportamiento aleatorio. En la sección 4 introduciremos un modelo matemático para estimar el tiempo promedio de captura de partículas en difusión en un ambiente con múltiples trampas que aparecen y desaparecen continuamente siguiendo un patrón estocástico. Usaremos los resultados generados por el modelo para aportar información sobre la caracterización del movimiento de los receptores hacia las trampas en fibroblastos humanos.

2 La endocitosis vía receptores.

La lipoproteína de baja densidad LBD transporta aproximadamente dos tercios del colesterol en el plasma sanguíneo. (Brown y Goldstein 1979). Las células requieren colesterol pues es un componente esencial de la membrana celular. Este a su vez representa un peligro potencial pues sus moléculas son insolubles y pueden acumularse en las arterias. Las partículas de LBD proporcionan un arreglo soluble que transporta a la célula colesterol del hígado y los intestinos a través del torrente sanguíneo. El núcleo de una partícula simple de LBD contiene aproximadamente

1500 moléculas de colesterol. Una descripción de la estructura de la LBD aparece en la Figura (1). En los seres humanos la endocitosis vía receptores para la LBD ocurre en las células fibroblásticas del tejido conectivo.

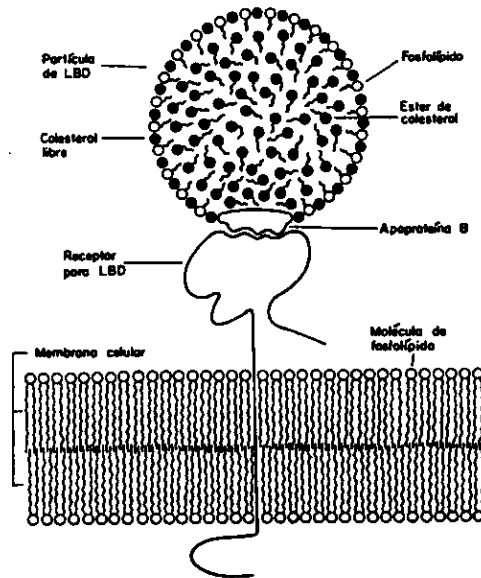


Fig. 1 Una partícula de LBD tiene un núcleo de 1500 moléculas de colesterol esterificado. El núcleo está rodeado por una membrana compuesta de 800 moléculas fosfolípidas y 500 moléculas de colesterol. El receptor para la LBD es una cadena de glicoproteína con carga negativa y con un peso molecular de 164,000 Daltons. El receptor se adhiere a la partícula de LBD mediante el acoplamiento con una molécula de apoproteína B.

Como casi la totalidad de las células de los mamíferos, los fibroblastos poseen en sus membranas grandes cantidades de receptores LBD. Un fibroblasto humano, en condiciones normales puede poseer hasta 50,000 receptores (Brown y Goldstein, 1979). En condiciones experimentales, continuamente, cerca de las dos terceras partes del número total de receptores LBD en fibroblastos humanos se localizan en depresiones sobre la superficie celular, cuya conexión con el sector citoplasmático de la membrana está constituido por una cubierta de la proteína Clatrina (Pearse 1975). Dichas depresiones recubiertas o trampas representan los sitios de internación de moléculas biológicamente importantes. Los receptores se acumulan en las trampas de manera independiente como en el caso de la LBD o bien en acoplamientos con ligandos como en el caso de algunas hormonas, y el caso de las propias partículas LBD. Posteriormente, los receptores son transportados al interior de la célula, conjuntamente con los ligandos presentes mediante vesículas cerradas

formadas en la invaginación de las trampas. Después de la internación, las LBD son transportadas a los lisosomas donde son degradadas para liberar el colesterol que transportan (Brown y Goldstein, 1976a) y los receptores LBD son reciclados a la superficie (Anderson Goldstein y Brown, 1977). Una ilustración del modelo conceptual para la EVR asociada a la LBD aparece en la Figura (2).

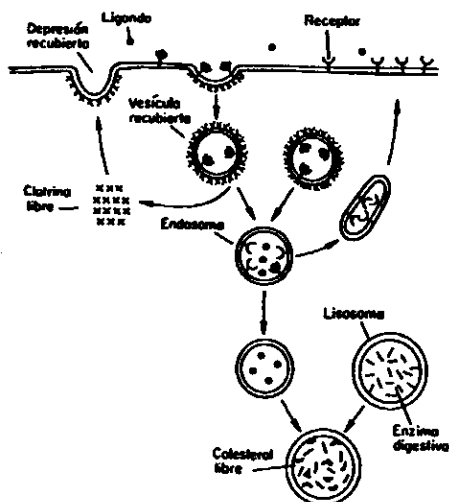


Fig. 2. Modelo conceptual para la EVR según Anderson, Goldstein y Brown. Las trampas son depresiones en la membrana celular, con un recubrimiento de clatrina. Los receptores se acoplan con los ligandos y se mueven sobre la superficie celular hasta que alcanzan una trampa donde son atrapados. Mediante la invaginación de la trampa, los complejos son transportados al interior de la célula. Las vesículas que se forman de la invaginación de las trampas se funden para formar endosomas, vesículas más grandes de paredes suaves en cuyos ambientes ácidos las partículas de LBD se disocian de los receptores. A continuación los receptores son insertados nuevamente en la membrana para iniciar un nuevo ciclo de acoplamiento. Las moléculas de LBD se transfieren después a organelos celulares llamados lisosomas, los cuales contienen enzimas digestivas que sintetizan las partículas de LBD disociando las moléculas de colesterol de los ácidos grasos y produciendo así colesterol libre para funciones celulares.

A nivel celular, el colesterol derivado de las LBD tiene diversas funciones. Representa un componente fundamental en la construcción de la membrana y sirve como sustrato para la sintetización de hormonas esteroideas. También controla un complicado sistema retroalimentador que estabiliza el nivel celular del mismo. El control se ejerce en por lo menos tres formas diferentes: inhibición de una enzima que promueve la síntesis del colesterol, activación de una enzima que promueve la esterificación del colesterol libre y finalmente por la inhibición de la síntesis de los receptores LBD.

Se han identificado un gran número de mutaciones que causan el funcionamiento defectuoso de los receptores LBD y consecuentemente la internación deficiente de la LBD. La enfermedad asociada a la predisposición genética que causa el funcionamiento deficiente de los receptores LBD se conoce como hipercolesterolemia familiar. Se caracteriza por altas concentraciones de LBD en la sangre y por la depositación del colesterol en las arterias y tendones. Esta anomalía se conoce como ateromatosis y el caso homocigoto de la enfermedad conduce a ataques cardíacos agudos durante la infancia (Goldstein y Brown, 1979).

3 Modelos Matemáticos preliminares

Las interacciones moleculares pueden concebirse como un proceso que involucra al menos dos etapas. Primeramente, las moléculas deben encontrarse, luego dependiendo de su geometría y estructura química, el acoplamiento se lleva a cabo por la acción de fuerzas físicas. El agregado puede ser reversible o esencialmente irreversible. Si una o ambas moléculas interactuantes se encuentran en difusión, entonces el máximo valor que la tasa de acoplamiento puede obtener viene dado por la tasa a la cual ocurren los encuentros.

A menudo es interesante saber si una reacción molecular es controlada por difusión, esto es, si está ocurre tan pronto como las partículas en difusión se encuentran. El valor k_{d+} , asociado al control por difusión para la constante de velocidad de agregación k_a , de una interacción molecular, es el valor promedio del número de encuentros entre las moléculas en difusión. Al número k_{d+} se le conoce también como límite difusivo de k_a . El conocimiento del valor del límite difusivo k_{d+} nos permite obtener información sobre la dinámica de la interacción molecular en estudio. Por ejemplo, si el valor experimental de la constante de velocidad de agregación es mayor que k_{d+} , concluiremos que las partículas se han puesto en interacción por algún proceso más activo que la difusión.

El obtener el tiempo promedio t_d para que una partícula en difusión se encuentre con otra partícula también en difusión o con un cuerpo absorbente estacionario, nos permite calcular el valor del límite difusivo k_{d+} . Para obtener la relación entre t_d y k_{d+} , obsérvese que si T es el tiempo promedio para que el número total de partículas sean capturadas por un cuerpo absorbente, entonces el promedio de partículas capturadas por unidad de tiempo será T/t_d . Como k_{d+} es la constante de velocidad de agregación por difusión de una partícula en un único cuerpo absorbente si tenemos ρ cuerpos absorbentes por unidad de área se tendrá que:

$$k_{d+} T \rho = \frac{T}{t_d}$$

de donde se concluye que

$$k_{d+} = \frac{1}{\rho t_d} \quad (3.1).$$

Entonces si se requiere calcular el límite difusivo de la constante de velocidad de agregación el problema por resolver consiste en calcular el tiempo promedio de captura para una partícula en difusión.

Un procedimiento alternativo para calcular k_{d+} es el llamado método de flujo. El valor de k_{d+} para la interacción de dos partículas esféricas en difusión en un espacio tridimensional fue calculado usando este método por Smoluchowsky en 1916. Su resultado se basa en la teoría de Einstein sobre el movimiento Browniano, la cual usando la ley de Fick establece la ecuación de difusión

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C$$

en la cual $C(x,y,z,t)$ representa la concentración de partículas en difusión en una vecindad del punto (x,y,z) y al tiempo t y D es el coeficiente de difusión. Para ilustrar el método de Smoluchowski, consideremos un cuerpo esférico absorbente de radio a , inmerso en un medio que contiene partículas en difusión. (véase figura (3)). Suponiendo que las partículas son atrapadas permanentemente, se generará sobre su superficie de la esfera un flujo neto de partículas. Entonces podemos definir el límite difusivo k_{d+} como el flujo de partículas que se adhieren a la trampa por cada unidad de concentración de las mismas.

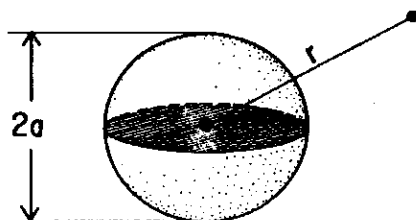


Fig. 3 Smoluchowski consideró un cuerpo esférico absorbente de radio a inmerso en un medio que contenía partículas en difusión. Una partícula que al tiempo $t=0$ se encuentra a una posición r del centro de la esfera absorbente deambula libremente bajo la influencia del proceso de difusión y sin ningún otro factor que controle su movimiento hasta que es atrapada.

Smoluchowski abordó el caso de estado estable en la concentración de partículas en difusión. Esto se logra manteniendo un valor fijo para la concentración en infinito, y usando una condición de frontera de absorción sobre la superficie de la esfera. Suponiendo la existencia de un único cuerpo absorbente de radio a y en virtud de la simetría esférica, Smoluchowski introdujo para la concentración $C(r)$ de partículas a una distancia r del cuerpo absorbente, el siguiente modelo:

$$D \nabla^2 C = 0 \quad (3.2)$$

$$C(a) = 0 \quad (3.2a)$$

$$C(\infty) = C_- \quad (3.2b)$$

Donde D es el coeficiente de difusión y C_- una constante positiva. Usando la expresión tridimensional del laplaciano en coordenadas polares y tomando en cuenta la simetría inherente se tiene equivalentemente

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) = 0$$

$$C(a) = 0$$

$$C(\infty) = C_-$$

Cuya solución se expresa como

$$C(r) = C_- \left(1 - \frac{a}{r} \right), \quad a \leq r < \infty$$

usando este resultado se puede expresar el flujo de partículas hacia el cuerpo absorbente como

$$\begin{aligned} [\text{flujo hacia la trampa}] &= [\text{área de la esfera}] D \left[\frac{\partial C}{\partial r} \Big|_{r=a} \right] \\ &= 4\pi a^2 D \left(\frac{C_- a}{r^2} \Big|_{r=a} \right) \\ &= 4\pi a D C_- \end{aligned}$$

El límite difusivo de la constante de velocidad de agregación que se definió como el flujo hacia la trampa por unidad de concentración de partículas en difusión. Se expresa entonces como

$$k_{d+} = 4\pi D a \quad (3.3).$$

Usando en la ecuación (3.1) el valor dado por la ecuación (3.3) para el límite difusivo se obtiene un tiempo promedio de encuentro

$$t_d = \frac{b^3}{3Da}$$

para una partícula que se mueve con un coeficiente de difusión D y un cuerpo absorbente estacionario de radio a . Este resultado supone que la densidad de estructuras de absorción es de una por cada esfera de radio b

La difusión molecular sobre superficies celulares es un problema bidimensional, y en este caso la ecuación (3.2) sujeta a las condiciones de frontera (3.2a) y (3.2b) no tiene solución. Adam y Delbruck en 1968, calcularon el tiempo promedio necesario para que un ligando en difusión en un disco de radio b encuentre un receptor circular estacionario de radio a localizado en el centro del disco (véase figura 4).

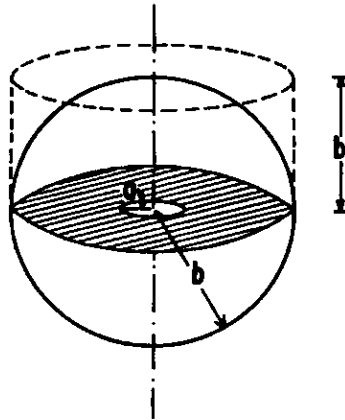


Fig. 4 El esquema de absorción molecular de Adam y Delbruck, llamado de reducción de dimensión consistía en la agregación preliminar de las moléculas en una esfera o cilindro que representaba la membrana exterior de una célula o bacteria. Las moléculas eran de este modo sustraídas de un medio en el cual el cuerpo absorbente se encontraba inmerso. Posteriormente las moléculas en difusión se transferían a un anillo interior que contenía una trampa circular al centro, simulando este arreglo una membrana interior de especialización donde las moléculas eran atrapadas permanentemente. Se consideraba que este mecanismo de reducción de dimensión hacía más eficiente el proceso de absorción de moléculas de relevancia biológica para la célula.

Adam y Delbruck consideraron que la concentración al tiempo t , $C(r,t)$ de partículas que se difunden en el interior del anillo $a \leq r \leq b$ satisface el problema de frontera

$$D \nabla^2 C = \frac{\partial C}{\partial t}, \quad t \geq 0 \quad (3.4)$$

$$C(r, 0) = C_0 \quad (3.4a)$$

$$C(a, t) = 0 \quad (3.4b)$$

$$\frac{\partial C}{\partial r} \Big|_{r=b} = 0 \quad (4.3c)$$

Donde D es el coeficiente de difusión bidimensional y C_0 una constante positiva.

El número $P(t)$ de partículas que permanecen en difusión en el anillo al tiempo t se obtiene integrando sobre las coordenadas espaciales la solución $C(r,t)$ al problema arriba planteado. Esto es,

$$P(t) = \int_V C dV$$

donde V representa el espacio de difusión.

El tiempo promedio de permanencia de una partícula en el espacio de difusión, es decir el tiempo promedio requerido para que una partícula alcance el cuerpo absorbente se definió como

$$\tau = \int_0^\infty t \frac{d}{dt} \left\{ 1 - \frac{P(t)}{P(0)} \right\} dt \quad (3.5)$$

Nótese que la expresión entre paréntesis en la integral es la derivada de la fracción de partículas que tienen un tiempo de permanencia en el anillo menor o igual que t , por ende se identifica con la función de densidad de probabilidad de los tiempos de captura. Obteniendo la solución a la ecuación (3.4) Adam y Delbruck derivaron para $P(t)$ la expresión,

$$P(t) = P(0) \sum_{n=1}^{\infty} B_n \exp \left[-\frac{D}{b} y_n^2 t \right] \quad (3.6)$$

En la cual

$$B_n = \frac{4[J_1(y_n)]^2}{y_n(1 - (a/b)^2) [[J_0(ky_n)]^2 - [J_1(y_n)]^2]}$$

$$P(0) = C_0 \pi b^2 (1 - (a/b)^2)$$

siendo y_n la enésima raíz de la ecuación

$$J_0(ky)Y_1(y) - Y_0(ky)J_1(y) = 0$$

donde $J_n(\cdot)$ y $Y_n(\cdot)$ son funciones de Bessel de orden n y $k = a/b$.

Usando la expresión dada en la ecuación (3.6) para $P(t)$ con el propósito de evaluar la integral (3.5) se obtiene el tiempo promedio de captura

$$\tau = \frac{b^2}{D} \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{B_n}{y_n^2} \right)$$

Los resultados de Adam y Delbruck indican que si b es mucho mayor que a entonces el tiempo promedio de captura t_d viene dado aproximadamente por

$$t_d = (b^2/D)(\ln(b/a) - 1/2) \quad (3.7)$$

En 1977, Berg y Purcell presentaron un procedimiento más simple para calcular t_d . En el mismo caso límite considerado por Adam y Delbruck, cuando $b \gg a$ Berg y Purcell obtuvieron para t_d

$$t_d = (b^2/2D)(\ln(b/s) - 3/4) \quad (3.8)$$

El problema biológico que Berg y Purcell abordaron involucraba la interacción de ligandos en difusión con receptores estacionarios distribuidos ordenadamente sobre la superficie celular. Para obtener el valor dado en la ecuación (3.8) Berg y Purcell introdujeron una aproximación al sistema periódico de receptores múltiples mediante un receptor circular de radio a , cuyo centro coincide con el centro de un círculo de radio b que satisface la relación

$$N(\pi b^2) = A$$

En esta ecuación N es el número de trampas en la superficie celular y A representa el área de dicha superficie, es decir se tiene

$$(\pi b^2)\rho = 1$$

donde ρ es la densidad de las trampas (véase figura 5).

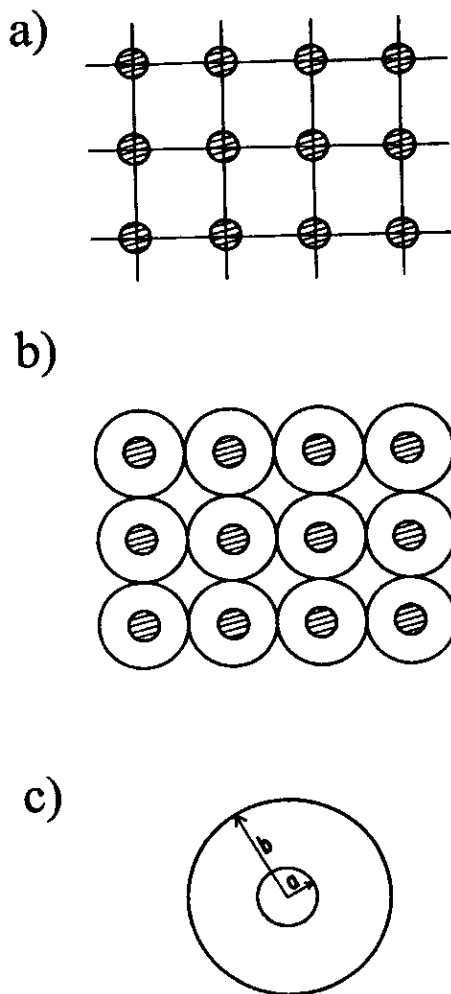


Fig. 5 Aproximación al sistema de trampas múltiples. a) Representación geométrica de un sistema periódico de cuerpos absorbentes. b) La sustitución del sistema de trampas múltiples puede sugerirse al notar que la periodicidad inherente permite asociar a cada trampa una región anular de la misma área. De esta ilustración es posible intuir que cuando una partícula en difusión alcanza la frontera exterior de un anillo particular, podría internarse a otro anillo similar contiguo. Esta situación puede simularse reflejando la partícula en dicha frontera. c) La hipótesis del movimiento por difusión y la periodicidad arriba explicada permite substituir el sistema esbozado en b) mediante una única trampa rodeada de una región anular de radio exterior b . Este radio exterior se obtiene asignando a cada trampa la parte proporcional de área de membrana celular que le corresponde de acuerdo con la densidad de trampas.

Berg y Purcell consideraron que una típica partícula en difusión inicia su movimiento en un punto aleatorio en el anillo de radio interior a y radio exterior b que rodea a la región de absorción, moviéndose libremente hasta que es atrapada en la trampa. Para calcular el tiempo promedio de captura $W(r)$ para una partícula que inicia su movimiento a una distancia r del centro de la trampa donde $a \leq r \leq b$, Berg y Purcell usaron la ecuación de Poisson.

$$D \nabla^2 w + 1 = 0 \quad (3.9)$$

con la condición de frontera absorbente

$$w(s) = 0 \quad (3.9a)$$

y la condición de reflexión en la frontera

$$\frac{\partial w}{\partial r} \Big|_{r=b} = 0 \quad (3.9b)$$

donde D denota el coeficiente de difusión.

Para justificar intuitivamente la validez de la ecuación (3.9), supongamos que en un espacio bidimensional una partícula inicia al tiempo $t=0$ un proceso de difusión en el punto (x,y) a una tasa determinada por su coeficiente de difusión D , y que deambula libremente hasta encontrar algún cuerpo absorbente donde al tiempo t es atrapada. Convengamos en que este proceso se repite un gran número de veces, manteniendo siempre la posición inicial (x,y) , y denotemos mediante $W(x,y)$ el tiempo promedio de captura de la partícula liberada. Para encontrar la ecuación diferencial que satisface $W(x,y)$, consideremos inicialmente una aproximación al proceso de difusión mediante una caminata aleatoria bidimensional con saltos de magnitud δ en ambas direcciones y a intervalos de

tiempo de magnitud Δt . Una de estas partículas, con tiempo promedio de captura $W(x,y)$, con igual probabilidad puede ocupar al tiempo Δt cualquiera de los puntos con coordenadas $(x \pm \delta, y \pm \delta)$. Se tendrá entonces que

$$W(x,y) = \Delta t + \frac{1}{4} [W(x + \delta, y) + W(x - \delta, y) + W(x, y + \delta) + W(x, y - \delta)]$$

Expandiendo W en series de Taylor alrededor del punto (x,y) tenemos

$$W(x,y) = \Delta t + \frac{1}{4} \left[4W(x,y) + \delta^2 \left(\frac{\partial^2 W}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 W}{\partial y^2} \right) + \dots \right] \quad (3.10)$$

Usando el factor de escala $\delta^2 = 4D \Delta t$, relación que estima como δ^2 el área promedio que cubre una partícula en difusión en un intervalo Δt y tomando el límite cuando δ y Δt tienden simultáneamente a cero tenemos que la ecuación (3.10) se reduce a:

$$D \nabla^2 W + 1 = 0$$

La condición de reflexión en la frontera expresada por la ecuación (3.9b) es el ingenioso artificio que permite substituir el sistema ordenado de trampas múltiples, por una trampa única rodeada del anillo antes descrito. Cuando se tiene un sistema periódico de trampas, esta condición de frontera puede ser equivalente a decir que una partícula que se aleja de una trampa y que se encuentra en la frontera de un disco de radio b , observa, en virtud de la aludida periodicidad, una situación muy semejante a ambos lados de la frontera (véase figura 4b) es decir, otra trampa centrada a una distancia b del punto donde se encuentra o bien a una distancia muy cercana a b . En cualquier caso el tiempo promedio para alcanzar la segunda trampa será similar al tiempo promedio requerido para alcanzar la primera trampa, si la partícula fuera simplemente reflejada en vez de internarse en el segundo disco.

Joel Kaizer y colaboradores (Kaizer et al 1985), utilizaron métodos de termodinámica estadística de no equilibrio para abordar problemas similares al tratado por Berg y Purcell. Mediante dichos métodos, es posible considerar el problema de múltiples regiones de absorción de manera directa en vez de recurrir al artificio de substituir el sistema de trampas múltiples por una única rodeada de un espacio anular de difusión. Los resultados de Kaizer y su equipo en lo referente a la estimación del tiempo promedio de captura, no difieren en forma sustancial del valor calculado por Berg y Purcell. La ventaja de utilizar la aproximación debida a estos últimos autores radica en el uso de un formalismo matemático más simple, que facilita el estudio de las dependencias de las funciones relevantes al problema biológico (como son el límite difusivo de la constante de velocidad de agregación y el tiempo promedio de captura) respecto a los valores de los parámetros involucrados.

Berg y Purcell resolvieron la ecuación (3.9) con las condiciones de frontera dadas para encontrar $W(r)$, el tiempo promedio de captura para una partícula que inicia su movimiento a una distancia r del centro del receptor o trampa. Considerando la simetría radial inherente, el tiempo promedio de captura t_d , el cual corresponde al promedio de $W(r)$ sobre todas la posiciones iniciales se expresa como:

$$t_d = \frac{1}{\pi(b^2 - a^2)} \int_a^b 2\pi r w(r) dr$$

integrando y tomando el límite cuando $b \gg a$ (esto es cuando la distancia entre las regiones de absorción es mucho mayor que el radio de las mismas) obtuvieron la aproximación dada en la ecuación (3.8).

4 Trampas con comportamiento aleatorio.

Consideremos ahora el problema de calcular el tiempo promedio para la captura de un receptor en una depresión recubierta o trampa con comportamiento aleatorio.

Los receptores para la LBD se transportan al interior de la célula a un ritmo considerable. Para conservar la concentración de receptores en la superficie celular a niveles adecuados se deben insertar continuamente en la membrana celular los receptores que han sido llevados al interior después de haber sido sintetizados en los lisosomas. Se sospecha que los receptores no se reciclan en general en las trampas, pues a un tiempo dado solo cerca del 60 por ciento de ellos se localizan en las mismas.

Anderson, Goldstein y Brown (1977) establecieron la hipótesis de que los receptores para LBD después de ser insertados en la membrana citoplasmática en puntos aleatorios se mueven en la superficie celular hasta que son atrapados en las trampas (véase figura 2). La pregunta fundamental que trataremos de resolver es si el movimiento de los receptores es atribuible de un modo exclusivo a un proceso difusivo. Algunos biólogos celulares (véase Bretscher (1980)) sugieren que la difusión como único factor a consideración en el movimiento de los receptores para LBD sería demasiado lenta para determinar las altas tasas de agregación en las trampas. Esto es debido a que los receptores LBD tienen un coeficiente de difusión muy pequeño. Bretscher sugiere la existencia de un flujo transversal de lípidos en la membrana que empuja a los receptores hacia las trampas. La posibilidad de acelerar la tasa de captura de receptores en las trampas mediante inserción preferencial de los mismos en las vecindades de los cuerpos absorbentes ha sido sugerida en Robneck y Hez (1985).

Mediante el uso de un modelo matemático calcularemos la tasa a la cual los receptores son atrapados en las trampas, bajo la hipótesis de que una vez que los mismos han sido sintetizados en los Lisosomas estos son insertados en la membrana en puntos aleatorios y luego se mueven únicamente bajo la influencia de un proceso difusivo hasta que son atrapados en las trampas. Comparando el valor del tiempo promedio de captura así obtenido con los datos experimentales correspondientes a los tiempos de captura reales, podremos determinar la confiabilidad de hipótesis sobre la manera en la cual los receptores se desplazan en la membrana celular.

En el presente esquema el cálculo del tiempo promedio para que un receptor en difusión sea capturado por una trampa se complica por el hecho de que dichas estructuras aparecen y desaparecen constantemente sobre la superficie celular, ya sea porque su invaginación las interna a distancia de la membrana para luego reaparecer en la misma posición (Anderson, Goldstein y Brown, 1977) o bien porque la invaginación se produzca sin que la depresión recubierta se separe de la de la membrana, es decir en este último caso se puede concebir como trampas que abren y cierran aleatoriamente. (Willingham et al., 1981). Si los receptores de las LBD cubrieran grandes distancias en relación a la distancia media entre las trampas, en el tiempo promedio que éstas permanecen en la superficie, tendríamos que el tiempo promedio requerido por un receptor para alcanzar una trampa sería aproximadamente igual al tiempo promedio de la captura calculado por Berg y Purcell para partículas que se difunden entre trampas de vida infinita. La distancia media que un receptor con coeficiente de difusión D recorre en un tiempo T , equivalente a la vida media de una trampa es $\sqrt{4DT}$ y una medida de la distancia entre los centros de las depresiones recubiertas es $\sqrt{1/\rho}$, donde ρ es la densidad de dichas estructuras. entonces si $\sqrt{4DT} \gg 1/\rho$ podríamos usar con suficiente confianza el tiempo promedio de captura dado por la ecuación (3.8) como una aproximación al tiempo promedio para la captura de un receptor LBD en una trampa. Sin embargo, como el coeficiente de difusión para receptores de LBD a una temperatura de $37^\circ C$ es de $2.7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{seg}$, el tiempo promedio T que una trampa permanece en la superficie celular es de 240 seg. y la densidad de las trampas a la temperatura de $37^\circ C$ es $\rho = 0.31 \mu\text{m}^2$. [(los valores de T , y ρ se calculan usando datos experimentales publicados en Goldstein et al (1979), Brown y Goldstein 1976 b; y Orci et al 1978. Para una revisión de los métodos usados en el cálculo de dichos parámetros véase Goldstein, Wofsy y Bell (1981)]. Entonces,

$$\sqrt{4DT} = .9$$

es decir, el hecho de que la estructura absorbente posea un comportamiento aleatorio podría ejercer cierta influencia en el tiempo promedio de captura. Para evaluar el efecto del comportamiento aleatorio de la trampa usaremos un modelo matemático que se obtiene modificando la idea presentada por Berg y Purcell y justificada por Kaizer y colaboradores.

El modelo que usaremos para el cálculo del tiempo promedio de captura de un receptor LBD en una estructura absorbente se concibe considerando inicialmente las hipótesis que sustentan al descrito para el caso de una trampa de vida infinita. Se considera una partícula en difusión en un anillo de radio interior s (el radio de la trampa) y radio exterior b que se obtiene de la relación

$$\pi b^2 \rho = 1$$

donde ρ es la densidad de las trampas en células fibroblásticas del tejido conectivo humano a una temperatura de 37°C. La posición inicial de la partícula será un punto aleatorio en el anillo. Para tomar en cuenta el efecto debido al comportamiento aleatorio de la trampa la ecuación diferencial asociada al tiempo promedio de captura $W(r)$ será substituida por la ecuación diferencial parcial que corresponde a la densidad de probabilidad $q(r,t)$ para la absorción al tiempo t , de una partícula que empieza a moverse a una distancia r del centro de una trampa, donde $s \leq r \leq b$.

Para obtener la ecuación asociada a $q(r,t)$, sea λ la tasa de invaginación de las trampas. Resulta razonable suponer que el tiempo que una trampa permanece sobre la superficie de la célula es una variable aleatoria exponencialmente distribuida con parámetro λ . Supondremos además que las trampas se internan de manera independiente de ellas mismas, de los acoplamientos ligando receptor, y de los receptores que atrapan, véase Goldstein y Wofsy (1981)). Entonces, $e^{-\lambda t}$, es la probabilidad de que una trampa ocupando una cierta posición al tiempo cero se encuentre en el mismo sitio al tiempo t . Sea $P(r,t)$ la densidad de probabilidad asociada al tiempo aleatorio t en el cual una partícula inicialmente a una distancia r del centro de una trampa de vida infinita, y radio s es atrapada por la misma.

Entonces la densidad de probabilidad $q(r,t)$ asociada al tiempo t aleatorio para el alcance de una trampa viene dada por

$$q(r,t) = p(r,t)e^{-\lambda t} \tag{4.1}$$

Esto es la probabilidad de que un receptor sea absorbido por una trampa en un pequeño intervalo de tiempo centrado en t es igual a la probabilidad de que el receptor alcance la posición ocupada por la trampa durante dicho lapso, multiplicada por la probabilidad de que la trampa se encuentre aún en dicho sitio.

La densidad $p(r,t)$ satisface la ecuación de difusión

$$\frac{\partial p(r,t)}{\partial t} = D \nabla^2 p(r,t) \quad s < r < b, \quad 0 < t \tag{4.2}$$

donde D es el coeficiente de difusión para un receptor LBD, en fibroblastos humanos.

La condición de frontera absorbente para p es

$$p(s,r) = \delta(t)$$

donde $\delta(t)$ es la delta de Dirac y la condición de frontera reflejante es

$$\frac{\delta p}{\delta r} \Big|_{r=b} = 0$$

además, se tiene la condición

$$p(r, 0) = 0 \quad s < r < b.$$

En virtud de que las trampas son estructuras de vida efímera, la tasa a la cual los receptores se adhieren a las mismas, no se puede obtener calculando el tiempo promedio absoluto para la captura en una trampa de un receptor con posición inicial en una vecindad de dicha estructura, debido a que existe una probabilidad positiva de que el receptor no alcance el sitio donde se encuentra la trampa antes de que esta desaparezca.

Los receptores que no interactúan con una determinada estructura absorbente no contribuyen a la tasa de agregación. En este caso, el límite difusivo para la constante de velocidad de agregación depende de un tiempo promedio de captura relativo;

$$t_d = \frac{\int_s^b 2\pi r \int_0^\infty tq(r, t) dt dr}{\int_s^b 2\pi r \int_0^\infty q(r, t) dt dr} \quad (4.3)$$

La expresión anterior representa el tiempo de captura para aquellos receptores que eventualmente chocan con una trampa dada. De las ecuaciones (4.1) y (4.3) se obtiene:

$$t_d = \frac{\int_s^b r \int_0^\infty tp(r, t)e^{-\lambda t} dt dr}{\int_s^b r \int_0^\infty p(r, t)e^{-\lambda t} dt dr}$$

donde p satisface la ecuación (4.2) y las condiciones de frontera dadas. En vez de resolver la ecuación diferencial para p encontraremos una expresión para t_d en términos de la función $v(r)$ que satisface una ecuación diferencial relacionada. Definamos

$$v(r) = \int_0^\infty p(r, t)e^{-\lambda t} dt. \quad (4.4)$$

entonces

$$t_d = -\frac{\partial}{\partial \lambda} \ln \left[\int_s^b r v(r) dr \right]. \quad (4.5)$$

Para obtener la ecuación que satisface $v(r)$, integramos por partes la ecuación (4.4) y obtenemos

$$v(r) = \frac{1}{\lambda} \int_0^{\infty} e^{-\lambda t} \left(\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} \right) dt$$

entonces de la ecuación (4.2) se sigue que

$$v(r) = \frac{D}{\lambda} \nabla^2 v(r).$$

usando la representación del laplaciano en coordenadas polares obtenemos

$$v(r) = \frac{D}{\lambda} \left[\frac{\partial^2 v}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial v}{\partial r} \right]. \quad (4.6)$$

Las condiciones de frontera para $p(r, t)$ se transforman en

$$v(s) = 1$$

$$\frac{\partial v}{\partial r} \Big|_{r=b} = 0$$

La solución general para la ecuación (4.6) tiene la forma

$$v(r) = C_1 K_0(\alpha r) + C_2 I_0(\alpha r)$$

donde $\alpha = \sqrt{\lambda/D}$ y K_0 e I_0 son las funciones modificadas de Bessel de orden cero (véase Abramowitz y Stegun, (1970) sección 9.6). Las condiciones de frontera determinan

$$C_1 = \frac{I_1(\alpha b)}{\Delta_{10}}$$

$$C_2 = \frac{K_1(\alpha b)}{\Delta_{10}}$$

donde I_1 y K_1 , son las funciones modificadas de Bessel de orden 1 y

$$\Delta_{10} = I_1(\alpha b)K_1(\alpha s) + K_1(\alpha b)I_1(\alpha s)$$

sea:

$$\Sigma_i = I_i(\alpha b)K_i(\alpha s) + K_i(\alpha b)I_i(\alpha s) \quad i = 0, 1$$

entonces substituyendo la expresión obtenida para $v(r)$ en la ecuación (4.5) se obtiene el tiempo promedio de captura

$$t_d = \frac{1}{2\alpha D} \left(\frac{2}{\alpha} + \frac{(b \Sigma_0 - s \Sigma_1)}{\Delta_{10}} - \frac{(b \Sigma_0 - s \Sigma_1)}{\Delta_{10}} \right)$$

cuando $b \gg s$ (esto es cuando el área cubierta por las trampas es una fracción despreciable de la superficie de la célula):

$$t_d = \frac{1}{2\alpha D} \left\{ \frac{2}{\alpha} + \frac{(b \Sigma_0 - s \Sigma_1)}{\Delta_{10}} - \frac{b I_0(\alpha b)}{I_1(\alpha b)} \right\}. \quad (4.7)$$

Esta fórmula se aplica en el caso que nos ocupa, puesto que las trampas cubren únicamente alrededor del 1% de la superficie celular. La expresión para t_d que se ha dado en la ecuación (4.7) tiende en el límite cuando $t \rightarrow \infty$ al valor dado por la ecuación (3.8) (esto es, cuando el tiempo de permanencia de la trampa sobre la superficie de la célula tiende a infinito).

Los parámetros que se requieren para encontrar t_d son:

$$\lambda = 0.25/\text{min}$$

$$D = 2.7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$$

$$s = 0.10 \mu\text{m}$$

$$b = \sqrt{\frac{1}{\pi \rho}} = 1.0 \mu\text{m}$$

Entonces

$$t_d = 1.9 \text{ min}$$

El propósito de calcular el tiempo t_d que le tomaría a un receptor LDL alcanzar una trampa, una vez que los receptores se hubieran insertado en puntos aleatorios de la superficie celular y después se movieran por difusión hacia las mismas, fue el de suministrar una base para evaluar la hipótesis de que los receptores LDL se comportan de esa manera. El tiempo promedio de captura asociado a un movimiento difusivo debe ahora compararse con el tiempo promedio de captura determinado

experimentalmente. La estimación experimental se basa en el uso de una ecuación para la tasa de cambio respecto al tiempo del número de receptores en las trampas, y no considera ningún mecanismo (por ejemplo difusión) como el responsable del acarreo de los receptores a las estructuras absorbentes.

sean:

$R_p(t)$ = número de receptores en las estructuras de absorción al tiempo t

$R(t)$ = número de receptores no capturados por unidad de área al tiempo t

$\rho(t)$ = número de trampas por unidad de área al tiempo t , entonces:

$$\frac{dR_p}{dt} = k_+ \rho R - k_- R_p - \lambda R_p \quad (4.8)$$

donde k_+ es la constante de rapidez de agregación de un receptor LDL en una trampa, k_- es la constante de velocidad de disociación y λ es la tasa de internación de la trampa. Una hipótesis subyacente en la ecuación (4.8) es que el número promedio de receptores LDL por trampa es pequeño en comparación al máximo número que dicha estructura puede retener. Esta hipótesis se fundamenta en los estudios de Brown y Goldstein (1967 b), quienes compararon la internación de LDL para fibroblastos humanos normales y para aquellos con números reducidos de receptores LDL en sus superficies (células con mutaciones que inducen concentraciones superficiales deficientes de receptores LDL). De sus experimentos obtuvieron que

$$\lambda R_p / (R + R_p) = 0.17 \text{ min}^{-1}$$

para las células normales y 0.13 min^{-1} para las células con concentraciones deficientes. Si las trampas funcionan a niveles cercanos a la saturación, al incrementar el número de receptores LBD en la superficie celular el cociente disminuirá (λ permanecería constante, mientras que la fracción de receptores LBD en las trampas debería disminuir). En virtud de que el cociente $\lambda R_p / (R_p + R)$ no es menor para células normales que para células con concentraciones deficientes, todo parece indicar que las trampas no se hayan saturadas de receptores LBD.

En un estado estable (dicho estado se obtiene bajo condiciones experimentales en los que los cultivos se mantienen a una temperatura de 37°C), tenemos:

$$k_+ \rho = (k_- + \lambda) R_p / R. \quad (4.9)$$

Usando el equivalente a la ecuación (3.1) para la constante de velocidad de agregación se tiene que, el tiempo promedio t_s que un receptor permanece sobre la superficie antes de ser atrapado por una trampa esta dado por:

$$t_s = \frac{R/R_p}{(k_- + \lambda)}. \quad (4.10)$$

El valor de la constante de disociación k_- no se ha estimado, pero la ecuación (4.10) permite obtener una cota superior para t_s :

$$t_s < R/R_p \lambda. \quad (4.11)$$

La igualdad se cumple si una vez que el receptor alcanza una trampa éste permanece atrapado permanentemente.

La constante λ para la velocidad de internación de las trampas tiene un valor $\lambda = 0.25/\text{min}$ y como cerca del 69% de los receptores LBD se encuentran en las trampas, bajo condiciones de estado estable, podemos establecer la desigualdad

$$t_s \leq 1.8 \text{ min}$$

donde la igualdad se cumple en el caso en el cual los receptores son atrapados de manera irreversible.

De acuerdo con el modelo usado, la ecuación (4.7) indica que el tiempo promedio t_s requerido para la captura de un receptor en difusión es de aproximadamente 1.9 min siendo este valor muy cercano a la cota superior obtenida experimentalmente para t_s . Como esta cota superior corresponde a la agregación irreversible de receptores en las trampas, concluimos que si así es el caso, entonces el movimiento por difusión sería suficiente para determinar las tasas de agregación estimadas. Sin embargo, si la agregación es irreversible esto es si $t_s < 1.8 \text{ min}$, entonces podría ser necesario considerar otro mecanismo más activo para el transporte de los receptores hacia las trampas, bajo la hipótesis de que son insertados uniformemente sobre la superficie celular y luego se mueven hacia los sitios donde son atrapados. Una evaluación de la potencialidad de flujos convectivos e inserción preferencial como mecanismos para acelerar la agregación de receptores en las trampas aparece en Echavarría Heras (1988). Los resultados de este trabajo indican que con valores fisiológicamente plausibles para la magnitud de tales flujos, no se producirán cambios dramáticos en el tiempo promedio de captura calculado con base en la difusión como único mecanismo. Como conclusión establecemos que resulta sumamente importante el diseñar experimentos para determinar el valor de la constante de disolución k_- . Su valor determinará la magnitud del carácter reversible o irreversible de la interacción de los receptores con las trampas. Si dicha interacción fuese irreversible nuestros cálculos han demostrado que la difusión como único mecanismo de transporte

sería suficiente para explicar las tasas de agregación observadas. En caso contrario se deben de formular nuevas hipótesis sobre el mecanismo responsable del acarreo de los receptores hacia las trampas.

Hemos ilustrado mediante este trabajo, como el uso de la matemática aplicada puede suministrar ideas tendientes a la validación de hipótesis existentes o a sugerir experimentos para elucidar las mismas, en relación al mecanismo responsable del transporte de los receptores LBD hacia los sitios donde son internados en la Endocitosis Vía Receptores, a la cual dichas partículas se asocian en los fibroblastos del tejido conectivo humano.

Es conveniente destacar, como es el caso general, que el modelo usado para la estimación del tiempo promedio de captura t_c representa una aproximación lógicamente aceptable del sistema real. Esto nos conmina a reflexionar sobre la validez de un modelo, sobre todo en lo relativo al grado de incertidumbre asociado con sus predicciones, el precio que pagamos, al ser por necesidad reduccionistas.

5 Bibliografía

- Abramowitz, M. and Stegun, I. A. (1970). Handbook of Mathematical Functions. Dover. al
- Adam, G. and Delbruck, M. (1968). Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. Structural Chemistry and Molecular Biology, a. Rick and N. Davidson. editors. W. H. Freeman and Company, 198-215.
- Anderson, R. G. W., Goldstein, J. L. and Brown, M.S. (1977). A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localize in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. Nature 695-699.
- Barak, L. S. and Webb, W. W. (1981). Molecular motion of individual LDL molecules on cell membranes. Biophys. J. 33, 74a.
- Berg, H. C. and Purcell, E. M. (1977). Physics of chemoreception. Biophys. J. 193-219.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1975). Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. Cell, 307-316.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1976a). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. Science, 150-153.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1976b). Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. Cell, 633-674.

- Echavarría, H. H. (1986). Mean capture time calculations with applications to cell biology Ph.D. dissertation the University of New Mexico.
- Echavarría Heras, Hector. (1988). Convective flow effects in receptor mediated endocytosis. *Mathematical Biosciences* 89:927.
- Goldstein, B. and Wofsy, C. (1981). Analysis of coated pit recycling on human fibroblasts. *Cell Biophysics*, 251-277.
- Goldstein, B., Wofsy, C. and Bell, G. (1981). Interaction of low density lipoprotein receptors with coated pits on human fibroblasts: Estimate of the forward rate constant and comparison with the diffusion limit. *Proc. Natl. Acad. USA*, 5695-5698.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. and Brown, M.S. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 679-685.
- Goldstein, J.L., Basu, S. K., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1976). Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans.
- Keizer J., J. Ramirez and E. Peacock- Lopez. The effect of diffusion on the binding of membrane bound receptors to coated pits, *Biophys. J*, 47, 1985, 79-88.
- Maxfield, F. R., Schlessinger, Y. S., Pata, I. and Willingham, M. C. (1978). Collection of insulin, EGF and α -macroglobulin in the same patches on the surface of cultured fibroblasts and common internalization. *Cell*, 805-810.
- McCammon, J. A. and Northrup, S. H. (1981). Gated binding of ligands to protein. *Nature*, 316-317.
- Orci, L., Carpenter, J.L., Perrelet, A. Anderson, R. G. W., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1978). Occurrence of low density lipoprotein receptors within large pits on the surface of human fibroblasts as demonstrated by freezeetching. *Exp. Cell. Res.*, 1-13.
- Pearse, B. (1975). Coated vesicles from pig brain: purification from pig brain and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 93-98.
- Smoluchowski, M. V. (1916). Drei vortrage uber Diffusion, Kolloidteilchen. *Physik. Z.* 585-599.
- Willingham, M. C., Rutherford, A.V., Gallo, M. G. Wehland, J., Dickson, R. B., Schlegel, R. and Pastan, I. H. (1981). Receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts: cryptic coated pits and the formation of receptosomes. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 1003-1013.