



KELLEN MANOELA SIQUEIRA

**MODELOS DINÂMICOS PARA A
PRODUÇÃO DE ATP EM MITOCÔNDRIAS**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE MATEMÁTICA, ESTATÍSTICA
E COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA

KELLEN MANOELA SIQUEIRA

MODELOS DINÂMICOS PARA A
PRODUÇÃO DE ATP EM MITOCÔNDRIAS

Orientador(a): Prof. Dr. Alberto Vazquez Saa

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica da Unicamp para obtenção do título de Mestra em Matemática Aplicada.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KELLEN MANOELA SIQUEIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR ALBERTO VAZQUEZ SAA

Assinatura do Orientador

ALBERTO VAZQUEZ SAA

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARIA FABIANA BEZERRA MULLER - CRB8/6162
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE MATEMÁTICA, ESTATÍSTICA E
COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA - UNICAMP

Siqueira, Kellen Manoela, 1987-
Si75m Modelos dinâmicos para a produção de ATP em mitocôndrias /
Kellen Manoela Siqueira. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Alberto Vazquez Saa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica.

1. Mitocôndria. 2. Fisiologia - Modelos matemáticos. 3.
Adenosina trifosfato. I. Saa, Alberto Vazquez, 1966-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Matemática,
Estatística e Computação Científica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Dynamical models for ATP production in the mitochondria

Palavras-chave em inglês:

Mitochondria

Physiology - Mathematical models

Adenosine triphosphate

Área de concentração: Matemática Aplicada

Titulação: Mestra em Matemática Aplicada

Banca examinadora:

Alberto Vazquez Saa [Orientador]

Hyun Mo Yang

Marcus Aloizio Martinez de Aguiar

Data de defesa: 24-10-2012

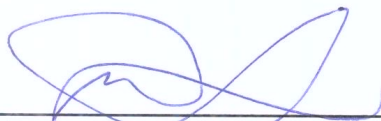
Programa de Pós-Graduação: Matemática Aplicada

Dissertação de Mestrado defendida em 24 de outubro de 2012 e aprovada

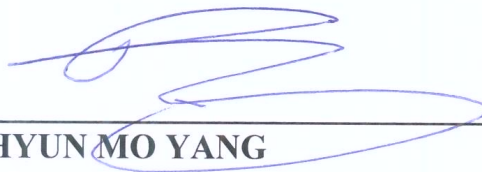
Pela Banca Examinadora composta pelos Profs. Drs.



Prof.(a). Dr(a). ALBERTO VAZQUEZ SAA



Prof.(a). Dr(a). MARCUS ALOIZIO MARTINEZ DE AGUIAR



Prof.(a). Dr(a). HYUN MO YANG

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe e à minha vó,

Por serem compreensivas, fornecerem excelentes conselhos e apoiarem as minhas decisões. Também por me ensinar que a educação é, sim, importante e que, com a devida dedicação, as metas podem ser alcançadas.

Agradecimentos

Agradeço a meu orientador, Alberto Saa, por ter me aceitado como aluna mesmo eu tendo vindo de uma área distinta da sua linha de pesquisa usual.

Agradeço, também, por todo o apoio fornecido ao longo do mestrado. Gostaria de agradecer aos funcionários do Imecc, que sempre estavam dispostos a ajudar. A os colegas da pós-graduação do Imecc, em particular à Francielli, Luciana, Isabel e Rafael. Também aos colegas da física, em especial à Carol e Thaís, que acompanharam de perto toda a trajetória do mestrado.

Agradeço, finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro.

Epígrafe

”Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme”
Antoine Laurent de Lavoisier

Resumo

O ATP (adenosina tri-fosfato) é uma molécula chave para a fisiologia, atuando como fonte de energia para diversos processos celulares. O transporte ativo através de membranas, a condução nervosa e a contração muscular são alguns exemplos desses processos. Devido à sua importância para a fisiologia, o estudo da dinâmica dos processos envolvidos na produção de ATP é de extrema importância. A produção de ATP se inicia no citoplasma celular e é seguida por uma etapa que ocorre na mitocôndria, uma organela celular que possui as enzimas necessárias para catalisar as reações de oxidação necessárias para produção de ATP. As reações que ocorrem na mitocôndria são as que determinam, de fato, a taxa com a qual o ATP será produzido. O objetivo deste trabalho foi obter um modelo simples e fisiologicamente preciso para descrever as etapas mitocondriais da produção de ATP e analisar alguns dos modelos já presentes na literatura. Trabalhamos com três modelos: o modelo MK (de Magnus e Keizer), o de Cortassa e o de Bertram. O modelo MK é o mais preciso dentre eles, fornecendo resultados quantitativamente condizentes com os resultados experimentais. O de Cortassa é uma modificação do modelo MK, incluindo maiores detalhes das reações envolvidas. Estes dois modelos, no entanto, são ambos complexos e não apropriados para simulações do tipo *whole cell* onde as equações para produção de ATP são apenas uma parte pequena do modelo. Com o objetivo de obter um modelo mais simples, Bertram efetuou uma série de modificações no modelo MK. O modelo obtido é, de fato, mais simples, porém verificamos que a resposta desse modelo não concordava quantitativamente (e, em alguns casos qualitativamente) com o modelo MK (e, consequentemente, com os dados experimentais). Sendo assim, buscamos novas modificações de modo a obter um modelo que fosse simples, como o de Bertram, mas que tivesse um comportamento mais próximo ao MK. Fizemos isso buscando novos parâmetros para as equações de Bertram e propondo novas equações simplificadas. Obtivemos, com isso, um modelo mais simples e fisiologicamente razoável, mas que ainda não concordava totalmente com o MK. Isso mostra que para obter um bom modelo não é possível aproveitar a estrutura do modelo de Bertram.

Palavras-chave: Produção de ATP; Mitocôndria; Modelo dinâmico.

Abstract

ATP (adenosine triphosphate) acts as an "energy currency" providing energy to several physiological processes. Active transport through membranes, nerve impulses and muscle contraction are examples of these processes. Due to its physiological importance the study of the dynamics of ATP production is quite relevant. ATP production starts in the cytoplasm and is followed by a phase that occurs in the mitochondria. This is a cell organelle that has the enzymes needed for catalyzing the reactions that lead to the ATP production. The processes that take place in the mitochondria are the ones that determine the rate of ATP production in the cell. The purpose of this work was to develop a simple and physiologically accurate model to describe the mitochondrial phase of ATP production and review some of the models already present in the literature. We worked with three models: MK's (Magnus and Keizer), Cortassa's and Bertram's model. MK's model is the most accepted among these models, because it is very complete and provides an accurate description of ATP production. Cortassa's model is a modification of MK's that includes a more detailed description of some of the processes. These two models, although complete, are complex and, therefore, unsuited for some simulations, such as whole cell models. Attempting to achieve a simpler model Bertram proposed some simplifications in MK's equations. The model he obtained was, indeed, simpler, but when we studied it we saw that it didn't agree with MK model quantitatively (and qualitatively in some cases). We then attempted to modify MK's model in order to obtain a model that was simple, like Bertram's, but as accurate as MK's. We did this by searching for new parameters in Bertram's equations and by proposing new simplified equations. We were, then, able to obtain a simpler and more physiologically accurate model. However this model still wasn't able to reproduce completely MK's, what suggests that, in order to get a good model, one can't use Bertram's as a starting point.

Key-words: ATP production; Mitochondria; Dynamical Model.

Sumário

Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Siglas	xxix
Lista de Símbolos	xxxi
Introdução.....	1
1 A biologia do problema	3
1.1 O ATP - Adenosina Trifosfato	3
1.2 A produção de ATP	6
1.2.1 Etapa citoplasmática - Glicólise.....	7
1.2.2 Etapa mitocondrial	10
1.2.2.1 A mitocôndria	10
1.2.2.2 Ciclo do ácido cítrico	11
1.2.2.3 Fosforilação Oxidativa	12
1.2.3 Balanço da produção de ATP	14
1.2.4 Regulação da fosforilação oxidativa - papel do cálcio	15
2 Modelos Matemáticos para Produção de ATP	19
2.1 Modelo MK.....	20

2.2	Modelo de Cortassa	23
2.3	Modelo de Bertram	24
2.4	Funções presentes nas equações dinâmicas.....	25
2.4.1	Atividade do ciclo do ácido cítrico	25
2.4.1.1	Piruvato desidrogenase	25
2.4.2	Bomba de prótons - Complexo I a IV	29
2.4.2.1	Taxa de consumo de oxigênio	29
2.4.2.2	Fluxo de prótons devido à respiração	31
2.4.3	F1F0-ATPase	31
2.4.3.1	Fluxo de prótons pela ATP-sintetase	32
2.4.3.2	Atividade da F1F0-ATPsintetase	33
2.4.3.3	Leak de prótons	34
2.4.4	Transportador de ATP/ADP (J_{ANT})	35
2.4.4.1	Trocador de ATP/ADP	35
2.4.5	Transportadores de cálcio	38
2.4.5.1	Transportador uniporte de cálcio	39
2.4.5.2	Trocador Na/Ca	40
2.4.6	Parâmetros presentes nos modelos.....	42
3	Comparação entre os Modelos	47
3.1	Modelo de Bertram	50
3.2	Modelo MK.....	56
3.3	Modelo de Cortassa	58
3.4	Modelo de Cortassa errado.....	65
3.5	Comparação do modelo MK com os modelos de Cortassa e de Bertram	67

4	Modificações propostas	69
4.1	Novos parâmetros para o Modelo de Bertram	69
4.1.1	Ajuste dos parâmetros a partir da superfície de resposta das funções - Modificação I	69
4.1.2	Ajuste dos parâmetros a partir do ponto de equilíbrio - Modificação II	74
4.1.3	Pontos de equilíbrio para outros valores de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$	76
4.2	Novas equações simplificadas - Modificação III	78
	Conclusões.....	81
	Referências	83
	Apêndice A – Artigo resultante deste trabalho	87

Lista de Figuras

Figura 1	Ilustração da estrutura do ATP.	4
Figura 2	Ilustração do bomba de sódio/potássio.	5
Figura 3	Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.	7
Figura 4	Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.	8
Figura 5	Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.	9
Figura 6	Ilustração da estrutura de uma mitocôndria.	11
Figura 7	Ilustração das etapas de produção de ATP que ocorrem na mitocôndria. .	12
Figura 8	Reações presentes no ciclo do ácido cítrico.	13
Figura 9	Cadeia transportadora de elétrons e ATP-sintetase.	14
Figura 10	Produção de ATP pela ATP-sintetase no processo de fosforilação oxidativa.	15

Figura 11	Ilustração da influência do cálcio na produção de ATP.	17
Figura 12	Representação esquemática dos processos eletrofisiológicos e metabólicos relevantes para a produção de ATP de acordo com o modelo de CORTASSA et al..	23
Figura 13	Ilustração dos <i>inputs</i> e <i>outputs</i> do modelo de BERTRAM et al..	24
Figura 14	Comparação entre a função $f([Glc])$ do artigo de MK (vermelho) e a versão apresentada no modelo de Bertram (verde).	27
Figura 15	Comportamento da função J_{PDH} (taxa de atuação do ciclo do ácido cítrico) de acordo com o valor de $[Ca]_m$ e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	28
Figura 16	Comportamento da função J_o (taxa de consumo de oxigênio - oxidação de NADH) de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	30
Figura 17	Comportamento da função J_{Hbomba} (taxa de ejeção de prótons pela bomba de prótons) de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha	

sólida.	32
Figura 18 Comportamento da função J_{HATP} (taxa de passagem de prótons pela ATP-sintetase) de acordo com o valor de ΔV_m e $[ATP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	33
Figura 19 Comportamento da função $J_{F_1F_0}$ (taxa de produção de ATP pela bomba de prótons) de acordo com o valor de ΔV_m e $[ATP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	34
Figura 20 Resposta da função J_{ANT} do modelo MK tal como apresentada no artigo de MK (J_{ANT}^{MK} - vermelho), de Cortassa ($J_{ANT}^{MK-Cortassa}$ - azul) e de Bertram ($J_{ANT}^{MK-Bertram}$ - verde) em relação a razão $[ATP]_m/[ADP]_m$ e da voltagem ΔV_m	36
Figura 21 Resposta da versão simplificada de Bertram para a função J_{ANT} ($J^{Bertram}$ - laranja) e desta função tal qual apresentada no artigo de de MK (J_{ANT}^{MK} - vermelho), de Cortassa ($J_{ANT}^{MK-Cortassa}$ - azul) e de Bertram ($J_{ANT}^{MK-Bertram}$ - verde) em relação a concentração $[ADP]_m$ e da voltagem ΔV_m	38
Figura 22 Comportamento da função J_{ant} (trocador de ATP/ADP) de acordo com o valor de ΔV_m e $RAT_m = [ATP]_m/[ADP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	39

Figura 23	Comportamento da função J_{uni} (transportador uniporte de cálcio) de acordo com o valor de ΔV_m . (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	40
Figura 24	Resposta da versão simplificada de Bertram para a função J_{NaCa} ($J_{NaCa}^{Bertram}$ - laranja) a versão do modelo MK (J_{NaCa}^{MK} - vermelho) e a do modelo de Cortassa tal qual apresentada no artigo de Cortassa ($J_{NaCa}^{Cortassa}$ - azul) e no de Bertram ($J_{ANT}^{Cortassa-Bertram}$ - verde) em relação a concentração $[Ca]_m$ e da voltagem ΔV_m	41
Figura 25	Comportamento da função $j_{Na/Ca}$ (trocador de sódio/cálcio) de acordo com o valor de ΔV_m e $[Ca^{2+}]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o <i>software Mathematica</i> , Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.	42
Figura 26	Mapa dinâmico para modelo de Bertram nas proximidades do ponto A. Conforme pode ser observado, embora o ponto A seja estável ele só é alcançado por condições iniciais não fisiológicas.	54
Figura 27	Mapa dinâmico para modelo de Bertram nas proximidades do ponto C. ..	55
Figura 28	Mapa dinâmico para modelo MK nas proximidades do ponto de equilíbrio.	57
Figura 29	Mapa dinâmico para modelo de Cortassa nas proximidades do ponto de equilíbrio.	59

Figura 30	Mapa dinâmico para modelo de Cortassa na forma correta nas proximidades do ponto de equilíbrio A.	63
Figura 31	Mapa dinâmico para modelo de Cortassa na forma correta nas proximidades do ponto de equilíbrio C.	64
Figura 32	Modelo de Bertram (verde), modelo MK (vermelho), modelo de Cortassa (amarelo) e modelo de Cortassa tal como apresentado no artigo de Bertram (azul). (a) $[Ca]_m(\mu M)$; (b) $\Delta V(mV)$; (c) $[NADH](mM)$; (d) $[ADP](mM)$	68
Figura 33	Modelo de Bertram com valores alterados para os parametros (verde) e modelo MK (vermelho).	70
Figura 34	Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 7 (verde) e modelo MK (vermelho).	72
Figura 35	Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 8(verde) e modelo MK (vermelho).	75
Figura 36	Modelo de Bertram com valores alterados para os parametros apresentados na Tabela 8 (azul) e modelo MK (vermelho).	76
Figura 37	Valor de equilíbrio da concentração de ATP na mitocôndria de acordo com o valor de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$. (a) modelo MK; (b) modelo de Bertram; (c) $[NADH](mM)$; (d) $[ADP](mM)$	77
Figura 38	Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 9(verde) e modelo MK (vermelho).	79

Figura 39	Valor de equilíbrio da concentração de ATP na mitocôndria de acordo com o valor de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$.	80
-----------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Balço da quantidade de ATP produzido pela glicólise e fosforilação oxidativa.	16
Tabela 2	Parâmetros no modelo de MAGNUS; KEIZER.	43
Tabela 3	Parâmetros no modelo de CORTASSA et al..	44
Tabela 4	Parâmetros no modelo de CORTASSA et al. (continuação).	45
Tabela 5	Parâmetros no modelo de BERTRAM et al..	45
Tabela 6	Pontos de equilíbrio dos três modelos avaliados	67
Tabela 7	Parâmetros do modelo de Bertram e obtidos pelo ajuste da superfície de resposta das funções presentes no modelo com o modelo MK	71
Tabela 8	Parâmetros do modelo de Bertram modificado e obtidos pelo ajuste para o ponto de equilíbrio do modelo MK	74
Tabela 9	Parâmetros do modelo de Bertram e obtidos pela versão deste modelo onde a equação para J_{UNI} modificada para a expressão 4.1 e usando J_{ANT} do modelo MK.	78

Lista de Siglas

ATP	adenosina trifosfato, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
ADP	adenosida difosfato
PFK	fosfo-frutoquinase, do inglês <i>phospho-fuctokinase-1</i>
GPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
NAD^+	hidreto de nicotinamica de adenina, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
$NADH$	hidreto de nicotinamica de adenina, do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
acetil-CoA	acetil-coenzima-A
PDH	piruvato desidrogenase
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina, do inglês <i>flavin adenine dinucleotide</i>
GTP	guanosina trifosfato, do inglês <i>guanosine triphosphate</i>
AMP	Adenosina mono-fosfato

Lista de Símbolos

Na^+	sódio
K^+	potássio
Pi	fosfato
H^+	prótons
O_2	oxigênio
Ca^{2+}	cálcio
ΔV	diferença de voltagem na membrana interna da mitocôndria
$[Ca^{2+}]_m$	concentração de cálcio na matriz mitocondrial
$[NADH]_m$	concentração de NADH na matriz mitocondrial
$[ADP]_m$	concentração de ADP na matriz mitocondrial
J_{PDH}	atividade da piruvato desidrogenase
J_o	atividade da cadeia respiratória
J_{ANT}	atividade do trocador ATP/ADP
$J_{F_1F_0}$	atividade da ATP sintetase
J_{uni}	atividade do transportador uniporte de cálcio
$J_{Na^+/Ca^{2+}}$	atividade do trocador de sódio/cálcio
$J_{H,res}$	fluxo de prótons por bombas de prótons na mitocôndria da cadeia transportadora de elétrons
$J_{H,atp}$	fluxo de prótons através da ATP-sintetase
$J_{H,leak}$	fluxo de prótons por difusão pela membrana
C_{mito}	capacitância da membrana mitocondrial interna
$[Ca^{2+}]_c$	concentração de cálcio no citoplasma

$[ADP]_c$	concentração de ADP no citoplasma
ΔV_c	diferença de potencial na membrana celular
I_{Kdr}	corrente na membrana citoplasmatica devido ao canal de potássio voltagem dependente
$I_{K,ATP}$	corrente na membrana citoplasmatica devido ao canal de potássio ativado por ATP
$I_{Ca,f}$	corrente na membrana citoplasmatica devido ao canal de cálcio de inativação rápida
$I_{Ca,s}$	corrente na membrana citoplasmatica devido ao canal de cálcio de inativação lenta
I_{NS}	corrente na membrana citoplasmatica devido ao canal de cálcio não seletivo
J_{hyd}	taxa de hidrólise do ATP citoplasmático originando ADP
$[Glc]$	concentração de glicose no citoplasma
$[FBP]$	concentração de frutose bi-fosfato
[FBP]	concentração de frutose bi-fosfato

Introdução

Diversos processos fisiológicos necessitam de energia para ocorrer. A condução de impulsos nervosos e a exocitose de vesículas, por exemplo, necessitam que ocorra o transporte de íons contra um gradiente eletroquímico. Isso só é possível se houver um fornecimento de energia. A contração muscular fornece outro exemplo de um processo que demanda energia (GUYTON; HALL, 2006)

E de onde vem esta energia? Essencialmente ela é fornecida pelos alimentos que ingerimos. Este é metabolizado e a energia obtida é usada para fosforilar moléculas de adenosina di-fosfato (ADP) originando a adenosina tri-fosfato (ATP). O ATP é muitas vezes chamado de moeda de energia pois pode ser rapidamente quebrado em ADP e fosfato, liberando energia. Estima-se que em 24 horas uma massa de ATP equivalente ao seu peso corporal é produzida e consumida pelas células. (TORNROTH-HORSEFIELD; NEUTZE, 2008)

O processo de produção de ATP é controlado de acordo com as necessidades energéticas das células. Se há um fornecimento maior que o consumo de energia, outras vias que não levem à produção de ATP podem ser acionadas. Ocorre, então, a produção de glicogênio e/ou lipídeos, que atuam como reservas de energia. Estas reservas são armazenadas no fígado e músculos (glicogênio) e tecido adiposo (lipídeos) e são mobilizadas pelo corpo apenas quando há falta de energia nas células. A primeira forma de armazenamento (glicogênio) origina depósitos que são mobilizados mais rapidamente. (NELSON; COX, 2008)

O ATP é produzido em todas as células sendo que nas eucarióticas a sua produção segue duas etapas. A primeira ocorre no citoplasma celular e tem como produto moléculas de piruvato. Para carboidratos esta etapa é chamada de glicólise. Lipídeos e aminoácidos podem, também, ser convertidos em piruvato no citoplasma. A segunda etapa ocorre na mitocôndria. (NELSON; COX, 2008)

A mitocôndria é uma organela celular que possui dois ambientes distintos, chamados de matriz mitocôndrial e espaço intermembrana. Esses ambientes são separados um do

outro através de uma membrana lipídica (a membrana interna) e o espaço intermembrana é separado do citoplasma celular pela membrana externa. A matriz mitocondrial possui as enzimas necessárias para dar continuidade ao processo de produção de ATP e a sua membrana interna possui uma proteína transmembrana que efetua a conversão de ADP em ATP. O ATP produzido é, então, transportado para o citoplasma. As reações que ocorrem na mitocôndria são as que determinam, de fato, a taxa com a qual o ATP será produzido. (NELSON; COX, 2008)

A modelagem matemática desse processo foi inicialmente feita por Magnus e Keizer em uma série de artigos em 1997 e 1998 ((MAGNUS; KEIZER, 1997), (MAGNUS; KEIZER, 1998a)). Nestes artigos eles apresentaram um modelo que descreve em detalhes o processo, no qual a taxa de reação de todas as etapas cruciais foram incluídas. (MAGNUS; KEIZER, 1997)

O modelo MK é detalhista e descreve bem a produção de ATP, mas ele apresenta equações bastante complexas. Com isso pode ser difícil extrair propriedades do modelo. A verificação se um determinado fluxo irá aumentar ou diminuir quando o valor de uma variável é alterada, por exemplo, pode ser mascarado pela complexidade das equações. Além disso, quando se deseja fazer simulações do tipo *whole cell*, nas quais a produção de ATP é uma pequena parte do modelo, o modelo MK pode ser problemático. (BERTRAM et al., 2006).

Para tentar obter um modelo mais simples Bertram propôs algumas modificações no modelo MK ((BERTRAM et al., 2006)). O modelo que ele obteve apresenta equações mais simples e de fácil interpretação. No entanto, pelo que verificamos na literatura, uma comparação detalhada do modelo de Bertram com o modelo MK ainda não tinha sido feita. Esse foi um dos objetivos deste trabalho: avaliar se as simplificações propostas por Bertram não alteraram o comportamento do modelo.

Tendo feito isso, e encontrado algumas não concordâncias, buscamos construir um novo modelo que reproduzisse bem o de MK (e, conseqüentemente, o comportamento fisiológico) mas mantivesse a simplicidade do de Bertram.

CAPÍTULO 1

A BIOLOGIA DO PROBLEMA

Neste capítulo procurar-se-á justificar a importância do estudo da taxa de produção da molécula de ATP apresentando alguns dos diversos processos fisiológicos nos quais o ATP é um participante fundamental. A seguir o processo de produção de ATP será descrito em termos fisiológicos.

1.1 O ATP - Adenosina Trifosfato

Muitos dos processos fisiológicos que ocorrem no nosso corpo necessitam de energia, que é obtida a partir dos alimentos que ingerimos e é armazenada nas células na forma de moléculas de adenosina tri-fosfato (**ATP**). O ATP é um nucleotídeo composto de uma base nitrogenada (adenina), um anel de açúcar pentose (ribose) e três radicais de fosfato (Figura 1). Os dois radicais de fosfato mais externos estão conectados com o restante da molécula por ligações químicas chamadas de *ligações de fosfato de alta energia* (representado na Figura 1 pelo símbolo $\sim$). Sob as condições físicas e químicas do corpo cada uma destas ligações armazena certa de 12.000 calorias por mol de ATP, uma energia superior ao usualmente armazenado em uma ligação química, o que justifica o nome desta ligação (GUYTON; HALL, 2006).

Além disso, as ligações de fosfato de alta energia são muito lábeis, de modo que podem ser instantaneamente quebradas sempre que energia é necessária para promover alguma reação intracelular. Quando um dos radicais de fosfato é removido da molécula, o ATP

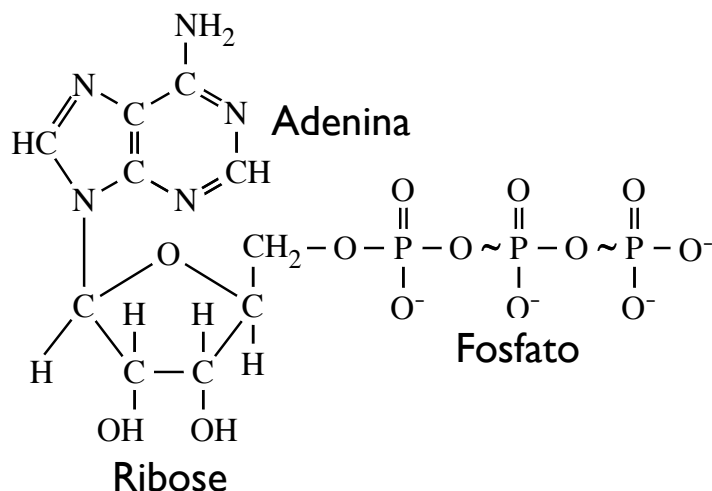


Figura 1: Ilustração da estrutura do ATP.

Fonte: (GUYTON; HALL, 2006, p.32).

libera sua energia e há formação de ADP (adenosina di-fosfato). A quebra dessa ligação é usada como fonte de energia em, virtualmente, todas as demais funções celulares (GUYTON; HALL, 2006; NELSON; COX, 2008). Alguns exemplos encontram-se a seguir.

ATP fornece energia para a síntese de importantes componentes celulares

Proteínas correspondem a cadeias de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas e executam diversas funções celulares como catálise de reações, controle do transporte de moléculas dentro da célula e através de membranas (GUYTON; HALL, 2006). A síntese protéica ocorre em uma estrutura celular chamada de ribossomo, onde uma maquinaria catalisa a ligação entre aminoácidos. A formação destas ligações requer energias que podem variar entre 500-5000 calorias por mol, de acordo com os aminoácidos usados. Esta energia é obtida pela quebra de ligações de fosfato de alta energia (GUYTON; HALL, 2006).

O ATP também fornece energia para a síntese de glicose a partir do ácido láctico e síntese de ácidos graxos a partir da acetil-coenzima A. Além disso, a energia do ATP é usada para a síntese de colesterol, fosfolipídios, hormônios, etc. Mesmo a uréia excretada pelos rins necessita de ATP para ser formada a partir de amônia (GUYTON; HALL, 2006; NELSON; COX, 2008).

ATP fornece energia para a contração muscular

A contração muscular é efetuada por fibras musculares. Um dos seus componentes dessas fibras é a proteína contrátil miosina. Ela atua como uma enzima quebrando ATP em ADP obtendo, assim, a energia necessária para a contração. Apenas uma pequena quantidade de ATP é usada pelas células musculares na ausência de contração, mas esta quantidade pode aumentar em até 150 vezes durante uma contração vigorosa (GUYTON; HALL, 2006).

ATP fornece energia para transporte ativo através de membranas

Muitas vezes é necessário que seja efetuado o transporte de substâncias (íons, glicose, aminoácidos, etc) contra um gradiente eletroquímico. Para se opor a este gradiente e efetuar o transporte precisa-se de energia, a qual é fornecida pelo ATP. Na Figura 2 encontra-se uma ilustração da bomba de sódio-potássio que faz uso do ATP para transportar íons de sódio (Na^+) para o exterior da célula e de potássio (K^+) para o interior. Neste processo uma molécula de ATP é gasta para cada $3Na^+$ e $2K^+$ transportados.

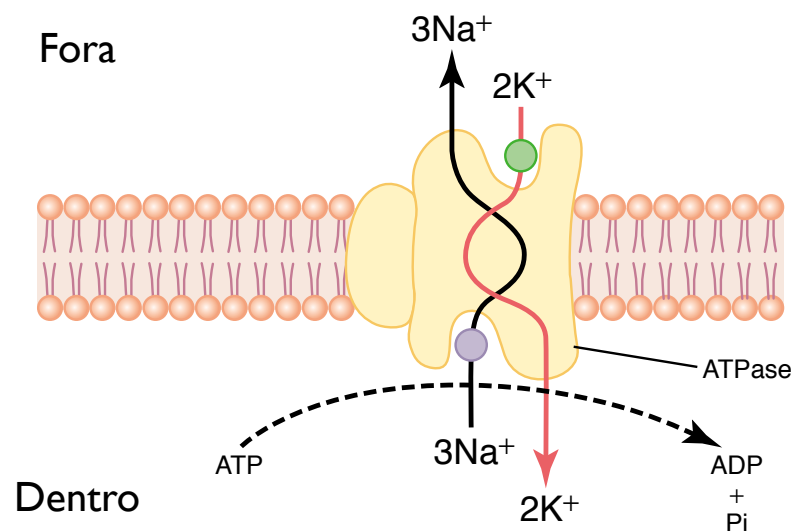


Figura 2: Ilustração do bomba de sódio/potássio.

Fonte: (GUYTON; HALL, 2006, p.53).

ATP fornece energia para secreção glandular

Os mesmos princípios do transporte de substâncias contra o seu gradiente se aplicam

para secreção glandular. Neste processo é necessário concentrar substâncias em vesículas para que as células glandulares as secretem. Além disso, energia é necessária para sintetizar muitos dos componentes orgânicos que são secretados nestas vesículas (GUYTON; HALL, 2006).

ATP fornece energia para a condução nervosa em neurônios

A energia usada durante a propagação de um impulso nervoso é proveniente de energia potencial armazenada na forma de diferença de concentração de íons através da membrana celular dos neurônios. Estes íons são o potássio, K^+ , que apresenta alta concentração dentro da célula e baixa fora, e o sódio, Na^+ , que apresenta alta concentração fora da célula e baixa concentração dentro. A energia usada na propagação dos impulsos nervosos é obtida desta energia potencial com a transferência de pequenas quantidades de potássio para fora e de sódio para dentro da célula. O transporte de sódio e potássio de volta para suas concentrações iniciais (antes do impulso), e manutenção dessas concentrações, são feitos de modo ativo pela bomba de sódio/potássio (ver Figura 2), a qual obtém energia a partir do ATP (GUYTON; HALL, 2006; NELSON; COX, 2008).

Estes exemplos deixam claro que o ATP é uma molécula chave para o metabolismo como um todo o que justifica o interesse no estudo da dinâmica de produção de ATP.

1.2 A produção de ATP

Os alimentos são as principais fontes da energia usada para converter ADP e fosfato em ATP. No corpo humano, essencialmente todos os carboidratos absorvidos são convertidos em glicose pelo trato digestivo e fígado antes de atingir as demais células do corpo. De maneira similar, proteínas e lipídeos são convertidos em aminoácidos e ácidos graxos, respectivamente. Estes são internalizados pelas células e, então, sofrem uma série de reações, sob a influência de enzimas que as controlam. Estas reações culminam na produção de ATP, conforme ilustrado na Figura 3 (GUYTON; HALL, 2006).

Nas seções a seguir, a via metabólica da glicose será descrita.

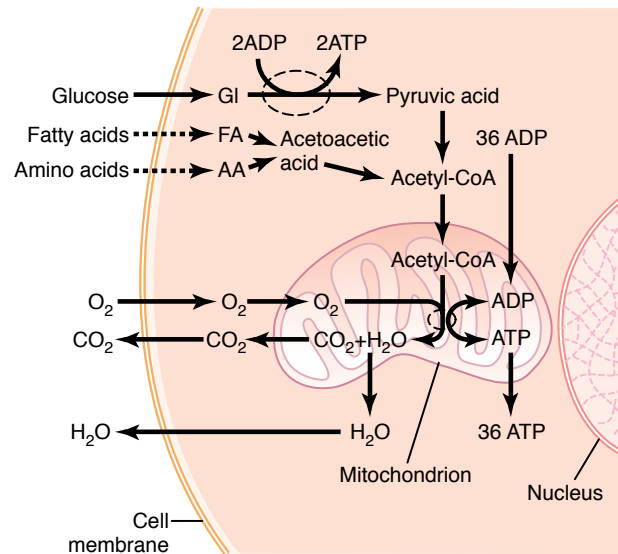


Figura 3: Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.

Fonte: (GUYTON; HALL, 2006, p.22).

1.2.1 Etapa citoplasmática - Glicólise

As moléculas de glicose, uma vez presentes no citoplasma das células, sofrem uma série de reações catalizadas por enzimas, um processo chamado de **glicólise**. Este processo é constituído de duas etapas: a etapa de preparatória e a de pagamento.

A **etapa preparatória** está ilustrada na Figura 4. Nesta etapa a glicose é, inicialmente, fosforilada pela ação da enzima hexoquinase, transformando-se em glicose-6-fosfato e consumindo 1 ATP no processo (passo 1). A glicose-6-fosfato é, então, convertida em frutose-6-fosfato (passo 2) a qual é fosforilada pela enzima fosfo-frutoquinase-1 (PFK) consumindo mais 1 ATP (passo 3). A enzima aldolase, então, atua quebrando a frutose 1,6-bisfosfato produzida na reação anterior, em duas moléculas com três carbonos cada (passo 4): gliceraldeído- 3-fosfato e dihidroxi-acetona-fosfato. Este último é, por sua vez, convertido, também, em gliceraldeído- 3-fosfato (passo 5) (NELSON; COX, 2008).

O ganho de energia da glicólise vem da **fase de pagamento** (Figura 5). Nesta etapa a enzima GPDH oxida e fosforila, usando fosfato inorgânico (P_i), a o gliceraldeído-3-fosfato em gliceraldeído 1-3-bisfosfato (passo 6). Nesta reação NAD^+ é convertido em $NADH$. Energia é, então, liberada, quando as duas moléculas de gliceraldeído 1-3-bisfosfato

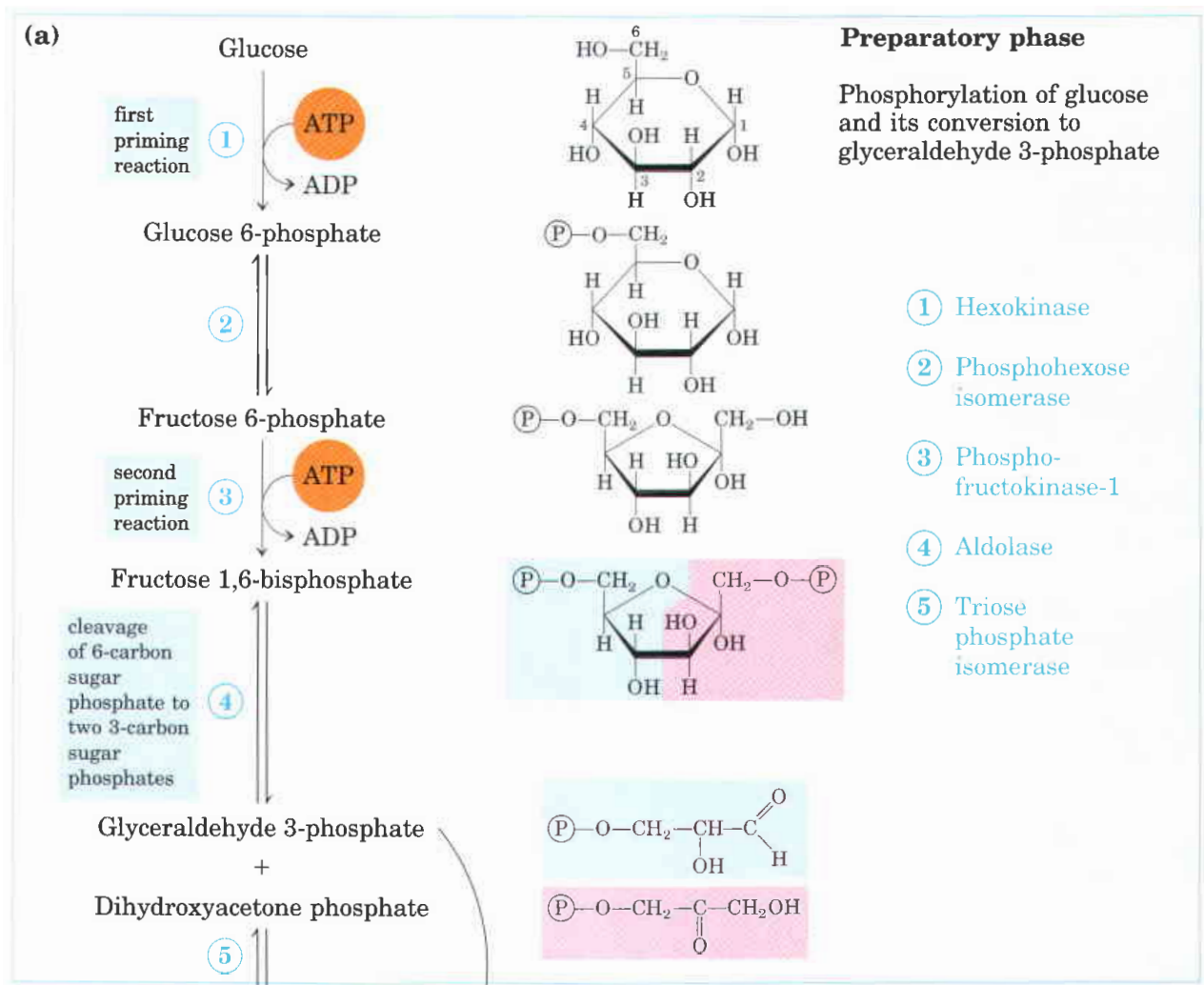


Figura 4: Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.

Fonte: (NELSON; COX, 2008, p.529).

são convertidas em piruvato (passos 7-10)(NELSON; COX, 2008).

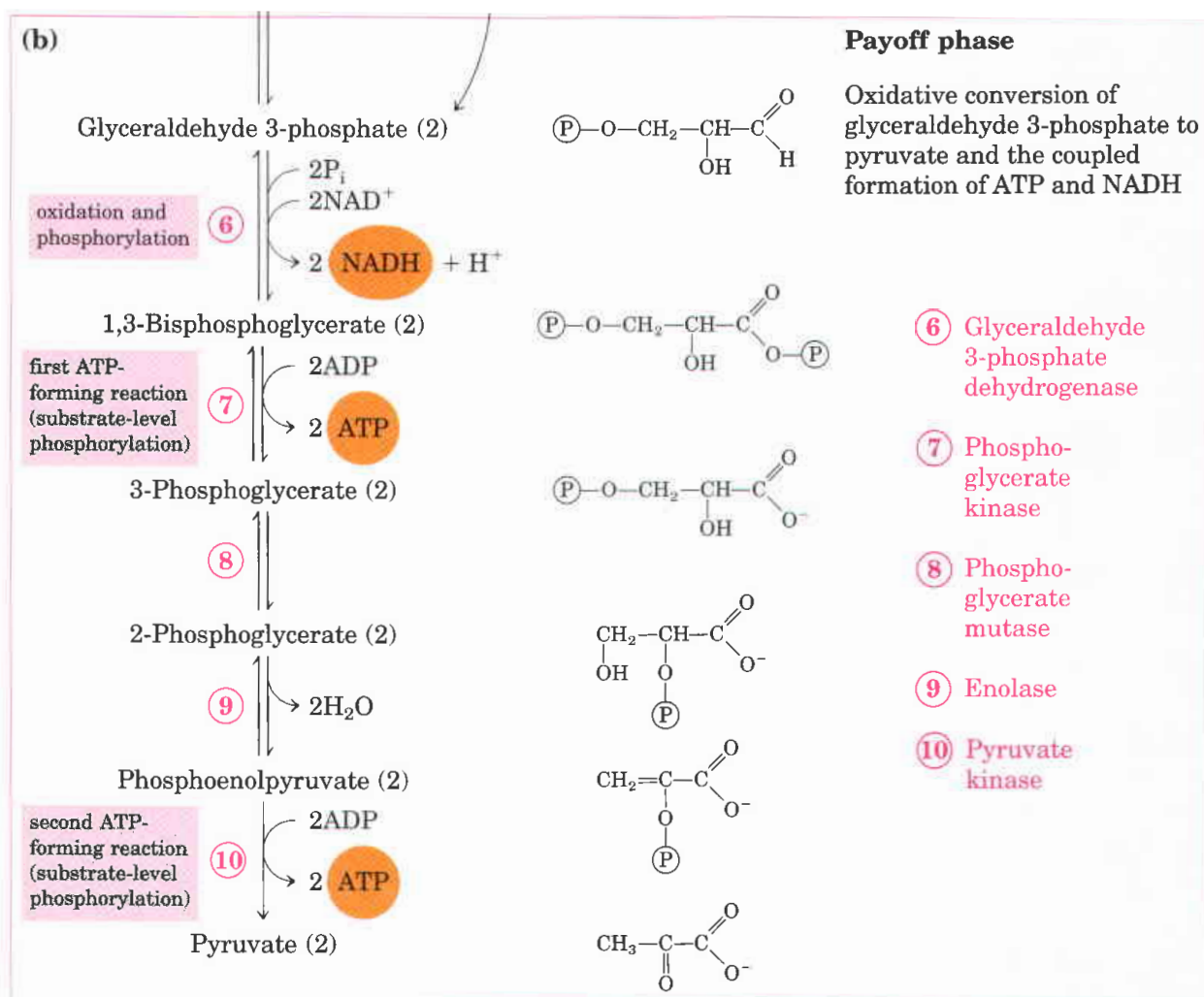
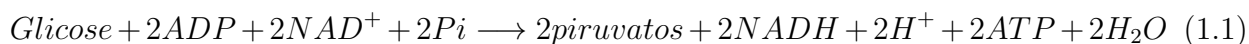


Figura 5: Ilustração das etapas envolvidas na produção de ATP a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos.

Fonte: (NELSON; COX, 2008, p.529).

O balanço da glicólise é:



Isto é, na glicólise há uma produção líquida de dois ATP's por molécula de glicose. Um número maior de moléculas de ATP será produzido na fase seguinte, que ocorre na

mitocondria. Esta será descrita na próxima seção.

1.2.2 Etapa mitocondrial

O piruvato resultante da glicólise ainda possui energia armazenada nas suas ligações químicas, a qual pode ser usada para produzir mais ATP's.

Após a glicólise o piruvato é transportado para a mitocôndria, onde sofrerá uma série de reações de oxidação-redução. Antes de passar para esta etapa do processo de produção de ATP convém revisar algumas características da mitocôndria que são relevantes para este processo.

1.2.2.1 A mitocôndria

A mitocôndria é uma organela celular na qual ocorrem etapas importantes do processo de síntese de ATP. Sem elas as células seriam incapazes de extrair energia suficiente dos nutrientes e funções celulares essenciais cessariam.

As mitocôndrias estão presentes em todas as áreas do citoplasma celular, mas o número total por célula varia de menos que 100 até milhares dependendo da demanda energética da célula. Elas podem apresentar formato e tamanhos variáveis, sendo que algumas apresentam apenas alguns nanômetros de diâmetro e estrutura globular, enquanto outras são alongadas e atingem 1 micrometro de diâmetro e 7 micrometros de comprimento (GUYTON; HALL, 2006).

A estrutura básica da mitocôndria, mostrada na Figura 6, corresponde a duas membranas constituídas de uma bicamada de fosfolipídios e proteínas (membrana externa e membrana interna). O espaço dentro da membrana interna é chamado de **matriz mitocondrial** e aquele entre a membrana interna e externa é o **espaço intermembrana** (NELSON; COX, 2008). A membrana interna apresenta envergaduras e é impermeável para diversas moléculas pequenas e íons. Nesta membrana estão presentes algumas proteínas importantes para o processo de produção de ATP, como a Cadeia Respiratória de Elétrons (**Complexos I-IV**), o **Trocador de ATP/ADP** e a **F_0F_1 -ATP Sintetase** (NELSON; COX, 2008). Na matriz mitocondrial se encontram diversas enzimas, incluindo o complexo piruvato desidrogenase e enzimas que participam do ciclo do ácido cítrico, etapas fundamentais na produção de ATP

(NELSON; COX, 2008). Já a membrana externa é permeável a pequenas moléculas e íons.

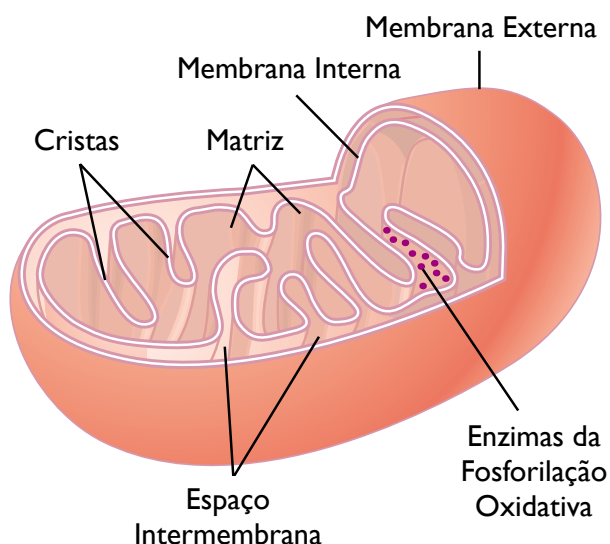


Figura 6: Ilustração da estrutura de uma mitocôndria.

Fonte: (GUYTON; HALL, 2006, p.16).

As mitocôndrias possuem a habilidade de se auto-replicar sempre que há uma maior demanda de ATP pela célula. De fato, elas possuem DNA próprio (GUYTON; HALL, 2006). Além de serem organelas chave para a produção de ATP as mitocôndrias participam de diversos processos fisiológicos, como apoptose, metabolismo de lipídeos, entre outras (NELSON; COX, 2008).

As reações envolvidas na etapa mitocondrial da síntese de ATP estão resumidas na Figura 7. O piruvato internalizado é convertido em acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico. Neste há a produção de moléculas de NADH que são oxidadas na membrana mitocondrial interna e levam a ejeção de prótons. Estes, por sua vez, fazem com que a ATP sintetase converta ADP em ATP. Mais detalhes destas reações serão dadas a seguir.

1.2.2.2 Ciclo do ácido cítrico

O piruvato produzido na glicólise se difunde para a matriz mitocondrial onde é convertido em acetil-CoA (acetil-coenzima-A) pela ação do complexo enzimático piruvato

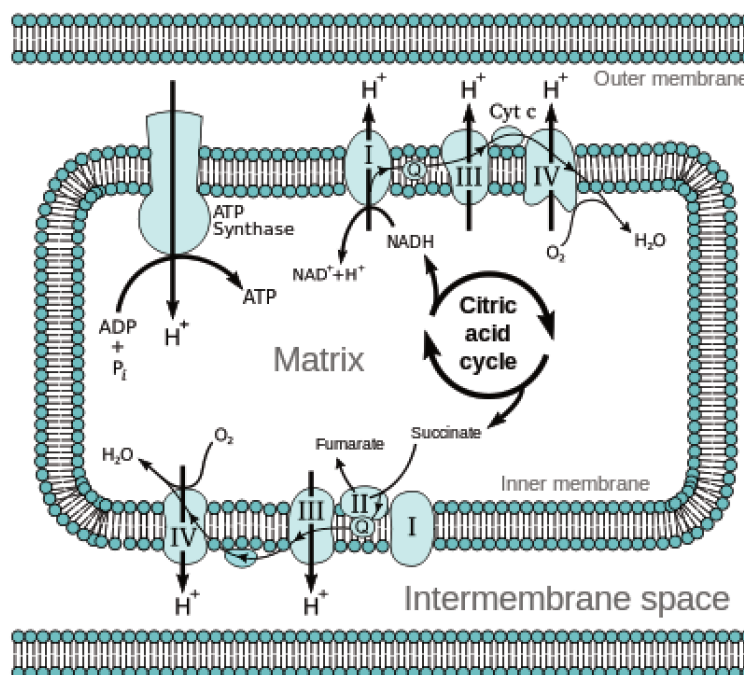


Figura 7: Ilustração das etapas de produção de ATP que ocorrem na mitocôndria.

Fonte: Fvasconcellos, 2007

desidrogenase (PDH). A acetil-CoA entra, então, no ciclo do **ácido cítrico** onde sofre uma série de reações de oxidação/redução que culminam na produção de $NADH$ e $FADH_2$ (forma reduzida do FAD , dinucleotídeo de flavina e adenina). Para cada molécula de acetil-CoA são produzidas 3 moléculas de $NADH$, 1 de $FADH_2$ e uma de GTP (guanosina trifosfato) que armazena energia como o ATP. Estas reações estão ilustradas na Figura 8.

1.2.2.3 Fosforilação Oxidativa

Os $NADH$ e $FADH_2$ produzidos no ciclo do ácido cítrico fornecem energia para a síntese de moléculas de ATP através do processo de **fosforilação oxidativa** que ocorre na membrana interna da mitocôndria, onde há um conjunto de proteínas transmembrana chamados de **cadeia transportadora de elétrons** (Figura 9).

A fosforilação oxidativa inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia respiratória provenientes das reações de oxidação de $NADH$ em NAD^+ e de $FADH_2$ em FAD . O fluxo desses elétrons pelos carreadores de elétrons da cadeia respiratória leva à ejeção de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana originando um gradiente

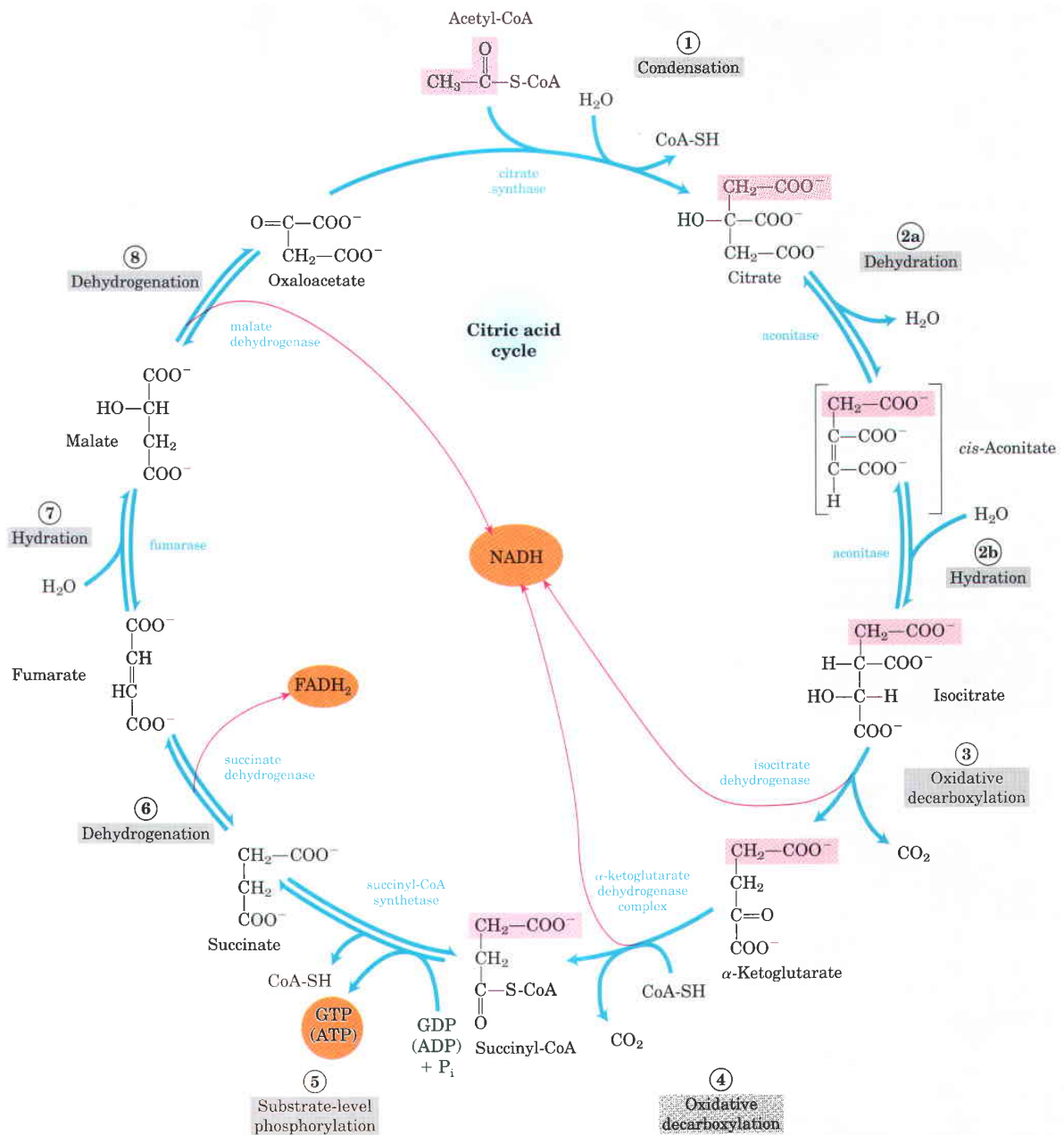


Figura 8: Reações presentes no ciclo do ácido cítrico.

Fonte: (NELSON; COX, 2008, p.621).

de prótons. Neste processo há consumo de oxigênio (O_2).

Os prótons ejetados tendem a retornar à matriz mitocondrial, passando pelo F_1F_0 -ATPase, a qual usa a energia dos prótons para catalisar a conversão de ADP em ATP (Figura 10). O ATP produzido na mitocôndria é, então, transportado para o citoplasma pelo **tro-**

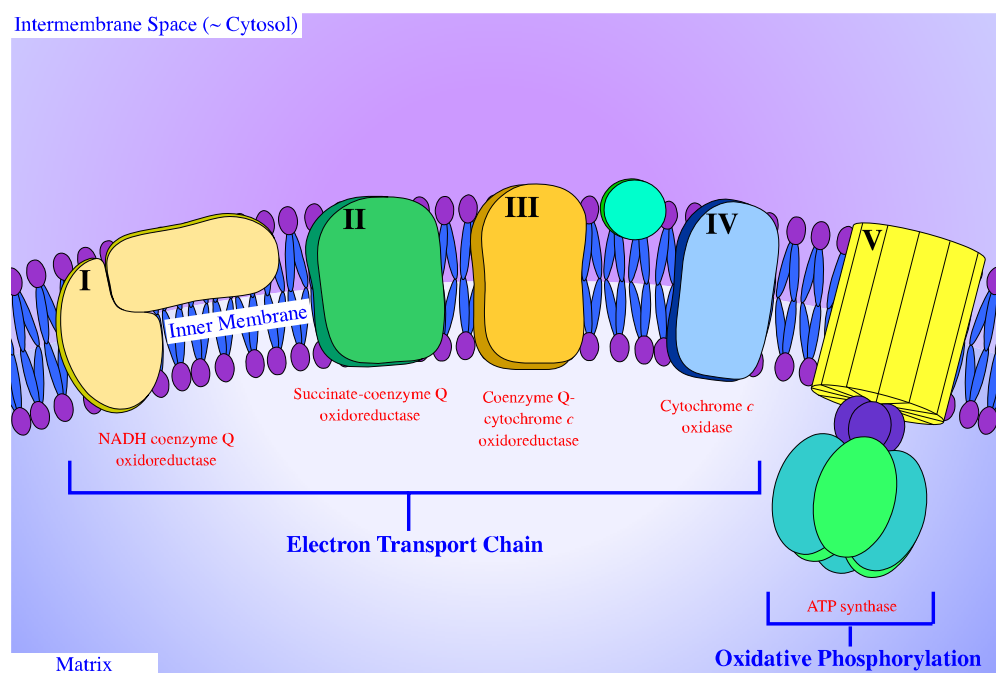


Figura 9: Cadeia transportadora de elétrons e ATP-sintetase.

Fonte: WWW.BROOKSCOLE.COM.

cador ADP/ATP localizado na membrana interna da mitocôndria (NELSON; COX, 2008).

Na fosforilação oxidativa para cada molécula de *NADH* (ou *FADH₂*) são produzidos cerca de 2,5 (ou 1,5) ATP's (GRIFFITHS; RUTTER, 2009; GUYTON; HALL, 2006).

1.2.3 Balanço da produção de ATP

Conforme mencionado na seção 1.2.1, no processo de glicólise são produzidos 2 *ATP*'s e 2 *NADH*'s para cada molécula de glicose e esta é quebrada em duas moléculas de piruvato. Na seção 1.2.2.2 mostrou-se que para cada molécula de piruvato são produzidas 3 moléculas de *NADH*, 1 de *FADH₂* e 1 *GTP*. Ou seja, para cada molécula de glicose há a produção de 2 *ATP*'s, 2 *GTP*'s (que podem ser contados como *ATP*'s pois, como este, armazenam energia que pode ser liberada nas reações bioquímicas da célula), 8 *NADH*'s e 2 *FADH₂* nas etapas de glicólise e do ciclo do ácido cítrico.

Na seção 1.2.2.3 foi mencionado que para cada *NADH* reduzido a *NAD⁺* há a produção de 2,5 moléculas de ATP, enquanto para cada *FADH₂* reduzido a *FAD* há a

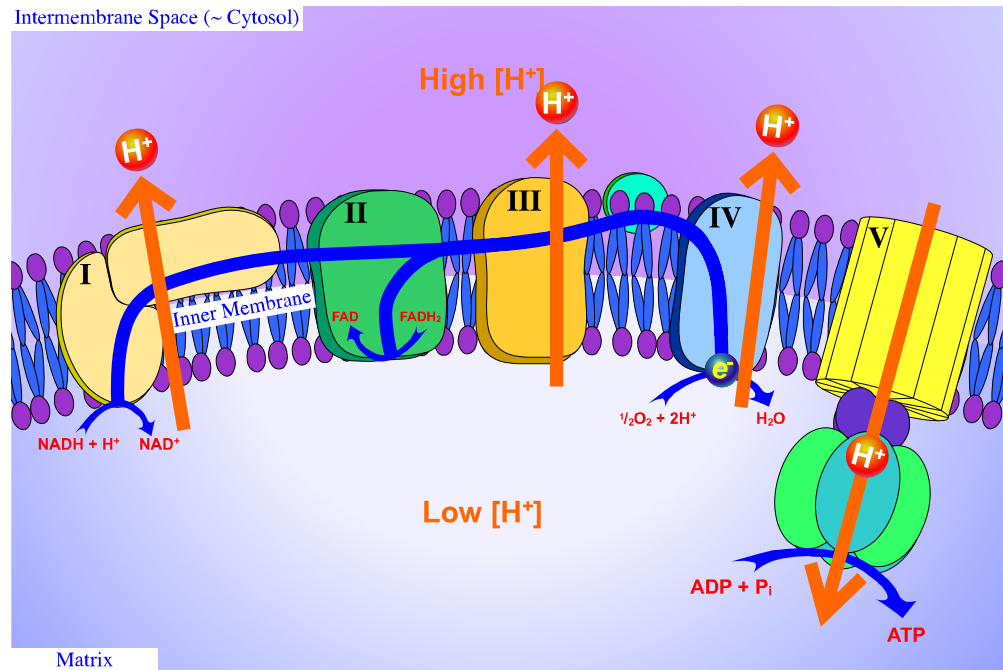


Figura 10: Produção de ATP pela ATP-sintetase no processo de fosforilação oxidativa.

Fonte: WWW.BROOKSCOLE.COM.

produção de 1,5. Com isso tem-se que para cada molécula de glicose podem ser produzidos até ~ 30 moléculas de ATP, onde cerca de 90% destas se devem à etapa mitocondrial (GRIFFITHS; RUTTER, 2009).

O balanço de *ATP*'s produzidos está apresentado na Tabela 1. Pode-se verificar que o processo é bastante eficiente, produzindo uma grante quantidade de moléculas de ATP a partir de uma única molécula de glicose. Virtualmente toda a energia armazenada nas ligações da molécula de glicose é eproveitada (NELSON; COX, 2008).

1.2.4 Regulação da fosforilação oxidativa - papel do cálcio

A fosforilação oxidativa pode ser regulada por diversos mecanismos. Variação nas concentrações de *NADH*, *NAD⁺*, *ADP* e *ATP*, por exemplo, que são os componentes envolvidos na fosforilação oxidativa, podem influenciar a taxa de ocorrência das reações. O oxigênio não é limitante, uma vez que seus níveis precisariam ser menores que $20\mu M$ para isso e estes níveis não são observados fisiologicamente (RIZZUTO ALEC W. M. SIMPSON; POZZAN, 1992 apud GRIFFITHS; RUTTER, 2009). Assim, originalmente foi proposto que

Tabela 1: Balanço da quantidade de ATP produzido pela glicólise e fosforilação oxidativa.

Processo	Molécula Produzida	Moléculas de ATP produzidos no final
Glicólise	2 NADH (citoplasmático)	3 ou 5
	2 ATP	2
Oxidação do Piruvato (dois por molécula de glicose)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidação da acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico	6 NADH (matriz mitocondrial)	15
	2 FADH ₂	3 ou 5
	2 ATP ou 2 GTP	2
Total (por molécula de glicose)		30 ou 32 ATP's

Fonte: (NELSON; COX, 2008, p.733).

Nota: o número de ATP's produzidos a partir do NADH proveniente da glicólise depende do sistema considerado para transporte de NADH do citoplasma para a mitocôndria.

mudanças na razão $[ATP]/[ADP]$ fosse o principal regulador da síntese de ATP, o que foi verificado experimentalmente em suspensões de mitocôndria isoladas (CHANCE; WILLIAMS, 1956 apud GRIFFITHS; RUTTER, 2009). No entanto estudos posteriores mostraram que as concentrações citoplasmáticas de ATP permaneciam constantes mesmo em situações onde a demanda energética era maior e onde, portanto, esperar-se-ia que ocorresse uma queda na concentração de ATP antes do aumento da sua produção (NEELY et al.; KATZ et al., 1972, 1989 apud GRIFFITHS; RUTTER, 2009).

Evidentemente, é necessário haver um aumento na produção de ATP quando células e tecidos são estimulados, mas este processo parecia ser controlado de modo fino para que a taxa de produção de ATP correspondesse à de utilização. O trabalho de Denton, na regulação de desidrogenases mitocondriais via Ca^{2+} (cálcio) os levou a propor que um aumento na concentração mitocondrial de Ca^{2+} causada por um aumento na sua concentração citoplasmática (a qual ocorre por aumento no atividade celular ou estimulação por agonistas), leva a um aumento na concentração de NADH e, conseqüentemente, na síntese de ATP fornecendo, assim, uma ligação entre demanda e fornecimento de energia. Este processo está ilustrado na Figura 11. Esta elegante teoria foi extensamente demonstrada experimentalmente e é, agora, amplamente aceita (MCCORMACK; DENTON, 1981; MCCORMACK; DENTON, 1984; MCCORMACK; ENGLAND, 1983; UNITT et al., 1989; ALLEN; STONE; MCCORMACK, 1992; TARASOV; GRIFFITHS; RUTTER, 2012).

Com isso concluímos o capítulo tratando da produção de ATP. No capítulo seguinte serão apresentados alguns modelos que visam descrever matematicamente a dinâmica deste processo.

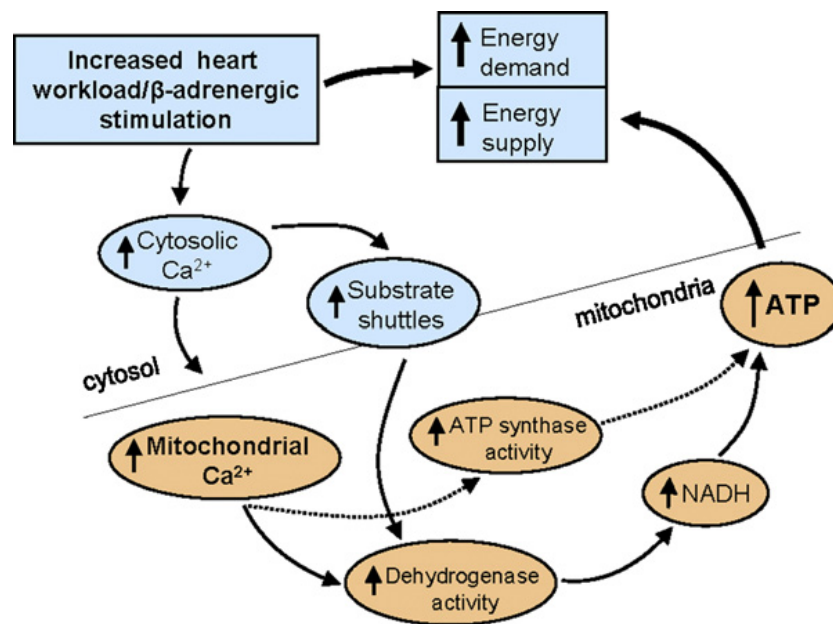


Figura 11: Ilustração da influência do cálcio na produção de ATP.

Fonte: (TARASOV; GRIFFITHS; RUTTER, 2012).

CAPÍTULO 2

MODELOS MATEMÁTICOS PARA PRODUÇÃO DE ATP

Tentamos demonstrar no capítulo anterior, como o ATP é uma molécula de extrema importância fisiológica. Sendo assim, a obtenção de uma descrição matemática da sua produção que seja capaz de reproduzir dados experimentais, pode ser muito útil em estudos de fisiologia. Estes modelos permitem, por exemplo, uma análise mais detalhada do processo de produção de ATP e da fisiologia da mitocôndria, sugerindo mecanismos para explicar comportamentos observados no laboratório.

Além disso, ao se fazer simulações de células inteiras (*whole cell simulations*), independente da célula com qual se esteja trabalhando, sempre será necessário incluir a cascata de produção de ATP. Nesse caso, um bom modelo para produção de ATP deve, também, ser razoavelmente simples pois corresponde apenas a parte das equações que precisarão ser resolvidas.

A simplicidade de um modelo pode ser útil, também, para que ele possa dar informações sobre o comportamento geral das variáveis mesmo sem a implementação numérica. Verificar, por exemplo, que moléculas terão sua concentração aumentada com o aumento de cálcio, é algo que só é possível fazer em modelos com equações pouco complexas.

Pensando nestes casos buscamos na literatura **modelos** que fossem **realistas**, mas com **equações mais simples**. O modelo MK é o mais tradicional dentre os modelos para

produção de ATP e fornece resultados que concordam muito bem com dados experimentais (MAGNUS; KEIZER, 1997). No entanto ele falha no quesito simplicidade. Algumas modificações foram propostas para esse modelo de modo de modo a deixar as equações mais simples. Neste capítulo apresentaremos um desses modelos, o proposto por Bertram ((BERTRAM et al., 2006)). Ele foi o escolhido por ter sido usado em diversos trabalhos posteriores.

O modelo de Bertram não trabalha diretamente com as equações do modelo MK, mas sim com modificações dessas equações propostas por CORTASSA et al.. Sendo assim, o modelo de Cortassa será, também, apresentado de modo breve.

2.1 Modelo MK

Em 1997 MAGNUS; KEIZER publicaram uma série de artigos apresentando um modelo matemático (modelo MK) que descreve a dinâmica de todo o processo de produção de ATP (MAGNUS; KEIZER, 1997; MAGNUS; KEIZER, 1998a; MAGNUS; KEIZER, 1998b). Todas as etapas da produção de ATP descritas no capítulo anterior foram levadas em consideração e incluídas de alguma forma. Este modelo apresenta equações dinâmicas para variáveis citoplasmáticas e mitocondriais que são importantes para a produção de ATP.

As **variáveis mitocondriais** com a dinâmica descrita por este modelo são: diferença de voltagem na membrana interna da mitocôndria (ΔV), concentrações na matriz mitocondrial de cálcio ($[Ca^{2+}]_m$), NADH ($[NADH]_m$) e ADP ($[ADP]_m$).¹

A variação na $[NADH]_m$ ocorre com a sua produção no ciclo do ácido cítrico e consumo na fosforilação oxidativa podendo, portanto, ser descrita pela equação:

$$\frac{d}{dt}[NADH]_m = \gamma(J_{PDH} - J_o) \quad (2.1)$$

onde J_{PDH} é a atividade da piruvato desidrogenase (que, como mencionado em 1.2.2.2, converte piruvato em acetil-CoA e, portanto, indica da taxa com a qual as reações do ciclo do ácido cítrico estão ocorrendo) e J_o é a taxa de transferência de elétrons para a cadeia respiratória (pela oxidação do NADH). $\gamma = 0,001$ é um fator de conversão para que $[NADH]_m$ tenha unidade de mM .

¹Assume-se que a soma $[ATP]_m + [ADP]_m$ é constante, de modo que $[ATP]_m = constante - [ADP]_m$.

A variação de $[ADP]_m$ se deve à sua conversão em ATP na fosforilação oxidativa e ao transporte de ADP do citoplasma para a matriz mitocondrial pelo trocador de ATP/ADP.

$$\frac{d}{dt}[ADP]_m = J_{ANT} - J_{F_1F_0} \quad (2.2)$$

onde J_{ANT} é a atividade do trocador ATP/ADP e $J_{F_1F_0}$ é taxa de atividade da ATP sintetase.

Conforme apresentado na seção 1.2.4, a $[Ca^{2+}]_m$ é um fator importante para determinar a taxa de produção de ATP. Esta concentração depende da atividade de dois transportadores: i. transportador uniporte de cálcio, que transporta Ca^{2+} do citoplasma para a matriz mitocondrial; ii. o trocador de sódio/cálcio que transporta cálcio da matriz mitocondrial para o citoplasma e, concomitantemente, sódio do citoplasma para a matriz mitocondrial.

$$\frac{d_m}{dt}[Ca^{2+}]_m = f_m(J_{uni} - J_{Na^+/Ca^{2+}}) \quad (2.3)$$

onde J_{uni} e $J_{Na^+/Ca^{2+}}$ são as atividades do transportador uniporte de cálcio e do trocador de sódio/cálcio, respectivamente. $f_m = 0,0003$ é a fração de cálcio total livre na matriz.

A diferença de potencial na membrana mitocondrial interna (ΔV) também é alterada ao longo do processo de produção de ATP tendo seu valor afetado pela alteração da concentração de H^+ , Na^+ , Ca^{2+} .

$$C_{mito} \frac{d}{dt} \Delta V = -(-J_{H,res} + J_{H,atp} + J_{ANT} + J_{H,leak} + 2J_{uni} + J_{Na/Ca}) \quad (2.4)$$

onde $J_{H,res}$ é o fluxo de prótons por bombas de prótons na mitocondria da cadeia transportadora de elétrons, $J_{H,atp}$ é o fluxo de prótons através da ATP-sintetase, $J_{H,leak}$ é o fluxo de prótons por difusão pela membrana. C_{mito} é a capacitância da membrana mitocondrial interna.

Há algum tempo havia controvérsias sobre se o trocador de sódio/cálcio altera ΔV . No artigo de MAGNUS; KEIZER ambas as situações foram avaliadas, mas em modelos subsequentes assume-se que este trocador é eletrogênico transportando 1 íon de Ca^{2+} para cada 3 íons de Na^+ . Além disso, diversos estudos experimentais indicam que esta é a estequiometria correta (BAYSAL et al., 1994; JUNG; BAYSAL; BRIERLEY, 1995).

As variáveis citoplasmáticas incluídas no modelo são: concentração citoplasmática

de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), concentração de ADP no citoplasma ($[ADP]_c$) e diferença de potencial na membrana celular (ΔV_c).

O modelo MK é focado na descrição de células beta pancreáticas, de modo que as **variáveis citoplasmáticas** incluídas são apropriadas para este tipo celular e precisam de modificações para outras células. No modelo de Bertram, que será apresentado posteriormente, as variáveis citoplasmáticas são incluídas como parâmetros do modelo e sua dinâmica não é avaliada em detalhes. Durante a análise do modelo MK faremos o mesmo. Sendo assim, para estas variáveis serão apresentadas as equações dinâmicas por completeza, mas os termos presentes nestas equações não serão discutidos de modo detalhado como será feito para as variáveis mitocondriais.

A variação na ΔV_c se deve ao movimento de íons (K^+ e Ca^{2+} , principalmente) através das membranas. O transporte desses íons é feito pelos seguintes transportadores: canal de potássio voltagem dependente (I_{Kdr}) e ativado por ATP ($I_{K,ATP}$), canais de cálcio de inativação rápida ($I_{Ca,f}$) e lenta ($I_{Ca,s}$) e canal de cálcio não seletivo (I_{NS}).

$$C \frac{d\Delta V_c}{dt} = -(I_{Kdr} + I_{K,ATP} + I_{Ca,f} + I_{Ca,s} + I_{NS}) \quad (2.5)$$

A concentração de ADP no citoplasma varia devido ao seu consumo na etapa de glicólise para produção de ATP ($J_{p,gly}$), hidrólise do ATP originando ADP (J_{hyd}) e transporte para a matriz mitocondrial pelo trocador ATP/ADP (J_{ANT}).

$$\frac{d[ADP]_c}{dt} = \gamma_1(-J_{ANT} + J_{hyd} - J_{p,gly}) \quad (2.6)$$

γ_1 é um fator de conversão de unidades.

A concentração citoplasmática de cálcio é alterada pelas correntes de cálcio pela membrana plasmática (I_{NS} , $I_{Ca,f}$ e $I_{Ca,s}$) e pela membrana mitocondrial (J_{uni} e $J_{Na+/Ca^{2+}}$).

$$\frac{d[Ca^{2+}]_c}{dt} = f_m[\alpha(I_{NS} + I_{Ca,f} + I_{Ca,s}) - \gamma_2(J_{uni} - J_{Na+/Ca^{2+}}) - k_{Ca}[Ca^{2+}]_c] \quad (2.7)$$

onde γ_2 e α são fatores de conversão de unidades e f_m é a fração de cálcio livre.

O termo $k_{Ca}[Ca^{2+}]_c$ representa a remoção de cálcio citoplasmático para outros locais,

que não a mitocôndria.

2.2 Modelo de Cortassa

O modelo MK foi, posteriormente, modificado por CORTASSA *et al.* para se adequar a células cardíacas. Este modelo foca na dinâmica mitocondrial e não possui equações dinâmicas para as variáveis citoplasmáticas. Além das 4 equações para variáveis mitocondriais presentes no modelo MK (equações 2.1 - 2.4) Cortassa *et al.* incluíram equações dinâmicas para todas as moléculas produzidas ao longo do ciclo do ácido cítrico. A Figura 12 ilustra os processos fisiológicos descritos pelo modelo de Cortassa.

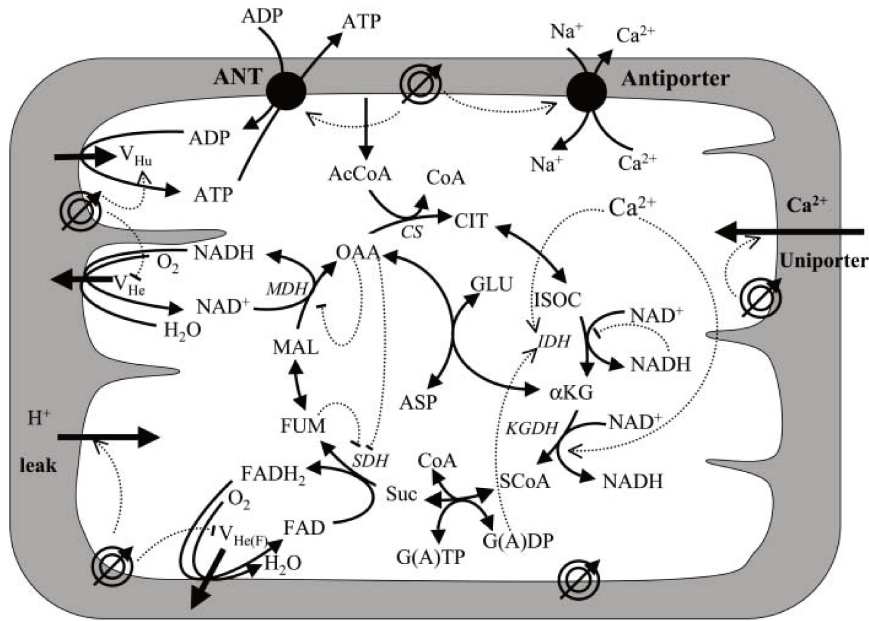


Figura 12: Representação esquemática dos processos eletrofisiológicos e metabólicos relevantes para a produção de ATP de acordo com o modelo de CORTASSA *et al.*.

Fonte: (CORTASSA *et al.*, 2003).

Além de acrescentar variáveis dinâmicas, Cortassa *et al.* efetuaram modificações nas funções presentes nas equações 2.1 - 2.4. Uma descrição dessas modificações nas funções será dada na seção 2.4.

O modelo de Cortassa é ainda mais completo que o MK mas apresenta um número de variáveis dinâmicas elevado e funções que não são mais simples que as do modelo de MK.

2.3 Modelo de Bertram

Novas modificações do modelo MK foram, mais tarde, propostas por BERTRAM et al. com o intuito de torná-lo **mais simples**. As equações dinâmicas deste modelo são as mesmas usadas para variáveis mitocondriais no modelo de MAGNUS; KEIZER. A concentração citoplasmática de cálcio e de frutose bifosfato (produzida durante a glicólise, ver Figura 4) são tomadas como *input's* enquanto o ATP produzido é o *output* do sistema de equações (Figura 13).

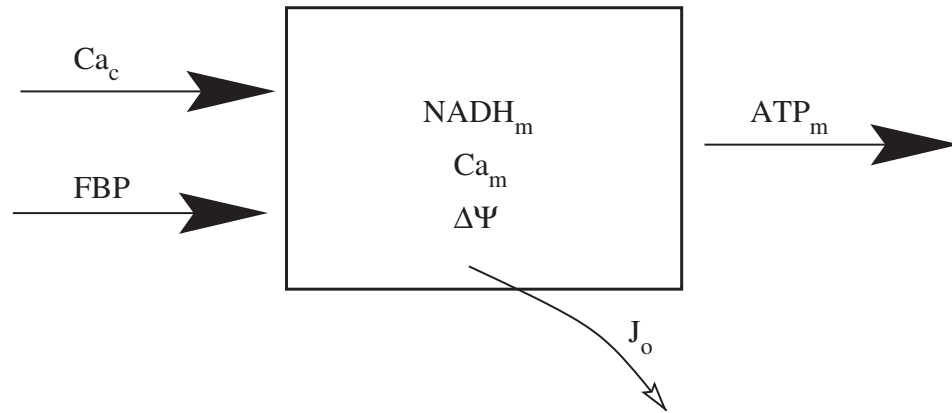


Figura 13: Ilustração dos *inputs* e *outputs* do modelo de BERTRAM et al..

Fonte: (BERTRAM et al., 2006).

Este modelo é mais simples e fácil de se interpretar, que o modelo MK. No entanto ainda não havia sido feita uma análise quando à equivalência entre este modelo e o MK. Isto é o que será feito na seção e capítulo seguintes.

2.4 Funções presentes nas equações dinâmicas

Para avaliar se as simplificações propostas por Bertram originaram um modelo com os mesmos resultados que o modelo MK, foram comparadas, para os 3 modelos, as funções presentes nas equações 2.1 - 2.4. O modelo de Cortassa foi avaliado, também, pois Bertram baseou-se nele para obter suas equações simplificadas.

A seguir será descrito cada um desses termos presentes nas equações dinâmicas (equações 2.1 - 2.4) para as variáveis mitocondriais. Apenas estas equações serão avaliadas pois são as únicas presentes nos 3 modelos. Além disso, são as únicas equações dinâmicas do modelo de Bertram, que é o foco do trabalho.

Nestes modelos a etapa citoplasmática é tratada de modo simplificado, sendo que todos se preocupam, essencialmente, com a taxa de disponibilização de acetil CoA para o ciclo do ácido cítrico. Sendo assim, a descrição das funções se iniciará por esta etapa do ciclo.

2.4.1 Atividade do ciclo do ácido cítrico

2.4.1.1 Piruvato desidrogenase

Conforme descrito no capítulo anterior, o piruvato, ao chegar na matriz mitocondrial, é convertido em acetil CoA pelo complexo PDH. A atividade desta enzima depende da disponibilidade de substrato (piruvato, que depende da taxa de glicólise no citoplasma), da concentração de seus agonistas/antagonistas (cálcio e magnésio) e do seu estado de fosforilação (que depende da atividade da PDH kinase e PDH fosfatase).

$$\Delta J_{PDH}^{MK} = f([Glc])\Delta J_{gly,total}(V_{PDH}/\gamma_2) \quad (2.8)$$

onde $V_{PDH} = 77\mu M/s$ e $\gamma_2 = 0,1$ é a razão de volumes entre a mitocôndria e o citosol, $\Delta J_{gly,total}$ representa a taxa de glicólise e $f([Glc])$ a dependência com a concentração de glicose (que afeta estado de fosforilação da PDH).

No modelo de MK a glicólise é tratada como proporcional à atividade da glucoqui-

nase, cuja atividade, determinada empiricamente, é:

$$\Delta J_{gly,total} = \frac{\beta_{max}(1 + \beta_1[Glc])[Glc][ATP]_c}{1 + \beta_3[ATP]_c + (1 + \beta_4[ATP]_c)} \cdot \beta_5[Glc] + (1 + \beta_6[ATP]_c)\beta_7[Glc]^2 \quad (2.9)$$

onde β_i são parâmetros determinados experimentalmente, $[Glc]$ é a concentração citoplasmática de glicose.

Neste mesmo modelo, levando-se em conta a dependência da PDH kinase e fosfatase os autores obtiveram que a dependência em relação à concentração de glicose é dada por:

$$f([Glc]) = f_{PDH} = \frac{1}{1 + u_2 \left\{ \left[1 + u_1 \cdot \left(1 + \frac{C_{am}}{K_{Ca}} \right)^{-2} \right] \cdot \left(\frac{NADH_m}{NAD_m} + K_{PDH,total} \right) \right\}} \quad (2.10)$$

onde $u_1 = 1, 5$, $u_2 = 1, 0$, $K_{Ca} = 0, 05\mu M$ e $K_{PDH} = 1$

No modelo de Bertram *et al* usa-se a taxa de reação da GPDH como indicativo do nível de glicólise total.

$$\Delta J_{gly,total} = J_{GPDH} = k_{GPDH} \sqrt{[FBP]/1\mu M} \quad (2.11)$$

onde k_{GPDH} é uma constante e $[FBP]$ é a concentração de frutose bi-fosfato.

De acordo com Bertram esta equação foi modificada por Cortassa para incluir dependência em relação ao NADH. No entanto no artigo de Cortassa em questão o modelo inicia-se no ciclo do ácido cítrico e, embora a concentração de acetil-CoA esteja presente nas equações referentes às atividades de diversas enzimas do ciclo, não há nenhuma descrição sobre a taxa de produção de acetil-CoA. Em outras palavras, tal modificação não foi encontrada no artigo de Cortassa citado.

No artigo de Bertram a equação 2.10 foi transcrita como:

$$f([Glc]) = f_{PDH} = \frac{1}{1 + u_2 \left\{ \left[1 + u_1 \cdot \left(1 + \frac{C_{am}}{K_{Ca}} \right)^{-2} \right] / \left(\frac{NADH_m}{NAD_m} + K_{PDH,total} \right) \right\}} \quad (2.12)$$

Neste caso acreditamos que se trate apenas de um erro de digitação pois, conforme pode ser visto na Figura 14, a função presente no modelo de MK e a transcrita para o modelo de Bertram tem um comportamento distinto, mas, como será apresentado a seguir, a versão simplificada proposta por Bertram concorda com o modelo MK.

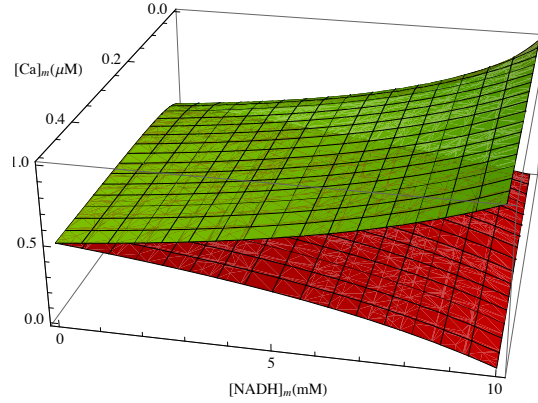


Figura 14: Comparação entre a função $f([Glc])$ do artigo de MK (vermelho) e a versão apresentada no modelo de Bertram (verde).

A versão simplificada proposta por Bertram encontra-se abaixo. Nesta equação Bertram apenas buscou uma expressão mais simples para a dependência em relação ao cálcio e que estivesse de acordo com a equação não simplificada.

$$J_{PDH}^{Bertram} = \left(\frac{p_1}{p_2 + \frac{NADH_m}{NAD_m}} \right) \left(\frac{Ca_m}{p_3 + Ca_m} \right) J_{GPDH} \quad (2.13)$$

No modelo de Bertram *et al* usa-se a taxa de reação da GPDH como indicativo do nível de glicólise total.

$$\Delta J_{gly,total} = J_{GPDH} = k_{GPDH} \sqrt{FBP/1\mu M} \quad (2.14)$$

onde k_{GPDH} é uma constante e $[FBP]$ é a concentração de frutose bi-fosfato.

No modelo de Cortassa o ciclo do ácido cítrico é modelado detalhadamente, levando-se em conta a dinâmica de todas as moléculas produzidas e consumidas neste processo (CORTASSA et al., 2003). Como o objetivo final do trabalho era obter um modelo simples para descrever a produção de ATP, este tratamento de Cortassa não foi incluído no nosso modelo e, portanto, não será incluído aqui. Ressaltamos que esta modificação proposta por Cortassa

é benéfica no sentido de fornecer uma descrição mais detalhada, mas torna o modelo mais complexo, indo contra os nossos objetivos. Além disso, como o modelo de MK tem sido bem sucedido em descrever a fisiologia do problema, nos pareceu desnecessário incluir esta complicação adicional. Sendo assim, nos resultados apresentados no próximo capítulo para o modelo de Cortassa, a etapa relacionada à atividade do ácido cítrico faz uso da função presente no modelo MK. Justificamos este procedimento lembrando que no artigo de Bertram este foi o caminho seguido e são as respostas deste artigo que desejamos comparar com as do modelo MK.

A Figura 15-A mostra a superfície de resposta da função J_{PDH} do modelo de Bertram e do modelo MK (valor dessa função para diversos valores de $[Ca]_m$ e $[NADH]_m$). Verifica-se que há uma boa concordância entre elas, mostrando que as modificações feitas por Bertram parecem permitir uma boa reprodução do comportamento dessa função. Nesta figura (15-B) também se observa as curvas presentes no artigo de Bertram mostrando a resposta da J_{PDH} a essas mesmas variáveis. Nestas curvas também é possível ver a boa concordância entre as funções dos dois modelos.

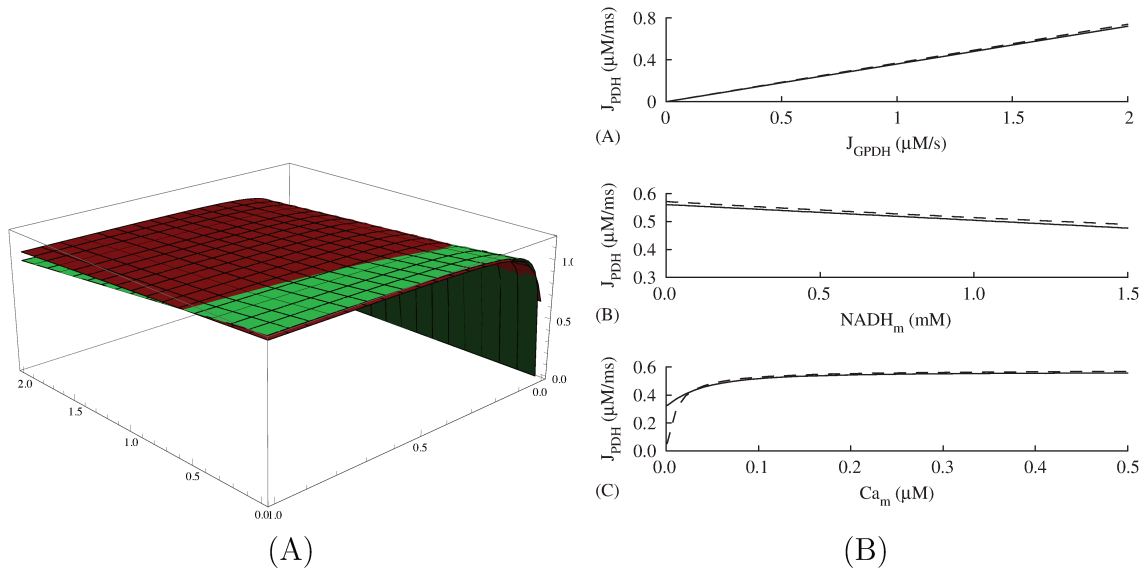
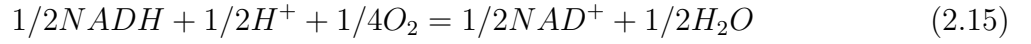


Figura 15: Comportamento da função J_{PDH} (taxa de atuação do ciclo do ácido cítrico) de acordo com o valor de $[Ca]_m$ e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.2 Bomba de prótons - Complexo I a IV

No ciclo do ácido cítrico são produzidos $NADH$ e $FADH_2$ os quais são, então, oxidados nos complexos I a IV. A oxidação do $NADH$ pode ser descrita pela seguinte equação:



A energia liberada por essa reação é armazenada na forma de um gradiente de prótons (ΔpH e ΔV) na membrana interna mitocondrial.

A modelagem deste processo foi feita (nos três modelos) avaliando-se a taxa de consumo de oxigênio na oxidação e o fluxo de prótons através da membrana para originar o gradiente de prótons.

2.4.2.1 Taxa de consumo de oxigênio

Magnus e Keizer partiram do modelo para funcionamento das regiões de redução (de $NADH$) proposto por PIETROBON; CAPLAN em 1985. No modelo MK assumiu-se que a concentração total de NAD era constante ($NAD_m + NADH_m = 8nmol/mgproteina$). A equação derivada do esquema de funcionamento das regiões de redução apresentavam mais de 100 termos. Por manipulações algébricas e substituições numéricas (não apresentadas no artigo), Magnus e Keizer verificaram que era possível obter uma equação mais simples que apresentava 10% de acurácia em relação às equações originais. A equação simplificada encontra-se abaixo:

$$J_O^{MK} = 0,5\rho_{res} \frac{(r_a + r_{cl}e^{(6RTF\Delta V_B)})e^{(FRTA_{res})} - r_a e^{(g6RTF\Delta\mu_H)} + r_{c2}e^{(FRTA_{res})}e^{(g6RTF\Delta\mu_H)}}{(1 + r_1e^{(RTFA_{res})})e^{(6RTF\Delta V_B)} + (r_2 + r_3e^{(RTFA_{res})})e^{(g6RTF\Delta\mu_H)}} \quad (2.16)$$

onde FRT , $g6$ e r_i são constantes, $\Delta\mu = \Delta V_m$, para o modelo MK e A_{res} é a afinidade da região de oxidação pelo $NADH$:

$$A_{res} = \frac{RT}{F} \ln \left(K_{res} \sqrt{\frac{NADH_m}{NAD_m}} \right) \quad (2.17)$$

A versão de Cortassa é a mesma com a única alteração sendo que $\Delta\mu$ corresponde ao

potencial químico ($\Delta\mu = \Delta V + \Delta pH/FRT$). A equação acima foi simplificada por Bertram *et al*, desprezando-se termos ”pequenos”, e se assemelha a um modelo alostérico:

$$J_o^{Bertram} = \left(\frac{p_4 NADH_m}{p_5 + NADH_m} \right) \left(\frac{1}{1 + \exp((\Delta V - p_6)/p_7)} \right) \quad (2.18)$$

Nesta expressão desprezou-se, também, a influência do pH, o que é aceitável, uma vez que o termo $RTpH/F$ é da ordem de 15mV e ΔV_m varia aproximadamente entre 120 e 180mV. Além disso, uma alteração do pH leva a alterações de voltagem e, dessa forma, continua afetando (mesmo que indiretamente) a taxa de oxidação.

A Figura 16-A mostra o comportamento da função J_o de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. A concordância não é muito boa na maior parte da região avaliada. Além disso algo curioso foi observado. Nas curvas presentes nesta figura (16-B) o valor escolhido (por Bertram) para ΔV_m ao se plotar a dependência de J_o com $[NADH]_m$ foi 160mV, que corresponde à região onde as duas superfícies se interceptam. Bertram parece ter ajustado as suas funções a partir do comportamento gráfico das funções do modelo MK observando a dependência com cada uma das variáveis em separado. É possível que ao olhar apenas para as funções Bertram não tenha sido capaz de avaliar de modo adequado o comportamento dessa função. Com isso, o modelo de Bertram pode não conseguir reproduzir o MK adequadamente (e, de fato, é o que acontece, como será mostrado no próximo capítulo).

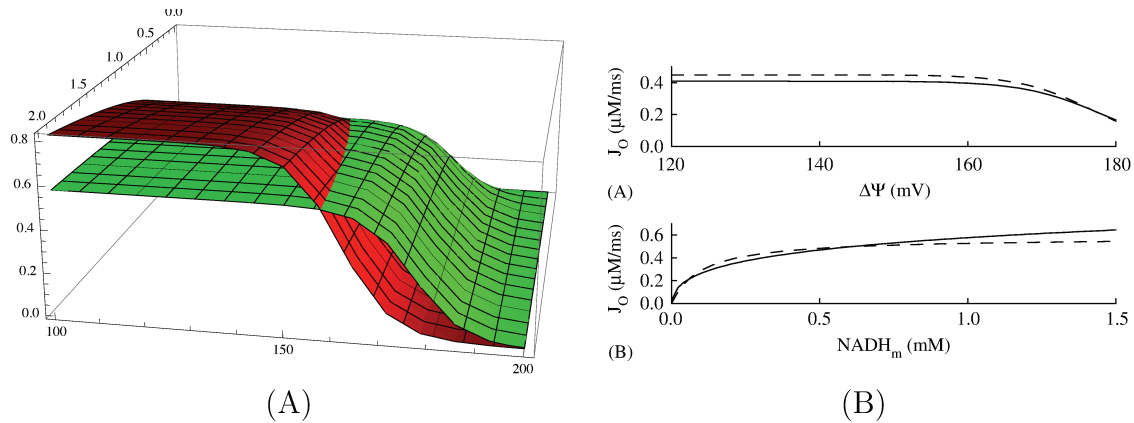


Figura 16: Comportamento da função J_o (taxa de consumo de oxigênio - oxidação de NADH) de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM *et al.*, Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.2.2 Fluxo de prótons devido à respiração

A bomba de prótons usa energia livre de elétrons doados por $FADH_2$ e $NADH$ para criar um gradiente de prótons. A expressão de MK, novamente, foi obtida simplificando-se expressões geradas ao trabalhar com o modelo de funcionamento das regiões que oxidam NADH.

$$J_{H,bomba}^{MK} = 6\rho_{res} \frac{(r_a e^{(FRTA_{res})} - (r_a + r_b) e^{(g6RTF\Delta\mu_H)})}{(1 + r_1 e^{(RTFA_{res})}) e^{(6RTF\Delta V_B)} + (r_2 + r_3 e^{(RTFA_{res})}) e^{(g6RTF\Delta\mu_H)}} \quad (2.19)$$

Novamente na versão de MK $\Delta\mu = \Delta V$ e na de Cortassa $\Delta\mu = \Delta V + \Delta pH/FRT$.

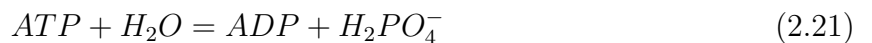
A versão simplificada de Bertram, tem a mesma forma que a equação 2.19, com parâmetros diferentes, ajustados para essa função:

$$J_{H,bomba}^{Bertram} = \left(\frac{p_8 NADH_m}{p_9 + NADH_m} \right) \left(\frac{1}{1 + \exp((\Delta V - p_{10})/p_{11})} \right) \quad (2.20)$$

A Figura 17-A mostra o comportamento da função $J_{H,bomba}$ de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. Novamente, a concordância não é muito boa na maior parte da região avaliada. Como para a J_o , nas curvas presentes nesta figura (17-B) o valor escolhido (por Bertram) para ΔV_m ao se plotar a dependência de $J_{H,bomba}$ com $[NADH]_m$ foi $160mV$, que corresponde à região onde as duas superfícies se interceptam. Isso indica, novamente, que Bertram parece ter ajustado as suas funções a partir do comportamento gráfico das funções do modelo MK observando a dependência com cada uma das variáveis em separado.

2.4.3 F1F0-ATPase

A medida que os gradiente de prótons vai aumentando estes tendem a retornar para a matriz mitocondrial. Esse retorno ocorre principalmente pela F1F0-ATPase, a qual usa a energia que estava armazenada no gradiente para catalizar a conversão de ADP em ATP:



A modelagem desse processo foi feita dividindo-o em três estágios: i. fluxo de prótons

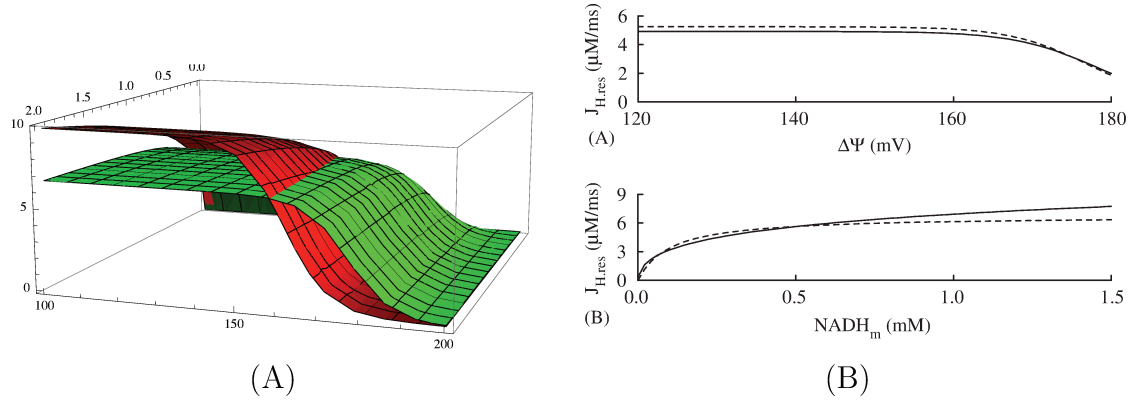


Figura 17: Comportamento da função J_{Hbomba} (taxa de ejeção de prótons pela bomba de prótons) de acordo com o valor de ΔV_m e $[NADH]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

pela ATP sintetase; ii. atividade da ATP-sintetase resultante do fluxo desses prótons e iii. difusão dos prótons pela membrana mitocondrial interna.

2.4.3.1 Fluxo de prótons pela ATP-sintetase

O fluxo de prótons pela ATPase foi modelado por MK da mesma forma que a taxa de consumo de oxigênio. A expressão foi modificada por Cortassa para incluir uma dependência com pH (ΔV foi substituído por $\Delta\mu = \Delta V + RT\Delta pH/F$), e permitir reversibilidade do processo.

$$J_{H,ATPase}^{MK} = -3\rho_{F1} \frac{10^2 p_a (1 + e^{(A_{F1} RT F)}) - (p_a + p_b) e^{(3 RT F \Delta\mu_H)}}{(1 + p_1 e^{(RT F A_{F1})}) e^{(3 RT F \Delta V_B)} + (p_2 + p_3 e^{(RT F A_{F1})}) e^{(3 RT F \Delta\mu_H)}} \quad (2.22)$$

onde:

$$A_{F1} = \frac{RT}{F} \ln \left(K_{F1} \frac{ATP_m}{ADP_m P_i} \right) \quad (2.23)$$

No modelo de MK $\Delta\mu = \Delta V$ e no de Cortassa $\Delta\mu = \Delta V + \Delta pH / FRT$.

A expressão simplificada é semelhante à obtida nas seções anteriores.

$$J_{H,atp}^{Bertram} = \left(\frac{p_{13}}{p_{13} + ATP_m} \right) \left(\frac{p_{12}}{1 + e^{((p_{14} - \Delta V)/p_{15})}} \right) \quad (2.24)$$

A Figura 18-A mostra o comportamento da função $J_{H,atp}$ de acordo com o valor de ΔV_m e $[ATP]_m$. Há uma boa concordância em uma grande região, mas não em todos os possíveis valores fisiológicos das variáveis. Essa não concordância não foi observada por Bertram (Figura 18-B) pois os valores de ΔV_m e $[ATP]_m$ avaliados por ele não atingiam essa região.

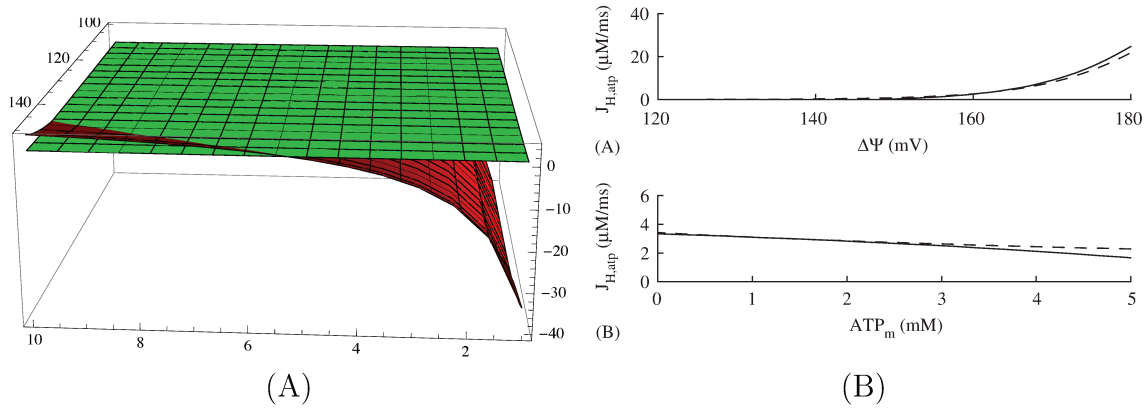


Figura 18: Comportamento da função J_{HATP} (taxa de passagem de prótons pela ATP-sintetase) de acordo com o valor de ΔV_m e $[ATP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.3.2 Atividade da F1F0-ATP-sintetase

A taxa de atividade da FiFo-ATP-sintetase foi modificada por Cortassa a partir do modelo de MK para incluir a possibilidade de reversibilidade. Foi substituído ΔV por $\Delta\mu_H = \Delta V + \Delta pH/FRT$, definido abaixo, o qual inclui uma dependência no pH.

$$J_{F1F0}^{MK} = -\rho_{F1} \frac{(10^2 p_a + p_{cl} e^{(3RTF\Delta V_B)}) e^{(A_{F1} RTF)} - (p_a e^{(3RTF\Delta\mu_H)} + p_{c2} e^{(A_{F1} RTF)} e^{(3RTF\Delta\mu_H)})}{(1 + p_1 e^{(RTFA_{F1})}) e^{(3RTF\Delta V_B)} + (p_2 + p_3 e^{(RTFA_{F1})}) e^{(3RTF\Delta\mu_H)}} \quad (2.25)$$

A expressão simplificada proposta por Bertram é um múltiplo da equação para o

fluxo de prótons (equação 2.24):

$$J_{F_1F_0}^{Bertram} = \left(\frac{p_{13}}{p_{13} + ATP_m} \right) \left(\frac{p_{16}}{1 + e^{((p_{14} - \Delta V)/p_{15})}} \right) \quad (2.26)$$

Novamente, aqui, a equação de Bertram para o fluxo de prótons foi uma boa aproximação para as equações de MK para uma grande região, conforme pode ser visto na Figura 19-A). A região de não concordância não foi observada por Bertram pois este não avaliou ΔV_m e $[ATP]_m$ para todo o intervalo de valores fisiologicamente possíveis.

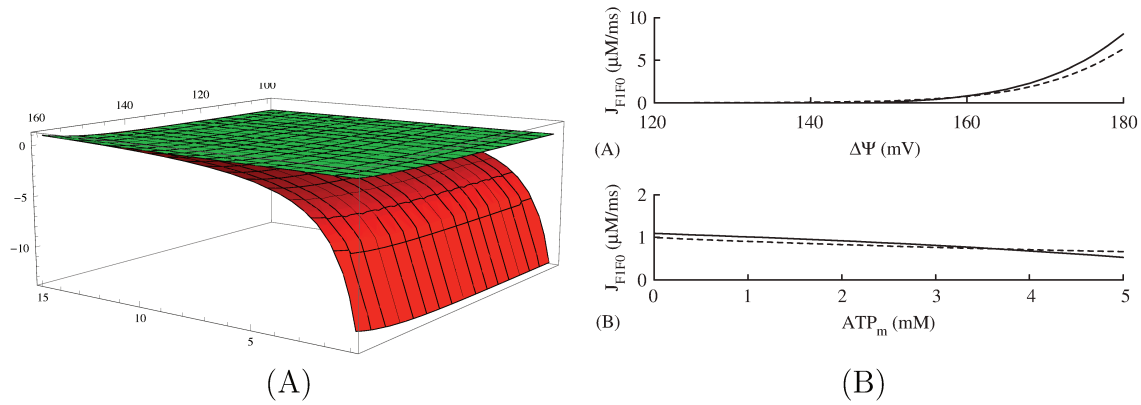


Figura 19: Comportamento da função $J_{F_1F_0}$ (taxa de produção de ATP pela bomba de prótons) de acordo com o valor de ΔV_m e $[ATP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.3.3 Leak de prótons

Expressão original de Magnus e Keizer (que corresponde, também, à de Cortassa) é:

$$J_{H,leak}^{MK} = g_H \Delta \mu_H \quad (2.27)$$

onde $g_H = 2.10^{-3} \mu M.ms^{-1}.mV^{-1}$ e $\Delta \mu_H = \Delta V + \Delta pH/FRT$.

A versão de Bertram não inclui dependência com pH.

$$J_{H,leak}^{Bertram} = p_{17} \Delta V + p_{18} \quad (2.28)$$

Conforme mencionado anteriormente, isso é razoável pois o segundo termo na equação acima é da ordem de $15mV$ enquanto ΔV varia entre 120 e $180mV$. Além disso, o fluxo de prótons (que origina a variação de ΔpH) também origina uma alteração no ΔV .

2.4.4 Transportador de ATP/ADP (J_{ANT})

Na seção anterior foi modelado a taxa de produção de ATP. Uma vez produzido, este é transportado para o citoplasma pelo trocador de ATP/ADP, presente na membrana interna mitocondrial. O modelo para a atividade deste transportador será apresentada a seguir:

2.4.4.1 Trocador de ATP/ADP

No modelo de MK a atividade do trocador de ATP/ADP é descrita por:

$$J_{ANT}^{MK} = V_{max,ANT} \frac{1 - 0,8 \frac{ATP_c}{ADP_c} \frac{ADP_m}{ATP_m} e^{-F\Delta V/RT}}{\left[1 + 0,11 \frac{ATP_c}{ADP_c} e^{-0,5F\Delta V/RT}\right] \left[1 + 7,3 \frac{ADP_m}{ATP_m}\right]} \quad (2.29)$$

Esta equação se baseia no mecanismo de funcionamento do trocador proposto por BOHNENSACK. Aqui $e^{-F\Delta V/RT}$ atua como a constante de Michaelis da reação (MAGNUS; KEIZER, 1997).

A equação do modelo MK apresentada no artigo de MAGNUS; KEIZER, CORTASSA et al. e no de Bertram **são diferentes entre si**, mas em princípio, deveriam ser iguais. Ressaltamos que se trata da **mesma equação** e não de uma versão modificada proposta por Cortassa ou por Bertram.

A versão desta equação presente no artigo de Cortassa é:

$$J_{ANT}^{MK-Cortassa} = V_{max,ANT} \frac{1 - 0,8 \frac{ATP_c}{ADP_c} \frac{ADP_m}{ATP_m}}{\left[1 + 0,11 \frac{ATP_c}{ADP_c} e^{-0,5F\Delta V/RT}\right] \left[1 + 7,3 \frac{ADP_m}{ATP_m}\right]} \quad (2.30)$$

Já a versão presente no artigo de Bertram é:

$$J_{ANT}^{MK-Bertram} = V_{max,ANT} \frac{\frac{ATP_c}{ADP_c} - 0,8 \frac{ATP_m}{ADP_m}}{\left[1 + 0,11 \frac{ATP_c}{ADP_c}\right] e^{-0,5F\Delta V/RT} \left[\frac{ATP_m}{ADP_m} + 7,2\right]} \quad (2.31)$$

A superfície de resposta destas funções a valores da razão $[ATP]_m/[ADP]_m$ (considerando que $[ATP]_m/[ADP]_m = [ATP]_c/[ADP]_c$) e da voltagem ΔV_m se encontra na Figura 20. Nesta figura verifica-se que a resposta de cada função é consideravelmente distinta das demais.

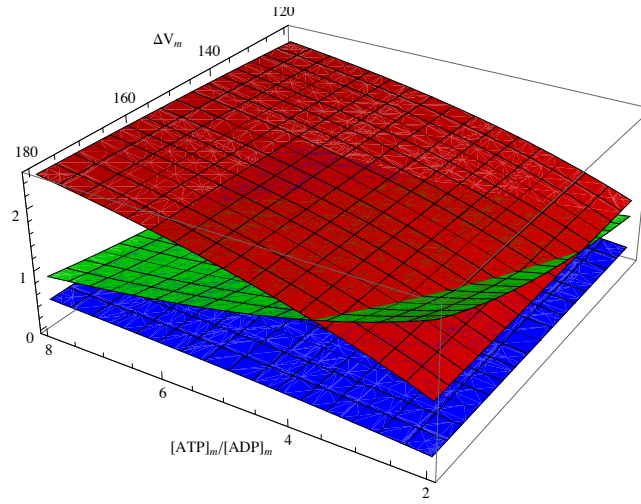


Figura 20: Resposta da função J_{ANT} do modelo MK tal como apresentada no artigo de MK (J_{ANT}^{MK} - vermelho), de Cortassa ($J_{ANT}^{MK-Cortassa}$ - azul) e de Bertram ($J_{ANT}^{MK-Bertram}$ - verde) em relação a razão $[ATP]_m/[ADP]_m$ e da voltagem ΔV_m

É estranho essa não concordância entre as equações e, em princípio, supusemos que ocorreram erros de transcrição da equação. O problema é que a versão errada da equação pode ter sido usada nos modelos de Bertram e Cortassa e, com isso, os resultados obtidos, mesmo qualitativamente, podem não ser válidos. Uma análise do impacto dessas mudanças para o comportamento geral do modelo será feito no próximo capítulo.

A equação simplificada não inclui a dependência na concentração de ADP e ATP citoplasmático. Como o transportador mantém as razões $\frac{ADP}{ATP}$ constante, Bertram assume que $\frac{ATP_m}{ADP_m} = \frac{ATP_c}{ADP_c}$. Também foi substituída a dependência na ATP/ADP por uma forma

funcional mais simples.

$$J_{ANT}^{Bertram} = p_{19} \left(\frac{\frac{ATP_m}{ADP_m}}{\frac{ATP_m}{ADP_m} + p_{20}} \right) e^{0.5FRT\Delta V} \quad (2.32)$$

No modelo de MK a concentração de ADP mitocondrial e citoplasmático foi tratada separadamente, inclusive levando-se em conta mecanismos de consumo de ATP no citoplasma, o que não foi feito por Bertram.

Como o trocador ADP/ATP não efetua um transporte ativo e não é eletrogênico (ou seja, atua de modo a tentar igualar as razões ATP/ADP na mitocondria e no citosol), é razoável supor que estas razões sejam aproximadamente as mesmas (ao menos por intervalos curtos de tempo onde metabolismo de AMP, que pode ser convertida em ADP e ATP, possa ser desconsiderado). Mas deve-se tomar um cuidado: da mesma forma que a taxa de produção de ATP na mitocondria influencia a atividade do trocador, o consumo/produção de ATP no citoplasma também a afeta. Dessa forma, sim, pode-se tomar apenas a razão ATP/ADP mitocondrial, mas desde que se note que esta razão não é dependente apenas em variáveis mitocondriais.

Note que dizer que as razões ATP/ADP ficarão sempre iguais acompanhado da hipótese que $ATP + ADP = constante$ tanto na mitocondria como no citoplasma excuiria a influência em separado de $[ADP]_m$ e $[ADP]_c$ na atividade da bomba. Se apenas a variação do ATP mitocondrial for usada, está se assumindo, indiretamente, que a ação do transportador ATP/ADP depende quase exclusivamente da taxa de produção de ATP. É evidente que a validade dessas hipóteses simplificadoras só pode ser realmente verificada ao fazer uma análise mais global do modelo.

Um problema que tanto as modificações de Bertram apresentam é que a reversibilidade do transportador ATP/ADP é perdida. Como essas equações só possuem termos positivos J_{ANT} será sempre positivo. Assim, de acordo com essas equações, ocorrerá apenas o transporte de ATP mitocondrial para o citoplasma e ADP citoplasmático para a mitocondria e nunca o reverso.

Como havia três versões da função J_{ANT} do modelo MK, avaliamos a superfície resposta da versão simplificada de Bertram com as três versões (Figura 21).

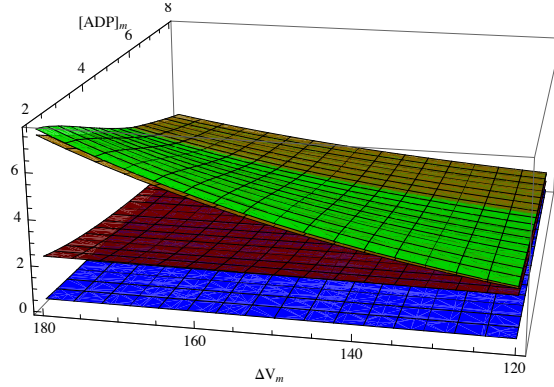


Figura 21: Resposta da versão simplificada de Bertram para a função J_{ANT} ($J_{Bertram}$ - laranja) e desta função tal qual apresentada no artigo de de MK (J_{ANT}^{MK} - vermelho), de Cortassa ($J_{ANT}^{MK-Cortassa}$ - azul) e de Bertram ($J_{ANT}^{MK-Bertram}$ - verde) em relação a concentração $[ADP]_m$ e da voltagem ΔV_m

Nota-se que a versão simplificada de Bertram concorda com a versão da função J_{ANT} apresentada em seu artigo. Isso pode ser um problema, pois não se apresentou uma boa justificativa para a alteração dessa função ao longo dos artigos, sendo que essas alterações parecem ser resultantes apenas de erros de transcrição. Uma análise do comportamento geral do modelo de Bertram será apresentada no próximo capítulo.

A Figura 22-A mostra a comparação da função J_{ANT} do modelo MK e do modelo de Cortassa. Nesta verifica-se, novamente, uma não concordância entre as duas versões. Já na Figura 22-B, do artigo de Bertram, as curvas apresentadas são quase coincidentes. Isso parece confirmar que Bertram usou $J_{ANT}^{MK-Bertram}$ como base para obter sua versão simplificada.

2.4.5 Transportadores de cálcio

Conforme mencionado no capítulo anterior, o cálcio é importante para controlar a taxa de produção de ATP. Sendo assim, é importante descrever a dinâmica da concentração de cálcio na matriz mitocondrial. Para isso é necessário conhecer a atividade de dois transportadores: o transportador uniporte de cálcio e o trocador de Ca/Na.

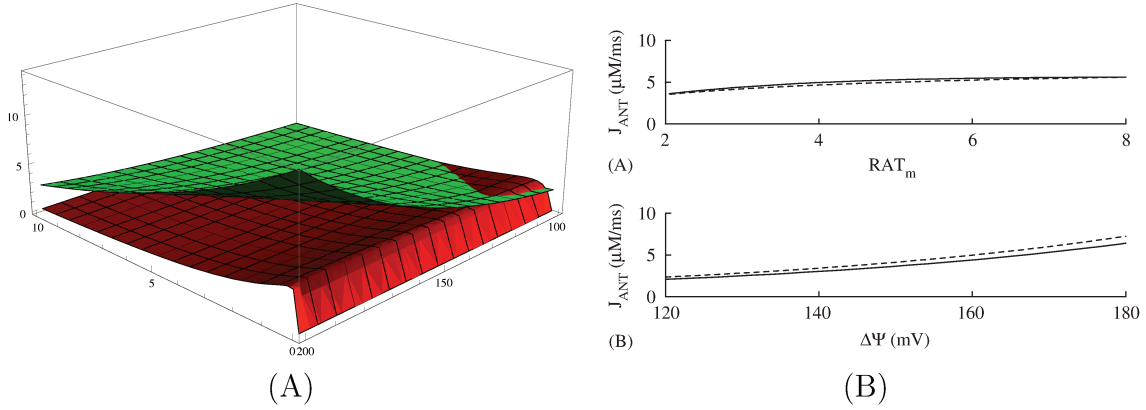


Figura 22: Comportamento da função J_{ant} (trocaador de ATP/ADP) de acordo com o valor de ΔV_m e $RAT_m = [ATP]_m/[ADP]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.5.1 Transportador uniporte de cálcio

A equação para a atividade do transportador uniporte de cálcio no modelo MK leva em conta um modelo alostérico detalhado desse transportador e é dada por:

$$J_{uni}^{MK} = V_{max,uni} \left[\frac{2FRT(\Delta V_m - \Delta V_0) \frac{Ca_c}{K_{trans}} \left(1 + \frac{Ca_c}{K_{trans}}\right)^3}{\left[\left(1 + \frac{Ca_c}{K_{trans}}\right)^4 + \frac{L}{(1+Ca_c/K_{act})^{n_a}} \right] (1 - e^{-2FRT(\Delta V_m - \Delta V_0)})} \right] \quad (2.33)$$

Esta expressão parece ter sido **incorretamente transcrita** para o artigo de Cortassa e deste para o artigo de Bertam. A versão encontrada nesses artigos encontra-se abaixo:

$$J_{uni}^{Cortassa} = V_{max,uni} \left[\frac{2FRT(\Delta V_m - \Delta V_0) \frac{Ca_c}{K_{trans}} \left(1 + \frac{Ca_c}{K_{trans}}\right)^3}{\left(1 + \frac{Ca_c}{K_{trans}}\right)^4 + \frac{L}{(1+Ca_c/K_{act})^{n_a}} (1 - e^{-2FRT(\Delta V_m - \Delta V_0)})} \right] \quad (2.34)$$

Como o primeiro termo do denominador da equação 2.33 é bastante pequeno em relação ao segundo, essa alteração pode não ter afetado muito a resposta do transportador em relação ao cálcio e ΔV .

A expressão simplificada proposta por Bertram é:

$$J_{uni}^{Bertram} = (p_{21}\Delta V - p_{22})Ca_c^2 \quad (2.35)$$

Esta equação funciona bem em alguns intervalos de $[Ca_c]$ e ΔV , mas há valores ainda fisiológicos em que ela deixa de reproduzir as equações de MK (Figura 23-A). Estes valores não foram incluídos na avaliação de Bertram (Figura 23-B).

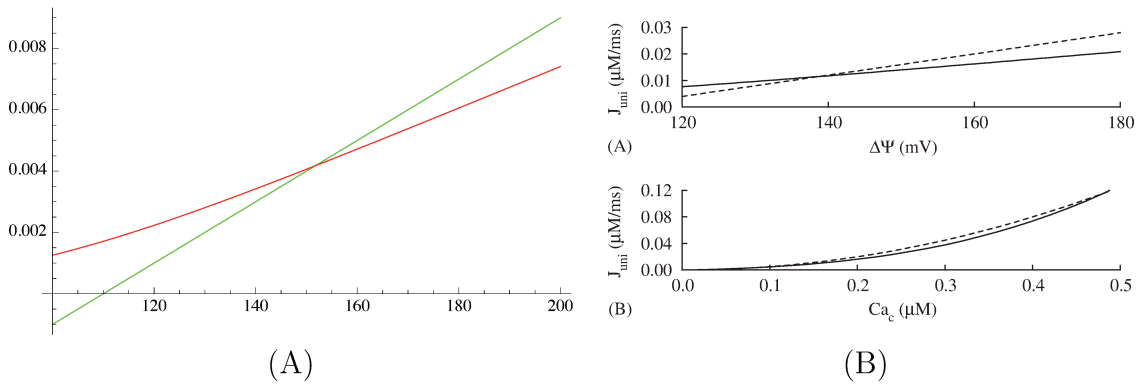


Figura 23: Comportamento da função J_{uni} (transportador uniporte de cálcio) de acordo com o valor de ΔV_m . (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.5.2 Trocador Na/Ca

A equação do modelo MK para a taxa de atividade do trocador de Na/Ca é:

$$J_{NaCa}^{MK} = V_{max} \frac{e^{\frac{bF(\Delta V - \Delta V_B)}{RT}}}{\left(1 + \frac{K_{Na}}{[Na]_c}\right)^3 \left(1 + \frac{K_{Ca}}{[Ca]_m}\right)} \quad (2.36)$$

As expressões originais de MK foram reformuladas por Cortassa para incluir a influencia do cálcio mitocondrial, obtendo-se:

$$J_{NaCa}^{Cortassa} = V_{max} \frac{\left(\frac{[Ca]_c}{[Ca]_m}\right) e^{bFRT(\Delta V - \Delta V^0)}}{\left(1 + \frac{K_{Na}}{[Na]_c}\right)^3 \left(1 + \frac{K_{Ca}}{[Ca]_m}\right)} \quad (2.37)$$

onde $Na_c = 10mM$, $K_{Na} = 9.4mM$ e $K_{Ca} = 3.75 \cdot 10^{-4}mM$.

Já a versão da equação de Cortassa apresentada no artigo de Bertram é:

$$J_{NaCa}^{Cortassa-Bertram} = V_{max} \frac{\left(\frac{[Ca]_m}{[Ca]_c}\right) e^{bFRT(\Delta V - \Delta V^0)}}{\left(1 + \frac{K_{Na}}{[Na]_c}\right)^3 \left(1 + \frac{K_{Ca}}{[Ca]_m}\right)} \quad (2.38)$$

Isto é, houve uma inversão entre $[Ca]_m$ e $[Ca]_c$ no numerador. Esta inversão foi mantida na forma simplificada proposta por Bertram:

$$J_{NaCa}^{Bertram} = p_{23} \left(\frac{[Ca]_m}{[Ca]_c}\right) e^{p_{24}\Delta V} \quad (2.39)$$

Nesta assume-se que a concentração de sódio no citoplasma é constante.

A Figura 24 mostra a superfície de resposta das funções J_{NaCa} : a versão simplificada de Bertram para a função ($J_{NaCa}^{Bertram}$) a versão do modelo MK (J_{NaCa}^{MK}) e a do modelo de Cortassa tal qual apresentada no artigo de Cortassa ($J_{NaCa}^{Cortassa}$) e no de Bertram ($J_{NaCa}^{Cortassa-Bertram}$) em relação a concentração $[Ca]_m$ e da voltagem ΔV_m . Nesta figura verifica-se que as quatro funções não concordam entre si.

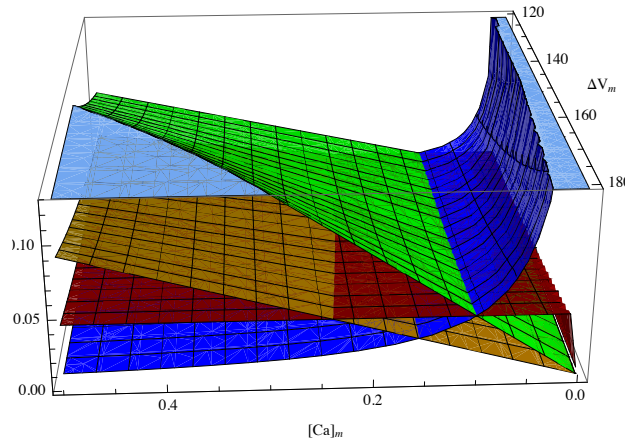


Figura 24: Resposta da versão simplificada de Bertram para a função J_{NaCa} ($J_{NaCa}^{Bertram}$ - laranja) a versão do modelo MK (J_{NaCa}^{MK} - vermelho) e a do modelo de Cortassa tal qual apresentada no artigo de Cortassa ($J_{NaCa}^{Cortassa}$ - azul) e no de Bertram ($J_{NaCa}^{Cortassa-Bertram}$ - verde) em relação a concentração $[Ca]_m$ e da voltagem ΔV_m .

A Figura 25-A mostra a função J_{NaCa} do artigo de MK e de Bertram e a 25-B as

curvas para estas funções apresentadas no artigo de Bertram. Enquanto a Figura 25-B sugere uma boa concordância entre as funções, a 25-A mostra que esse não é o caso. Acreditamos que essas não concordâncias se devam ao fato de Bertram ter se baseado na $J_{NaCa}^{Bertram}$ para obter a sua forma simplificada.

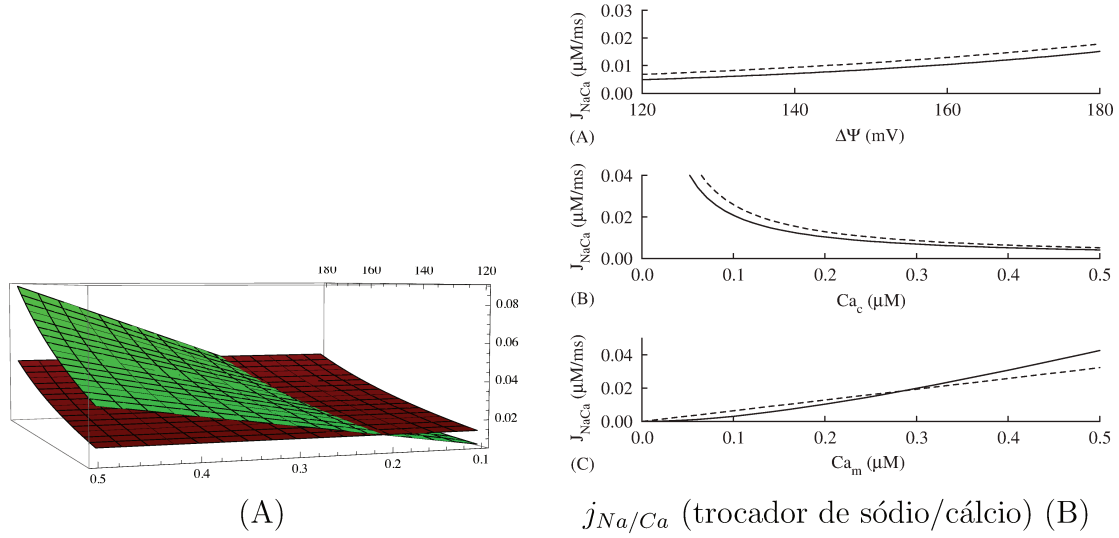


Figura 25: Comportamento da função $j_{Na/Ca}$ (trocador de sódio/cálcio) de acordo com o valor de ΔV_m e $[Ca^{2+}]_m$. (A) Superfície de resposta avaliada usando o *software Mathematica*, Modelo de Bertram em verde e modelo MK em vermelho; (B) Curvas presentes no artigo de BERTRAM et al., Modelo de Bertram corresponde à linha pontilhada e Modelo MK à linha sólida.

2.4.6 Parâmetros presentes nos modelos

Nos três modelos já um conjunto de parâmetros que foram ajustados ou que correspondem a constantes de valor conhecido. As Tabelas 2, 3 e 4, e 5 apresentam os valores desses parâmetros nos modelos de MK, Costassa e Bertram, respectivamente.

Tabela 2: Parâmetros no modelo de MAGNUS; KEIZER.

Parâmetro	Valor	Unidade
ΔpH	-0,400	
T	310	K
g_H	0,200	nmol/min.mV.(mg de proteína)
C_{mito}	1,450E-03	nmol/mV.(mg de proteína)
K_{res}	1,350E+18	
p_{res}	0,400	nmol/(mg de proteína)
r_1	2,077E-18	
r_2	1,728E-09	
r_3	1,059E-26	
r_a	6,394E-10	/s
r_b	1,762E-13	/s
r_{c1}	2,656E-19	/s
r_{c2}	8,632E-27	/s
ΔVB	50,0	mV
g	0,850	ajustado
K_{F1}	1,710E+06	mM
P_i	20,0	mM
p_{F1}	0,7	nmol/(mg de proteína)
p_1	1,346E-08	
p_2	7,739E-07	
p_3	6,650E-15	
p_a	1,656E-05	/s
p_b	3,373E-07	/s
p_{c1}	9,651E-14	/s
p_{c2}	4,845E-19	/s
J_{ANTmax}	1,000	nmol/min.(mg de proteína)
f	0,5	
J_{maxUNI}	300	nmol/min.(mg de proteína)
K_{trans}	19	μM
K_{act}	0,38	μM
n_a	2,8	
L	110	ajustado
ΔV^*	91	mV
$J_{maxNaCa}$	25	nmol/min.(mg de proteína)
b	0	ajustado
K_{Na}	9,4	mM
K_{Ca}	0,003	nmol/(mg de proteína)
$[Na]_c$	30	mM
f_m	0,0003	

Fonte: (MAGNUS; KEIZER, 1997).

Tabela 3: Parâmetros no modelo de CORTASSA et al..

Parâmetro	Valor	Unidade
ΔpH	-0,600	
R	8,315	V.C/mol.K
T	310,16	K
F	96480	C/mol
g_H	0,01	mM/s.V
C_{mito}	1,812	mM/V
K_{res}	1,350E+18	
p_{res}	0,0006-0,05	mM
r_1	2,077E-18	
r_2	1,728E-09	
r_3	1,059E-26	
rc_1	2,656E-19	/s
rc_2	8,632E-27	/s
ΔVB	0,05	V
g	0,85	
[FADH ₂]	1,24	mM
[FAD]	0,01	mM
K_{F1}	1,710E+06	mM
P_i	20,0	mM
p_{F1}	0,06-1,8	mM
p_1	1,346E-08	
p_2	7,739E-07	
p_3	6,650E-15	
p_a	1,656E-05	/s
p_b	3,373E-07	/s
p_{c1}	9,651E-14	/s
p_{c2}	4,845E-19	/s
V_{maxANT}	0,05-24,0	mM/s
h	0,5	
[ADP] _c	0,05-0,2	mM
[ATP] _c	6,5	mM/s
V_{maxUNI}	0,625-1,25	μ M/s
[Ca] _c	2,0E-2 - 1,25	μ M
ΔV^*	0,091	V
K_{trans}	19	μ M
K_{act}	0,38	μ M
n_a	2,8	
L	110	ajustado
$V_{maxNaCa}$	0,005-0,2	mM/s.V

Fonte: (CORTASSA et al., 2003).

Tabela 4: Parâmetros no modelo de CORTASSA et al. (continuação).

Parâmetro	Valor	Unidade
b	0,5	
KNa	9,4	mM/V
KCa	3,75E-04	
[Na]c	10	mM
n	3	mM
f	0,0003	

Fonte: (CORTASSA et al., 2003).

Tabela 5: Parâmetros no modelo de BERTRAM et al..

Parâmetro	Valor	Unidade
p1	400	
p2	1	
p3	0,01	μM
p4	0,6	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p5	0,1	mM
p6	177	mV
p7	5	mV
p8	7	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p9	0,1	mM
p10	177	mV
p11	5	mV
p12	120	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p13	10	mM
p14	190	mV
p15	8,5	mV
p16	35	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p17	0,002	$\mu\text{M}/\text{ms.mV}$
p18	-0,03	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p19	0,35	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p20	2	
p21	0,01	$\mu\text{M}/\text{ms.mV}$
p22	1,1	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p23	0,001	$\mu\text{M}/\text{ms}$
p24	0,016	/mV

Fonte: (BERTRAM et al., 2006).

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO ENTRE OS MODELOS

Vimos no capítulo anterior que várias funções do modelo de Bertram não apresentavam o mesmo comportamento que o modelo MK. Neste capítulo o comportamento do modelo como um todo será avaliado. Antes, porém, de apresentar os resultados obtidos na comparação do modelo de Bertram com os demais modelos dinâmicos faremos uma pequena digressão para tratar da estabilidade de pontos de equilíbrio em modelos dinâmicos. Isto será feito pois a análise de todos os modelos passou por esta etapa.

Dado um sistema dinâmico com N variáveis dinâmicas:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx_1}{dt} = f_1(x_1, \dots, x_N); \\ \frac{dx_2}{dt} = f_2(x_1, \dots, x_N); \\ \vdots \\ \frac{dx_N}{dt} = f_N(x_1, \dots, x_N); \end{array} \right. \quad (3.1)$$

Ou, de forma mais compacta:

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{x}) \quad (3.2)$$

onde $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_N)$ e $\mathbf{f} = (f_1, f_2, \dots, f_N)$

Definição: Um vetor ($\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_N)$) é um ponto de equilíbrio de um sistema se ele tem a propriedade que uma vez que o sistema o atinge seu estado permanece o mesmo para todo o tempo futuro.

De maneira mais prática, os pontos de equilíbrio do sistema são aqueles onde $\frac{dx_i}{dt} = F_i = 0 \forall i$.

Ao se afastar ligeiramente do ponto de equilíbrio o sistema pode tender a retornar ao ponto de equilíbrio (ponto estável) ou se afastar dele (ponto instável). A estabilidade de pontos de equilíbrio de um sistema dinâmico depende, essencialmente, do comportamento do sistema nas vizinhanças desses pontos. Para sistemas não lineares esta avaliação é feita linearizando-se o sistema nas proximidades do ponto de equilíbrio num processo chamado de *primeiro método de Liapunov* (LUENBERGER, 1979).

Sejam $\bar{\mathbf{x}} := (\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N)$ e $\mathbf{y} = (y_1, y_2, \dots, y_N)$ dois vetores. A aproximação linear da função vetorial $\mathbf{F}$ em torno de $\bar{\mathbf{x}}$ é:

$$\mathbf{F}(\bar{\mathbf{x}} + \mathbf{y}) = \mathbf{F}(\bar{\mathbf{x}}) + \mathbf{J} \mathbf{y} \quad (3.3)$$

onde, J é chamada de *matriz jacobiana* com elementos de linha (i) e coluna (j) dados por:

$$(J_{ij}) = \left. \frac{\delta F_i}{\delta j} \right|_{\mathbf{x}=\bar{\mathbf{x}}} \quad (3.4)$$

Consideremos, agora, que $\bar{\mathbf{x}}$ seja um ponto de equilíbrio do sistema. Substituindo $\mathbf{x}$ por $\bar{\mathbf{x}} + \mathbf{y}$ teremos:

$$\frac{d\mathbf{y}}{dt} = \mathbf{J} \mathbf{y} \quad (3.5)$$

Com isso temos um sistema linear, que possui solução:

$$\mathbf{y}(t) = \mathbf{y}(0)e^{\mathbf{J}t} \quad (3.6)$$

Supondo que a matriz $\mathbf{J}$ seja diagonalizável com autovetores $\mathbf{e}_j$ e autovalores correspondentes λ_j (ou seja $\mathbf{J} \mathbf{e}_j = \lambda_j \mathbf{e}_j$) podemos escrever $\mathbf{y}$ em como combinação linear destes

autovetores:

$$\mathbf{y}(t) = z_1(t)\mathbf{e}_1 + \dots + z_N(t)\mathbf{e}_N \quad (3.7)$$

Seja $\mathbf{M}$ a matriz tal que as colunas são os autovetores de J . Com esta definição podemos escrever 3.7 como:

$$\mathbf{y}(\mathbf{t}) = \mathbf{M} \mathbf{z}(\mathbf{t}) \quad (3.8)$$

Substituindo em 3.6 temos:

$$\mathbf{M} \frac{d\mathbf{z}}{dt} = \mathbf{J} \mathbf{M} \mathbf{z} \quad (3.9)$$

ou ainda:

$$\frac{d\mathbf{z}}{dt} = \mathbf{M}^T \mathbf{J} \mathbf{M} \mathbf{z} \quad (3.10)$$

onde foi usado que M , por ser composta dos autovetores de J é uma matriz ortogonal, ou seja, $M^{-1} = M^T$.

Assim, temos que os componentes z_i satisfazem a equação:

$$\frac{dz_i(t)}{dt} = \lambda_i z_i(t) \quad (3.11)$$

tendo como solução:

$$z_i(t) = z_i(0)e^{\lambda_i t} \quad (3.12)$$

Com isso podemos verificar que o comportamento da solução próximo ao ponto de equilíbrio dependerá essencialmente dos autovalores da matriz J . O teorema a seguir formaliza este raciocínio:

Teorema: Uma condição necessária e suficiente para que um ponto de equilíbrio de um sistema contínuo seja assintoticamente estável é que todos os autovalores de $\mathbf{J}$ possuam

parte real negativa. Se ao menos um autovalor possuir parte real positiva o ponto é instável.

Não apresentaremos uma prova formal do teorema acima, mas verificaremos sua plausibilidade. Se todos os λ_i forem negativos, a medida que o tempo passa os $z_i \rightarrow 0$. Consequentemente $y_i \rightarrow 0$ e, portanto, $x_i \rightarrow \bar{x}_i$. Ou seja, pontos próximos do ponto de equilíbrio tendem a ele com o passar do tempo.

Já se algum dos λ_i for positivo, $z_i \rightarrow \infty$ e o mesmo ocorre com y_i . Assim, pontos na vizinhança do ponto de equilíbrio tendem a se afastar dele com o passar do tempo.

Há ainda um caso não englobado pelo teorema que é aquele que ocorre quando nenhum autovalor tem parte real positiva mas alguns apresentam parte real nula. Se os autovalores de parte real nula possuírem um conjunto completo de autovetores associados aparecerão apenas termos do tipo $z_j(t) = z_j(0)e^{i\omega t}$ que possui módulo constante. Dessa forma o sistema nem se aproxima do ponto de equilíbrio, nem se afasta dele. Esta condição é chamada de *marginamente estável*.

Trataremos, agora, das análises feitas para os modelos dinâmicos apresentados no capítulo anterior (modelo de Bertram, MK e de Cortassa).

3.1 Modelo de Bertram

Como o modelo de Bertram busca descrever um processo fisiológico é interessante que ele reproduza adequadamente este processo. Em particular, dada uma condição inicial as variáveis do modelo precisam se comportar como estas se comportam nas medidas fisiológicas. Sabe-se que na ausência de um estímulo externo para regular a produção de ATP, ou seja, para concentrações constantes de cálcio citoplasmático ($[Ca]_c$) e frutose (FBP), as concentrações de ATP, NADH e cálcio mitocondrial, e a voltagem da membrana plasmática tendem a uma situação de equilíbrio (homeostase) na qual estas quantidades variam muito pouco (GUYTON; HALL, 2006). Para que um modelo seja bom para descrever esta situação ele deve apresentar o mesmo comportamento qualitativamente (tender a um ponto de equilíbrio) e quantitativamente (apresentar os valores de equilíbrio corretos).

Sendo assim, iniciamos a avaliação do modelo de Bertram buscando-se os pontos de equilíbrio do sistema de equações deste modelo.

Conforme mencionado anteriormente, os pontos de equilíbrio de um sistema dinâmico de equações correspondem aos pontos onde as derivadas temporais de cada uma das variáveis do modelo seja zero. Ou seja, para o modelo de Bertram, encontrar os pontos de equilíbrio equivale a resolver o sistema de equações apresentado abaixo:

$$F_{NADH} := \gamma(J_{PDH} - J_o) = 0 \quad (3.13)$$

$$F_{ADP} := J_{ANT} - J_{F_1F_0} = 0 \quad (3.14)$$

$$F_{Ca} := f_m(J_{uni} - J_{Na^+/Ca^{2+}}) = 0 \quad (3.15)$$

$$F_{\Delta V} := -(-J_{H,res} + J_{H,atp} + J_{ANT} + J_{H,leak} + 2J_{uni} + J_{Na/Ca}) = 0 \quad (3.16)$$

Este sistema foi resolvido com o auxílio do software *Mathematica*. Inicialmente reescreveu-se F_{NADH} , F_{ADP} e F_{Ca} de modo que $NADH$, ADP e Ca fossem escritos como função de ΔV . A seguir, estas equações foram combinadas com $F_{\Delta V}$ para se obter uma função onde a única variável presente era ΔV . Esta função foi graficada para localizar os valores de V que a zeravam. Uma vez localizados visualmente, os valores de ΔV foram localizados numericamente. A partir da dependência de $NADH$, ADP e Ca com ΔV definida por $F_{NADH} = F_{ADP} = F_{Ca} = 0$ os valores dessas variáveis, correspondentes ao ΔV obtido, foram calculadas. Este procedimento foi tomado para garantir que todos os pontos de equilíbrio do sistema foram localizados.

Para o modelo de Bertram foram obtidos 6 pontos.

A seguir avaliamos a estabilidade dos pontos de equilíbrio. Para isto calculamos a matriz Jacobiana do sistema e determinamos os seus autovalores (usando o software *Mathematica*) para cada um dos pontos de equilíbrio encontrados. Os resultados obtidos encontram-se abaixo:

$$\begin{array}{l}
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_A = 172,831mV; \\ [ADP]_A = 8,31258mM; \\ [NADH]_A = -0,177054mM; \\ [Ca_m]_A = 0,03955\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_A} = -0,892892; \\ \lambda_{[ADP]_A} = -0,00408331; \\ \lambda_{[NADH]_A} = -0,00158857; \\ \lambda_{[Ca_m]_A} = -0,000612146; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_B = 110,087mV; \\ [ADP]_B = 14,9678mM; \\ [NADH]_B = 0,00298601mM; \\ [Ca_m]_B = 0,000149267\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_B} = -0,00863943 + 0,0099244i; \\ \lambda_{[ADP]_B} = -0,00863943 - 0,0099244i; \\ \lambda_{[NADH]_B} = 0,00914143; \\ \lambda_{[Ca_m]_B} = -0,0000898752; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_C = 165,803mV; \\ [ADP]_C = 10,5067mM; \\ [NADH]_C = 4,37991mM; \\ [Ca_m]_C = 0,0393134\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_C} = -0,361589; \\ \lambda_{[ADP]_C} = -0,00141947; \\ \lambda_{[NADH]_C} = -0,000444445; \\ \lambda_{[Ca_m]_C} = -0,0000378638; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_D = 165,803mV; \\ [ADP]_D = 14,9812mM; \\ [NADH]_D = -0,100003mM; \\ [Ca_m]_D = -0,0100006\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_D} = -6,02714 \cdot 10^6; \\ \lambda_{[ADP]_D} = -316,053; \\ \lambda_{[NADH]_D} = 315,627; \\ \lambda_{[Ca_m]_D} = -0,000442235; \end{array} \right.
\end{array}$$

$$\begin{array}{l}
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_E = 120mV; \\ [ADP]_E = 25,11mM; \\ [NADH]_E = 1,897mM; \\ [Ca_m]_E = 0,01466\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_E} = 0,183392; \\ \lambda_{[ADP]_E} = -0,001477; \\ \lambda_{[NADH]_E} = -0,0006457; \\ \lambda_{[Ca_m]_E} = -0,0000635; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_F = 109,1mV; \\ [ADP]_F = 25,0mM; \\ [NADH]_F = -0,028mM; \\ [Ca_m]_F = -0,00165\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_F} = 0,13959; \\ \lambda_{[ADP]_F} = -0,01277; \\ \lambda_{[NADH]_F} = -0,001597 + 0,00676i; \\ \lambda_{[Ca_m]_F} = -0,001597 - 0,00676i; \end{array} \right.
\end{array}$$

Apenas para os pontos A e C todos os autovalores possuem parte real negativa correspondendo a um equilíbrio estável. O ponto C é aquele observado no artigo de BERTRAM et al..

O ponto A também corresponde a um equilíbrio estável e, de fato, para condições iniciais próximas do ponto A, o sistema tende a este ponto (ver Figura 26). No entanto, estas condições iniciais fazem uso de valores negativos para $[NADH]$, o que não é compatível com a biologia do problema (concentrações apresentam apenas valores positivos ou nulos). Assim, com condições iniciais fisiologicamente plausíveis apenas o ponto C corresponde a um equilíbrio estável, conforme ilustrado nas Figuras 26 e 27. Este é, sem dúvida, um ponto positivo do modelo de Bertram, pois começando com condições iniciais fisiológicas o modelo permanece em regiões onde as variáveis apresentam valores encontrados fisiologicamente.

Alem disso, o modelo tende sempre ao mesmo ponto de equilíbrio, como ocorre fisiologicamente.

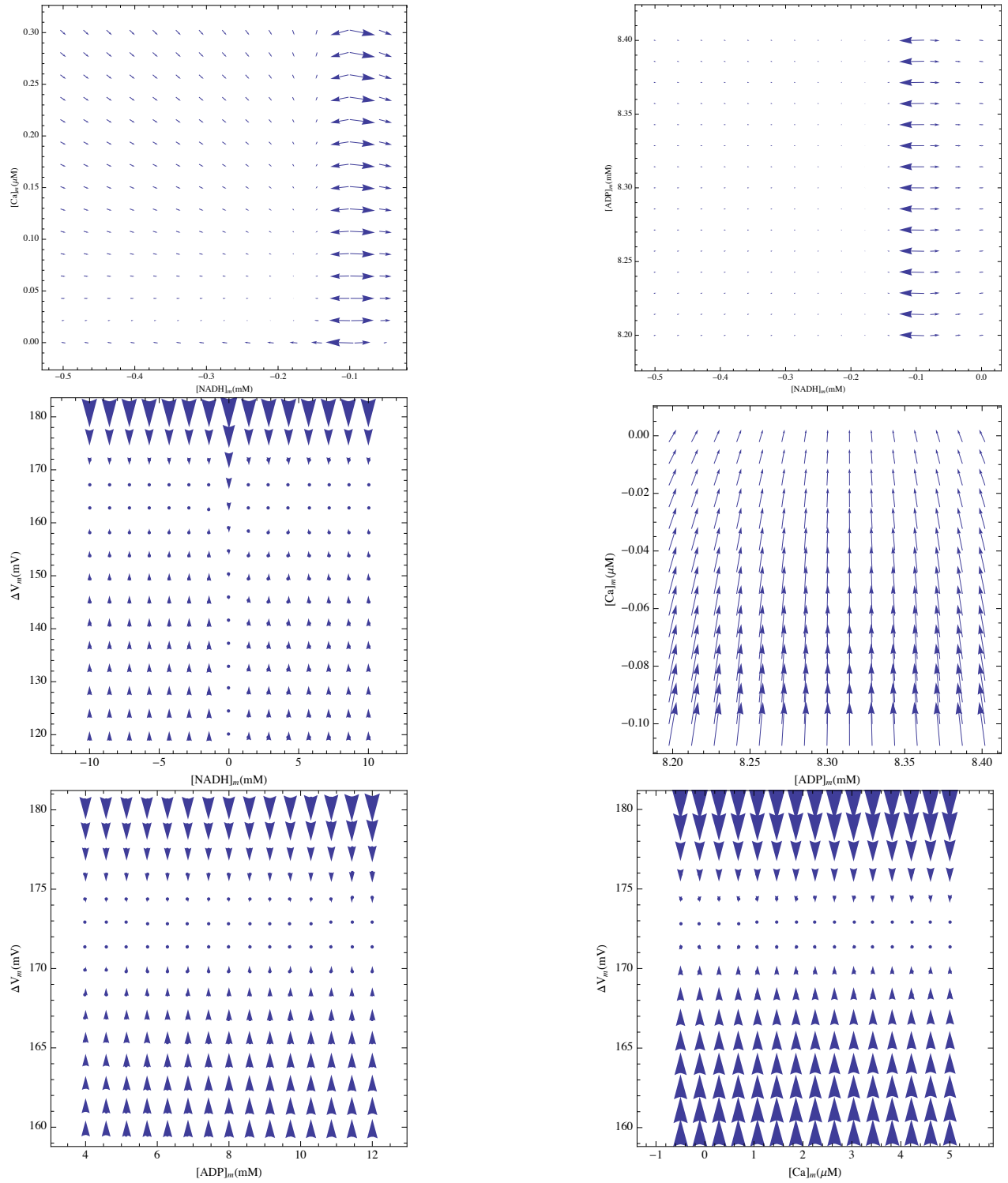


Figura 26: Mapa dinâmico para modelo de Bertram nas proximidades do ponto A. Conforme pode ser observado, embora o ponto A seja estável ele só é alcançado por condições iniciais não fisiológicas.

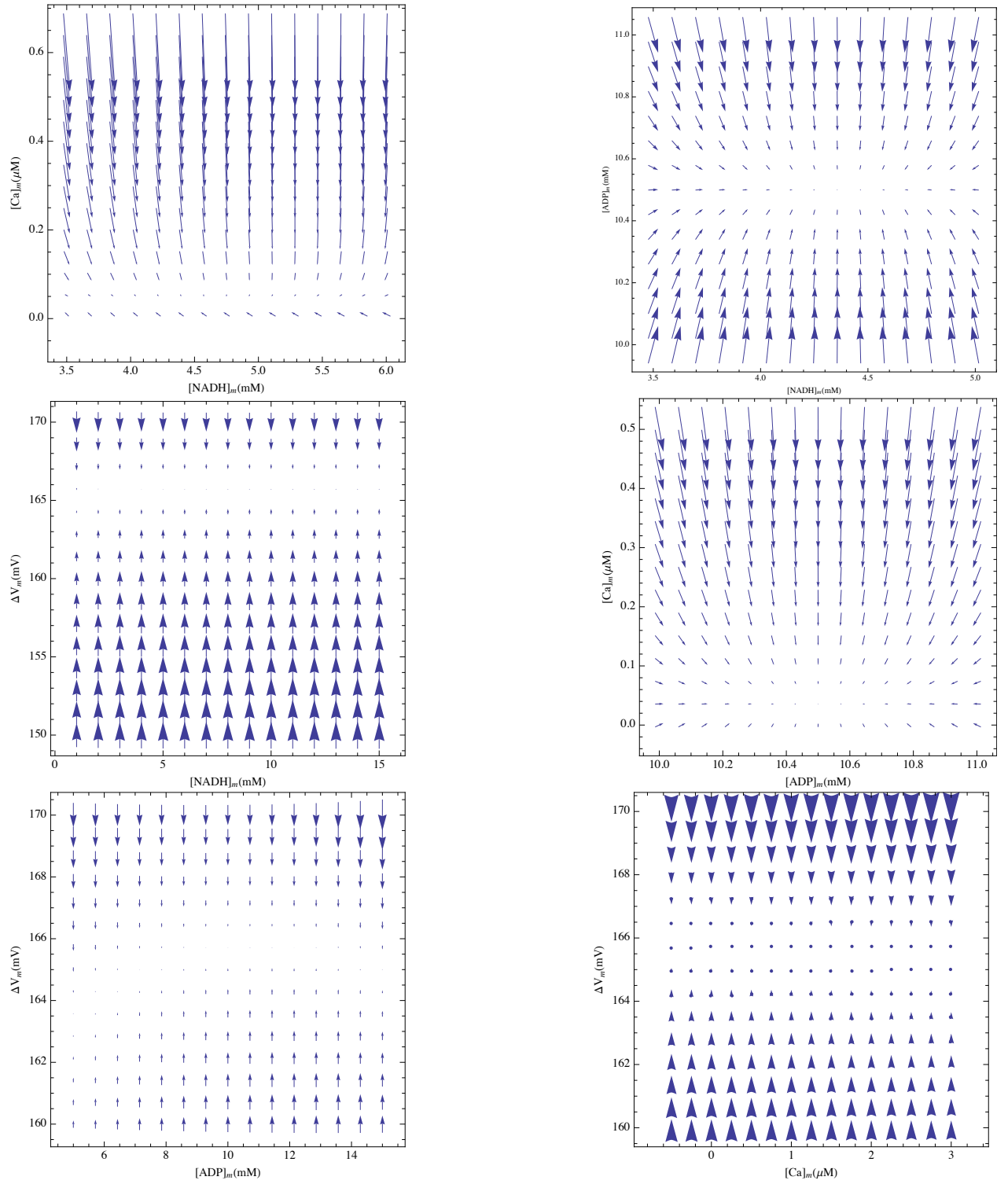


Figura 27: Mapa dinâmico para modelo de Bertram nas proximidades do ponto C.

3.2 Modelo MK

A seguir a mesma análise foi feita para o modelo MK. Neste caso apenas um ponto de equilíbrio foi encontrado e este é estável.

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_{MK} = 158,131mV; \\ [ADP]_{MK} = 3,5871mM; \\ [NADH]_{MK} = 2,08783mM; \\ [Ca_m]_{MK} = 7,22263.10^{-8}\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_{MK}} = -1,81527; \\ \lambda_{[ADP]_{MK}} = -0,000730925; \\ \lambda_{[NADH]_{MK}} = -0,0000817738; \\ \lambda_{[Ca_m]_{MK}} = -7,85334.10^{-23}; \end{array} \right.$$

A Figura 28 ilustra o comportamento das derivadas temporais das variáveis nas proximidades do ponto de equilíbrio.

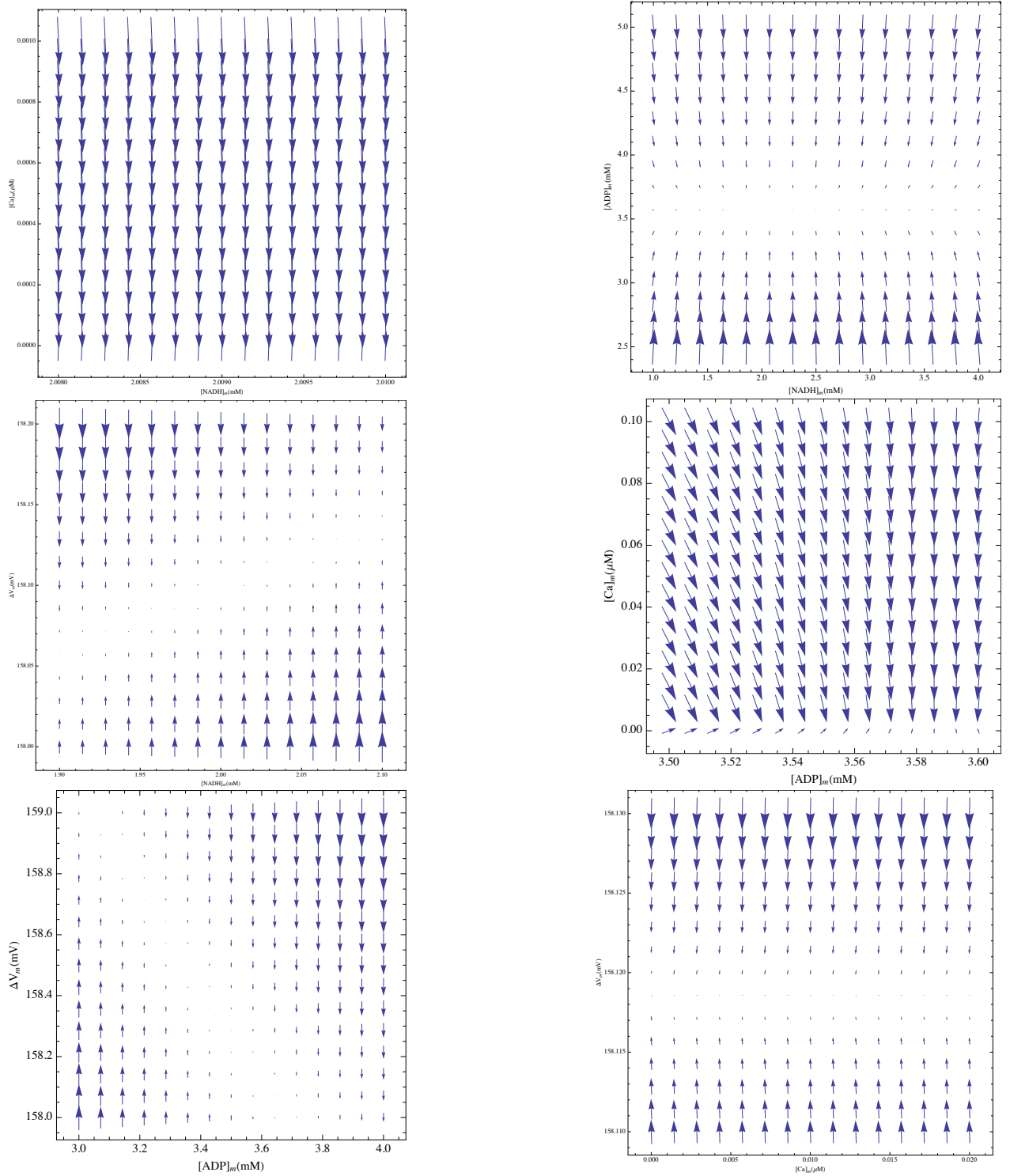


Figura 28: Mapa dinâmico para modelo MK nas proximidades do ponto de equilíbrio.

3.3 Modelo de Cortassa

O processo foi, então, repetido para o modelo de Cortassa com as equações apresentadas no artigo de CORTASSA et al.. Aqui também foi encontrado apenas um autovalor mas, ao contrário do observado no modelo MK, o único autovalor do modelo de Cortassa não era estável.

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_{Cortassa} = 175,763mV; \\ [ADP]_{Cortassa} = 3,14422mM; \\ [NADH]_{Cortassa} = 6,26801mM; \\ [Ca_m]_{Cortassa} = 0,683005\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_{Cortassa}} = -1,22694; \\ \lambda_{[ADP]_{Cortassa}} = -0,000921752; \\ \lambda_{[NADH]_{Cortassa}} = -0,000129375; \\ \lambda_{[Ca_m]_{Cortassa}} = 0,0000845069; \end{array} \right.$$

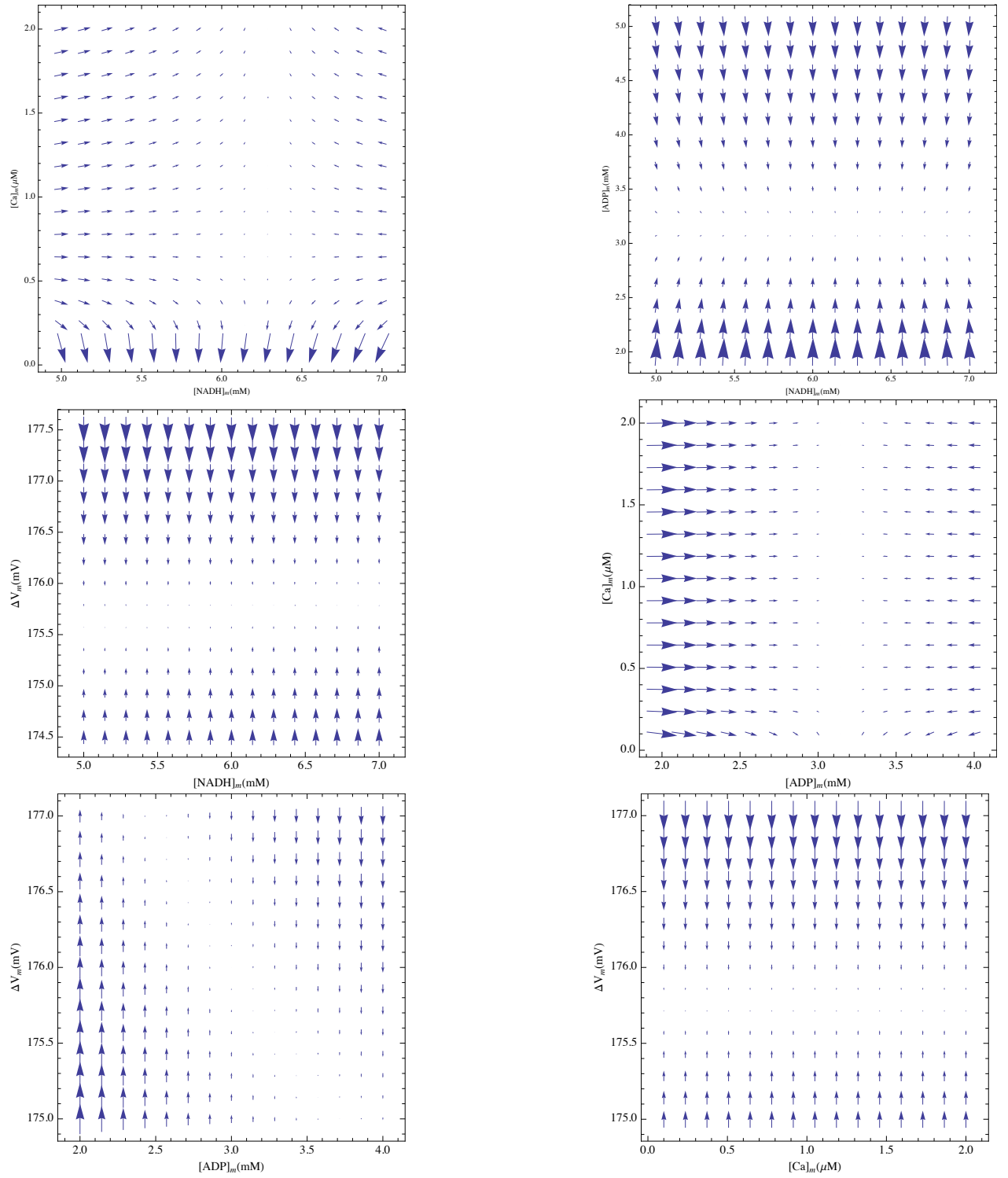


Figura 29: Mapa dinâmico para modelo de Cortassa nas proximidades do ponto de equilíbrio.

Dado que o modelo de Cortassa é extensamente usado e citado na literatura nos pareceu estranho que o único ponto de equilíbrio existente fosse instável. A simulação feita aqui usou as equações tais quais elas se encontravam no artigo de Cortassa. No entanto, para o transportador de ATP/ADP (J_{ANT}) a função correspondente parece ter sido transcrita de modo errado para o artigo de Cortassa. Além disso a expressão para o trocador Na/Ca (J_{NaCa}) apresentada por Bertram como sendo a do modelo de Cortassa ($J_{NaCa}^{Cortassa-Bertram}$) também foi usada em outros artigos que citam (CORTASSA et al., 2003), inclusive alguns publicados pela Cortassa (CORTASSA et al., 2006). Isso sugere que, embora não tenha havido uma retratação por parte dos autores, tenha havido apenas um erro na transcrição desta equação no artigo.

Sendo assim, efetuamos novamente o processo de busca de pontos de equilíbrio para o modelo de Cortassa usando o J_{ANT}^{MK} no lugar do $J_{ANT}^{Cortassa}$ e $J_{NaCa}^{Cortassa-Bertram}$ no lugar de $J_{NaCa}^{Cortassa}$. Obtivemos 10 pontos de equilíbrio, dos quais dois são estáveis:

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_A = 181,586mV; \\ [ADP]_A = 1,33132mM; \\ [NADH]_A = 1,30718567274886mM; \\ [Ca_m]_A = 0,0140401\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_A} = -1,76069; \\ \lambda_{[ADP]_A} = -0,00439103; \\ \lambda_{[NADH]_A} = -0,00113502; \\ \lambda_{[Ca_m]_A} = -0,0000653586; \end{array} \right.$$

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_B = 211,315mV; \\ [ADP]_B = 0,0484995mM; \\ [NADH]_B = 0,14557775342mM; \\ [Ca_m]_B = 0,0107474\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_B} = -5,80827; \\ \lambda_{[ADP]_B} = 0,033505; \\ \lambda_{[NADH]_B} = -0,00761217; \\ \lambda_{[Ca_m]_B} = -0,0000519886; \end{array} \right.$$

$$\begin{array}{l}
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_C = 183,164mV; \\ [ADP]_C = 1,12943mM; \\ [NADH]_C = 7,40847716294902mM; \\ [Ca_m]_C = 0,0138719\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_C} = -2,02763; \\ \lambda_{[ADP]_C} = -0,00452105; \\ \lambda_{[NADH]_C} = -0,00149302; \\ \lambda_{[Ca_m]_C} = -0,0000931976; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_D = 211,315mV; \\ [ADP]_D = 0,0484997mM; \\ [NADH]_D = 9,98139935072mM; \\ [Ca_m]_D = 0,0107474\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_D} = -5,80191; \\ \lambda_{[ADP]_D} = 0,0342061; \\ \lambda_{[NADH]_D} = -0,00761124; \\ \lambda_{[Ca_m]_D} = -0,000113138; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_E = 165,226mV; \\ [ADP]_E = 1,58105mM; \\ [NADH]_E = 23,3915mM; \\ [Ca_m]_E = 0,0156158\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_E} = -0,521468 - 0,0633955i; \\ \lambda_{[ADP]_E} = -0,00324454 - 1,66225 \cdot 10^{-7}i; \\ \lambda_{[NADH]_E} = -0,00258024 - 0,000466949i; \\ \lambda_{[Ca_m]_E} = 5,59333 \cdot 10^{-7} - 2,911 \cdot 10^{-6}i; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_F = 182,818mV; \\ [ADP]_F = 1,17114mM; \\ [NADH]_F = 4,99215125524569mM; \\ [Ca_m]_F = -3,7499 \cdot 10^{-7}\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_F} = 6,31707 \cdot 10^6; \\ \lambda_{[ADP]_F} = -1,96732; \\ \lambda_{[NADH]_F} = -0,00212019; \\ \lambda_{[Ca_m]_F} = -9,50486 \cdot 10^{-6}; \end{array} \right.
\end{array}$$

$$\begin{array}{l}
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_G = 211,316mV; \\ [ADP]_G = 0,0484947mM; \\ [NADH]_G = 9,97666788124mM; \\ [Ca_m]_G = -3,74987 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_G} = 6,33278 \cdot 10^6; \\ \lambda_{[ADP]_G} = -5,79587; \\ \lambda_{[NADH]_G} = 0,0517549; \\ \lambda_{[Ca_m]_G} = -0,0000129734; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_H = 183,061mV; \\ [ADP]_H = 1,12943mM; \\ [NADH]_H = 6,68957865211152mM; \\ [Ca_m]_H = -3,7499 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_H} = 6,34553 \cdot 10^6; \\ \lambda_{[ADP]_H} = -2,01466; \\ \lambda_{[NADH]_H} = -0,00221457; \\ \lambda_{[Ca_m]_H} = -7,66688 \cdot 10^{-6}; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_I = 211,316mV; \\ [ADP]_I = 0,048495mM; \\ [NADH]_I = 9,97695317899mM; \\ [Ca_m]_I = -3,74987 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_I} = 6,33278 \cdot 10^6; \\ \lambda_{[ADP]_I} = -5,79584; \\ \lambda_{[NADH]_I} = 0,0517544; \\ \lambda_{[Ca_m]_I} = -0,0000130539; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_J = 163,498mV; \\ [ADP]_J = 0,849292mM; \\ [NADH]_J = 23,2187mM; \\ [Ca_m]_J = -3,74991 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_J} = 5,45513 \cdot 10^6 + 2,94564 \cdot 10^{-12} \iota; \\ \lambda_{[ADP]_J} = -0,484696 - 0,0485393 \iota; \\ \lambda_{[NADH]_J} = -0,00616675 - 0,00144334 \iota; \\ \lambda_{[Ca_m]_J} = 3,73394 \cdot 10^{-7} - 2,19668 \cdot 10^{-6} \iota; \end{array} \right.
\end{array}$$

Para os dois pontos de equilíbrio estáveis (ponto A e C) plotamos os mapas com o comportamento das derivadas de cada variável na proximidade desses pontos (Figuras 30 e

31).

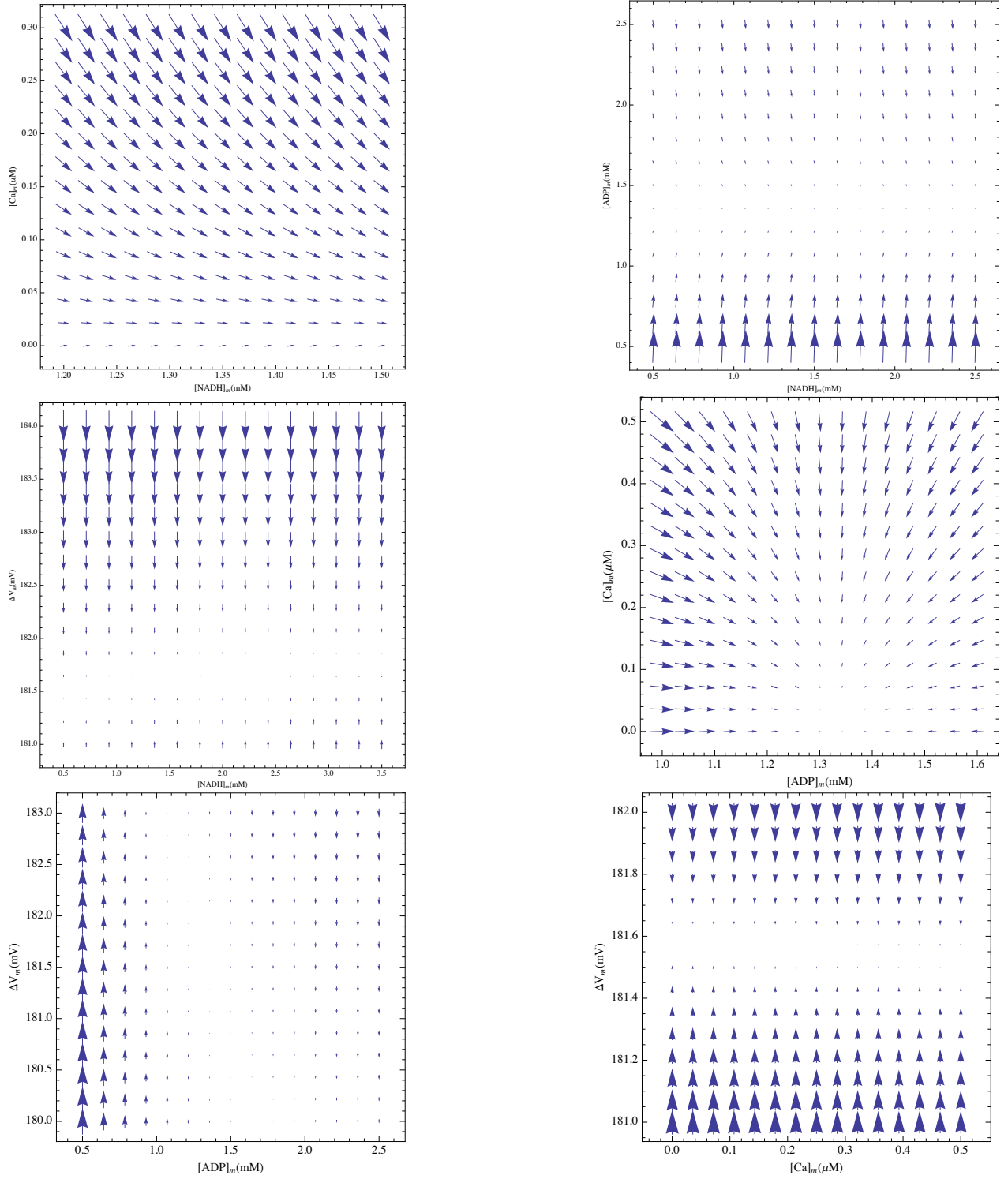


Figura 30: Mapa dinâmico para modelo de Cortassa na forma correta nas proximidades do ponto de equilíbrio A.

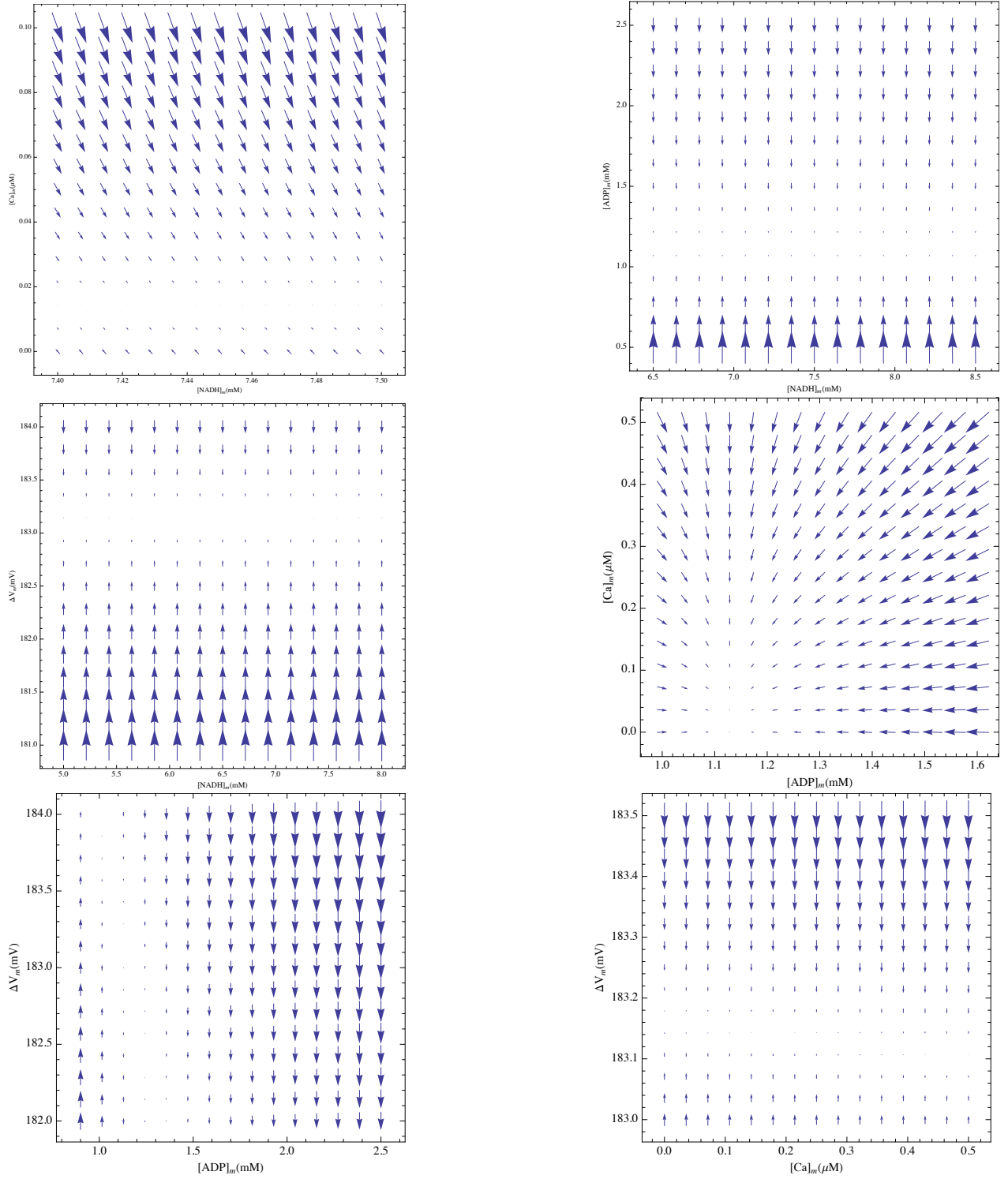


Figura 31: Mapa dinâmico para modelo de Cortassa na forma correta nas proximidades do ponto de equilíbrio C.

Conforme pode ser visto na Figuras 30 e 31, a maioria das trajetórias tende para o ponto C. Pode, então, ter havido um erro de transcrição desta função do modelo MK para o de Cortassa.

3.4 Modelo de Cortassa errado

O modelo de Cortassa com as equações apresentadas no artigo de BERTRAM et al. também foi avaliado. Para este modelo foram encontrados 7 pontos de equilíbrio dos quais apenas um é estável mas apresenta valor de tensão muito acima do fisiologicamente suportável ($532.499mV$). Isto mostra que os possíveis "erros de transcrição" cometidos por Bertram podem ter alterado significativamente a dinâmica do modelo de Cortassa. Sendo assim, se o modelo de Bertram foi baseado nessas funções ele pode apresentar problemas.

$$\begin{aligned}
 & \bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_A = 241,244mV; \\ [ADP]_A = -0,00175307mM; \\ [NADH]_A = 9,99724mM; \\ [Ca_m]_A = -3,74982 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_A} = -5,36339; \\ \lambda_{[ADP]_A} = -0,0656084; \\ \lambda_{[NADH]_A} = -0,0000912118; \\ \lambda_{[Ca_m]_A} = 4,60581 \cdot 10^{-7}; \end{array} \right. \\
 & \bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_B = 532,548mV; \\ [ADP]_B = 14,785mM; \\ [NADH]_B = 9,9973073796mM; \\ [Ca_m]_B = -3,73651 \cdot 10^{-7} \mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_B} = -1,88349; \\ \lambda_{[ADP]_B} = -0,127711; \\ \lambda_{[NADH]_B} = -0,0000912184; \\ \lambda_{[Ca_m]_B} = 2,95683 \cdot 10^{-9}; \end{array} \right.
 \end{aligned}$$

$$\begin{array}{l}
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_C = 479,99mV; \\ [ADP]_C = -0,00683668mM; \\ [NADH]_C = 0,1441466151mM; \\ [Ca_m]_C = -3,74419.10^{-7}\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_C} = -86,6502; \\ \lambda_{[ADP]_C} = 12,043; \\ \lambda_{[NADH]_C} = -0,0000471831; \\ \lambda_{[Ca_m]_C} = -5,24768.10^{-11}; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_D = 241,244mV; \\ [ADP]_D = -0,00175308mM; \\ [NADH]_D = 9,99764mM; \\ [Ca_m]_D = 0,00771382\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_D} = -5,3634; \\ \lambda_{[ADP]_D} = -0,0656046; \\ \lambda_{[NADH]_D} = -0,0000912249; \\ \lambda_{[Ca_m]_D} = 4,60611.10^{-7}; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_E = 532,499mV; \\ [ADP]_E = 14,7848mM; \\ [NADH]_E = 0,1441463327mM; \\ [Ca_m]_E = 0,00010396\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_E} = -362,701; \\ \lambda_{[ADP]_E} = -0,179362; \\ \lambda_{[NADH]_E} = -0,0000471831; \\ \lambda_{[Ca_m]_E} = -4,08764.10^{-12}; \end{array} \right. \\
\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_F = 480,074mV; \\ [ADP]_F = 0,0045954mM; \\ [NADH]_F = 9,9973228404mM; \\ [Ca_m]_F = 0,00024115\mu M; \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_F} = 6,67367; \\ \lambda_{[ADP]_F} = -3,98048; \\ \lambda_{[NADH]_F} = -0,0000912189; \\ \lambda_{[Ca_m]_F} = 4,54197.10^{-10}; \end{array} \right.
\end{array}$$

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_G = 480,032mV; \\ [ADP]_G = -0,00683863mM; \\ [NADH]_G = 9,9973073270mM; \\ [Ca_m]_G = -3,74418.10^{-7}\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_G} = -48,6471; \\ \lambda_{[ADP]_G} = 36,8292; \\ \lambda_{[NADH]_G} = -0,0000912184; \\ \lambda_{[Ca_m]_G} = -4,79248.10^{-11}; \end{array} \right.$$

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_H = 532,585mV; \\ [ADP]_H = 14,7851mM; \\ [NADH]_H = 9,9973140427mM; \\ [Ca_m]_H = 0,000103815\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_H} = -1,88361; \\ \lambda_{[ADP]_H} = -0,127786; \\ \lambda_{[NADH]_H} = -0,0000912186; \\ \lambda_{[Ca_m]_H} = 2,26015.10^{-9}; \end{array} \right.$$

3.5 Comparação do modelo MK com os modelos de Cortassa e de Bertram

Pode-se observar nas seções anteriores que o número de pontos de equilíbrio é diferente em cada modelo, conforme resumido na Tabela 6.

Tabela 6: Pontos de equilíbrio dos três modelos avaliados

Modelo	MK	Bertram	Cortassa	Cortassa-Bertram
Pontos de equilíbrio	1	6	10	7
Estáveis	1	2	2	1
Estáveis e fisiológicos	1	1	1	0

Além disso, o ponto de equilíbrio para o qual cada um dos modelos tende é diferente. Ao resolver numericamente as equações do modelo (pelo *software Mathematica*) também observamos isso. Os resultados obtidos estão na Figura 32.

Conforme esperado levando-se em conta os pontos de equilíbrio estável encontrados, cada modelo tende a um ponto de equilíbrio diferente. Esse é um resultado preocupante, pois todos os modelos visam descrever o mesmo processo e usam as mesmas variáveis dinâmicas. No próximo capítulo serão apresentadas as nossas tentativas de modificar o modelo de Ber-

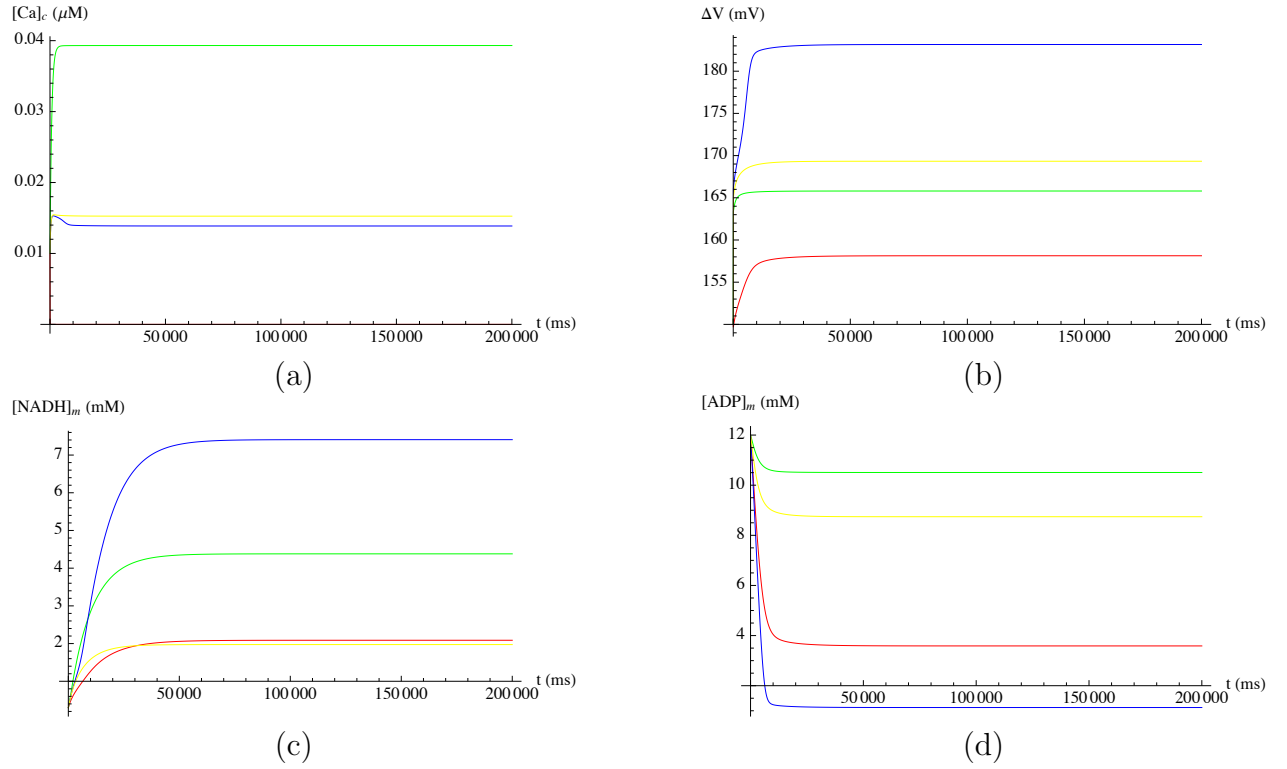


Figura 32: Modelo de Bertram (verde), modelo MK (vermelho), modelo de Cortassa (amarelo) e modelo de Cortassa tal como apresentado no artigo de Bertram (azul). (a) $[Ca]_m(\mu M)$; (b) $\Delta V(mV)$; (c) $[NADH](mM)$; (d) $[ADP](mM)$.

tram para que este fique mais próximo do MK.

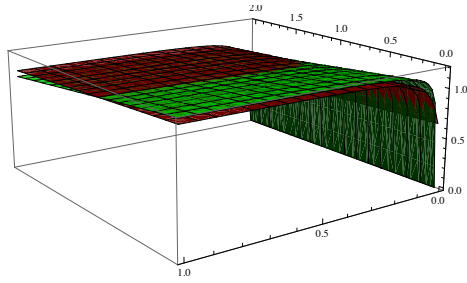
CAPÍTULO 4

MODIFICAÇÕES PROPOSTAS

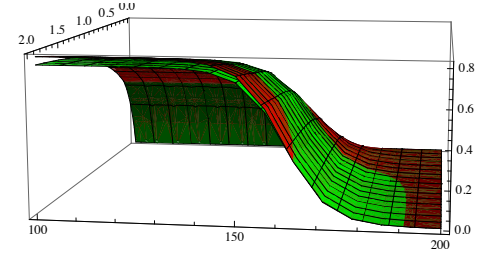
4.1 *Novos parâmetros para o Modelo de Bertram*

4.1.1 **Ajuste dos parâmetros a partir da superfície de resposta das funções - Modificação I**

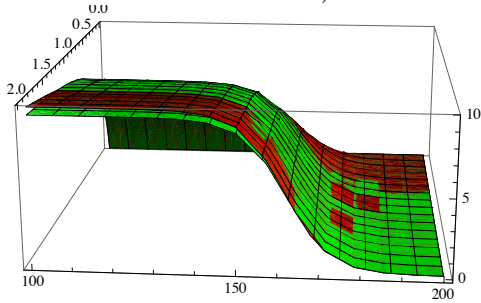
Devido à simplicidade do modelo de Bertram, buscou-se, inicialmente, manter as suas equações com a mesma forma e procurar por parâmetros com valores tais que as respostas do modelo de Bertram ficassem mais próximas do modelo MK. Para isso efetuou-se um ajuste de superfícies para cada uma das funções presentes no modelo de Bertram frente à correspondente função do modelo MK usando o *software Mathematica*. As superfícies obtidas estão na Figura 33.



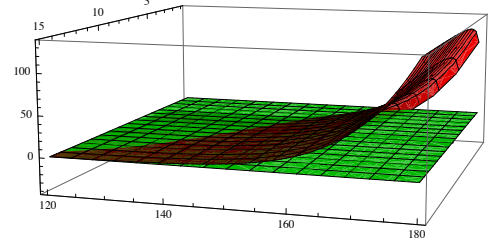
J_{PDH} (taxa de atuação do ciclo do ácido cítrico)



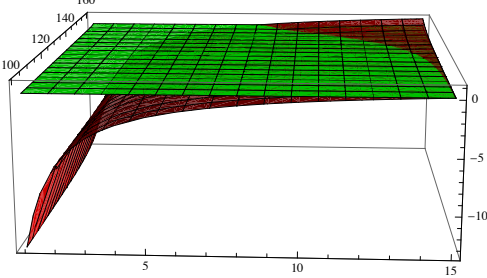
J_o (taxa de consumo de oxigênio - oxidação do NADH)



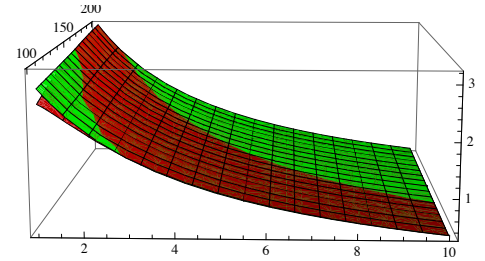
J_{Hbomba} (taxa de ejeção de prótons pela bomba de prótons)



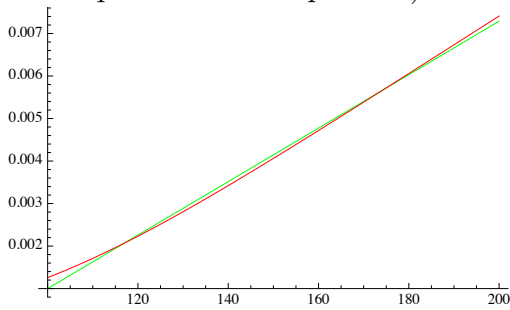
J_{HATP} (taxa de passagem de prótons pela ATP-sintetase)



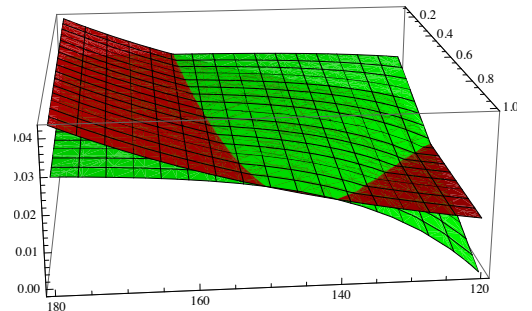
$J_{F_1F_0}$ (taxa de produção de ATP pela bomba de prótons)



J_{ant} (trocador de ATP/ADP)



J_{uni} (transportador uniporte de cálcio)



$j_{Na/Ca}$ (trocador de sódio/cálcio)

Figura 33: Modelo de Bertram com valores alterados para os parametros (verde) e modelo MK (vermelho).

Os parâmetros obtidos no ajuste em comparação com os do modelo de Bertram estão na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros do modelo de Bertram e obtidos pelo ajuste da superfície de resposta das funções presentes no modelo com o modelo MK

Parâmetro	Modelo de Bertram	Ajuste com superfície
p1	400	400
p2	1	0,99
p3 (μM)	0,01	0,007
p4 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	0,6	0,88
p5 (mM)	0,1	0,26
p6 (mV)	177	162
p7 (mV)	5	5,3
p8 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	7	11
p9 (mM)	0,1	0,26
p10 (mV)	177	162
p11 (mV)	5	5,3
p12 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	120	11
p13 (mM)	10	16
p14 (mV)	190	190
p15 (mV)	8,5	1,3
p16 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	35	38495
p17 ($\mu\text{M}/\text{ms.mV}$)	0,002	0,002
p18 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	-0,03	-0,032
p19 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	0,35	3,8
p20	2	6,1
α ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	-	0,026
p21 ($\mu\text{M}/\text{ms.mV}$)	0,01	0,0063
p22 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	1,1	0,53
p23 ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	0,001	-3,0
p24 (/mV)	0,016	-0,057
β ($\mu\text{M}/\text{ms}$)	-	0,030

Apesar do ajuste ter fornecido superfícies com o mesmo comportamento das funções do modelo MK, o modelo simplificado continua não apresentando os mesmos valores como ponto de equilíbrio estável que o modelo MK.

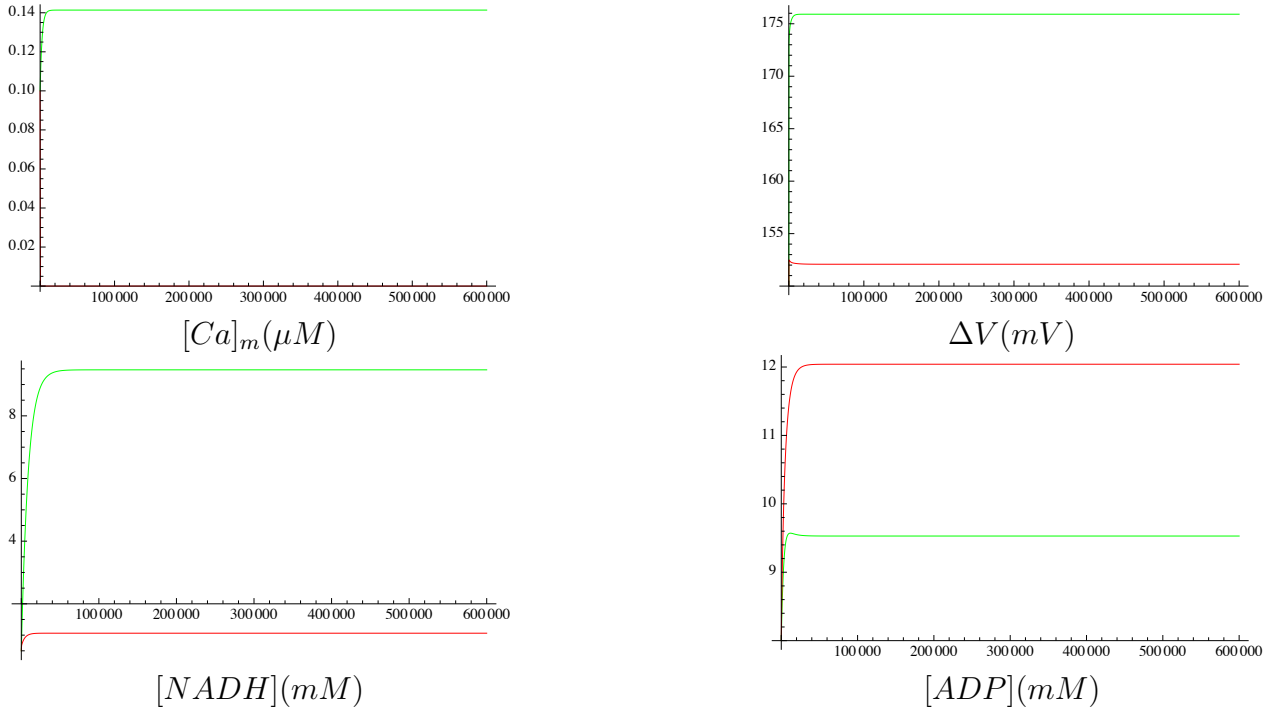


Figura 34: Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 7 (verde) e modelo MK (vermelho).

Ponto de equilíbrio próximo do fisiológico:

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_A = 176mV; \\ [ADP]_A = 9,53mM; \\ [NADH]_A = 9,47mM; \\ [Ca_m]_A = 0,141\mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_A} = -0,128116; \\ \lambda_{[ADP]_A} = -0,000408774; \\ \lambda_{[NADH]_A} = -0,000354748; \\ \lambda_{[Ca_m]_A} = -0,000113098; \end{array} \right.$$

Este ponto de equilíbrio não coincide, também, com o modelo de Bertram, mostrando que o sistema é bastante sensível quanto aos seus parâmetros.

4.1.2 Ajuste dos parâmetros a partir do ponto de equilíbrio - Modificação II

Uma nova tentativa de ajustar os parâmetros do modelo de Bertram foi feita deixando 4 parâmetros do modelo de Bertram livres e usando para os demais o mesmo valor que no artigo de Bertram. A seguir, buscamos o valor desses parâmetros tal que o ponto de equilíbrio do modelo MK fosse um ponto de equilíbrio do novo modelo. Para isso foi resolvido o sistema de equações $F_{NADH} = F_{ADP} = F_{Ca} = F\Delta V = 0$. Os valores obtidos para os parâmetros e o valor apresentados por esses parâmetros no artigo de BERTRAM et al. encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros do modelo de Bertram modificado e obtidos pelo ajuste para o ponto de equilíbrio do modelo MK

Parâmetro	Modelo de Bertram	Ajuste do ponto de equilíbrio
p1	400	33.100.000
p8	7 $\mu\text{M/ms}$	19,3 $\mu\text{M/ms}$
p19	0,35 $\mu\text{M/ms}$	0,0328 $\mu\text{M/ms}$
p23	0,001 $\mu\text{M/ms}$	531 $\mu\text{M/ms}$

Conforme pode ser observado, foi necessário alterar consideravelmente os valores dos parâmetros para fazer com que o ponto de equilíbrio coincidissem com o de MK.

A Figura 35 mostra o resultado da simulação do modelo de Bertram com os 4 parâmetros alterados e do modelo MK. Como esperado, os pontos de equilíbrio são os mesmos.

Para nos certificarmos do valor e estabilidade do ponto de equilíbrio próximo ao modelo MK este foi calculado novamente para o modelo de Bertram modificado:

$$\bullet \left\{ \begin{array}{l} \Delta V_{eq} = 158,131mV; \\ [ADP]_{eq} = 3,5871mM; \\ [NADH]_{eq} = 2,08783mM; \\ [Ca_m]_{eq} = 7,22 \cdot 10^{-8} \mu M; \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\Delta V_{eq}} = -666.634; \\ \lambda_{[ADP]_{eq}} = -0.963405; \\ \lambda_{[NADH]_{eq}} = -0.000356977; \\ \lambda_{[Ca_m]_{eq}} = -0.0000869324; \end{array} \right.$$

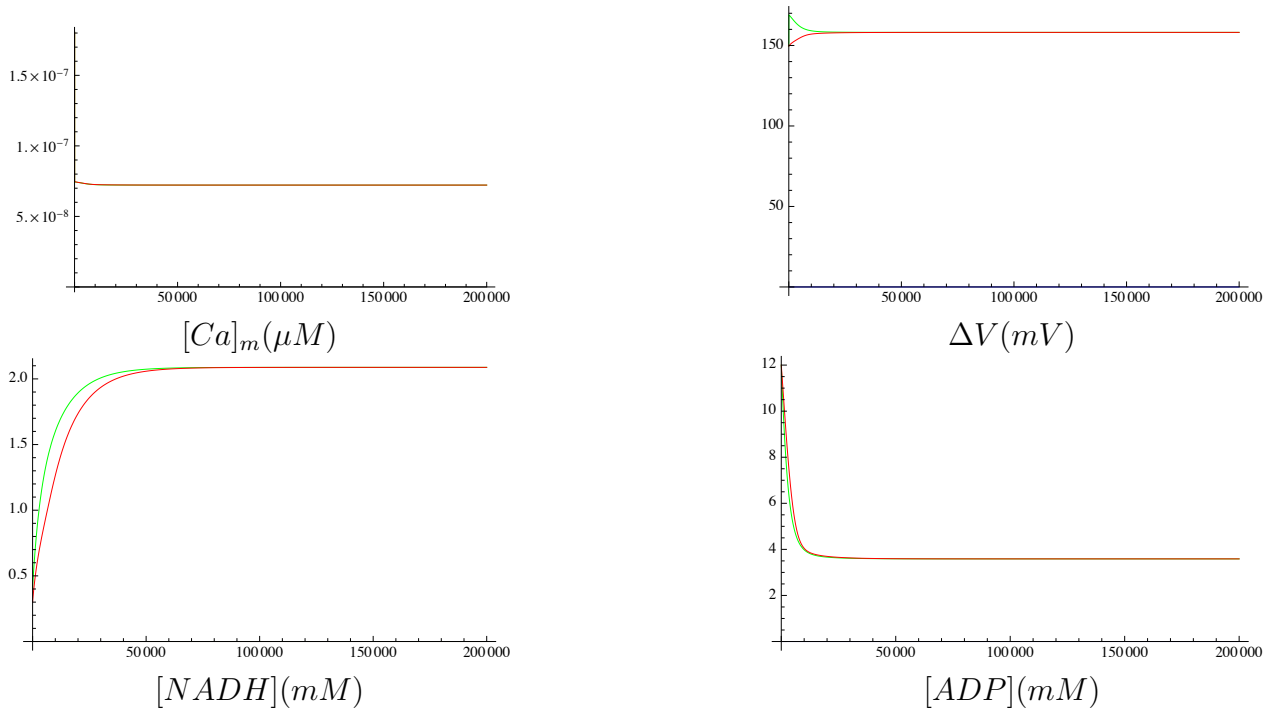


Figura 35: Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 8(verde) e modelo MK (vermelho).

Conforme desejávamos o modelo apresenta o mesmo ponto de equilíbrio que o modelo MK e este ponto é estável.

Curiosamente, as funções do modelo de Bertram com esses 4 parâmetros alterados não coincidem com as do modelo MK (Figura 36) o que pode indicar que o modelo modificado não apresente a mesma dinâmica do modelo MK em resposta a estímulos externos. Se isso de fato ocorrer, então as equações do modelo de Bertram não permitem simultaneamente atingir o ponto de equilíbrio fisiológico para suas variáveis e apresentar a mesma resposta qualitativa a estímulos. Verifiremos este ponto na seção 4.1.3.

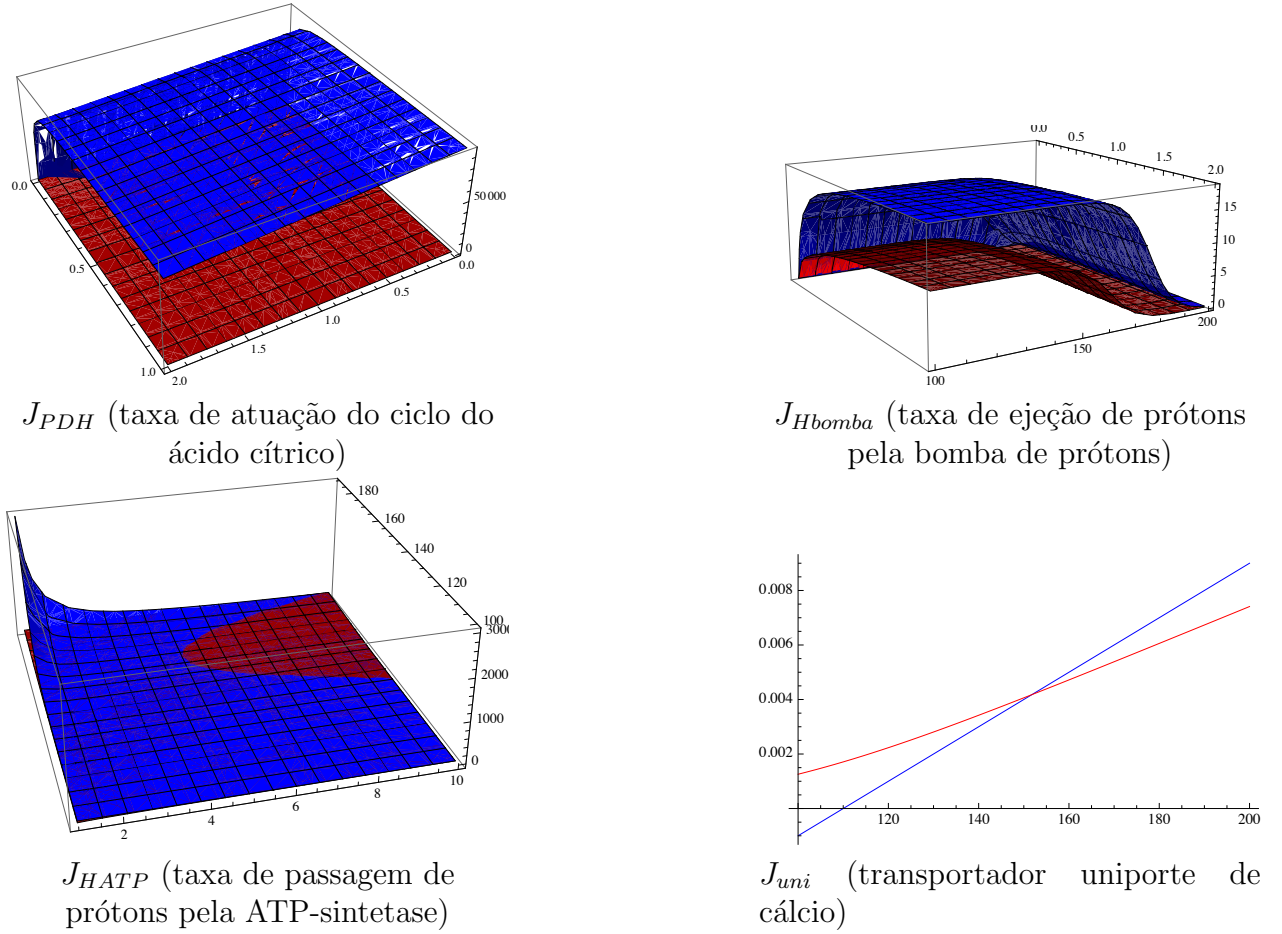


Figura 36: Modelo de Bertram com valores alterados para os parâmetros apresentados na Tabela 8 (azul) e modelo MK (vermelho).

4.1.3 Pontos de equilíbrio para outros valores de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$

Vimos que com o ajuste dos parâmetros do modelo de Bertram conseguimos que este apresentasse o mesmo ponto de equilíbrio que o modelo MK. No entanto, para fazer essa avaliação foi usado um valor fixo de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$ ($[Ca]_c = 0.1\mu M$ e $[FBP]_c = 35\mu M$). Este valor corresponde ao encontrado fisiologicamente em diversas células quando há estímulo externo para a produção de ATP (HERS; HUE, 1983; NELSON; COX, 2008).

No entanto, na ausência de tal estímulo os valores desses parâmetros se alteram e, consequentemente, o ponto de equilíbrio dos modelos irá se modificar. Gostaríamos, então, de avaliar qual a resposta apresentada pelos modelos de MK e Bertram, assim como pelas versões modificadas que obtivemos para o modelo de Bertram em diversos valores desses parâmetros que ainda estejam em regiões fisiologicamente atingíveis. Para isso, determinamos o valor

de equilíbrio do ATP desses modelos para diversos valores desses parâmetros externos. A superfície de resposta se encontra na Figura 37. Escolhemos o ATP para a construção da superfície pois esse é o *output* principal dos modelos.

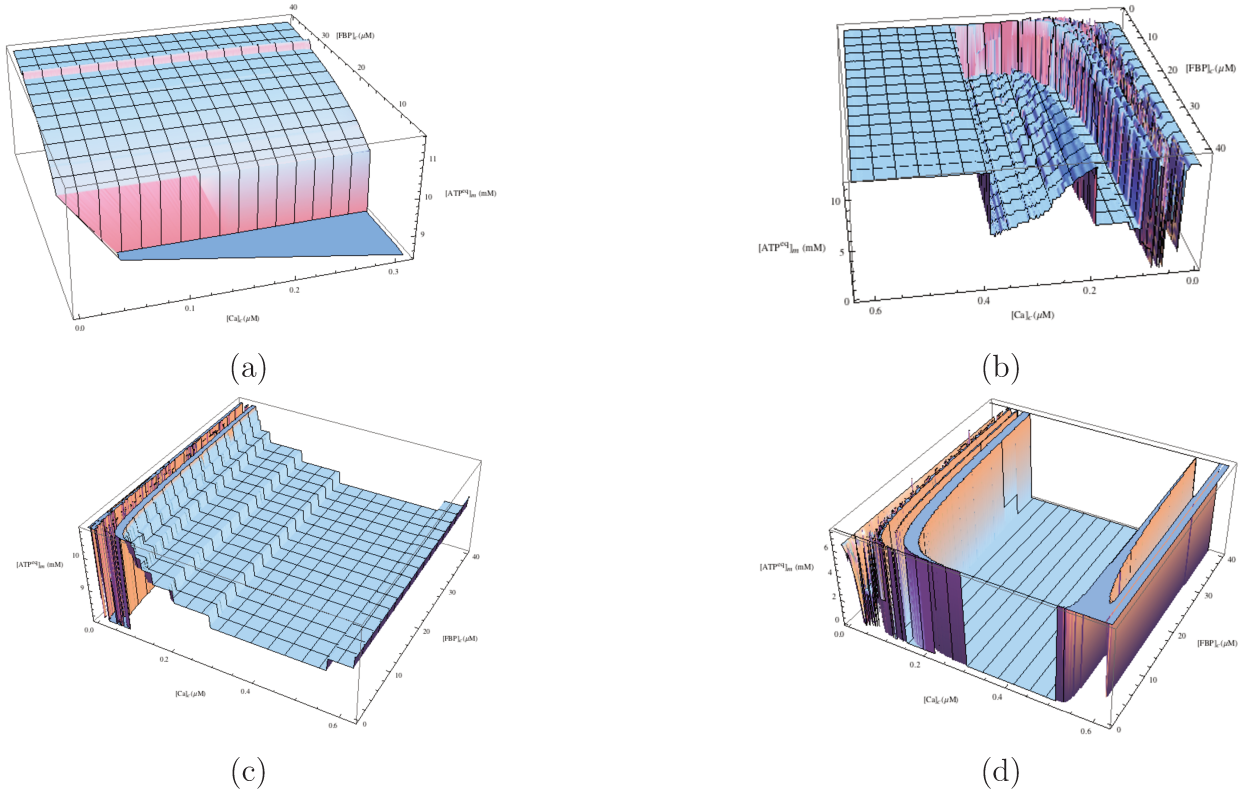


Figura 37: Valor de equilíbrio da concentração de ATP na mitocondria de acordo com o valor de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$. (a) modelo MK; (b) modelo de Bertram; (c) $[NADH](mM)$; (d) $[ADP](mM)$.

Vemos que o modelo de Bertram e as suas versões modificadas apresentam um comportamento bastante distinto entre si e com o modelo MK. Em particular, no modelo MK o valor de equilíbrio da $[ATP]_m$ é mais sensível à concentração de FBP que de cálcio. Já no modelo de Bertram, e nos modificados, o cálcio é mais importante nesse controle. Fisiologicamente, o modelo de MK está mais correto. Além disso, no modelo de Bertram há um grande ruído para valores pequenos de $[Ca]_c$. Com isso, os modelos obtidos podem não reproduzir bem o comportamento fisiológico em alguns limites. Sendo assim, buscamos uma nova modificação que possuísse os mesmos pontos de equilíbrio do modelo MK para valores fisiológicos de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$.

4.2 Novas equações simplificadas - Modificação III

Dentre as funções presentes nos modelos de MK e Bertram, apenas 3 dependem explicitamente de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$: J_{PDH} (de $[FBP]_c$), J_{NaCa} e J_{uni} (de $[Ca]_c$). A J_{PDH} de ambos modelos depende de $[FBP]_c$ através da função J_{GPDH} , de modo que uma alteração neste parâmetro afetaria ambas as funções da mesma forma. O mesmo ocorre para a dependência da J_{NaCa} em relação ao $[Ca]_c$, onde em ambas tem-se o fator $1/[Ca]_c$. Já para o J_{uni} a dependência com $[Ca]_c$ de ambos os modelos é diferente. Enquanto no modelo de Bertram há uma dependência quadrática com este parâmetro, no modelo MK a dependência é bem mais complexa. Então essa foi a função selecionada para ter sua expressão modificada.

A nova expressão obtida para J_{UNI} foi:

$$J_{UNI}^{MOD} = [Ca]_c \left(1 + \frac{[Ca]_c}{k_{trans}} p_{21}^{MOD} \Delta V - p_{22}^{MOD} \right) \quad (4.1)$$

Nesta expressão buscou-se manter uma dependência em ΔV semelhante à do modelo de Bertram, mas com dependência em $[Ca]_c$ semelhante à encontrada no modelo MK.

Devido aos diversos erros de transcrição, o J_{ANT} do artigo de Bertram apresentava uma superfície de resposta bem distinta do modelo MK. Sendo assim, essa função foi substituída pela versão do MK com a modificação $[ATP]_m/[ADP]_m \approx [ATP]_c/[ADP]_c$.

Os parâmetros do modelo foram ajustados a partir do ponto de equilíbrio como na seção 4.1.2. Quatro parâmetros foram alterados e os valores obtidos encontram-se na Tabela 9. Os demais continuam apresentando o valor do modelo de Bertram.

Tabela 9: Parâmetros do modelo de Bertram e obtidos pela versão deste modelo onde a equação para J_{UNI} modificada para a expressão 4.1 e usando J_{ANT} do modelo MK.

Parâmetro	Modelo de Bertram	Ajuste do ponto de equilíbrio para modelo modificado
p1	400	33.100.000
p13	10mM	-24.61mM
p18	-0,03 $\mu\text{M/ms}$	-0.58 $\mu\text{M/ms}$
p23	0,001 $\mu\text{M/ms}$	5390 $\mu\text{M/ms}$

Usando os parâmetros novos, verifica-se que o ponto de equilíbrio está bem próximo

do encontrado no modelo MK (38).

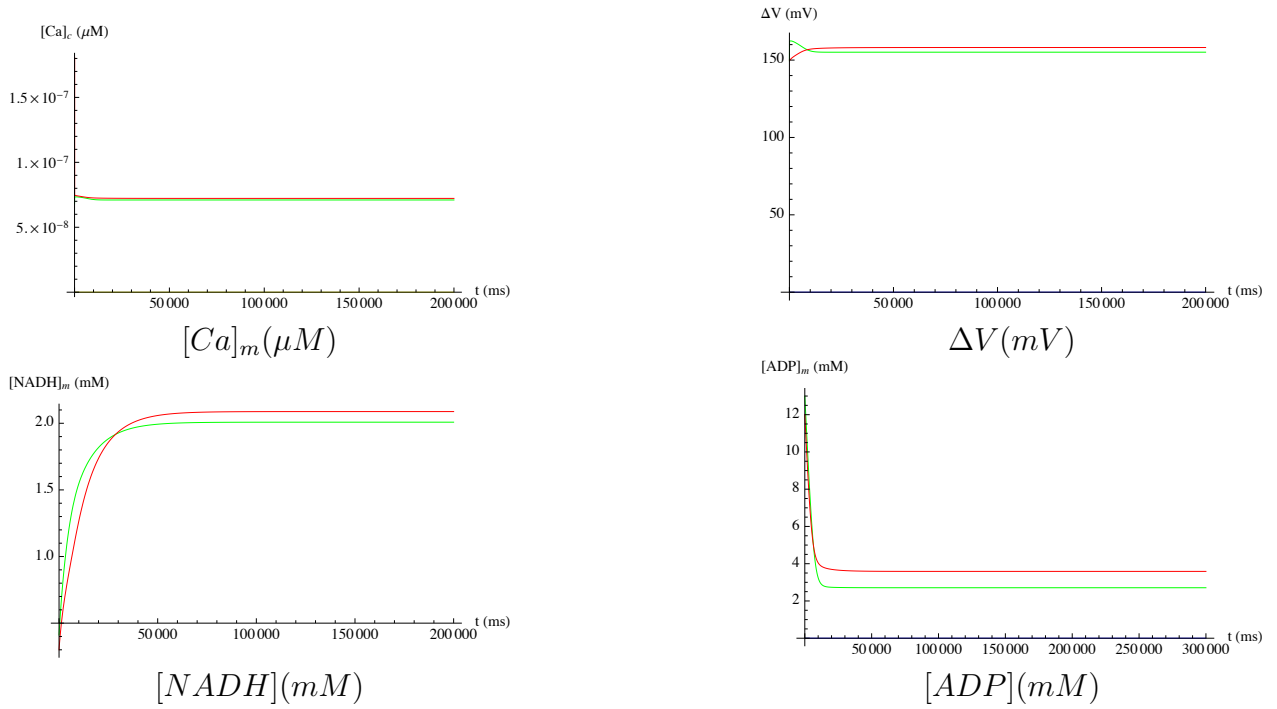


Figura 38: Modelo de Bertram modificado usando os parâmetros presentes na Tabela 9(verde) e modelo MK (vermelho).

O valor de equilíbrio para o ATP de acordo com o $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$ também foi determinado, verificando-se que essas alterações efetuadas foram suficientes para fazer com que o modelo apresentasse uma superfície de resposta que, como a do MK, fosse mais sensível à $[FBP]_c$ que ao $[Ca]_c$. O valor de cálcio onde essa transição ocorre não é a mesma para o modificado III e para o MK. Esse ajuste precisa ser feito de forma mais fina e com mais cautela.

Com essa terceira estratégia de modificar o modelo de Bertram foi possível obter uma versão que tem um comportamento qualitativamente semelhante ao MK e que apresenta equações mais simples.

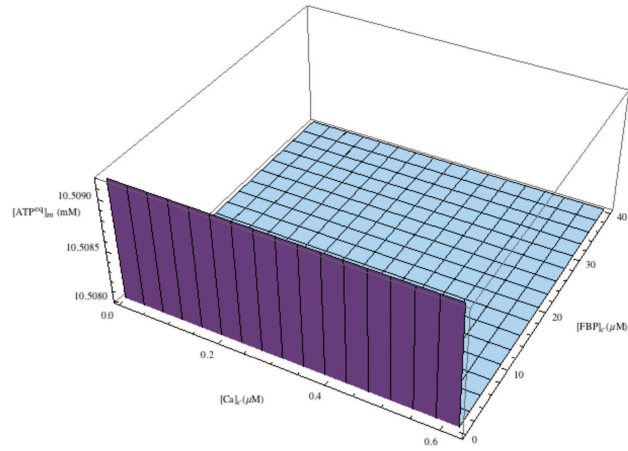


Figura 39: Valor de equilíbrio da concentração de ATP na mitocôndria de acordo com o valor de $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$.

Conclusões

Verificamos que construir um modelo para descrever o processo de produção de ATP que dê resultados condizentes com o esperado fisiologicamente mas que também apresente equações simples não é uma tarefa trivial. A produção de ATP envolve diversas etapas e cada uma das variáveis dinâmicas presentes influencia a dinâmica das demais. Além disso, é necessário que os modelos avaliados sejam sensíveis ao valor dos *inputs* $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$, pois estes são os fatores alterados quando há estímulo para produção de ATP. Mas a resposta a essas variáveis precisa ser condizente com o esperado fisiologicamente e, conforme vimos, a estrutura de um dado modelo é importante na determinação dessa resposta. Qualitativamente, essa estrutura pode ser mais importante que o valor apresentado pelos parâmetros do modelo para a resposta às variáveis externas.

Observamos diversas inconsistências, algumas grosseiras, no modelo de Bertram em relação ao MK. Além disso, o modelo de Bertram mostrou-se sensível à variações nos seus parâmetros o que pode ser ruim, pois esses parâmetros são obtidos a partir de dados biológicos, que apresentam precisão limitada.

Os modelos que obtivemos são mais simples e de fácil interpretação que o MK, mantendo os benefícios trazidos pelo de Bertram. No entanto, como o original de Bertram, os novos modelos não reproduzem completamente o modelo MK. Isso é particularmente preocupante se lembrarmos que aqui foram avaliados apenas os pontos de equilíbrio para o qual cada modelo caminha. Ao se avaliar a resposta dinâmica dos modelos a variações dos *inputs*, $[Ca]_c$ e $[FBP]_c$ (não só a diferentes valores, mas a mudança temporal destas variáveis), é possível que mais diferenças sejam observadas. Vemos, então, que se apoiar no modelo de Bertram pode não ser uma boa estratégia para obter um bom modelo.

Essa busca deve continuar pois um modelo que satisfaça essas exigências pode ser muito importante para estudos fisiológicos.

Esses modelos podem ser incluídos em simulações maiores, onde a cascata de produção de ATP é apenas uma pequena parte. Modelos que visem descrever o comportamento de

uma célula por inteiro, por exemplo, podem fazer uso dele (MAGNUS; KEIZER, 1997).

Estes podem, ainda, ser usado em simulações mais amplas. Células beta pancreáticas liberam insulina de acordo com o nível de ATP presente. Altas concentrações de ATP promovem o fechamento dos canais de potássio presentes na membrana celular e, com isso, ocorre um aumento da concentração intracelular de potássio causando despolarização. Essa despolarização leva à abertura de canais de cálcio, aumentando a concentração intracelular de cálcio. Em resposta há secreção de insulina que sinaliza para que a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas aumente (MAGNUS; KEIZER, 1997; BOSCHERO, 1998).

Estudos fisiológicos podem, também, se beneficiar dessa simplificação das equações. Com as equações mais simples é possível obter informações sobre o comportamento das variáveis dinâmicas mesmo sem resolver analiticamente as equações.

De maneira geral, qualquer descrição de processos metabólicos pode se beneficiar do uso de um modelo simples que descreva a produção de ATP. Esperamos, com este trabalho, ter caminhado um pouco em direção a obtenção de um modelo simples e fisiologicamente plausível para descrever este processo.

Referências

- ALLEN, S. P.; STONE, D.; MCCORMACK, J. G. The loading of fura-2 into mitochondria in the intact perfused rat heart and its use to estimate matrix ca^{2+} under various conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 24, n. 7, p. 765 – 773, 1992. ISSN 0022-2828. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022282892933906>>.
- BAYSAL, K. et al. Na(+)-dependent ca^{2+} efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive $ca^{2+}/2na^{+}$ exchanger. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 266, n. 3, p. C800–C808, 1994. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/266/3/C800.abstract>>.
- BERTRAM, R. et al. A simplified model for mitochondrial atp production. *Journal of Theoretical Biology*, v. 243, n. 4, p. 575 – 586, 2006. ISSN 0022-5193. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519306003225>>.
- BOHNENSACK, R. The role of the adenine nucleotide translocator in oxidative phosphorylation. a theoretical investigation on the basis of a comprehensive rate law of the translocator. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 1, n. 14, p. 45 – 61, 1982.
- BOSCHERO, A. e. a. Potassium channels sensibles to atp and insulin secretion: physiopathological aspects of the familial hyperinsulinism. *Arquivos brasileiros de endocrinologia metabolica*, v. 42, n. 1, p. 29–35, 1998.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. vi. the effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J.Biol.Chem.*, v. 221, n. 1, p. 477–489, 1956. Cited By (since 1996): 28. Disponível em: <www.scopus.com>.
- CORTASSA, S. et al. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophysical Journal*, v. 84, n. 4, p. 2734 – 2755, 2003. ISSN 0006-3495. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349503750796>>.
- CORTASSA et al, S. A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophysical Journal*, v. 91, n. 4, p. 1564 – 1589, 2006. ISSN 0006-3495. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506718677>>.
- GRIFFITHS, E. J.; RUTTER, G. A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial atp production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1787, n. 11, p. 1324 – 1333, 2009. ISSN 0005-2728. Mitochondrial Calcium in Health and Disease. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527280900036X>>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of Medical Physiology*. 11. ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2006. 829-839;889-901 p.

HERS, H. G.; HUE, L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 53, p. 617–53, 1983.

JUNG, D. W.; BAYSAL, K.; BRIERLEY, G. P. The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 2, p. 672–678, 1995. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/270/2/672.abstract>>.

KATZ, L. A. et al. Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 256, n. 1, p. H265–H274, 1989. Disponível em: <[http://ajpheart.physiology.org/content/256/1-H265.abstract](http://ajpheart.physiology.org/content/256/1/H265.abstract)>.

LUENBERGER, D. G. *Introduction to Dynamical Systems: Theory, Models and Applications*. 1. ed. New York: John Wiley Sons, 1979. 135-150;316-339 p.

MAGNUS, G.; KEIZER, J. Minimal model of β -cell mitochondrial ca^{2+} handling. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 273, n. 2, p. C717–C733, 1997. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/273/2/C717.abstract>>.

MAGNUS, G.; KEIZER, J. Model of β -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. i. cytoplasmic variables. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 274, n. 4, p. C1158–C1173, 1998. Disponível em: <[http://ajpcell.physiology.org/content/274/4-C1158.abstract](http://ajpcell.physiology.org/content/274/4/C1158.abstract)>.

MAGNUS, G.; KEIZER, J. Model of β -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. ii. mitochondrial variables. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 274, n. 4, p. C1174–C1184, 1998. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/274/4/C1174.abstract>>.

MCCORMACK, J. G.; DENTON, R. M. The activation of pyruvate dehydrogenase in the perfused rat heart by adrenaline and other inotropic agents. *Biochemical Journal*, v. 194, n. 2, p. 639–643, 1981. Cited By (since 1996): 13. Disponível em: <www.scopus.com>.

MCCORMACK, J. G.; DENTON, R. M. Role of ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of ca^{2+} . *Biochemical Journal*, v. 218, n. 1, p. 235–247, 1984. Cited By (since 1996): 45. Disponível em: <www.scopus.com>.

MCCORMACK, J. G.; ENGLAND, P. J. Ruthenium red inhibits the activation of pyruvate dehydrogenase caused by positive inotropic agents in the perfused rat heart. *Biochemical Journal*, v. 214, n. 2, p. 581–585, 1983. Cited By (since 1996): 26. Disponível em: <www.scopus.com>.

NEELY, J. R. et al. The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochemical Journal*, v. 128, n. 1, p. 147–159, 1972. Cited By (since 1996): 54. Disponível em: <www.scopus.com>.

NELSON, D. L.; COX, M. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 5. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008. 527-646;707-851 p.

PIETROBON, D.; CAPLAN, S. R. Flow-force relationships for a six-state proton pump model: intrinsic uncoupling, kinetic equivalence of input and output forces, and domain of approximate linearity. *Biochemistry*, v. 21, n. 24, p. 5764 – 5776, 1985.

RIZZUTO ALEC W. M. SIMPSON, M. B. A. R.; POZZAN, T. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, v. 358, n. 6384, 1992. Mitochondrial Calcium in Health and Disease. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/358325a0>>.

TARASOV, A. I.; GRIFFITHS, E. J.; RUTTER, G. A. Regulation of atp production by mitochondrial Ca^{2+} . *Cell Calcium*, v. 52, n. 1, p. 28 – 35, 2012. ISSN 0143-4160. Special issue on Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in health and disease states. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416012000541>>.

TORNROTH-HORSEFIELD, S.; NEUTZE, R. Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 50, p. 19565–19566, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/105/50/19565.short>>.

UNITT, J. F. et al. Direct evidence for a role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of oxidative phosphorylation in the stimulated rat heart. studies using ^{31}P n.m.r. and ruthenium red. *Biochemical Journal*, v. 262, n. 1, p. 293–301, 1989. Cited By (since 1996): 31. Disponível em: <www.scopus.com>.

WWW.BROOKSCOLE.COM. *The Mitochondrion*. Acesso em 09/07/2012. Disponível em: <http://www.brookscole.com/chemistry_d/templates/student_resources/shared_resources/animations/oxidative/oxidativephosphorylation.html>.

APÊNDICE A – Artigo resultante deste trabalho

Modelling the ATP production in mitochondria

Alberto Saa

*Departamento de Matemática Aplicada,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-859 Campinas, SP, Brazil*

Kellen M. Siqueira

*Instituto de Física “Gleb Wataghin”,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-859 Campinas, SP, Brazil*

Abstract

We revisit here the mathematical model for ATP production in mitochondria introduced recently by Bertram, Pedersen, Luciani, and Sherman (BPLS) as a simplification of the more complete but intricate Magnus and Keizer’s model. We correct some inaccuracies in the BPLS original approximations and then analyze some of the dynamical properties of the model. We infer from exhaustive numerical explorations that the enhanced BPLS equations have a unique attractor fixed point for physiologically acceptable ranges of mitochondrial variables and respiration inputs. We determine, in the stationary regime, the dependence of the mitochondrial variables on the respiration inputs, namely the cytosolic concentration of calcium Ca_c and the substrate fructose 1,6-bisphosphate FBP. The same effect of calcium saturation reported for the original BPLS model is observed here. We find out, however, an interesting non-stationary effect: the inertia of the model tends to increase considerably for high concentrations of calcium.

Keywords: Mitochondria, Calcium, ATP, Mathematical model

1. Introduction

The exchange of energy in cells is mostly mediated by ATP (adenosine triphosphate) molecules. Such molecules are produced in several processes in

Email addresses: asaa@ime.unicamp.br (Alberto Saa), kellenms@ifi.unicamp.br (Kellen M. Siqueira)

an eukaryotic cell, but the principal source of ATP is typically the oxidative phosphorylation process which takes place in mitochondria. The mitochondrion is an organelle with two membranes, having, therefore, two distinct bulk regions: the intermembrane space and the mitochondrial matrix. In the inner membrane, there are plenty of protein transporters and ionic channels, some of which execute an active transport leading to a gradient of some ions and molecules [1, 2]. The metabolic cascade that leads to the production of ATP in the mitochondrion starts in the cytoplasm. At first, glucose is transported from the extracellular medium into the cytoplasm by GLUT transporters. It is then converted in glucose-6-phosphate (G6P) by the enzyme hexokinase. G6P is then converted in pyruvate in a process called glycolysis, in which there is a net production of two ATP molecules. The pyruvate produced is transported into the mitochondrion (to the mitochondrial matrix) and is metabolized in a series of oxidation-reduction reactions in the citric acid cycle leading to the production of the nicotinamide adenine dinucleotide NAD and flavin adenine dinucleotide FAD. These electron donor molecules are oxidized in the complexes I to IV present in the inner mitochondrial membrane. These reactions lead to the activation of a proton pump, creating a pH gradient between the inter membrane space and the matrix. The protons pumped into the intermembrane space return to the matrix through a transporter that uses their energy to catalyze the conversion of ADP (adenosine diphosphate) into ATP. The ATP produced in the mitochondria is then transported to the cytoplasm by the ATP/ADP exchanger [1, 2].

The kinetic aspects of the processes involved in the ATP production in mitochondria are rather intricate. This issue was addressed by Magnus and Keizer (MK), who introduced in the series of papers [3, 4, 5] a theoretical kinetic model for ATP production in mitochondria based on the known biophysical properties of the enzymes and transporters involved in the process. In fact, the MK model was built by considering electrical activity and cytosolic calcium handling in insulin-secreting pancreatic β -cells. The model consists basically in a set of equations describing the dynamics of the citric acid cycle, the proton pump, and the inner mitochondrial membrane transporters of ATP and calcium. The MK model is effectively based on first biophysical principles and provides a very detailed and accurate description of the processes considered to be important for mitochondrial oxidative phosphorylation. However, it is also a rather complex model with cumbersome equations, preventing a systematic mathematical study of its dynamical and physiological properties.

A simplification of the MK model aiming to retain its main dynamical properties was introduced recently by Bertram, Pedersen, Luciani, and Sherman (BPLS) in [6]. The BPLS model incorporates some refinements introduced by Cortassa *et al.* in [7] for the description of the ATP production in cardiac cells. In fact, BPLS model can be considered as an approximation of the Cortassa *et al.*'s model instead of the original MK one. As we will see, this was probably the origin of some inaccuracies in the BPLS equations. As in the original MK model, the mitochondrial ATP production in the BPLS model is governed by four dynamical variables, namely the potential drop in the inner membrane ΔV and the mitochondrial concentrations of: reduced nicotinamide adenine dinucleotide NADH, adenosine diphosphate ADP, and calcium Ca_m . The mitochondrial concentrations of pyridine and adenine nucleotides are assumed to be conserved

$$NAD_m + NADH_m = NAD_{tot}, \quad (1)$$

$$ADP_m + ATP_m = A_{tot}, \quad (2)$$

where NAD_{tot} and A_{tot} stand for the total mitochondrial concentration of the respective nucleotides. The balance of the pertinent fluxes and reactions yields to the following equations

$$\frac{d}{dt}NADH = J_{PDH} - J_0, \quad (3)$$

$$\frac{d}{dt}ADP = J_{ANT} - J_{F1F0}, \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt}Ca_m = f_m(J_{uni} - J_{NaCa}), \quad (5)$$

$$\frac{d}{dt}\Delta V = C_m^{-1}(J_H - J_{ANT} - J_{NaCa} - 2J_{uni}), \quad (6)$$

where

$$J_H = J_{H,res} - J_{H,ATP} - J_{H,leak}. \quad (7)$$

The derivation and meaning of the fluxes presented in the right-handed sides of Eq. (3)-(6) are rather involved. The main details and the pertinent references can be found in the BPLS paper [6]. We have checked carefully the derivation of each of these fluxes and we have found out some inaccuracies in the BPLS expressions for adenine nucleotide translocator rate J_{ANT} and for calcium uniporter rate J_{uni} . As we will see, these problems probably have

originated in the transcription of the original MK equations to the Cortassa *et al.*'s model.

In the present paper, we propose some enhanced approximations in the BPLS framework for the fluxes J_{ANT} and J_{uni} and analyze some of the dynamical properties of Eqs. (3)-(6). We show, in particular, that for physiologically acceptable ranges of mitochondrial respiration inputs, namely the cytosolic concentration of calcium Ca_c and the substrate fructose 1,6-bisphosphate FBP, the BPLS equations have a unique physiologically acceptable attractor fixed point. Exhaustive numerical explorations indicate that the BPLS model is indeed globally stable, reinforcing its relevance to physiological quantitative studies, despite its simplicity when compared to the MK original model. We determine, in the stationary regime, the dependence on constant respiration inputs Ca_c and FBP of the of the four mitochondrial variables considered in the model. As in the original BPLS model, we observe here qualitatively distinct behavior for low and high Ca_c concentration excitations. We detect, moreover, a non-stationary effect: the inertia of the model tends to increase considerably for high concentrations of calcium.

2. The Enhanced BPLS Model

We will focus here in the problems for the BPLS expressions for the adenine nucleotide translocator rate J_{ANT} and for calcium uniporter rate J_{uni} , since all the other quantities appearing in (3)-(6) were checked to be correct and accurate for the physiological ranges of variables and parameters. The MK expression for the former is (see Eq. (16) of [3])

$$J_{\text{ANT}} = V_{\text{max,ANT}} \frac{1 - \frac{\text{ATP}_c}{\text{ADP}_c} \frac{\text{ADP}_m}{\text{ATP}_m} e^{-\frac{F\Delta V}{RT}}}{\left(1 + \frac{\text{ATP}_c}{\text{ADP}_c} e^{-f\frac{F\Delta V}{RT}}\right) \left(1 + \frac{\text{ADP}_m}{\text{ATP}_m}\right)}. \quad (8)$$

The precise meaning of all the quantities presented in this formula can be found in [3, 4, 5] or in the BPLS paper [6] as well. On the other hand, the expression for J_{ANT} presented in the Eq. (35) of the Cortassa *et al.* paper [7] lacks the exponential in the numerator as in (8). The BPLS expression for J_{ANT} , obtained probably from Cortassa *et al.*'s Eq. (35), is

$$J_{\text{ANT}} = p_{19} \left(\frac{\frac{\text{ATP}_m}{\text{ADP}_m}}{\frac{\text{ATP}_m}{\text{ADP}_m} + p_{20}} \right) e^{0.5 \frac{F\Delta V}{RT}}, \quad (9)$$

where p_{19} and p_{20} are numerical parameters. Notice that Eq. (35) of the BPLS paper has also a mistake in the denominator. The (reasonable) hypothesis used to simplify (8) in the BPLS model is the assumption that, due to the ion transporters action, the rates of ATP to ADP in the mitochondrial matrix and in the cytoplasm are approximately the same,

$$\frac{\text{ATP}_c}{\text{ADP}_c} \approx \frac{\text{ATP}_m}{\text{ADP}_m}. \quad (10)$$

Note that this assumption implies from (8) that $J_{\text{ANT}} \approx 0$ for $\text{ATP}_m \rightarrow A_{\text{tot}}$ (and, hence, $\text{ADP}_m \rightarrow 0$ according to (2)), which is incompatible with the BPLS expression (9). The same occurs for the limit $\Delta V \rightarrow 0$. With the assumption (10) and taking into account the conservation of mitochondrial pyridine nucleotides (2), the adenine nucleotide translocator rate reads

$$J_{\text{ANT}} = V_{\text{max,ANT}} \frac{\text{ATP}_m}{A_{\text{tot}}} \frac{1 - e^{-\frac{F\Delta V}{RT}}}{1 + \frac{\text{ATP}_m}{\text{ADP}_m} e^{-f\frac{F\Delta V}{RT}}}. \quad (11)$$

This is our first proposed approximation, which captures all the essential properties of (8) and is simple enough to be mathematically manipulated. Notice that for the typical range of physiological parameters, neglecting the exponential in the numerator of (11) implies an relative error inferior to 5%. We will not, however, adopt this further approximation in this work. Figure (1) illustrate the discrepancies between the expressions (9) and (11) for typical physiological ranges of the parameters and variables. An inspection of the graphics 9(B) of [6] reveals that they have probably compared their approximated expression with their Eq. (35), which was transcribed incorrectly from Cortassa's paper [7].

With respect to the calcium uniporter rate J_{uni} , the original MK expression reads (see Eq. (19) in [3])

$$J_{\text{uni}} = V_{\text{max,uni}} \frac{\frac{2F}{RT}(\Delta V - \Delta V_0)}{1 - e^{-\frac{2F}{RT}(\Delta V - \Delta V_0)}} \frac{\frac{\text{Ca}_c}{K_{\text{trans}}} \left(1 + \frac{\text{Ca}_c}{K_{\text{trans}}}\right)^3}{\left(1 + \frac{\text{Ca}_c}{K_{\text{trans}}}\right)^4 + \frac{L}{(1 + \text{Ca}_c/K_{\text{act}})^{n_a}}}. \quad (12)$$

In the BPLS derivation of the approximation for J_{uni} , it is used Eq. (38) of Cortassa *et al.* [7], where there is a mistake in the denominator. The BPLS proposed expression for the calcium uniporter rate is

$$J_{\text{uni}} = (p_{21}\Delta V - p_{22})\text{Ca}_c^2, \quad (13)$$

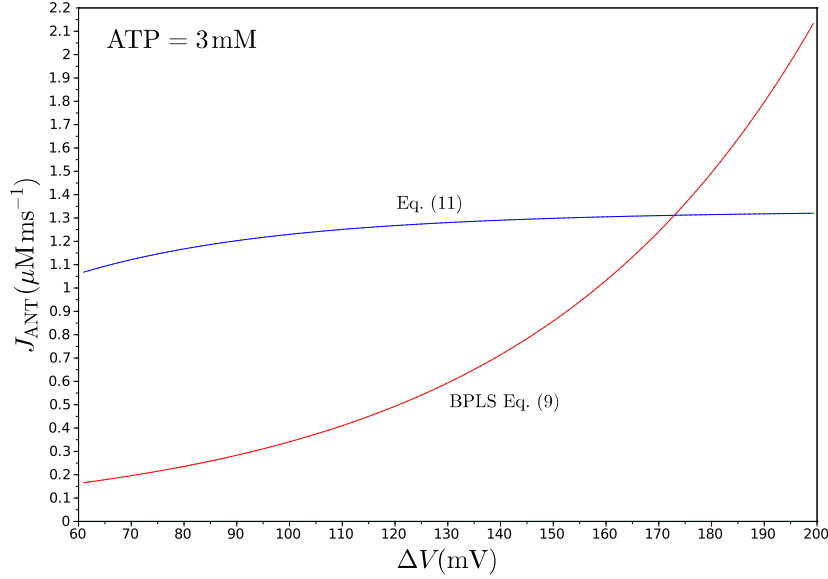


Figure 1: Comparison between the original BPLS expression for the adenine nucleotide translocator rate J_{ANT} (9) and our proposal (11) based on the MK model. Even the concavities of the curves are different. The curves were calculated by assuming $\text{ATP} = 3\text{mM}$ and $A_{\text{tot}} = 15\text{mM}$. An inspection of the graphics 9(B) of [6] reveals that they have probably compared their approximated expression with their Eq. (35), which was transcribed incorrectly from Cortassa’s paper [7].

where p_{21} and p_{22} are numerical parameters. We found this equation to be inaccurate for the typical physiological range of parameters. We propose to keep in the approximated model the complete original MK equation (12). Its dependence on ΔV is already in a rather simple form, and the complications for Ca_c are harmless for the dynamical analysis, as we will show. Now, by introducing the following dimensionless variables

$$x = \frac{\text{NADH}_m}{\text{NAD}_{\text{tot}}}, \quad (14)$$

$$y = \frac{\text{ATP}_m}{A_{\text{tot}}}, \quad (15)$$

$$z = \frac{Ca_m}{Ca_0}, \quad (16)$$

$$w = \frac{\Delta V}{\Delta V_0}, \quad (17)$$

$$u = \frac{Ca_c}{Ca_0}, \quad (18)$$

$$v = \frac{FBP}{FBP_0}, \quad (19)$$

where the constant values are presented in Table 1, and taking into account the new proposed expressions (11) and (12), the rates in the right-handed sides of (3)-(6) will be given by

$$J_{PDH} = r_1 \sqrt{v} \frac{z}{a_1 + z} \left(a_2 + \frac{x}{1 - x} \right)^{-1}, \quad (20)$$

$$J_0 = r_2 \frac{x}{a_3 + x} (1 + a_4 e^{a_5 w})^{-1}, \quad (21)$$

$$J_{ANT} = r_3 y \frac{1 - e^{-a_6 w}}{1 + \frac{y}{1-y} e^{-a_7 w}}, \quad (22)$$

$$J_{F1F0} = r_4 [(a_8 + y) (1 + a_9 e^{-a_{10} w})]^{-1}, \quad (23)$$

$$J_{H,res} = a_{11} J_0, \quad (24)$$

$$J_{H,ATP} = a_{12} J_{F1F0}, \quad (25)$$

$$J_{H,leak} = r_5 (w - a_{13}), \quad (26)$$

$$J_{NaCa} = r_6 \frac{z}{u} e^{a_{14} w}, \quad (27)$$

$$J_{uni} = r_7 \frac{a_{15} (w - 1)}{1 - e^{-a_{15} (w - 1)}} G(u), \quad (28)$$

where

$$G(u) = \frac{u(1 + a_{16} u)^{n_a} (1 + a_{17} u)^3}{a_{18} + (1 + a_{16} u)^{n_a} (1 + a_{17} u)^4}. \quad (29)$$

The values of the numerical parameters are presented in Table 1. With the new dimensionless variables, the Eqs. (3)-(6) can be cast in the form

$$\dot{x} = \frac{1}{NAD_{tot}} (J_{PDH} - J_0), \quad (30)$$

$$\dot{y} = \frac{1}{A_{tot}} (J_{F1F0} - J_{ANT}), \quad (31)$$

$\text{NAD}_{\text{tot}} = 10 \times 10^3 \mu\text{M}$	$\text{A}_{\text{tot}} = 15 \times 10^3 \mu\text{M}$	$\text{Ca}_0 = 0.2 \mu\text{M}$
$\Delta V_0 = 91 \text{ mV}$	$\text{FBP}_0 = 1 \mu\text{M}$	$C_m = 1.8 \mu\text{M mV}^{-1}$
$V_{\text{max,ANT}} = 5 \mu\text{M ms}^{-1}$	$V_{\text{max,uni}} = 10 \mu\text{M ms}^{-1}$	$\frac{F}{RT} = 0.037 \text{ mV}^{-1}$
$f = 0.5$	$K_{\text{trans}} = 19 \mu\text{M}$	$K_{\text{act}} = 0.38 \mu\text{M}$
$L = 110$	$f_m = 0.01$	$n_a = 2.8$
$r_1 = 0.2 \mu\text{M ms}^{-1}$	$r_2 = 0.6 \mu\text{M ms}^{-1}$	$r_3 = 5 \mu\text{M ms}^{-1}$
$r_4 = 23.3 \mu\text{M ms}^{-1}$	$r_5 = 0.182 \mu\text{M ms}^{-1}$	$r_6 = 0.001 \mu\text{M ms}^{-1}$
$r_7 = 0.11 \mu\text{M ms}^{-1}$		
$a_1 = 0.05$	$a_2 = 1$	$a_3 = 0.01$
$a_4 = 4.23 \times 10^{-16}$	$a_5 = 18.2$	$a_6 = 3.37$
$a_7 = 1.68$	$a_8 = 0.67$	$a_9 = 5.10 \times 10^9$
$a_{10} = 10.7$	$a_{11} = 11.7$	$a_{12} = 3.43$
$a_{13} = 0.16$	$a_{14} = 1.46$	$a_{15} = 6.73$
$a_{16} = 0.52$	$a_{17} = 0.01$	$a_{18} = 110$

Table 1: Numerical parameters and rates for the enhanced BPLS model, see equations (14)-(33). All the values were obtained from [3, 4, 5] and [6].

$$\dot{z} = \frac{f_m}{\text{Ca}_0} (J_{\text{uni}} - J_{\text{NaCa}}), \quad (32)$$

$$\dot{w} = \frac{1}{C_m \Delta V_0} (J_H - J_{\text{ANT}} - J_{\text{NaCa}} - 2J_{\text{uni}}), \quad (33)$$

where f_m and C_m stand, respectively, for the fraction of free Ca ions and the mitochondrial capacitance, see Table 1. Equations (30)-(33) form a non-autonomous systems of four first order differential equations. The external excitations $u(t)$ and $v(t)$ are related, respectively, to the cytosolic concentration of calcium Ca_c and the substrate fructose 1,6-bisphosphate FBP, see Eqs. (18) and (19). We can now start the dynamical analysis of the model.

3. Dynamics of the model

Let us consider initially the fixed points (x_*, y_*, z_*, w_*) of the system (30)-(33) assuming constant inputs (u_*, v_*) . The physiologically meaningful range for the variables x and y is $[0, 1]$ by construction, see (1)-(2) and (14)-(15). For z and w , we assume only that they are non negative. The typical physiological range for the potential drop, however, is more restrictive, corresponding to $\Delta V \approx [90, 225] \text{ mV}$, which is equivalent to $w \approx [1, 2.5]$. For the inputs u and v , we consider the ranges $[0, 10]$ and $[0, 20]$, respectively,

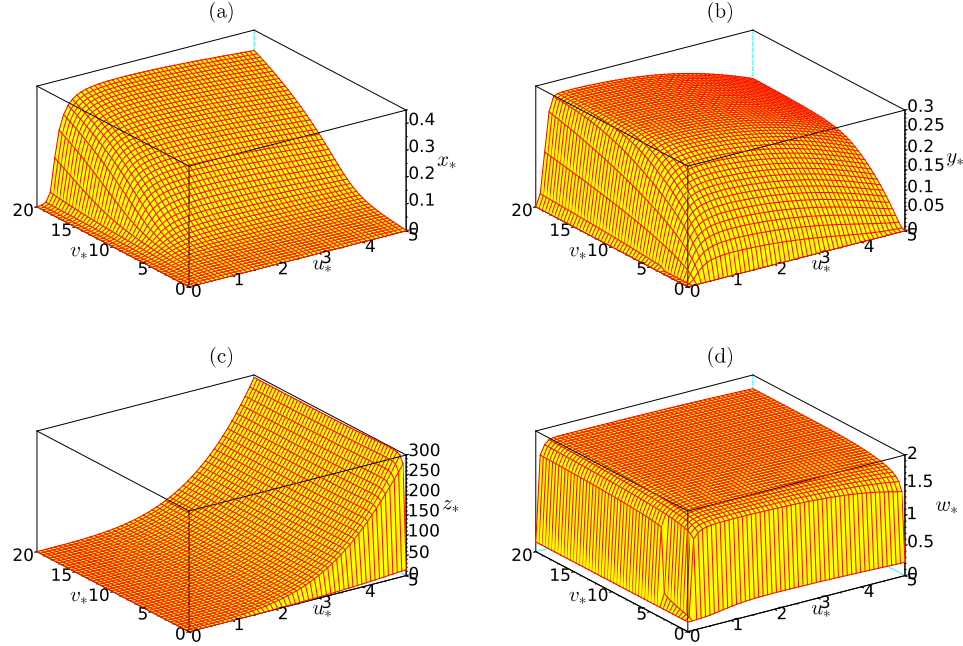


Figure 2: The globally stable physiological fixed point (x_*, y_*, z_*, w_*) of the system (30)-(33) assuming constant inputs (u_*, v_*) .

which corresponds to $\text{Ca}_c \approx [0, 2] \mu\text{M}$ and $\text{FBP} \approx [0, 20] \mu\text{M}$. We perform an exhaustive numerical search [8] for fixed points of (30)-(33) by assuming $u \in [0, 10]$ and $v \in [0, 20]$ constants. For all tested values of u and v , only one physiological ($x, y \in [0, 1]$ both $z, w > 0$) fixed point was found, which is always stable. Moreover, the fixed point is globally stable for physiological ranges of variables, meaning that any solution of (30)-(33) with reasonable initial conditions will tend asymptotically to the fixed point. The variable w and x have the quickest convergence to the fixed point, where y and z are the slowest ones. The values of (x_*, y_*, z_*, w_*) as function of the constant inputs (u_*, v_*) are depicted in Fig. (2), from where one can already observe some physiologically consistent dynamical properties which we describe briefly below.

First, the production of ATP and the concentration of NADH vanishes in the absence of cytosolic calcium Ca_c and/or the substrate fructose 1,6-bisphosphate FBP, *i.e.*, x and $y \rightarrow 0$ for u or $v \rightarrow 0$. Also, we see that for

reasonable values of u and v the value of the potential drop $\Delta V(w)$ is almost constant and close to 150 mV. This stability is probably the reason why the original BPLS model is robust, despite the inaccuracies for the expression of J_{ANT} and J_0 we are correcting in this paper. We will return to this point in the last section.

Another important feature of the BPLS model is the reversion of some mitochondrial variables dynamical behavior in the presence of lower and higher concentration of calcium, which can be simulated, as described in [6], by setting $a_1 = 0$ in the expression for J_{PDH} (20). This conclusion can be inferred from Fig. 2, but it is better illustrated in Fig. 3, which depicts the solutions of (30)-(33) for an oscillatory Ca_c input of the form

$$u(t) = u_0 + u_1 \sin(t/t_0), \quad (34)$$

with constant $v(t)$ and initial conditions $(x(0), y(0), z(0), w(0))$ given by the values of the fixed point corresponding to $u_* = u(0)$ and $v_* = v(0)$. As we will see, such a choice of initial condition is consistent with the adiabatic regime we observe for sufficiently slow inputs (large period t_0). For lower values of u_0 (low Ca_c concentrations), all the mitochondrial variables increases and decreases in synchrony with the variations of u . On the other hand, for higher values of u_0 , the dynamical behavior of x , y and w is reversed. *i.e.*, they tend to decrease/increase while u increases/decreases. This effect can be understood from the relation between u_* and z_* depicted in Fig. 2.c. The value of z_* tends to increase rapidly when u_* increases, and this behavior can be traced back to the condition $J_{\text{NaCa}} = J_{\text{uni}}$ defining the fixed point $\dot{z}_* = 0$. However, for large values of z , the dependence of the expression for J_{PDH} (20) on z saturates and becomes equivalent to setting $a_1 = 0$. Without the z suppression term in J_{PDH} , the dynamical behavior of the variables x , y , and w is reversed, as it was pointed out in the original BPLS analysis. The value of v (FBP) does not change qualitatively this dynamical behavior.

The oscillatory excitations illustrated in Fig. 3 has period $t_0 = 3$ min. For inputs varying over a time scale of minutes, the system evolves adiabatically in a good approximation, *i.e.*, the instantaneous solution $(x(t), y(t), z(t), w(t))$ is well approximated by the fixed point (x_*, y_*, z_*, w_*) corresponding to $u_* = u(t)$ and $v_* = v(t)$. In other words, for slowly varying inputs, the solutions of the system are confined to the fixed-point surfaces depicted in Fig. 2. Of course, one expects a breakdown of this adiabatic behavior for rapidly varying inputs. Non-stationary effects must appear for inputs varying with

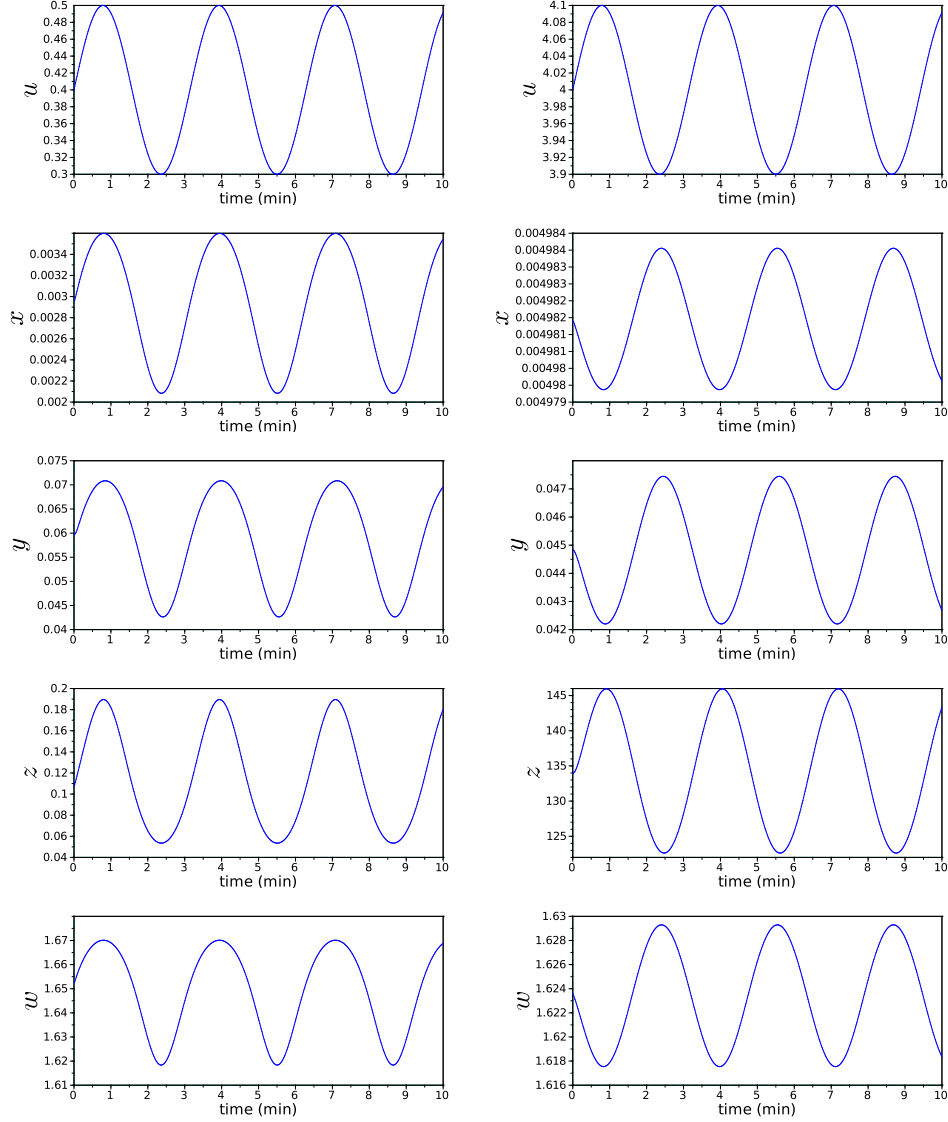


Figure 3: Response of the equations (30)-(33) to oscillatory inputs (34). Notice that for low Ca_c concentrations, all the mitochondrial variables increases and decreases in synchrony with the variations of u . On the other hand, for high Ca_c concentrations, the behavior of x , y and w is reversed. All the curves were evaluated for $\text{FBP} = 0.5 \mu\text{M}$. See the text for further details.

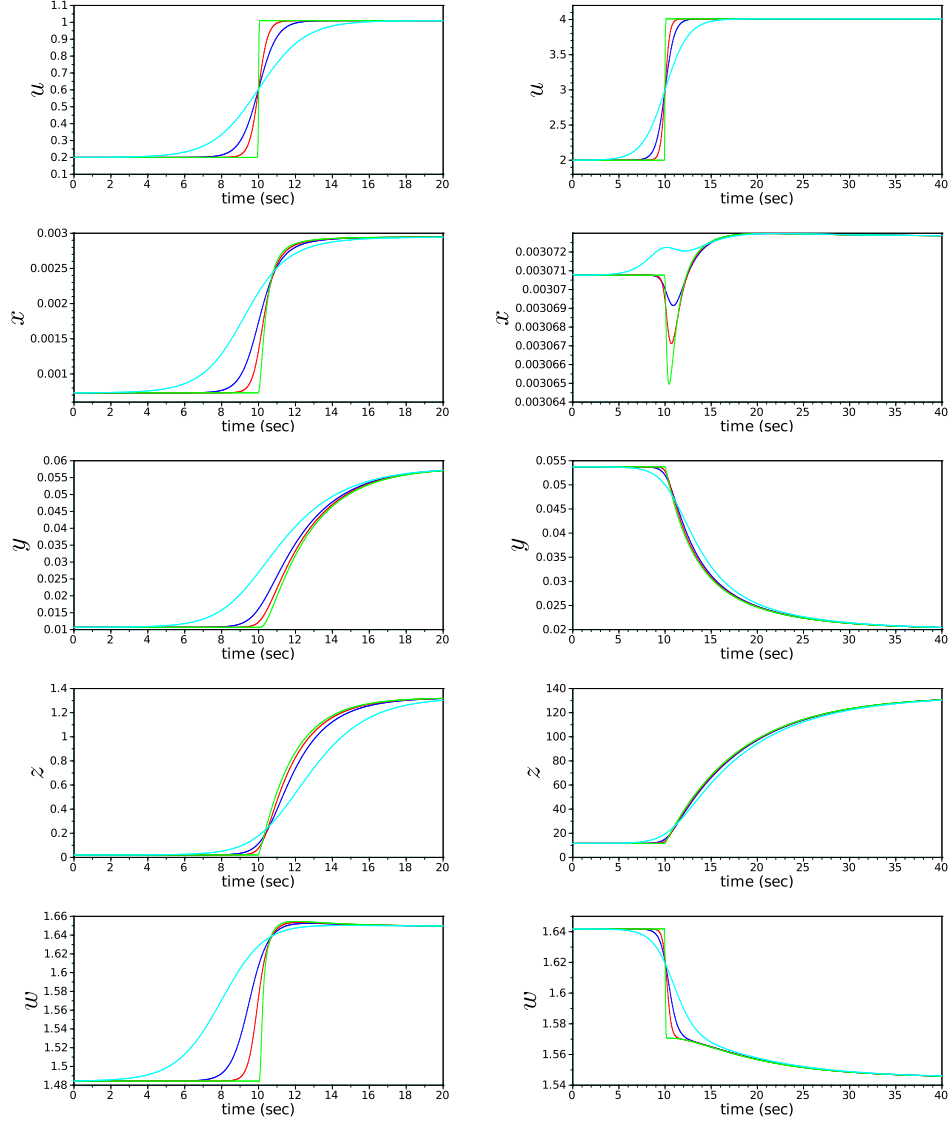


Figure 4: Response of the equations (30)-(33) to step-like inputs (35). The inertia of the system increases considerably for higher values of u , see the text for further details. The curves were evaluated for $\text{FBP} = 0.5 \mu\text{M}$.

a characteristic time smaller than a certain critical value. In order to study non-stationary effects, we consider the response of the system for inputs of

the type

$$u(t) = u_0 + u_1 \tanh(t/t_0), \quad (35)$$

for different values of t_0 . This situation is depicted in Fig. 4 for some values of u_0 and u_1 and for $t_0 = 2.5, 1, 0.5$, and 0.02 seconds. It is clear that for lower values of u (Ca_c), approximately 10 seconds are enough to assure that the system reaches an adiabatic regime. As we have already noticed, the variables y (ATP) and z (Ca_m) are the slowest ones to attain their respective stationary regime. Increasing the values of u implies the increasing of such “relaxation” time. The second column in Fig. 4 corresponds to a situation with $u \in [2, 4]$, for which almost 30 seconds are necessary to assure the attainment of the stationary regime. The inertia of the system, hence, increases considerably for higher concentrations of cytosolic calcium.

4. Final Remarks

We have revisited here the mathematical model for ATP production in mitochondria introduced recently by Bertram, Pedersen, Luciani, and Sherman (BPLS) in [6] as a simplification of the more complete but intricate Magnus and Keizer’s model [3, 4, 5]. We checked carefully all the approximations introduced in the BPLS model and found some inaccuracies for the approximations used for the adenine nucleotide translocator rate J_{ANT} and for calcium uniporter rate J_{uni} . We proposed enhanced approximations for such rates based on the original Magnus and Keizer’s model and analyzed some dynamical properties of the model. Our results for the stationary regime indicate that the BPLS model is indeed globally stable, reinforcing its relevance to physiological quantitative studies, despite its simplicity when compared to the Magnus and Keizer’s model. We have considered also the non-stationary regime and detected an interesting effect: the inertia of the model tends to increase considerably for high concentrations of cytosolic calcium.

It is interesting to notice that the dynamics of our enhanced model are qualitatively similar to the original BPLS one, despite the differences in the rates J_{ANT} and J_{uni} for physiological ranges, as depicted, for instance, in Fig. 1. This point can be understood from the fact that the value of w_* , which does not depends tightly on the details of such rates, is almost constant and corresponding to $\Delta V = 150$ mV for reasonable values of the inputs v_* and u_* . For a fixed value of ΔV , the numerical parameters in (9) can be

fitted to provide a good adjustment for the real ATP dependence of (11). An inspection of Fig. 9 of [6] reveals that the adjustment of their numerical parameters was checked for $\Delta V \approx 160$ mV, which is close to the physiological fixed point.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP and CNPq for the financial support.

References

References

- [1] A. C. Guyton and J. E. Hall, Textbook of Medical Physiology, Elsevier (2006).
- [2] D. L. Nelson and M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company (2004).
- [3] G. Magnus and J. Keizer, Am. J. Physiol. **273**, C717-C733 (1997).
- [4] G. Magnus and J. Keizer, Am. J. Physiol. **274**, C1158-C1173 (1998).
- [5] G. Magnus and J. Keizer, Am. J. Physiol. **274**, C1174-C1184 (1998).
- [6] R. Bertram, M.G. Pedersen, D.S. Luciani, and A. Shermand, J. Theor. Biol. **243**, 575-586 (2006).
- [7] S. Cortassa, M.A. Aon, E. Marban, R.L. Winslow, and B. O'Rourke, Biophys. J. **84**, 2734-2755 (2003).
- [8] Scilab files are available at <http://vigo.ime.unicamp.br/atp>