

**FORMULACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA LA
HOMEOSTASIS DE LA ALFA-2-MACROGLOBULINA**

TESIS DOCTORAL

María Cristina Aguirre

2009

Director: Alfredo Rigalli

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario

A mis padres...

El desarrollo de esta tesis doctoral dió origen a las siguientes presentaciones y publicaciones:

Aguirre MC, Armendariz MN, Rigalli A. Concentración plasmática de una alfa-macroglobulina. Modelo simplificado de su regulación. I Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Huerta Grande. Córdoba 2007.

Aguirre MC, Armendariz MN, Rigalli A, Puche RC. Qualitative analysis of a mathematical model applicable to the gastric absorption of one drug. *Biocell* 30(2): 398. 2006. ISSN 0327-9545.

Aguirre MC, Armendariz MN, Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Plasmatic clearance of alpha-2-macroglobulin monofluorophosphate (A2M-MFP) complex in the rat. Comparison of two methods of measurement. *Biocell* 29(1): 128. 2005. ISSN 0327-9545.

Aguirre MC, Armendariz M, Rigalli A. Análisis cualitativo de un modelo matemático para una proteína. LV Reunión de comunicaciones científicas de la Unión Matemática Argentina. Salta 2005.

Aguirre MC, Armendariz MN, Rigalli A, Puche RC. Análisis cualitativo de un modelo matemático aplicable a la absorción gástrica de una droga. VII Congreso. XXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario 2005

Armendariz MN, Aguirre MC, Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Avances en la modelización matemática de la homeostasis de la alfa-2-macroglobulina en la rata. LIV Reunión de comunicaciones científicas de la Unión Matemática Argentina. Neuquén 2004.

Aguirre MC, Armendariz MN, Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Comparación de dos métodos de medida de la depuración plasmática del complejo alfa-2-macroglobulina-monofluorofosfato (A2M-MFP) en la rata. VI Congreso y XXIV Reunión Científica anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario 2004.

Agradecimientos

Muchas han sido las personas que de forma directa o indirecta han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. Esta tesis, el sueño máximo de mi trayectoria profesional, es el resultado de una larga cadena de encuentros casuales y causales con personas que dejaron su huella. Es difícil nombrarlas sin cometer el error de no mencionar a aquellos pequeños eslabones que mantienen la unidad de la cadena. Mi sincero agradecimiento a todos y muy especialmente:

Al Dr. Alfredo Rigalli por su dedicación y dirección de esta tesis, su enorme interés en la aplicación de la matemática al estudio de los procesos biológicos y la confianza que depositó en mí para llevar adelante este trabajo. Le agradezco su gran apoyo científico y personal durante todos estos años en los que no han faltado ánimos y amistad para seguir adelante.

A Mirta Armendariz, mi amiga y colega, que siempre ha estado dispuesta a escucharme y ayudarme; con ella he compartido la mayor parte de este camino. Le agradezco su inestimable apoyo tanto en lo referente al trabajo como en el plano personal, que me ha soportado y motivado cuando más lo necesitaba. Gracias a su invaluable generosidad este proyecto es un sueño hecho realidad.

Al Dr. Rodolfo C. Puche, por la confianza que depositó en mí para que llevara adelante esta tesis.

A Marta Marzi que realizó una aguda y meticulosa lectura del último borrador.

A todos mis compañeros del grupo de investigación, que me ayudaron a transitar el escabroso camino hacia el conocimiento de las ciencias bioquímicas y médicas, les doy las gracias por haberme apoyado y hecho pasar tantos buenos ratos.

Mi más sincero agradecimiento a toda mi familia. A mis hijos, Andrés, Claudio y Silvina, que aceptaron y me alentaron a transitar el fascinante mundo de la investigación científica. A mi esposo Carlos que soportó las crisis en los fracasos y la euforia en los avances de este proyecto.

A mis padres, Elvira y Enzo, porque me enseñaron a perseguir los sueños y me dieron las alas para alcanzarlos. A ellos que permanecen en el cariño de la familia que forjaron y me acompañan, les dedico esta tesis.

0	Abreviaturas	8
1	INTRODUCCIÓN	10
	1.1 Alfa-2-macroglobulina	10
	1.1.1 Descripción de la alfa-2-macroglobulina	10
	1.1.2 Intervención de la AM en procesos inflamatorios	13
	1.1.3 Receptor LRP1.....	14
	1.2 Monofluorofosfato de sodio	15
	1.2.1 Farmacocinética del MFP.....	16
	1.2.2 Mecanismos de acción de compuestos con flúor sobre el tejido óseo.....	18
	1.3 Modelización matemática.....	22
	1.3.1 Sistemas de ecuaciones en diferencias	23
	1.3.2 Sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias	26
	1.3.3 Estimación de parámetros en sistemas de ecuaciones diferenciales.....	30
	1.3.4 Determinación de los órdenes y constantes de velocidad en una reacción química.....	32
2	OBJETIVOS.....	36
	2.1 Objetivo general.....	36
	2.2 Objetivos específicos.....	36
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
	3.1 Experimentos con ratas	38
	3.2 Inyección endovenosa de MFP	38
	3.3 Administración de MFP por sonda gástrica	39
	3.4 Medición de AM en ratas con operación simulada con pancreatitis.....	39

3.5	Mediciones.....	39
3.5.1	Determinación de la concentración plasmática de AM.....	39
3.5.2	Determinación de la concentración plasmática del complejo AMMFP.....	40
3.6	Determinación de los órdenes de reacción	40
3.7	Experimentos de validación del modelo	40
3.7.1	Experimento de validación del modelo por inyección del complejo AMMFP purificado.....	41
3.7.2	Experimentos de validación del modelo con ácido [5'] poli-inosínico por inyección intravenosa del complejo AMMFP.....	41
3.7.3	Experimentos de validación del modelo con ácido [5'] poli-inosínico con administración de MFP por sonda gástrica.....	42
3.7.4	Experimentos de validación del modelo por coadministración de MFP y calcio.....	42
3.8	Herramientas Matemáticas	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Modelo matemático del equilibrio en la concentración plasmática de AM en ausencia de factores perturbadores externos.....	45
4.2	Modelo matemático del equilibrio en la concentración plasmática de AM en presencia de factores perturbadores externos	54
4.3	Modelo de la homeostasis de la AM en presencia de MFP administrado por vía intravenosa.....	59
4.3.1	Determinación del orden de reacción de inactivación de AM.....	61
4.3.2	Estudio del proceso de captación del complejo AMMFP .	65
4.3.3	Formulación del modelo matemático.....	68
4.3.4	Análisis cualitativo del sistema	70
4.3.5	Identificación y estimación de parámetros.....	92

	4.4	Modelo matemático de la homeostasis de la A2M en presencia MFP administrado por sonda gástrica	98
	4.4.1	Análisis cualitativo del sistema	99
	4.4.2	Identificación y estimación de parámetros.....	110
	4.4.3	Validación del modelo	114
5		DISCUSIÓN.....	119
6		REFERENCIAS	124

0 ABREVIATURAS

x_1	Concentración de AM en plasma
x_2	Concentración de MFP en plasma
x_3	Concentración del complejo AMMFP
x_4	Concentración de MFP en tubo digestivo
k_a	Constante de velocidad de absorción gastrointestinal de MFP
k_c	Constante de velocidad de eliminación de AMMFP del plasma
k_e	Constante de velocidad de eliminación de MFP del plasma
k_i	Constante de velocidad de formación del complejo AMMFP
k_h	Constante de velocidad de hidrólisis del MFP en tubo digestivo
v_a	Velocidad de absorción de MFP en la mucosa gástrica
v_d	Velocidad de absorción de MFP en la mucosa intestinal
v_c	Velocidad de captación del complejo AMMFP
v_e	Velocidad de eliminación de MFP del torrente sanguíneo
v_h	Velocidad de hidrólisis de MFP en la luz intestinal
v_I	Velocidad de inactivación de AM por proteinasas
v_S	Velocidad de secreción de AM por tejidos productores
A1M	Alfa-1-macroglobulina
AM	Alfa-2-macroglobulina
AMMFP	Complejo formado por AM y MFP
AMPC	Adenosin monofosfato-3',5'-cíclico
AMs	Alfa macroglobulinas

E	Ecuación, ejemplo: E1-1
EDO	Ecuación diferencial ordinaria
F ⁻	fluoruro
FA	Flúorapatita
HA	Hidroxiapatita
IP3	Inositol-1,4,5- trifosfato
LRP1	Receptor de AM = LDL receptor related protein
MFP	Monofluorofosfato = monofluorofosfato de sodio
PA	Fosfatasa alcalina
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PZP	Proteína de zona del embarazo
RAP	Proteína asociada al receptor LRP1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Alfa-2-macroglobulina

1.1.1 Descripción de la alfa-2-macroglobulina

La alfa-2-macroglobulina (α 2-macroglobulina = AM) pertenece a la familia de las alfa-macroglobulinas (AMs). Esta familia está constituida por proteínas cuya función principal es ligar e inactivar proteinasas. Se encuentran en la circulación de vertebrados e invertebrados y en huevos de reptiles y aves. Existen diferentes tipos de alfa-macroglobulinas [1, 2, 3], aunque son similares en secuencias, peso molecular y estructura cuaternaria.

La AM es un inhibidor inespecífico de los cuatro tipos de proteinasas conocidos: serin-proteinasas, aspártico-proteinasas, cisteín-proteinasas y metalo-proteinasas. Muchas de estas proteinasas tienen a su vez otros inhibidores específicos más potentes [4,5]. Algunos inhibidores de proteinasas del plasma son alfa-2-antiplasmina, antitrombina III, alfa-1-macroglobulina, alfa-1-inhibidor3, proteína de zona del embarazo (PZP) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

Todas las AMs presentan en su estructura primaria una región conocida como región carnada, ubicada entre los aminoácidos 660-710. Tiene un enlace tioléster que se establece entre la cisteína y la glutamina de la siguiente secuencia de aminoácidos: glicina-cisteína-glicina-glutamato-glutamina. Este enlace es termodinámicamente inestable pero no es cinéticamente reactivo. La región carnada es un sitio de corte para enzimas como la trombina, plasmina, elastasa humana y porcina, quimiotripsina, quimosina, subtilisina, tripsina y colagenasa. La AM es hidrolizada por las proteinasas en la región carnada, produciéndole cambios conformacionales que conducen a la ruptura del enlace tioléster intramolecular. Cuando se hidroliza el tioléster la proteínasa queda unida covalentemente por un enlace amida con el residuo glutamina. El sulfhidrilo libre, originado por la hidrólisis del enlace tioléster puede reaccionar, por ejemplo, con factores de crecimientos y citoquinas. La AM liga factores de crecimiento y citoquinas pero se requiere que esté ligada a proteinasas. Inhibe la tripsina, kaliceína,

INTRODUCCIÓN

plasmina, trombina y además puede ligar factores de crecimiento IL-1 β , TGF- β , TNF, IL6, FGF, hormonas y otras proteínas [6] lo que sugiere fuertemente su intervención en un amplio espectro de respuestas biológicas.

Los cambios que produce la unión covalente de la proteinasa exponen dominios de unión a receptores. El complejo AM-proteinasa es eliminado de circulación por receptores predominantemente del hígado y de otros tejidos. El complejo es luego internalizado al citoplasma y degradado con la participación de lisosomas [7].

La AM es un homotetrámero de 720 kDa, en el cual cada subunidad tiene una masa molecular de 185 kDa y se halla como dos dímeros de 375 kDa. Los monómeros en cada dímero están unidos por puente disulfuro, mientras que los dímeros se unen no covalentemente. (Ilustración 1)

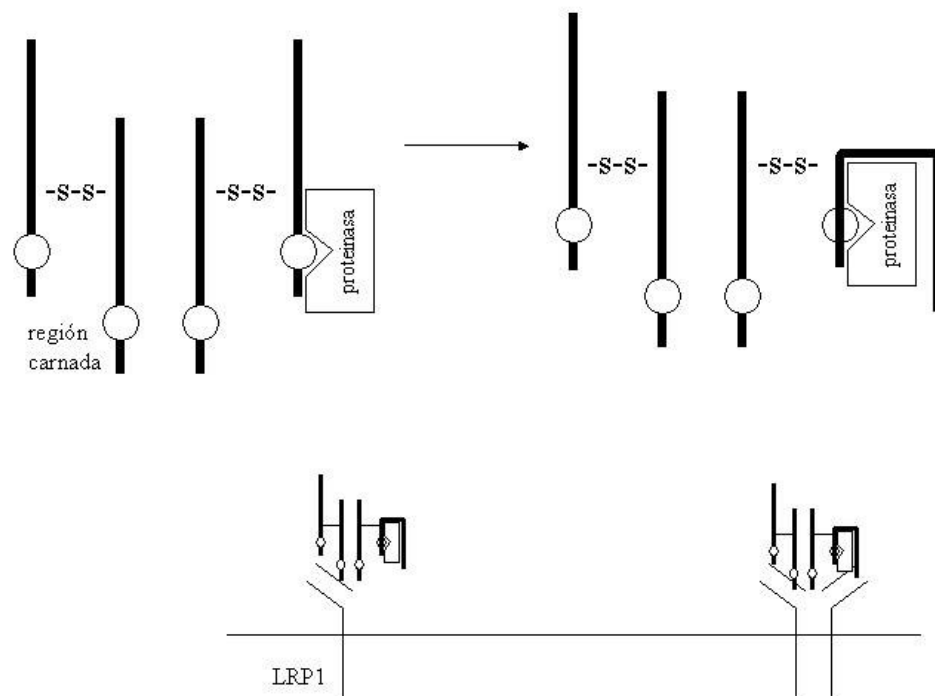


Ilustración 1: Representación esquemática de la estructura de la AM. Tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas. Se muestran puentes disulfuro y región carnada donde ataca la proteinasa (dibujo superior izquierdo). La hidrólisis de la región carnada produce cambios conformacionales (superior derecha) que determinan unión a receptores LRP1 (dibujo inferior)

INTRODUCCIÓN

Al unirse a las proteinasas se produce hidrólisis de la AM generando otros segmentos de pesos moleculares 85, 100 y 130 kDa. La unión de la AM a las proteinasas, no afecta el sitio activo de las enzimas, pero impide la acción de la proteinasa sobre otras proteínas.

Ciertos nucleófilos, como la metilamina y el amonio, pueden producir la hidrólisis del tioléster pero la reacción es muy lenta. Si los nucleófilos se adicionan con proteinasas la reacción es mas rápida [8, 9]. En presencia de proteinasa, ésta se une a un tioléster y la metilamina se une al tioléster de otra subunidad (ver más adelante). Esta diferencia cinética entre nucleófilos con y sin proteinasa podría explicar la diferencia entre la reacción del monofluorofosfato de sodio (MFP) y la AM *in vitro* e *in vivo*. (Ver 1.2 Pág. 15)

La AM-proteinasa puede activar vías de señalización intracelular que involucran a la adenilato ciclasa y fosfolipasa C, aumentando los niveles de AMPc, IP3 y diaciglicerol que fosforilan kinasas intracelulares. Estos mecanismos no son bloqueados por RAP (proteína asociada al receptor), por lo que se piensa que puede ser a través de otro receptor distinto a LRP1. (Ver 1.1.3 Pág. 14)

La captación de AM-metilamina es realizada en partes iguales por células endoteliales y del parénquima hepático. Las células de Kupffer también cumplen un rol importante. En cambio el complejo AM-tripsina es depurado casi en su totalidad por células del parénquima hepático. La depuración del complejo AM-metilamina puede ser bloqueada por un inhibidor específico del receptor, el ácido poli-inosínico [10, 11, 12].

En el hombre, la AM es sintetizada por los hepatocitos y su concentración plasmática es relativamente independiente de otros factores fisiológicos. Los macrófagos activados también secretan AM y son capaces de captar AM-Tripsina y AM unida a otras citoquinas.

La AM es una proteína normal del plasma sanguíneo humano, protectora de la integridad de los tejidos por su capacidad de inhibir proteinasas. La AM es una proteína de importancia biológica, de la que no se conocen deficiencias genéticas [13] y cuya homeostasis es parcialmente conocida. En la rata, la misma proteína es una proteína de fase aguda [14], aunque existe una proteína homóloga a la AM humana, la alfa-1-

INTRODUCCIÓN

macroglobulina (A1M) de secuencia similar a la AM humana. La expresión de la AM en la rata puede ser inducida cientos de veces después de 24 a 48 horas de una inyección intramuscular o subcutánea de turpenina [15, 16, 17, 18] o intraperitoneal de adyuvante completo de Freund [19, 20] o sulfato de bario estéril [21]. Este aumento en la concentración plasmática va acompañado de un aumento en la expresión de RNAm [20].

La AM se halla relacionada a un gran número de entidades clínicas. Aunque el polimorfismo de la AM no está relacionado con el inicio de la enfermedad de Alzheimer [22], la AM se une al beta amiloide aumentando su depuración y degradación. Por otro lado pacientes con esta enfermedad tienen sobre expresión del receptor LRP1 [23].

Participa en la hemostasia como reguladora de la trombina [24] y es un determinante de la viscosidad plasmática [25, 26].

Es inhibidora del veneno de serpientes [27]. Es marcadora del status hepático, utilizándose como evaluadora de la función en hepatitis crónica producida por infección por virus de la hepatitis C [28].

Un hallazgo novedoso constituyen los resultados encontrados en ratas, donde la AM tendría un papel radioprotector luego de la exposición a dosis letales de rayos X [29].

En la fase intermedia y tardía de los estadios agudos de la infección con *Trypanosoma cruzi*, la AM aumenta en niños infectados con respecto a niños sanos de la misma región geográfica [30]. La AM se une a proteinasas producidas por el *Trypanosoma cruzi* [31] evitando la acción invasiva del parásito.

La inyección de AM-tripsina modifica el metabolismo de quilomicrones y VLDL remanentes. La interrelación entre enfermedades derivadas del metabolismo de estas partículas lipídicas y AM es un fenómeno probable.

1.1.2 Intervención de la AM en procesos inflamatorios

La participación de la AM en la evolución de la pancreatitis tanto en humanos como en animales está ampliamente comprobada [32]. Por un lado, en patologías pancreáticas, pero no en otras, aumenta notablemente el complejo AM-Tripsina [33].

INTRODUCCIÓN

Además, durante la pancreatitis aguda inducida por dietas específicas, la sobrevida fue menor en ratones con knock-out del gen de AM [34]. En humanos, la fragmentación de AM, signo de unión a proteinasas, correlaciona con el grado de evolución hacia la falla multiorgánica [35]. En perros, la AM desciende en casos de pancreatitis aguda, sin diferencias con la gravedad, mientras que sí correlacionan con la gravedad los niveles de AM-Tripsina [36]. En la pancreatitis aguda en ratas, inducida por la inyección de ceruleína, disminuyen los niveles plasmáticos de macroglobulinas en función del tiempo [37]. En general el fenómeno se prolonga más de 72 hs [38]. Se entiende a la AM como una segunda línea de defensa contra la activación de zimógenos. Contribuye a esta hipótesis la existencia de inhibidores específicos de mayor afinidad por las proteinasas. En pancreatitis inducida por infusión de taurocolato en el conducto pancreobiliar, el lavado peritoneal con AM humana aumentó la sobrevida de animales con pancreatitis [39]. En humanos con pancreatitis aguda aumenta el complejo AM-tripsina y es baja la concentración total de AM, el complejo AM-Tripsina nunca superó el 10% en los casos más graves [40]. Además, el complejo AM-Tripsina fue mayor en casos agudos que en crónicos y correlacionó con el grado de gravedad de la pancreatitis aguda [41]. El tratamiento con MFP aumentó los niveles de AM en ratas con pancreatitis y dicho aumento estuvo acompañado de aumento en la sobrevida de los animales respecto de los que no recibieron MFP [42].

El uso de inhibidores de proteinasas en ratas con pancreatitis aguda inducida por taurocolato, produjo descenso de los niveles del complejo AM-Tripsina [43]. La inducción de pancreatitis en ratas que tienen aumento de los niveles plasmáticos de AM, produjo menor daño del parénquima pancreático, menores valores de amilasa y mayor sobrevida que en ratas con pancreatitis y niveles normales de AM [42].

1.1.3 Receptor LRP1

El receptor de AM es conocido como “LDL receptor related protein 1” (LRP1). Está formado por dos cadenas: alfa o cadena pesada de 515 kDa y una cadena beta o liviana de 85 kDa. Ambas cadenas se hallan asociadas no covalentemente. El receptor copurifica con una proteína de 39-45 kDa conocida como RAP (proteína asociada al receptor), que se une a la cadena pesada, en seis sitios posibles. La unión de RAP a

INTRODUCCIÓN

LRP1 inhibe la unión de prácticamente todos los ligandos conocidos. RAP no se halla en circulación en niveles detectables, pero sí intracelularmente. Se cree que participa en la regulación del proceso de captación de ligando.

LRP1 está fundamentalmente en células del parénquima hepático y en otros tejidos. Se lo ha encontrado en cerebro y se lo asocia con la enfermedad de Alzheimer [44]. LRP1 es vital, su disrupción produce freno del desarrollo embrionario. El receptor LRP1 pertenece a la superfamilia de receptores de LDL, que está formada por los receptores: LRP1, gp330, receptor de LDL y el receptor de VLDL [6]. Los cuatro tipos tienen las siguientes homologías: presentan dominios ricos en cisteína, dominios ricos en aminoácidos con cargas negativas, secuencias tirosina-triptófano-treonina-aspartato, dominio citoplasmático con secuencia aspartato-prolina-X-tirosina, dominio que es responsable de la endocitosis.

La AM interacciona con el receptor LRP1 en dos formas posible: alta y baja afinidad. En la primera el tetrámero unido a tripsina interacciona con dos cadenas alfa de dos receptores adyacentes. En el de baja afinidad un monómero del tetrámero interacciona con una cadena alfa del LRP1 (ver Ilustración 1 Pág. 11).

El receptor LRP1 une AM ligada a proteinasas, AM inactivada por metilamina, PZP unida a proteinasas, activador tisular del plasminógeno ligado a AM (tPA-AM), activador del plasminógeno tisular unido a inhibidor del activador del plaminógeno (tPA-PAI-1), activador del plaminógeno tipo urokinasa unido al inhibidor del activador del plaminógeno (uPA-PAI-1), apoproteína E (ApoE), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) enriquecidas con ApoE, lipoproteína lipasa (LPL), VLDL enriquecida con LPL, lactoferrina, RAP, remanentes de VLDL y quilomicrones enriquecidos con ApoE.

1.2 Monofluorofosfato de sodio

El fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato de sodio (MFP) son utilizados en terapéutica por su efecto osteoformador. El fluoruro (F^-), producido a partir de ambas sales, es un potente mitógeno de las células progenitoras de osteoblastos, aumentando su diferenciación y proliferación [45, 46, 47].

1.2.1 Farmacocinética del MFP

En un principio se supuso que el NaF y el MFP no discrepaban en su farmacocinética, en general la bibliografía existente describía estudios incompletos de comparación de formas farmacéuticas para ambas drogas [48,49,50]. Se han realizado estudios para demostrar la equivalencia de nuevas preparaciones con las ya existentes [51,52]. En estos estudios se utilizó potenciometría directa para la medición de flúor, que sólo detecta el anión fluoruro.

Sin embargo, la utilización de técnicas más sensibles y que permiten discriminar diferentes compuestos de flúor, permitieron demostrar que la farmacocinética de NaF y MFP son diferentes [53].

El NaF al ser administrado por vía oral se absorbe a nivel gástrico e intestinal pasando al plasma donde circula libre como fluoruro. El anión es depurado por riñón o bien es captado por el tejido óseo donde reemplaza al oxhidrilo en el cristal de hidroxiapatita (HA) formando flúorapatita (FA) (Ilustración 2).

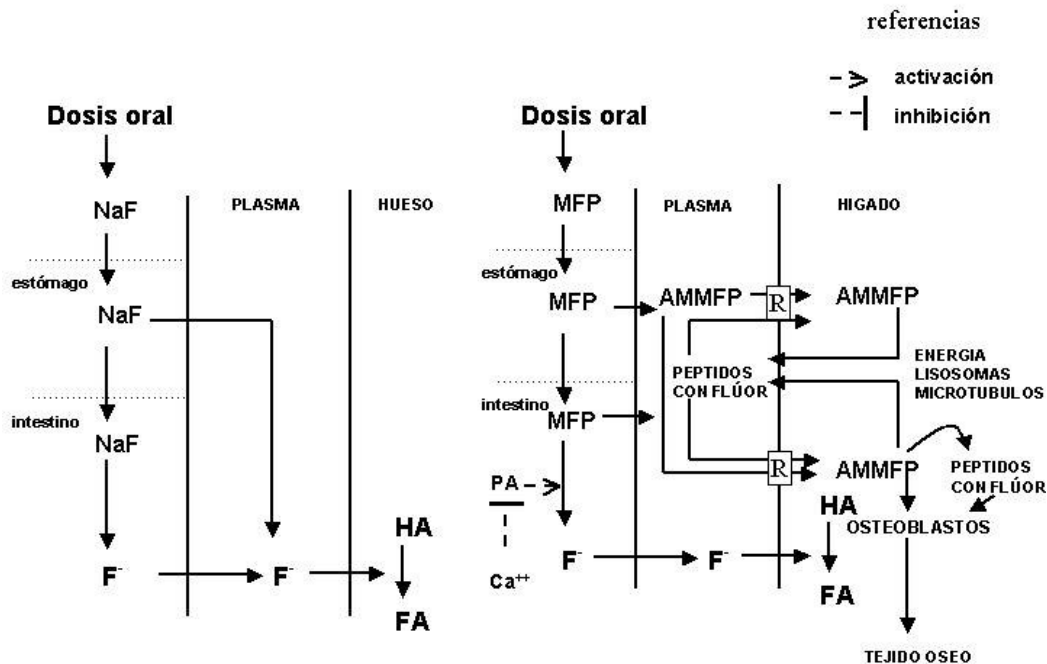


Ilustración 2: Farmacocinética del NaF y del MFP, luego de una dosis oral.

INTRODUCCIÓN

Por su parte el MFP (Ilustración 2) administrado por vía oral se absorbe en estómago en una pequeña fracción [54], la que al ingresar al compartimiento plasmático se liga a proteínas del plasma [55]. La proteína más importante que cumple esta función es la AM, que liga MFP en relación equimolar. La fracción de MFP que no se absorbe en estómago es absorbida en intestino en forma de fluoruro, luego de ser el MFP hidrolizado por la fosfatasa alcalina intestinal (PA). Esta enzima es inhibida en forma no competitiva por el calcio, de esta manera la coadministración de MFP y calcio mejora la biodisponibilidad del primero, ya que al inhibir la enzima mencionada, aumenta la vida media del MFP en la luz del intestino delgado, permitiendo su absorción y ligado a la AM [56,57]. Esta proteína se inactiva luego de la unión a MFP y es depurada por receptores ubicados en hígado y hueso donde el complejo alfa-macroglobulina-monofluorofosfato de sodio (AMMFP) es metabolizado a péptidos con flúor [58]. En hueso de ratas tratadas con MFP, el contenido de flúor es mayor que en el caso de ratas tratadas con NaF, existiendo además flúor ligado a proteínas y péptidos que se liberan al metabolizarse las proteínas a péptidos de menor peso molecular, siendo estos recaptados por el hueso. Esta recirculación de los compuestos con flúor aumentaría la vida media del flúor en el organismo, siendo ésta la principal diferencia con el NaF que sólo presenta en hueso flúor iónico [59,60]. A igualdad de dosis, el área bajo la curva fluoremia (fluoruro + flúor ligado a proteínas) es el doble para el MFP con respecto al fluoruro de sodio [61] (Ilustración 3) no existiendo diferencias en los niveles de fluoruro plasmático entre NaF y MFP.

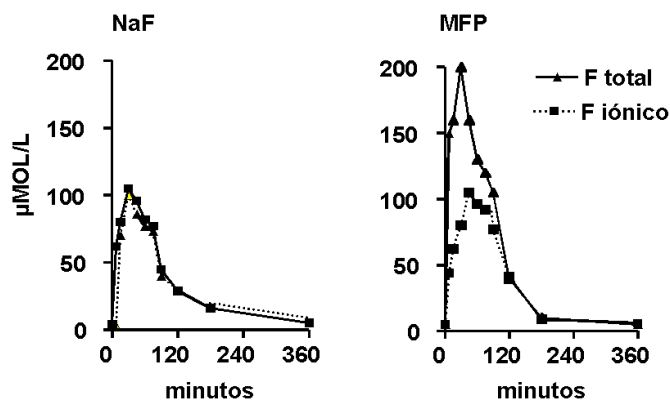


Ilustración 3: Flúor iónico y flúor total luego de una dosis oral de NaF (panel de la izquierda) y de MFP (panel derecho)

INTRODUCCIÓN

El fracaso en la terapéutica con compuestos con flúor podría deberse en primer lugar al desconocimiento de procesos metabólicos que involucran al fluoruro [62].

1.2.2 Mecanismos de acción de compuestos con flúor sobre el tejido óseo

Efecto mitogénico: El fluoruro es un estimulador de la formación ósea, produciendo una mayor densidad mineral ósea, en casos de ingestas adecuadas durante largos períodos de tiempo [63]. A nivel terapéutico este efecto no siempre se ha logrado y quedan dudas respecto de la resistencia y calidad del hueso formado.

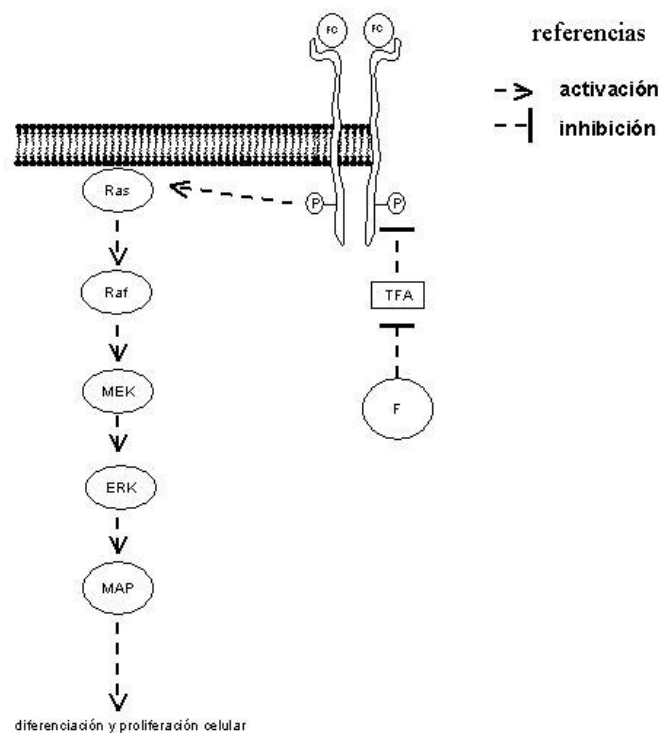


Ilustración 4: Activación de la proliferación y diferenciación celular por factores de crecimiento. El F⁻ inhibiría una tirosin fosfatasa ácida (TFA) que participa en la desfosforilación de los dominios intracelulares de los receptores de factores de crecimiento (FC)

La hipótesis con más evidencia experimental que explica el mecanismo de acción del fluoruro es su efecto inhibitorio sobre una enzima tirosin fosfatasa ácida encargada de desfosforilar los dominios citosólicos de ciertos receptores con actividad proteína quinasa intrínseca [64]. Estos receptores, que en general tienen como ligando a factores

INTRODUCCIÓN

de crecimiento, se autofosforilan al unirse éstos y activan vías de transducción de señales que involucran a las proteínas Ras, Raf, MEK y ERK (Ilustración 4).

Estas últimas proteínas fosforilarían a ciertos factores nucleares que aumentarían la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, produciendo la proliferación y diferenciación celular. La inhibición de la tirosin fosfatasa, aumentaría la vida media de intermediarios fosforilados de esta cascada de señalización y de esta manera estaría induciendo la proliferación y diferenciación celular a nivel osteoblástico, con el consecuente aumento de la formación ósea [65, 66]. Este efecto no se observó con otros cultivos celulares provenientes de riñón, hígado, piel y músculo. El efecto del fluoruro no se observó en ausencia de factores externos y fue restablecido en presencia de insulina, IGF-1, calcitonina y parathormona [67]. Estos resultados estarían indicando que el efecto del fluoruro es selectivo del tejido óseo y requiere la activación de vías de señalización por intermedio de factores de crecimiento. El efecto del fluoruro fue a su vez más importante cuanto más indiferenciadas se encontraban las células y la presencia de fosfato fue determinante. El fluoruro aumenta el proceso de diferenciación de células formadoras de hueso como así también la actividad de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina (ambos marcadores de diferenciación de osteoblastos).

Una segunda hipótesis plantea el estímulo de tirosin kinasas y aumento del transporte de fosfato a nivel de la membrana plasmática que se traduce en un aumento de la proliferación y diferenciación celular, simultáneamente con un aumento en el nivel de proteínas fosforiladas en tirosinas [68].

Otro mecanismo propuesto (tercera hipótesis), no excluyente del planteado anteriormente, es la hipótesis de la acción sobre las proteínas G [69]. Estas proteínas actúan como nexo entre receptores de membrana y enzimas intracelulares que producen segundos mensajeros. Dado que el fluoruro no produce aumento de la proliferación en ciertos tipos de células en cultivo, pero sí en presencia de Al^{+++} , se propuso que el fluoruro formaría con el Al^{+++} el complejo AlF_4^- , que es estimulador de las proteínas G. La inhibición de vías de señalización relacionadas a receptores asociados a proteínas G y proteín kinasa C, podría estar modificando a su vez los efectos del fluoruro sobre las vías mencionadas [70].

INTRODUCCIÓN

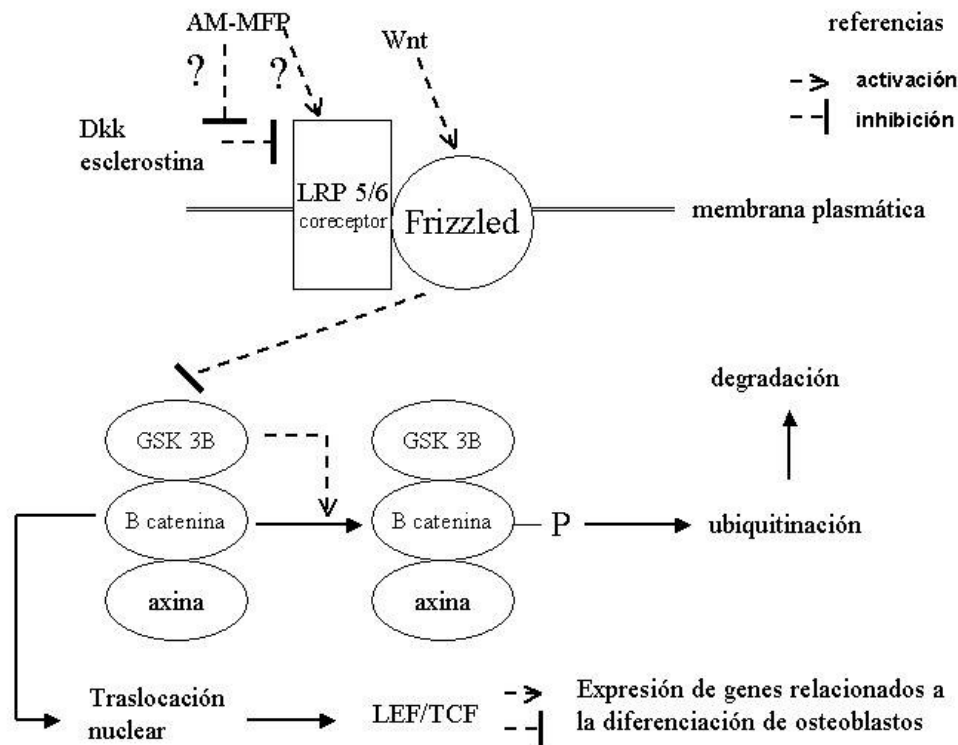


Ilustración 5: Mecanismo de diferenciación de osteoblastos inducidos por proteínas Wnt. LEF/TCF: lymphoid enhancer bindingfactor/Tcell specific factor.

En el caso del MFP, se suma a los efectos mencionados del fluoruro, la presencia de MFP ligado a la AM. Esta proteína se inactiva por su unión al MFP, produciendo cambios conformacionales que determinan su eliminación del plasma por receptores específicos e inespecíficos presentes en hígado y hueso. El receptor LRP1 es uno de los encargados de esta depuración. La diferenciación y proliferación de osteoblastos a partir de células pluripotentes del estroma de la médula ósea involucra a las cascadas de señalización del sistema Wnt/beta-catenina (Ilustración 5). Los osteoblastos poseen expresión del receptor LRP en sus isoformas LRP5 y LRP6. La acción de Wnt sobre el osteoblasto requiere la heterodimerización del receptor LRP5/6 y el receptor Frizzled. La dimerización produce señales intracelulares que inhiben a la enzima glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3). La GSK3 normalmente fosforila a beta-catenina, haciéndola sensible a enzimas ubiquitina ligasas que determinan la ubiquitinación de beta catenina y su posterior degradación por proteosomas. En consecuencia la inhibición

INTRODUCCIÓN

de GSK3 produce un estado no fosforilado de beta-catenina que se acumularía y sería traslocada al núcleo donde interactuaría con coactivadores produciendo la expresión de genes que determinan la diferenciación y proliferación del osteoblasto [71].

La AM podría estar modificando algunos de estos pasos, manteniendo el efecto sobre las células formadoras de hueso. Si bien la hipótesis de acción a este nivel requiere experimentos comprobatorios, el tratamiento con MFP produjo un valor de masa ósea máximo en ratas con la mitad de la dosis de flúor que cuando se utilizó fluoruro de sodio [53].

La administración de MFP a ratas produce, luego de 30 días, un aumento de los niveles plasmáticos de AM. Cuando a estos animales se les indujo pancreatitis por cerrado incompleto del asa duodenal, la sobrevivencia de los animales fue mayor que en animales que no habían recibido MFP [42].

De los datos mencionados se desprende que la AM participa en un gran número de procesos biológicos. La participación en la farmacocinética del MFP, el posible rol a nivel de la diferenciación de los osteoblastos y el papel protector contra los daños de la pancreatitis observados por la administración de MFP, han sido los puntos clave para desarrollar este trabajo de tesis. Es indiscutible que el conocimiento de la homeostasis de la AM contribuirá a explicar el potencial terapéutico de esta proteína y los efectos de la administración de MFP sobre su homeostasis y procesos que la involucran. Es poca la información que existe acerca de los procesos homeostáticos [72], a diferencia del gran conocimiento que existe sobre la expresión de su gen, la expresión de su receptor y la estructura de la proteína [1].

El MFP al unirse a la AM y modificar su concentración se presenta como un recurso experimental aplicable para producir modificaciones transitorias de los niveles de AM. Además el MFP es una droga sin efectos adversos importantes y puede ser administrada por vía oral en seres humanos y por vía intravenosa en ratas.

El estudio de los procesos involucrados en la homeostasis de la AM puede hacerse utilizando funciones matemáticas que relacionen las variables involucradas en el proceso y que incluyan parámetros representativos de los fenómenos que regulan la concentración plasmática de la proteína.

Los modelos matemáticos son recursos adecuados para estos casos ya que permiten, no sólo obtener curvas que ajustan a los valores experimentales, sino más importante, obtener valores de parámetros que expliquen las variaciones de los procesos homeostáticos y la simulación de cambios en los mismos sin mayores gastos y sacrificio de animales.

1.3 Modelización matemática

Un modelo matemático es una representación simplificada de un modelo real cuya estructura, variables y/o comportamiento son representados por un conjunto de ecuaciones.

El sistema de ecuaciones planteado representa una simplificación idealizada del problema en cuestión. Un modelo matemático es de utilidad cuando permite calcular parámetros de interés a partir de datos experimentales, simular respuestas del sistema biológico, reemplazar experimentos complejos y/o costosos, sugerir nuevos experimentos y manipular parámetros y valores iniciales cuando éstos no pueden ser alterados experimentalmente.

Por lo tanto, los modelos matemáticos se constituyen en una importante herramienta para describir, explicar, simular y/o predecir sistemas biológicos simples o más complejos.

En la construcción y selección de un modelo matemático deben considerarse distintos aspectos: la estructura del modelo biológico, los datos experimentales, los procesos utilizados para obtenerlos, la metodología utilizada para el ajuste de datos y el criterio de validación del modelo.

Desarrollar un modelo matemático significa obtener leyes que relacionen las variables involucradas en el fenómeno, siendo cada una de ellas representativa de las diferentes etapas o procesos que forman parte del fenómeno estudiado.

Un modelo debe ser lo suficientemente detallado para representar la situación del mundo real con relativa exactitud y también debe ser lo suficientemente sencillo para hacer posible el análisis matemático. Por lo tanto, el paso más delicado en el proceso de

construcción de un modelo matemático es encontrar el equilibrio entre realismo y factibilidad.

La formulación de modelos matemáticos de fenómenos biológicos generalmente se realiza utilizando sistemas dinámicos.

Los sistemas dinámicos tratan con situaciones que evolucionan en el tiempo. Si un sistema tiende al equilibrio, se repite en ciclos o se comporta de manera más complicada, se utiliza la dinámica para analizar su comportamiento.

Los sistemas dinámicos son adecuados para el estudio de cinéticas químicas, poblaciones biológicas y competencia de especies, entre otros.

Una de las características más importante a estudiar en un sistema dinámico es el comportamiento a largo plazo de sus soluciones (comportamiento asintótico).

Hay dos tipos fundamentales de sistemas dinámicos: las ecuaciones en diferencias o mapeos iterativos y las ecuaciones diferenciales.

Las primeras aparecen cuando la variable tiempo se trata de manera discreta mientras que las ecuaciones diferenciales describen la evolución de sistemas en tiempo continuo.

1.3.1 Sistemas de ecuaciones en diferencias

Las ecuaciones en diferencias permiten modelizar la evolución de un sistema dinámico, tratando el tiempo n como una variable discreta.

La forma general de una ecuación en diferencias es

$$a_{n+1} = f(a_n, a_{n-1}, \dots, a_{n-k+1}, n)$$

En esta ecuación n es el tiempo y $a_{n+1}, a_n, a_{n-1}, \dots, a_{n-k+1}$ hacen referencia a los valores de la variable a estudiar en los tiempos $n+1, n, n-1, \dots, n-k+1$. Como la diferencia entre el primer instante y el último es k , la ecuación es de orden k .

Cuando el tiempo no aparece en forma explícita y $k = 1$ se tiene una ecuación autónoma de orden uno que en su forma general se escribe:

$$a_{n+1} = f(a_n, n)$$

E 1-1

Un punto de equilibrio del sistema E 1-1 es aquel valor $a \in R$ tal que

$$\text{Si } a_0 = a \Rightarrow a_k = a \quad \forall k \in N$$

Un punto de equilibrio $a \in R$ del sistema E 1-1 es estable si existe $\varepsilon > 0$ tal que $|a_0 - a| < \varepsilon \Rightarrow \lim_{k \rightarrow +\infty} a_k = a$. Está demostrado que $a \in R$ es un punto de equilibrio de E 1-1 si y solo si $f(a) = a$

Dentro de las ecuaciones autónomas de orden 1 interesan en el desarrollo de esta tesis las ecuaciones lineales y las ecuaciones afines. Las ecuaciones del tipo E 1-1 donde $f(a_n, n) = ra_n$ con $r \in R$ se llaman ecuaciones lineales. Son ecuaciones del tipo

$$a_{n+1} = ra_n$$

E 1-2

Un punto de equilibrio de E 1-2 debe verificar que $f(a) = a$

$$\text{Luego } ra = a \Leftrightarrow a = 0 \text{ o } r = 1$$

El caso $r = 1$ es un caso trivial ya que la ecuación $a_{n+1} = a_n$ indica que el sistema permanece siempre en el valor inicial a_0 , por lo tanto cualquier número real es un punto de equilibrio del sistema.

Si $r \neq 1$ el único punto de equilibrio de E 1-2 es $a = 0$

Para estudiar la estabilidad de este punto de equilibrio, se busca la solución general del sistema y se analiza su comportamiento asintótico.

La ecuación $a_{n+1} = ra_n$ da lugar a la sucesión

$$a_1 = ra_0, \quad a_2 = ra_1 = r^2 a_0, \quad a_3 = ra_2 = r^3 a_0, \quad \dots \dots$$

cuyo término general es $a_k = r^k a_0$

 INTRODUCCIÓN

A partir de esta solución se deduce el comportamiento asintótico de E 1-2 que se resume a continuación:

Si $r < -1$ la sucesión diverge alternando el signo.

Si $r = -1$ la sucesión alterna entre a_0 y $-a_0$ (2-ciclo).

Si $-1 < r < 0$ la sucesión converge a cero alternando el signo.

Si $r = 0$ el término general de la sucesión es siempre cero.

Si $0 < r < 1$ la sucesión converge a cero monótonamente.

Si $r = 1$ el término general de la sucesión vale siempre a_0 .

Si $r > 1$ la sucesión diverge monótonamente.

Cuando en E 1-1, $f(a_n, n) = ra_n + b$ se tiene una ecuación autónoma de orden uno, cuya forma general es:

$$a_{n+1} = ra_n + b \quad \text{con } b \neq 0$$

E 1-3

Para encontrar sus posibles puntos de equilibrio se plantea y resuelve la ecuación

$$f(a) = ra + b = a$$

Luego $ra + b = a \Leftrightarrow a(1-r) = b \Rightarrow a = \frac{b}{1-r}$ siempre que $r \neq 1$

Si $r \neq 1$ hay un único punto de equilibrio y es $a = \frac{b}{1-r}$

La solución de la ecuación E 1-3 depende, entonces, de que sea $r \neq 1$ o $r = 1$

Si $r \neq 1$ la solución general de E 1-3 es $a_k = cr^k + a$

Dado un valor inicial a_0 se tiene que $a_0 = cr^0 + a = c + a \Rightarrow c = a_0 - a$

Por lo tanto, la solución particular de E 1-3 para un valor inicial a_0 es

$a_k = (a_0 - a)r^k + a$ siendo $a = \frac{b}{1-r}$ el punto de equilibrio.

A partir de esta solución se obtienen las siguientes condiciones para la estabilidad del punto de equilibrio.

Si $r < -1$ la sucesión diverge alternando el signo.

Si $r = -1$ la sucesión alterna entre a_0 y $b - a_0$ (2-ciclo).

Si $-1 < r < 0$ la sucesión converge a $a = \frac{b}{1-r}$ alternando el signo.

Si $r = 0$ es siempre $a_k = a \quad \forall k$.

Si $0 < r < 1$ la sucesión converge a $a = \frac{b}{1-r}$ monótonamente.

Si $r \geq 1$ la sucesión diverge monótonamente.

Si $r = 1$, la ecuación E 1-3 tiene la forma $a_{n+1} = a_n + b$ y la solución particular es de la forma $a_k = a_0 + kb$. Este sistema crece o decrece indefinidamente cualquiera sea la condición inicial. Luego no hay puntos de equilibrio.

1.3.2 Sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias

Las ecuaciones diferenciales permiten modelizar la evolución en el tiempo de un sistema dinámico, tratando el tiempo, t , como una variable continua.

Una ecuación diferencial ordinaria (EDO) es una ecuación donde aparece como incógnita una función de una variable independiente y alguna de sus derivadas. El orden de una ecuación diferencial es el orden de la derivada de mayor orden que aparece explícitamente en la ecuación.

Un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden con n ecuaciones y n incógnitas es un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden que deben verificarse simultáneamente.

Puede expresarse en la forma general como sigue

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = f_1(t; x_1; x_2; \dots; x_i; \dots; x_n) \\ \dot{x}_2 = f_2(t; x_1; x_2; \dots; x_i; \dots; x_n) \\ \dots \\ \dot{x}_i = f_i(t; x_1; x_2; \dots; x_i; \dots; x_n) \\ \dots \\ \dot{x}_n = f_n(t; x_1; x_2; \dots; x_i; \dots; x_n) \end{cases}$$

E 1-4

donde x_i $i = 1, 2, \dots, n$ representan las variables del sistema.

El punto superior indica derivada con respecto a t , es decir, $\dot{x}_i = \frac{dx_i}{dt}$ $i = 1, 2, \dots, n$

Las funciones f_i para $i = 1, 2, \dots, n$ están determinadas por el problema a tratar.

La importancia de estos sistemas, tanto práctica como teórica, está sustentada en el hecho que cualquier sistema de orden superior puede transformarse en un sistema equivalente de primer orden.

Cuando la variable independiente (t) no aparece en forma explícita, el sistema E 1-4 se llama autónomo. Técnicamente todo sistema de primer orden de n ecuaciones con n incógnitas puede trabajarse como un sistema autónomo de $n+1$ ecuaciones con $n+1$ incógnitas considerando $x_{n+1} = t$.

De aquí en más, se trabaja con sistemas autónomos.

Cuando todas las funciones f_i se expresan como una combinación lineal de las variables x_i , el sistema E 1-4 se llama lineal. En caso contrario es un sistema no lineal.

La diferencia esencial entre los sistemas lineales y no lineales está en el hecho que los sistemas lineales pueden ser particionados y cada parte puede ser resuelta por separado y a partir de cada solución reconstruir la solución completa. En este sentido, un sistema lineal es precisamente la suma de sus partes.

En general, los sistemas de la naturaleza no actúan de ese modo, sus partes interfieren, o cooperan o compiten entre ellas. Cuando aparecen interacciones no

INTRODUCCIÓN

lineales entre las partes de un sistema su modelización lleva al planteo de un sistema dinámico no lineal.

Se presenta la siguiente notación vectorial donde el supraíndice T indica el vector traspuesto.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \\ \cdot \\ x_i(t) \\ \cdot \\ x_n(t) \end{bmatrix} = [x_i(t)]_n \quad \dot{\mathbf{X}} = \begin{bmatrix} \dot{x}_1(t) \\ \dot{x}_2(t) \\ \cdot \\ \dot{x}_i(t) \\ \cdot \\ \dot{x}_n(t) \end{bmatrix} = [\dot{x}_i(t)]_n \quad \text{y} \quad \mathbf{F}(\mathbf{X}) = \begin{bmatrix} f_1(\mathbf{X}^T) \\ f_2(\mathbf{X}^T) \\ \cdot \\ f_i(\mathbf{X}^T) \\ \cdot \\ f_n(\mathbf{X}^T) \end{bmatrix} = [f_i(\mathbf{X}^T)]_n$$

que permite anotar al sistema E 1-4 como sigue

$$\dot{\mathbf{X}} = \mathbf{F}(\mathbf{X})$$

E 1-5

Si \mathbf{F} es continuo en un conjunto abierto $A \subseteq R^n$ entonces $\boldsymbol{\varphi}(t)$ es una solución de la ecuación diferencial E 1-5 en un intervalo $I \subseteq R$ si $\boldsymbol{\varphi}(t)$ es diferenciable en I , $\forall t \in I$ $\boldsymbol{\varphi}(t) \in A$ y $\dot{\boldsymbol{\varphi}}(t) = \mathbf{F}(\boldsymbol{\varphi}(t))$.

Dado $\mathbf{X}_0 \in A$, $\boldsymbol{\varphi}(t)$ es una solución del problema a valores iniciales

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{X}} = \mathbf{F}(\mathbf{X}) \\ \mathbf{X}(t_0) = \mathbf{X}_0 \end{cases}$$

E 1-6

en un intervalo $I \subseteq R$ si para $t_0 \in I$ $\boldsymbol{\varphi}(t_0) = \mathbf{X}_0$ y $\boldsymbol{\varphi}(t)$ es una solución de E 1-5 en el intervalo $I \subseteq R$

El siguiente teorema da las condiciones suficientes que aseguran la existencia de soluciones para el problema de Cauchy E 1-6.

INTRODUCCIÓN

Teorema Fundamental de Existencia y Unicidad: Sea A un conjunto abierto de \mathbf{R}^n que contiene a \mathbf{X}_0 y consideremos que $\mathbf{F}(\mathbf{X})$ admite derivadas parciales continuas en A , entonces el problema de valor inicial cuando $t_0 = 0$

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{X}} = \mathbf{F}(\mathbf{X}) \\ \mathbf{X}(0) = \mathbf{X}_0 \end{cases}$$

tiene una solución única definida en un intervalo máximo de existencia. [73,74]

El modelo que se presenta en esta tesis es un sistema no lineal. Por esta razón se revisan a continuación algunos conceptos clásicos de la teoría de sistemas no lineales.

Se establece, en lo que sigue, que $\mathbf{F}(\mathbf{X})$ admite derivadas parciales continuas de orden n en A

Se llama matriz Jacobiana de $\mathbf{F}(\mathbf{X})$ y se denota $\mathbf{DF}(\mathbf{X})$ a

$$\mathbf{DF}(\mathbf{X}) = \left[\frac{\partial f_i}{\partial x_j}(\mathbf{X}) \right]_{n \times n}$$

Para $\mathbf{X}^* \in A$, la función lineal $L(\mathbf{X} - \mathbf{X}^*) = \mathbf{DF}(\mathbf{X}^*)(\mathbf{X} - \mathbf{X}^*)$ es una aproximación de la función no lineal $\mathbf{F}(\mathbf{X})$ en un entorno de \mathbf{X}^* .

Un punto $\mathbf{X}^* \in A$ es un punto crítico o punto de equilibrio de E 1-5 si $\mathbf{F}(\mathbf{X}^*) = \bar{\mathbf{0}}$, es decir, los puntos críticos son soluciones estacionarias del sistema E 1-5.

Un punto de equilibrio \mathbf{X}^* es un punto de equilibrio hiperbólico si todos los autovalores de la matriz Jacobiana $\mathbf{DF}(\mathbf{X}^*)$ tienen parte real no nula.

Bajo las hipótesis ya establecidas, el sistema no lineal E 1-5 puede linealizarse, es decir, aproximarse por un sistema lineal, en un entorno de un punto crítico aislado.

Un importante resultado en la teoría cualitativa local de sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias es el teorema de Hartman-Grobman. Este teorema muestra que, bajo las hipótesis establecidas, cerca de un punto de equilibrio hiperbólico \mathbf{X}^* , el sistema no lineal E 1-5 tiene la misma estructura cualitativa del sistema lineal $\dot{\mathbf{X}} = \mathbf{DF}(\mathbf{X}^*)(\mathbf{X} - \mathbf{X}^*)$.

Es decir, si X^* es un punto de equilibrio hiperbólico de $\dot{X} = F(X)$ entonces el comportamiento local de este sistema es topológicamente equivalente al comportamiento local del sistema lineal $\dot{X} = DF(X^*)(X - X^*)$. Por lo tanto, la clasificación de los puntos de equilibrio hiperbólico del sistema E 1-5 está determinada por el signo de la parte real de los autovalores de la matriz Jacobiana de $F(X)$.

Un punto de equilibrio X^* es asintóticamente estable si y solo si la parte real de todos los autovalores correspondientes son negativas. Se dice que X^* es un sumidero o “sink”.

En caso contrario el punto de equilibrio hiperbólico es inestable.

Hay dos tipos de inestabilidad en un punto de equilibrio hiperbólico. Si la parte real de todos los autovalores de $DF(X^*)$ es positiva, X^* es una fuente o “source”.

Cuando hay al menos uno de los autovalores con parte real negativa y uno con parte real positiva, el punto X^* es un punto de ensilladura o “saddle point”.

1.3.3 Estimación de parámetros en sistemas de ecuaciones diferenciales

El problema E 1-6 involucra una variable vectorial X , una condición inicial X_0 y un vector de parámetros β cuya identificación y estimación es uno de los objetivos en el proceso de modelización.

Sea el problema a valores iniciales

$$\begin{cases} \dot{X} = F(t, X, \beta) \\ X(0) = X_0 \end{cases}$$

E 1-7

con $t > 0$ donde β es el vector de parámetros del sistema.

El problema de identificación o estimación de parámetros en sistemas dinámicos de ecuaciones diferenciales se presenta en varios campos de las ciencias y la tecnología. Desde la década de los 60 del siglo pasado se lo está estudiando en problemas de cinética química, farmacología y dinámica de poblaciones, entre otros.

Se conoce una tabla de valores observados $T = \left\{ \left(\begin{array}{c} t_i \\ X_i \end{array} \right) / i = 0, 1, \dots, m \right\}$ de la solución $\varphi(t, X_0, \beta)$ del problema E 1-7, entonces $X_i = \varphi(t_i, X_0, \beta) + \varepsilon_i$ donde $\varepsilon_i \in R^n$ son los errores de mediciones.

La solución $\varphi(t, X_0, \beta)$ existe, es única y depende con continuidad de X_0 y β si $F(t, X, \beta)$ es continua y derivable con continuidad respecto de X y de β .

El problema es encontrar el valor de β que haga mínima la suma de los cuadrados de los errores

$$g(\beta) = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^m |X_i - \varphi(t_i, X_0, \beta)|^2$$

E 1-8

Si β^* es el valor teórico exacto de β , se plantean dos cuestiones a resolver:

Identificar β^* en el sentido de dar condiciones suficientes para garantizar la existencia y unicidad de al menos un mínimo local de la función $g(\beta)$ dada por E 1-8.

Encontrar una estimación $\hat{\beta} = \arg \min_{\beta} g(\beta)$ de manera tal que $\varphi(t, X_0, \hat{\beta})$ sea la solución de E 1-7 que mejor ajuste los valores de la tabla T.

El modelo que se presenta en esta tesis implica el planteo de un problema de estimación no lineal. Generalmente los problemas no lineales se abordan numéricamente mediante la aplicación de métodos iterativos. Un método iterativo para estimar β^* consiste en elegir un valor β_0 que se llama parámetro inicial y generar una sucesión de vectores β_1, β_2, \dots esperando que converjan a β^* .

El método elegido para resolver numéricamente el problema de mínimos cuadrados es el método de Levenberg-Marquardt que utiliza los siguientes pasos:

Dada una primera aproximación β_0 para β^* generar las aproximaciones β_k para β^* como sigue:

$\beta_{k+1} = \beta_k + \Delta\beta_k$ con $k \geq 1$ donde $\Delta\beta_k$ es la solución del sistema $[DF^T(\beta_k)DF(\beta_k) + \gamma_k B]\Delta\beta_k = DF^T(\beta_k)(X - F(\beta_k))$ siendo $DF(\beta_k)$ el Jacobiano de F evaluado en β_k , $\gamma_k \geq 0$, B es una matriz simétrica y definida positiva.

Este algoritmo está basado en el método de Gauss-Newton.

En esta tesis interesa el caso en que se conocen sólo algunas condiciones iniciales y se dispone de las observaciones de algunas de las variables del sistema. En estos casos se modifica la función objetivo $g(\beta)$ afectando a cada término con un peso $W_i = [w_{ij}]$ con $w_{ij} \geq 0$.

El software mas completo que se dispone para resolver este problema es el paquete DIFFPAR de Edsberg y Wedin (1995) que utiliza un algoritmo basado en este método.

1.3.4 Determinación de los órdenes y constantes de velocidad en una reacción química.

La velocidad de un proceso químico es la rapidez con que cambia la concentración de algunos de los reactivos o los productos. Expresándola en términos matemáticos, la velocidad de una reacción química es la derivada de la concentración de la sustancia con respecto del tiempo.

La ley de acción de masas establece que la velocidad de una reacción es igual al producto de una constante de velocidad específica (k) por las concentraciones de los reactivos elevadas cada una a sus respectivos órdenes de reacción (δ).

En una reacción como la siguiente $A + 2B \rightarrow C + D$ resulta

$$v(t) = \frac{d[A]}{dt} = -k_d[A]^{\delta_A}[B]^{\delta_B} + k_i[C]^{\delta_C}[D]^{\delta_D}$$

E 1-9

Esta ecuación representa la ley de velocidad respecto de la sustancia A. El primer término del segundo miembro indica que la velocidad de desaparición de la sustancia A depende de las concentraciones de las sustancias A y B elevadas a sus respectivos órdenes de reacción, δ_A y δ_B . El segundo término indica que las sustancias C y D

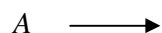
INTRODUCCIÓN

reaccionan entre sí generando las sustancias A y B y contribuyen a un aumento en la concentración de la sustancia A a lo largo del tiempo. Todos los órdenes de reacción δ_A , δ_B , δ_C y δ_D indican el peso que tiene cada sustancia sobre la velocidad.

Las constantes k_d y k_i involucran condiciones como temperatura, presión y presencia de catalizadores que podrían modificar la velocidad de un proceso. Habitualmente es interesante conocer estas constantes ya que sus valores darán información de las características intrínsecas del proceso.

A continuación se presentan las ecuaciones y los métodos para calcular los órdenes de reacción para situaciones en que la velocidad depende solamente de la concentración de la sustancia A .

Si el compuesto A se transforma en otra sustancia, este proceso se puede representar por la siguiente reacción



La ley de acción de masas para la velocidad directa de reacción queda expresada por la ecuación diferencial

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^{\delta_A}$$

E 1-10

Si el orden del proceso es cero, la ecuación E 1-10 resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = -k$$

La solución de esta ecuación cuando la concentración inicial de la sustancia A es $[A]_0$ es:

$$[A] = [A]_0 - kt$$

E 1-11

Esta ecuación indica que cuando el proceso es de orden cero la concentración de la sustancia A es una función lineal del tiempo.

Si el orden del proceso es uno, la ecuación E 1-10 resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]$$

La solución de esta ecuación cuando la concentración inicial de la sustancia A es $[A]_0$ está dada por la siguiente relación funcional:

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

E 1-12

Esta ecuación indica que si el proceso es de orden uno el logaritmo de la concentración de la sustancia A es una función lineal del tiempo.

La ecuación E 1-12 expresa que el decaimiento de la concentración de la sustancia A en el tiempo está modelizado por la siguiente función exponencial:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}$$

Para un orden genérico $n \geq 2$ la ecuación E 1-10 resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^n$$

Si $[A]_0$ es la concentración inicial de la sustancia A la resolución de la ecuación diferencial conduce a la ecuación

$$\frac{1}{A^{n-1}} = \frac{1}{A_0^{n-1}} + (n-1)kt$$

E 1-13

que establece una relación lineal entre $\frac{1}{A^{n-1}}$ y el tiempo.

En el laboratorio se realizan las mediciones de las concentraciones de la sustancia a estudiar. Una vez obtenidos los datos de las concentraciones para cada tiempo se analizan las siguientes regresiones lineales: concentración vs. tiempo (E 1-11), logaritmo natural de la concentración vs. tiempo (E 1-12), inversa de la potencia n-1 éxima de la concentración vs. tiempo (E 1-13). Aquella regresión que mejor ajuste los

INTRODUCCIÓN

datos indicará el orden del proceso. La pendiente de la recta de regresión permite obtener la constante de velocidad del proceso analizado. Cuando se dispone de medios tecnológicos y software adecuados, es conveniente utilizar la relación funcional explícita entre la concentración y el tiempo en la estimación de los valores de las constantes de velocidad.

Este análisis se puede realizar cuando se logra observar la variación de una variable en función del tiempo aislada de los posibles efectos de las otras. Esta situación no ocurre en la realidad que está modelizada por la ecuación E 1-9 donde intervienen varias variables y distintos parámetros. Sin embargo con la ayuda de métodos quirúrgicos, inhibidores enzimáticos y trabajos *in vitro* se pueden aislar los procesos y obtener valores de los órdenes y de las constantes que servirán como valores iniciales para la estimación de los valores reales.

2 OBJETIVOS

A modo de resumen podemos afirmar que la administración de MFP perturba la homeostasis de la AM, uniéndose a ella y determinando la depuración del complejo por receptores tisulares. La unión de MFP a AM determina la mayor biodisponibilidad de flúor del MFP con respecto a otras drogas con flúor.

Por otro lado, la perturbación de la homeostasis de AM, modifica el balance entre proteinasas y antiproteinazas, que determina mayor sobrevida en animales con pancreatitis.

Así, la AM se convierte en una “herramienta” de transporte de flúor hacia el hueso a la vez que el MFP aparece como un compuesto adecuado para manipular la concentración de AM durante la pancreatitis.

El posible uso clínico del control de la concentración plasmática de AM en el desarrollo de una pancreatitis, así como la realización de tratamientos con MFP en situaciones de remodelación ósea alterada, resultan casi imposibles de realizar por el desconocimiento de los procesos homeostáticos de AM y MFP.

Por esta razón se plantea el siguiente:

2.1 Objetivo general

Desarrollar un modelo matemático para estudiar la homeostasis de la AM y caracterizar cinéticamente los procesos de inactivación de AM por su unión al MFP, la reposición de AM a la circulación como consecuencia de su inactivación y la cinética de captación del complejo AMMFP.

2.2 Objetivos específicos

Plantear un sistema de ecuaciones diferenciales que involucre las variables relacionadas a la homeostasis de la AM en presencia de MFP: concentraciones de AM, AMMFP y MFP y las respectivas constantes de velocidad.

OBJETIVOS

Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo que permita validar el sistema planteado.

Resolver analítica y/o numéricamente el sistema planteado.

Obtener las constantes de velocidad de los procesos homeostáticos a partir de los valores experimentales de concentraciones de AM y/o del complejo AMMFP.

Validar el modelo utilizando sustancias cuyo efecto en la perturbación de la homeostasis de la AM es conocido.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Experimentos con ratas

Se utilizaron ratas IIM/Fm sublínea "m" [75] hembras de aproximadamente 200 g de peso corporal. Todos los experimentos se realizaron con animales anestesiados con uretano (120 mg/100 g de peso corporal, por vía intraperitoneal). Se realizó cateterismo de la arteria femoral para inyectar soluciones de prueba y obtener muestras de sangre; se utilizó heparina como anticoagulante.

La sangre se centrifugó y el plasma se guardó a -20 °C para determinar la concentración del complejo AMMFP y la concentración de la AM.

3.2 Inyección endovenosa de MFP

Se inyectó 1 μmol de MFP a 8 ratas (1 ml MFP 1mM + 5mg heparina / 100 g de peso corporal) por un catéter colocado en la arteria femoral y se extrajo sangre antes de la inyección y a los 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos de la inyección. Se determinó la concentración plasmática de AMMFP (3.5.2 Pág. 40) y AM (Ver 3.5.1 Pág. 39).

El cálculo de la cantidad de MFP a inyectar se realizó de manera que la concentración de MFP (teórica) alcanzada en plasma luego de la inyección supere al menos 10 veces la concentración de AM. La concentración de AM en el plasma de ratas es aproximadamente 10 $\mu\text{mol/l}$. Las ratas de 200 g tienen aproximadamente 10 ml de plasma [76] lo que indica que una rata contiene aproximadamente 0,1 μmol de AM. Al inyectar 1 ml de MFP 1 mmol/l (1 μmol) en solución fisiológica, suponiendo una distribución inmediata en el espacio plasmático, la concentración alcanzada de MFP sería aproximadamente 100 $\mu\text{mol/l}$ (10 veces mayor que la concentración teórica de AM plasmática).

3.3 Administración de MFP por sonda gástrica

Se administraron 80 μ moles MFP por sonda orogástrica (1 ml de MFP 80 mmol/l) a 8 ratas. Se extrajo sangre a los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 minutos en los que se determinó la concentración del complejo AMMFP (3.5.2 Pág. 40) y de AM (Ver 3.5.1 Pág. 39).

3.4 Medición de AM en ratas con operación simulada con pancreatitis

ICDL (Incomplete closed duodenal loop) es una técnica utilizada para inducir pancreatitis en ratas, que consiste en el cerrado incompleto del asa duodenal a ambos extremos de la desembocadura del conducto pancreobiliar. La cirugía simulada de ICDL consiste en laparotomía epigástrica medial sin el ligado del asa duodenal. La misma ocasiona una pancreatitis leve con modificación de amilasa y ligeros cambios histológicos del páncreas [77].

Se utilizaron 8 ratas macho de la línea IIM/Fm de 7 semanas en las que se realizó la cirugía descrita. La misma se realiza luego de anestesiarse a los animales con una mezcla de ketamina (5 mg/100 g peso corporal) y xilazina (0.1 mg/100 g peso corporal) por vía intramuscular. Se obtuvo sangre de la punta de la cola en capilares heparinizados antes de la cirugía y a las 24, 48 y 72 horas. Se separó el plasma de los glóbulos por centrifugación y se determinó la concentración de AM (Ver 3.5.1 Pág. 39)

3.5 Mediciones

3.5.1 Determinación de la concentración plasmática de AM

La determinación de la concentración de AM se realizó por dot-blot utilizando un anticuerpo anti-AM de rata producido en nuestro laboratorio y un anticuerpo anticobayo conjugado con fosfatasa alcalina. Como sustrato se utilizó 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) a pH 9.5 [78] y la concentración de la proteína se calculó por medidas de absorbancia obtenidas por comparación con una curva de calibración realizada con una solución con AM purificada [42].

3.5.2 Determinación de la concentración plasmática del complejo AMMFP

La concentración del complejo AMMFP se obtuvo por diferencia entre las concentraciones de flúor total del plasma y de su ultrafiltrado con membrana de ultrafiltración de 30 kDa de corte [79]. Se supuso que el flúor ligado a proteínas diferentes a la AM es despreciable y que la relación AM:MFP es 1:1 [55]. Para la determinación de flúor se utilizó un electrodo de ión específico Orión 94-09 conectado a un electrodo de referencia Ag/AgCl adaptado para medición de volúmenes de 50-100 μ l [80,81]. Simultáneamente se procesaron soluciones estándar de NaF en agua destilada de concentraciones adecuadas.

3.6 Determinación de los órdenes de reacción

Luego de la inyección intravenosa de MFP, se obtuvieron muestras de sangre y en el plasma se determinaron las concentraciones de AM y AMMFP. Con dichos valores se obtuvieron las constantes de velocidad de los procesos de formación, inactivación y captación del complejo AMMFP.

Los órdenes de los procesos respecto de cada una de las sustancias se calcularon a través de regresión lineal de la concentración o sus transformaciones en función del tiempo (Ver 1.3.4, Pág. 32). Las constantes de velocidad se calcularon utilizando las pendientes de las rectas de ajuste que se obtuvieron por mínimos cuadrados. Esta metodología tradicional fue contrastada con los resultados que se obtuvieron utilizando directamente la relación funcional entre concentración y tiempo. El ajuste se realizó con el software Origin [®] 6.1 que minimiza la suma de los cuadrados de los errores utilizando el Método de Gauss-Newton en su variante de Levenberg-Marquardt y calcula el error de estimación.

3.7 Experimentos de validación del modelo

Para validar el sistema, luego de la administración de MFP por sonda gástrica, se realizaron experimentos que alteran los procesos de hidrólisis intestinal de MFP y la captación del complejo AMMFP.

3.7.1 Experimento de validación del modelo por inyección del complejo AMMFP purificado

La inyección intravenosa del complejo AMMFP permite medir por técnicas invasivas la velocidad de captación del mismo. Para obtener el complejo se procedió como se detalla a continuación: se purificó el complejo preparado por adición de MFP a un pool de plasma, en concentración 10 veces mayor a la concentración de AM. Luego de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se purificó el complejo AMMFP de acuerdo a la técnica de Swenson [82]. Se purificó finalmente por una columna de Sephadex G100 para obtener la fracción de proteínas que contiene flúor ligado y peso molecular compatible con la AM.

Setenta y cinco μ moles del complejo AMMFP disueltos en solución fisiológica a $\text{pH} = 7$ se inyectaron a través de un catéter colocado en la arteria femoral a 8 ratas. A través del mismo catéter se obtuvieron muestras de sangre antes de la inyección y a los 15, 30, 45, 60 y 75 minutos sobre las que se determinó la concentración del complejo AMMFP (ver 3.5.2 , Pág. 40).

3.7.2 Experimentos de validación del modelo con ácido [5'] poli-inosínico por inyección intravenosa del complejo AMMFP

El ácido [5'] poli-inosínico es un inhibidor de la captación del complejo AMMFP [12, 58]. Esta droga fue utilizada para producir modificaciones predecibles sobre la homeostasis de manera de poner a prueba el modelo matemático.

Se realizó un experimento en el que se administraron 5 mg de ácido [5'] poli-inosínico por el catéter en la arteria femoral, 5 minutos antes de la inyección del complejo AMMFP. En presencia de ácido [5'] poli-inosínico la constante k_c fue $0,00057 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$ que no difirió significativamente de cero. Estos últimos resultados confirman que la depuración plasmática del complejo en estos experimentos es realizada predominantemente por los receptores específicos para el complejo AMMFP.

3.7.3 Experimentos de validación del modelo con ácido [5'] poli-inosínico con administración de MFP por sonda gástrica

Las ratas recibieron 80 μ moles de MFP (1ml MFP 80mmol/l) por sonda gástrica (n = 8) y 1 ml de solución fisiológica por un catéter colocado en la arteria femoral. Otro grupo de animales (n = 8) recibió la misma dosis de MFP y 5 mg de ácido [5'] poli-inosínico en 1 ml de solución fisiológica por un catéter colocado en la arteria femoral, 15 minutos antes del máximo en la concentración plasmática del complejo. El tiempo en el que se produce el máximo en la concentración plasmática del complejo AMMFP, puede ser establecido con bastante precisión en base a trabajos previos de este laboratorio (aproximadamente 60 minutos) [53]. Se extrajeron muestras de sangre por el mismo catéter antes de la administración del MFP y a los 5, 15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 130, 150 y 160 minutos. En el plasma se determinó la concentración del complejo AMMFP (3.5.2 Pág. 40). Con estos experimentos se validó el modelo ya que se conoce, por trabajos *in vitro* o por técnicas invasivas, que la constante de captación del complejo en estas condiciones disminuye.

3.7.4 Experimentos de validación del modelo por coadministración de MFP y calcio

Se conoce que el calcio inhibe la fosfatasa alcalina intestinal de la rata aumentando la velocidad de absorción del MFP a nivel intestinal [56]. Se utilizó este catión como perturbador de la homeostasis de la AM. Las ratas (n = 4) recibieron 80 μ moles de MFP por sonda gástrica (1 ml de solución de MFP 80 mmol/l). Otro grupo recibió el MFP en una solución con 50 mmol/l de CaCl_2 [56]. En este experimento los animales no se anestesiaron y se obtuvo sangre de la vena de la cola antes de la administración y a los 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 270 minutos. En el plasma se determinó la concentración del complejo AMMFP (3.5.2 Pág. 40).

3.8 Herramientas Matemáticas

La formulación, en esta tesis, de un modelo matemático de la homeostasis de la AM conduce al planteo de un sistema dinámico de ecuaciones diferenciales.

El sistema planteado verifica las hipótesis del Teorema de Hartman-Grobman, por lo tanto, existe un homeomorfismo entre los espacios de fase del sistema no lineal y el sistema linealizado. [83,84,85]. Se realizó el análisis cualitativo del sistema formulado determinando las características de los autovalores asociados a la matriz Jacobiana del sistema.

El modelo se utilizó para la construcción de simuladores virtuales que permitieron representar los resultados analíticos.

Las simulaciones se realizaron utilizando la biblioteca Simulink de MatLab [88].

Simulink posee una interfase gráfica que permite construir modelos en diagrama de bloques. Incluye una amplia librería de bloques de entradas y salidas, operaciones matemáticas, componentes lineales y no lineales y conectores. El uso de bloques de visualización (Scopes) permite observar gráficamente los resultados de la simulación. Además, es posible cambiar el valor de los parámetros y controlar los cambios en la exploración.

Para estudiar una ecuación diferencial ordinaria de primer orden $\dot{x} = f(t, x)$ usando la interfase Simulink se necesita crear un diagrama de retro alimentación, donde x y t son usados para calcular $f(t, x)$ y por lo tanto \dot{x} . A partir de \dot{x} se obtiene x por integración utilizando el bloque integrador (Integrator). También sería posible crear un modelo utilizando un bloque de derivación (Derivative) que asocia la entrada con x y la salida con \dot{x} . Se prefiere el uso del bloque Integrator porque la diferenciación numérica es mucho menos estable que la integración numérica.

La construcción del modelo se realiza seleccionando elementos estándar, los bloques, de la librería de Simulink. Los bloques corresponden a operaciones matemáticas y se conectan entre sí por líneas orientadas, señales, que son variables matemáticas. El bloque de integración numérica (Integrator) es fundamental para la construcción del modelo. La entrada de Integrator es $f(t, x)$, es decir \dot{x} y la salida es x .

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta salida es leída en cada paso en un bloque graficador (Scope) que grafica x como función de t [86].

Estos simuladores resultaron herramientas informáticas poderosas y de gran utilidad ya que ayudaron a obtener una primera aproximación de los parámetros del sistema que no pueden obtenerse experimentalmente. Estos valores aproximados se utilizaron como punto inicial en los métodos numéricos iterativos utilizados para el ajuste de datos.

4 RESULTADOS

4.1 Modelo matemático del equilibrio en la concentración plasmática de AM en ausencia de factores perturbadores externos

En esta sección se desarrolla un modelo que describe los procesos cinéticos que regulan los niveles de concentración plasmática de AM en ratas sólo en presencia de perturbadores fisiológicos.

En su función como inhibidora de proteinasas, la AM forma un complejo con estas enzimas y sufre importantes cambios conformacionales exponiendo dominios que la hacen reconocible por receptores tisulares. Luego, el complejo es removido de la circulación por receptores específicos.

El hecho que la concentración de AM en el plasma sea prácticamente constante, sugiere fuertemente la existencia de un mecanismo de almacenaje que asegura la restitución plasmática de la proteína ante procesos que tienden a disminuirla.

El hígado es el productor de AM y lo hace, presumiblemente, en función de los niveles de concentración plasmática de la proteína. Por otro lado, la AM es inactivada por proteinasas y depurada del plasma. Se asume que estos mecanismos son función de la concentración de AM en el plasma. Otros procesos menos relevantes no han sido considerados en la formulación del modelo.

Este modelo podría ser aplicado a situaciones como la pancreatitis donde la AM participa en la inactivación de proteinasas.

En la Ilustración 6 se esquematiza la homeostasis de AM en ausencia de perturbadores externos.

La razón de cambio de la concentración plasmática en el tiempo es la diferencia entre la velocidad de secreción v_S y la velocidad de inactivación v_I . Se considera que estas velocidades sólo dependen de la concentración plasmática de AM.

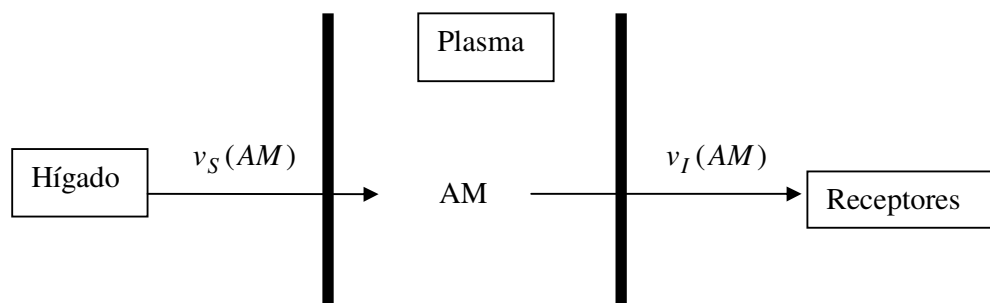


Ilustración 6: Esquema simplificado de la homeostasis de AM

En las mediciones obtenidas durante largos periodos de tiempo se encuentra que no existen diferencias significativas respecto del valor medio. Es por esta razón que se considera que la concentración plasmática de AM es prácticamente constante. En condiciones normales queda determinada una concentración basal AM_B propia de cada rata. Esta aparente estabilidad sería el resultado del balance entre los procesos de inactivación y secreción que se producen en lapsos de tiempo. Teniendo en cuenta esta suposición se propone analizar la evolución de este sistema tratando el tiempo n como una variable discreta.

Como se desconocen las relaciones funcionales entre las velocidades y la concentración de la proteína en plasma, se propone un modelo simple donde v_S y v_I se representan a través de funciones lineales.

Entonces

$$v_S(AM) = h_S AM + A_S$$

E 4-1

$$v_I(AM) = h_I AM + A_I$$

E 4-2

donde AM representa la concentración plasmática de AM y h_S , h_I , A_S y A_I son constantes reales.

RESULTADOS

Si las condiciones permanecen estables, la concentración plasmática basal se localiza en el punto en que se intersectan las rectas definidas por las ecuaciones E 4-1 y E 4-2, es decir, donde la velocidad de secreción iguala a la velocidad de inactivación.

El modelo de balance de concentración escrito en el lenguaje de la matemática es

$$\begin{cases} v_S(AM) = h_S AM + A_S \\ v_I(AM) = h_I AM + A_I \\ v_I = v_S \end{cases}$$

Si $h_S = h_I = 0$ resulta $v_S(AM) = A_S$ y $v_I(AM) = A_I$

El equilibrio se alcanza si y solo si $A_S = A_I$. Esta ecuación establece que las velocidades de secreción e inactivación permanecen constantes cualquiera sea la concentración de AM, situación contradictoria con las suposiciones antes discutidas.

Se supone que $h_S \neq 0$ y $h_I \neq 0$

La velocidad de inactivación en el periodo $n+1$ estaría determinada por la concentración en el mismo periodo, luego:

$$v_I(AM_{n+1}) = h_I AM_{n+1} + A_I$$

La velocidad de secreción en el periodo $n+1$ estaría determinada por la concentración plasmática en el periodo anterior, entonces:

$$v_S(AM_{n+1}) = h_S AM_n + A_S$$

Por la dinámica del proceso el equilibrio se alcanza cuando $v_S = v_I$, luego:

$$v_S(AM_{n+1}) = v_I(AM_{n+1}) \text{ y } h_S AM_n + A_S = h_I AM_{n+1} + A_I \text{ de donde}$$

$$AM_{n+1} = \frac{h_S}{h_I} AM_n + \frac{A_S - A_I}{h_I}$$

Se obtuvo una ecuación en diferencias

$$AM_{n+1} = r AM_n + b$$

E 4-3

$$\text{donde } r = \frac{h_S}{h_I} \text{ y } b = \frac{A_S - A_I}{h_I}$$

La ecuación en E 4-3 es una ecuación afín (ver 1.3.1, Pág.23). El comportamiento de esta ecuación está condicionado por el parámetro r .

Si $r = 1$ resulta $\frac{h_S}{h_I} = 1 \Leftrightarrow h_S = h_I$, luego las rectas del modelo son paralelas o coincidentes

Se analizan dos situaciones según sea b .

Cuando $b = 0$ las rectas son coincidentes y es el caso trivial para una ecuación lineal. Se tiene $\frac{A_S - A_I}{h_I} = 0 \Leftrightarrow A_S = A_I$ entonces la velocidad con que la AM es secretada es igual a la velocidad con que es inhibida; resulta $AM_{n+1} = AM_n$ lo que implica que, cualquiera sea el valor medido de AM el sistema se mantiene siempre en ese valor, situación contradictoria con las suposiciones antes discutidas.

$$\text{Para } b \neq 0 \text{ se tiene } \frac{A_S - A_I}{h_I} \neq 0 \Leftrightarrow A_S \neq A_I \text{ entonces } AM_{n+1} = AM_n + b$$

El sistema crece o decrece indefinidamente cualquiera sea la condición inicial, las rectas son paralelas, luego no hay puntos de equilibrio.

Luego, para $r = 1$ no se verifican las hipótesis enunciadas sobre que la concentración plasmática de AM fluctúa sin diferencias significativas en un entorno de un valor basal. Se analiza el caso en que $r \neq 1$

$$\text{Si } r \neq 1 \text{ resulta } \frac{h_S}{h_I} \neq 1$$

Para $h_S \neq h_I$ la solución particular para un valor inicial AM_0 de la ecuación en diferencias E 4-3 es

$$AM_n = (AM_0 - a)r^n + a$$

E 4-4

RESULTADOS

con $a = \frac{b}{1-r}$. Según lo explicado en 1.3.1 (Pág. 23) se tiene que $a = \frac{b}{1-r} = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$ es un punto de equilibrio.

A continuación y siguiendo la descripción del párrafo 1.3.1 se enumeran las condiciones que aseguran la estabilidad o inestabilidad de este punto de equilibrio.

Como $r = \frac{h_S}{h_I}$ resulta:

Si $\left| \frac{h_S}{h_I} \right| > 1$ es $|h_S| > |h_I|$ y el sistema diverge

Si $r = -1$ es $h_S = -h_I$ y el sistema alterna entre AM_0 y $b - AM_0$

Si $0 < \frac{h_S}{h_I} < 1$ el sistema converge a $a = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$ monótonamente. Esta situación

está esquematizada en la Ilustración 7

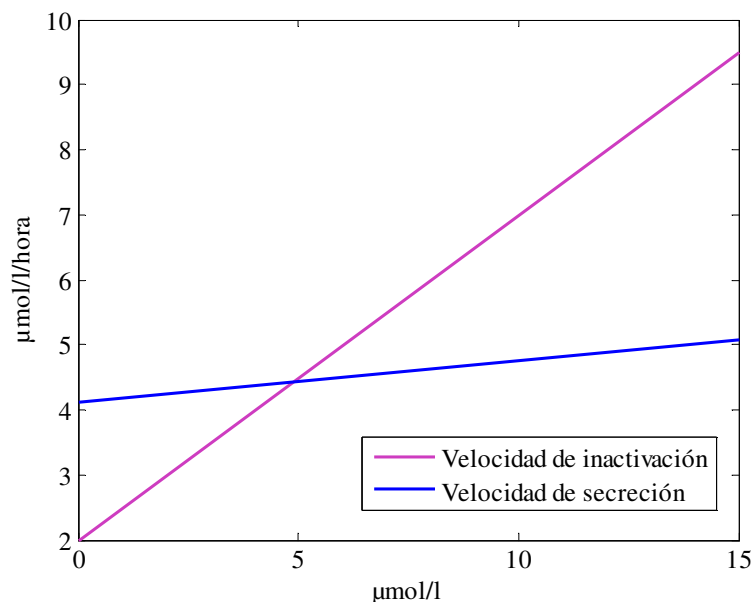


Ilustración 7: Balance de las velocidades de secreción e inactivación para $h_S > 0$ y $h_I > 0$. El punto de intersección entre las rectas es el punto de equilibrio.

RESULTADOS

Si $-1 < \frac{h_S}{h_I} < 0$ el sistema converge a $a = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$ alternando el signo. La

Ilustración 8 ejemplifica este caso.

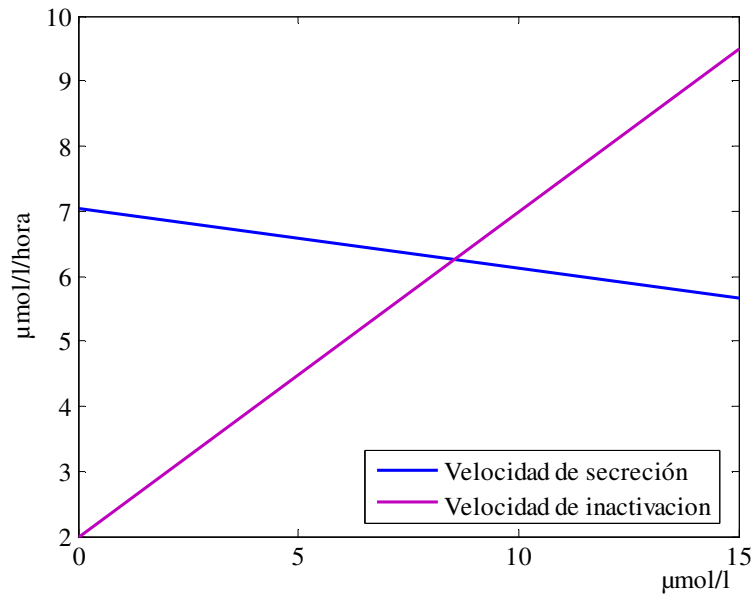


Ilustración 8: Balance de las velocidades de secreción e inactivación para $h_S < 0$ y $h_I > 0$. El punto de intersección entre las rectas es el punto de equilibrio.

Por lo tanto, el sistema converge a un valor de equilibrio $AM_E = a = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$

cuando $\left| \frac{h_S}{h_I} \right| < 1$ con $h_S \neq 0$ y $h_I \neq 0$

De este resultado resulta que para $0 < |h_S| < |h_I|$ el punto de equilibrio estable

$AM_E = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$ es biológicamente aceptable cuando $\frac{A_S - A_I}{h_I - h_S} > 0$.

Si $A_S = A_I$ resulta $AM_E = 0$, por lo tanto el sistema se equilibra cuando la concentración de AM es nula; esta situación es incompatible con la vida.

A continuación se resumen las conclusiones obtenidas a partir del modelo formulado:

RESULTADOS

Si $h_S \neq h_I$ y $\frac{A_S - A_I}{h_I - h_S} > 0$ la ecuación en diferencias $AM_{n+1} = \frac{h_S}{h_I} AM_n + \frac{A_S - A_I}{h_I}$ tiene un único punto de equilibrio en $AM_E = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$

La estabilidad de este punto depende de los valores de h_S y de h_I .

Si $|h_S| < |h_I|$ el equilibrio es estable.

Si $|h_S| > |h_I|$ el equilibrio es inestable.

Si $h_S = -h_I$ el sistema alterna en un 2-ciclo.

Estas conclusiones se testean con los datos obtenidos en experimentos realizados con 8 ratas durante tres días. Se utilizaron ratas con operación simulada que participaron en un experimento sobre el efecto de la AM en el desarrollo de la pancreatitis. Se realizaron mediciones de la concentración de AM a tiempo 0, a las 24, 48 y 72 horas.

Tabla I: Valores del proceso iterativo

Tiempo (horas)	AM medido	AM * teórico (E 4-4)
0	AM_0	AM_0
24	AM_1	$AM_1^* = (AM_0 - a)r + a$
48	AM_2	$AM_2^* = (AM_0 - a)r^2 + a$
72	AM_3	$AM_3^* = (AM_0 - a)r^3 + a$

En la primera columna de la Tabla I se muestran los tiempos en que se realizaron las extracciones de sangre. La segunda columna corresponde a las mediciones de la concentración de AM realizadas en las muestras obtenidas. Los valores teóricos que figuran en la tercera columna de la Tabla I se obtuvieron utilizando la ecuación E 4-4.

RESULTADOS

Se definió la función objetivo $g(AM_0, r, a) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^3 (AM_i - AM_i^*)^2$ para

proceder a la estimación de los parámetros a y r .

En las tablas y gráficas siguientes se muestra la evolución de la concentración plasmática de AM en dos casos representativos. En la Tabla II y la Ilustración 9, el sistema converge monótonamente, mientras que la Tabla III y la Ilustración 10 corresponden al caso en que el sistema converge oscilando.

Tabla II

Tiempo (horas)	AM medido ($\mu\text{mol/l}$)	AM iteración ($\mu\text{mol/l}$)
0	8,99	8,9900
24	3,75	5,3980
48	6,82	4,9402
72	4,05	4,8819
96		4,8744
120		4,8735
144		4,8733
168		4,8733

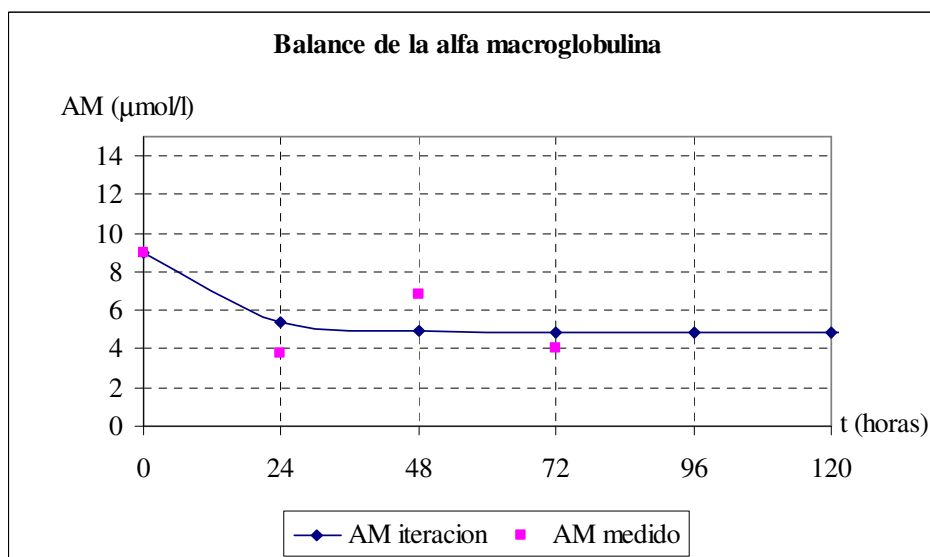


Ilustración 9: El sistema converge monótonamente hacia $AM_E = 4.8733$, $r = 0.12745$

RESULTADOS

Tabla III

Tiempo (horas)	AM medido ($\mu\text{mol/l}$)	AM iteración ($\mu\text{mol/l}$)
0	14,21	14,21
24	8,37	7,44541728
48	9,28	8,6901005
72	7,84	8,46107879
96		8,50321878
120		8,49546502
144		8,49689172
168		8,4966292
192		8,49667751
216		8,49666862
240		8,49667025
264		8,49666995

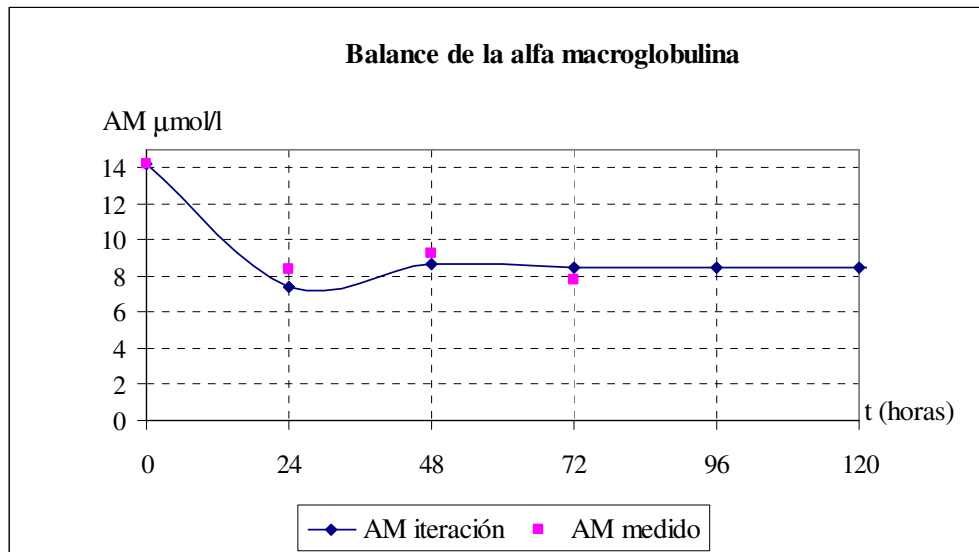


Ilustración 10: El sistema converge oscilando hacia $AM_E = 8.49667$, $r = -0.184$

Este modelo permitiría conocer el punto de equilibrio de la concentración plasmática de AM a partir de mediciones cada 24 horas. Los resultados obtenidos

utilizando aproximaciones lineales de v_s y v_l resultaron adecuados; dichas linealizaciones serán utilizadas en los modelos posteriores.

4.2 Modelo matemático del equilibrio en la concentración plasmática de AM en presencia de factores perturbadores externos

En esta sección se desarrolla un modelo matemático que permite estudiar la cinética de los procesos de inactivación de AM por su unión al MFP, la reposición de AM a la circulación como consecuencia de su inactivación y la cinética de captación del complejo AMMFP.

Cuando se administra MFP por vía oral una pequeña fracción de éste se absorbe en el estómago. Esta fracción al ingresar al compartimiento plasmático se liga a la AM en relación equimolar.

La fracción de MFP que pasa al intestino, en parte se hidroliza por acción de la fosfatasa alcalina intestinal, y en parte es absorbida intacta por la mucosa intestinal, ingresa al plasma y se liga a la AM.

Esta inactivación de la AM por el MFP genera el complejo AMMFP que es depurado por receptores tisulares de hígado y hueso.

En base a experimentos realizados previamente, se puede hipotetizar que la concentración de AM depende de la presencia de MFP. Al transformarse en el complejo AMMFP, la proteína pierde su actividad antiproteásica y sufre cambios conformacionales que determinan la captación por receptores tisulares. El complejo captado por los receptores es metabolizado a péptidos con flúor de menor peso molecular y a fluoruro.

La Ilustración 11 representa el metabolismo de la AM en presencia de una dosis oral de MFP.

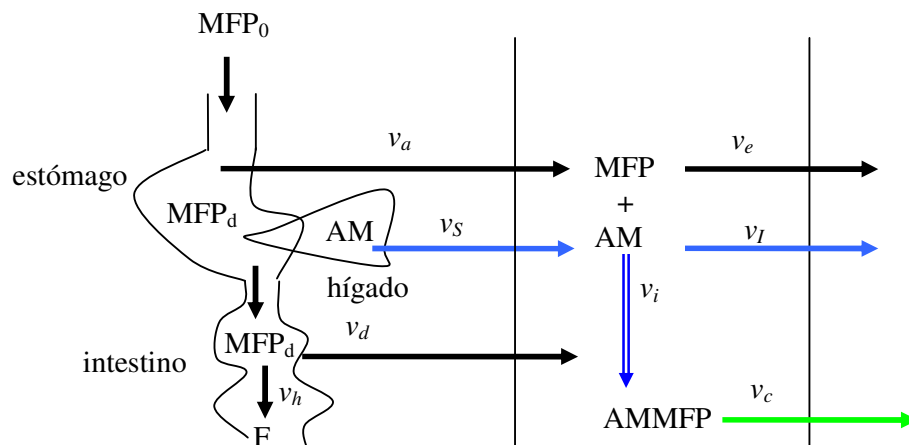


Ilustración 11: Metabolismo de la AM en presencia de una dosis oral de MFP

En la descripción del modelo se adoptó la siguiente nomenclatura.

El modelo contiene cuatro variables:

AM representa la concentración plasmática de AM.

MFP_d representa la concentración de MFP en el aparato digestivo.

MFP representa la concentración de MFP en el plasma.

$AMMFP$ representa la concentración del complejo AMMFP en el plasma.

En el modelo aparecen ocho velocidades definidas en función de las cuatro variables mencionadas:

v_s es la velocidad de secreción de AM (ver 4.1 Pág. 45).

v_I es la velocidad de inactivación de AM en ausencia de perturbadores externos.

v_i es la velocidad de inactivación de AM por acción de MFP plasmático.

v_a es la velocidad de absorción de MFP en la mucosa gástrica.

v_h es la velocidad de hidrólisis de MFP en la luz intestinal.

v_d es la velocidad de absorción de MFP en la mucosa intestinal.

RESULTADOS

v_e es la velocidad de eliminación de MFP del torrente sanguíneo (sin incluir unión a AM).

v_c es la velocidad de captación del complejo AMMFP por receptores tisulares.

En el sistema completo se distinguen varios subsistemas que interactúan entre sí

1.- El subsistema AM, estudiado en 4.1, es perturbado por la presencia del MFP que llega al plasma a través del aparato digestivo.

Esta situación representada en la Ilustración 12 queda modelizada por la ecuación:

$$\frac{dAM}{dt} = v_S - v_I - v_i$$

E 4-5

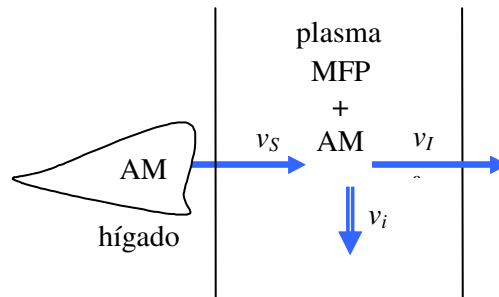


Ilustración 12: Subsistema AM

2.- El subsistema MFP digestivo, representado en la Ilustración 13, matemáticamente se modeliza por la ecuación:

$$\frac{dMFP_d}{dt} = -v_a - v_d - v_h$$

E 4-6

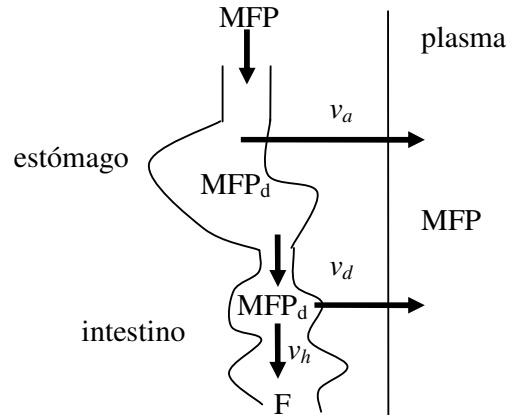


Ilustración 13: Subsistema MFP digestivo

3.- El subsistema MFP plasmático representado en la Ilustración 14 se describe a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{dMFP}{dt} = v_a + v_d - v_i - v_e$$

E 4-7

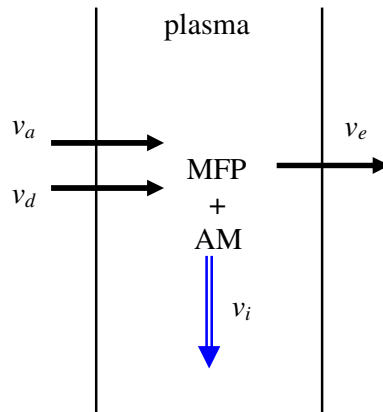


Ilustración 14: Subsistema MFP plasmático

RESULTADOS

4.- El subsistema del complejo AMMFP que se observa en la Ilustración 15 es modelizado por la ecuación diferencial:

$$\frac{dAMMFP}{dt} = v_i - v_c$$

E 4-8

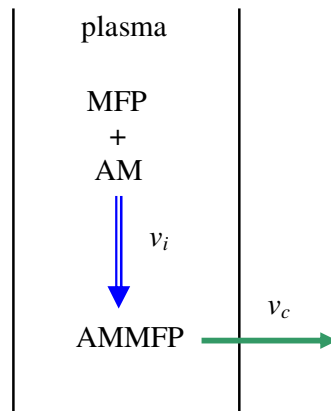


Ilustración 15: Subsistema AMMFP

Las ecuaciones E 4-5, E 4-6, E 4-7 y E 4-8 se reúnen en el siguiente sistema:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dAM}{dt} = v_S - v_I - v_i \\ \frac{dMFP}{dt} = v_a + v_d - v_i - v_e \\ \frac{dAMMFP}{dt} = v_i - v_c \\ \frac{dMFP_d}{dt} = -v_a - v_d - v_h \end{array} \right.$$

E 4-9

que está sujeto a las condiciones iniciales

$$\left\{ \begin{array}{l} AM(0) = AM_0 \quad ; \quad MFP_d(0) = MFP_{d0} \\ MFP(0) = 0 \quad ; \quad AMMFP(0) = 0 \end{array} \right.$$

E 4-10

RESULTADOS

donde AM_0 es la concentración de AM para $t = 0$ y MFP_{d0} es la dosis de MFP suministrada por vía oral. Se trabajó con ratas sin tratamiento previo con sustancias fluoradas por lo tanto a $t = 0$ no hay vestigios de MFP ni AMMFP en el torrente sanguíneo.

Se observa que el sistema completo no es la suma de los subsistemas. Esta situación predice que el sistema dinámico que describe el sistema biológico planteado será un sistema dinámico no lineal.

Con el propósito de describir la dinámica de los procesos se investigó acerca de los órdenes de cada una de las reacciones químicas que se observan.

Esta información permitirá encontrar las ecuaciones para las velocidades de las reacciones químicas y especificar los parámetros del sistema.

En el párrafo 4.3 se estudia un sistema más simple donde la homeostasis de la AM es perturbada por una inyección intravenosa de MFP.

Es evidente que este modelo es aplicable solamente a animales de experimentación. Posteriormente, en el párrafo 4.4 (Pág. 98) se trabaja con el modelo general donde la homeostasis de la AM es modificada por una dosis oral de MFP. Se sigue trabajando con ratas de laboratorio pero el modelo podría ser aplicable a seres humanos.

4.3 Modelo de la homeostasis de la AM en presencia de MFP administrado por vía intravenosa

En esta sección se desarrolla un modelo matemático que permite estudiar la cinética de los procesos de inactivación de AM por su unión al MFP, la reposición de AM a la circulación como consecuencia de su inactivación y la cinética de captación del complejo AMMFP luego de una dosis intravenosa de MFP.

En el sistema representado en la Ilustración 11 (Pág. 55) se realizaron las modificaciones necesarias para que modelizara la perturbación de la homeostasis de la AM por una dosis intravenosa de MFP. El sistema simplificado se observa en la Ilustración 16.

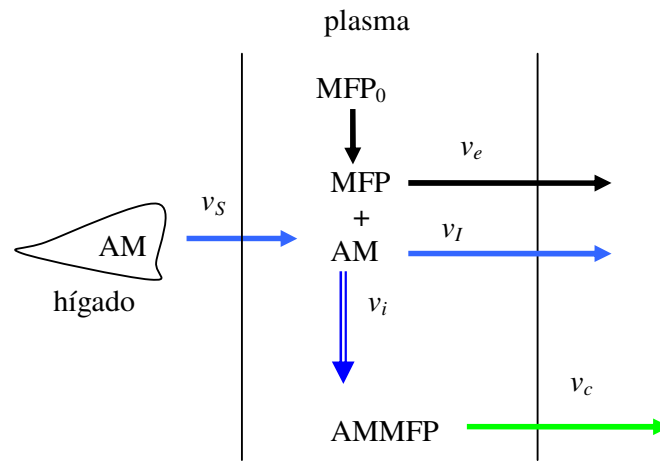


Ilustración 16: Perturbación de la homeostasis de la AM por una dosis intravenosa de MFP.

Este modelo contiene tres variables: la concentración plasmática de MFP luego de una inyección intravenosa de una dosis MFP_0 , la concentración plasmática de AM y la concentración del complejo AMMFP; y cinco velocidades: la velocidad de secreción de AM (v_S), la velocidad de inactivación de AM en ausencia de perturbadores externos (v_I), la velocidad de inactivación de AM por acción de MFP plasmático (v_i), la velocidad de eliminación de MFP del torrente sanguíneo (v_e) y la velocidad de captación del complejo AMMFP por receptores titulares (v_c).

El modelo está representado por el siguiente sistema:

$$\begin{cases} \frac{dAM}{dt} = v_S - v_I - v_i \\ \frac{dMFP}{dt} = -v_i - v_e \\ \frac{dAMMFP}{dt} = v_i - v_c \end{cases}$$

E 4-11

sujeto a las siguientes condiciones iniciales

RESULTADOS

$$AM(0) = AM_0 \quad ; \quad MFP(0) = MFP_0 \quad ; \quad AMMFP(0) = 0$$

E 4-12

donde MFP_0 es la dosis de MFP inyectada en el torrente sanguíneo a tiempo $t = 0$.

Es evidente que este nuevo problema de Cauchy es una simplificación del sistema E 4-9 (Pág. 58).

4.3.1 Determinación del orden de reacción de inactivación de AM

A través de un catéter en la arteria femoral se inyectó 1 ml de solución 1 $\mu\text{mol/l}$ de MFP (ver 3.2 Pág. 38). Antes de la inyección del MFP ($t = 0$) y en los tiempos indicados en la Tabla IV se extrajeron muestras de sangre por el catéter colocado en la arteria femoral.

En dichas muestras se midió la concentración de AM y la concentración del complejo AMMFP utilizando las técnicas antes descriptas. Los resultados de la Tabla IV se grafican en la Ilustración 17.

*Tabla IV: Concentraciones plasmática de AM y AMMFP.
Los resultados de expresan en media \pm ES. $n = 8$*

Tiempo (minutos)	AMMFP ($\mu\text{mol/l}$)	AM ($\mu\text{mol/l}$)
0	0	10.0 \pm 0.6
1	0.8 \pm 0.5	10.0 \pm 0.6
5	4.0 \pm 0.6	10.4 \pm 0.4
10	6.0 \pm 1.7	11.0 \pm 0.8
20	2.4 \pm 1.1	11.5 \pm 0.9
30	1.2 \pm 0.5	10.9 \pm 0.8
40	0.7 \pm 0.4	9.8 \pm 0.7
50	0.5 \pm 0.2	8.7 \pm 0.4
60	0.1 \pm 0.1	7.7 \pm 0.4
70	0.2 \pm 0.2	6.9 \pm 0.4

RESULTADOS

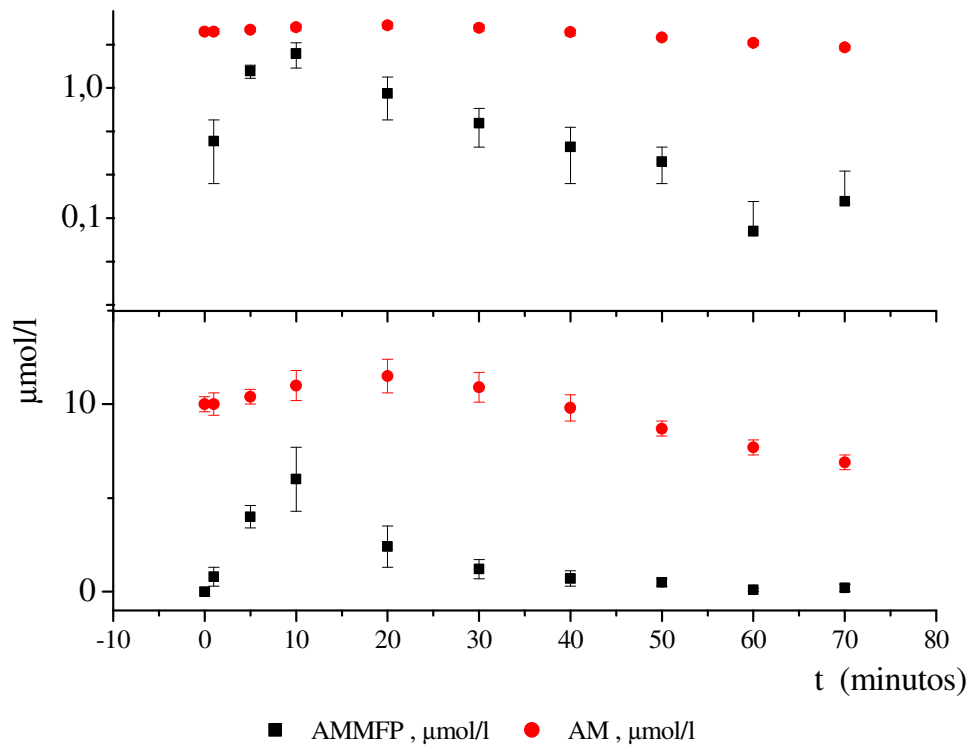
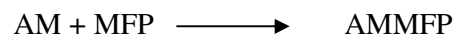


Ilustración 17: Concentración de AM y AMMFP luego de una inyección intravenosa de MFP. En el gráfico superior se utilizó una escala logarítmica en base e.

Instantes después de la inyección intravenosa de MFP se observa un rápido aumento de la concentración del complejo AMMFP. En este periodo la concentración de AM y de MFP son elevadas respecto de la concentración de AMMFP.

La reacción de formación del complejo AMMFP, que a su vez es la reacción de inactivación de la AM, está representada por la siguiente ecuación química



Dado que la concentración de AMMFP inicialmente es nula la reacción puede ser considerada una reacción aislada con velocidad inversa despreciable. Además, experimentos *in vitro* de filtración en gel en los que se estudió la reversibilidad del proceso mencionado anteriormente indicaron que la reacción inversa es despreciable para los tiempos involucrados en este experimento [58].

 RESULTADOS

Esta reacción, en las condiciones experimentales ocurre principalmente en sentido directo y la ley de velocidad del proceso expresada por la ley de acción de masas queda expresada por la siguiente ecuación

$$v_i = k_i AM^{\delta_{AM}} .MFP^{\delta_{MFP}}$$

donde δ_{AM} es el orden de reacción respecto de AM, δ_{MFP} es el orden de reacción respecto de MFP y k_i es la constante cinética de inactivación.

En los tiempos cercanos a la inyección se puede considerar que la reacción es de pseudo orden cero para el MFP, debido a que la relación de concentración entre AM y MFP es MFP:AM = 10. En tal situación la velocidad de inactivación de la AM dependería principalmente de la concentración de AM.

En estas condiciones el orden de reacción respecto de la AM se puede obtener del análisis la relación entre AM y el tiempo (ver 1.3.4 Pág. 32).

La concentración de AMMFP en el período de tiempo 0-10 minutos representa la concentración de AM que se han convertido en AMMFP. Por lo tanto restando estos valores de los valores de AM de la Tabla IV se obtienen los valores de AM no ligada a MFP que se muestran en la Tabla V y en el gráfico inferior de la Ilustración 18.

Tabla V: Concentración de AM remanente del proceso de inactivación por acción del MFP. Los resultados se expresan como media \pm ES. n = 8

Tiempo (minutos)	AM remanente ($\mu\text{mol/l}$)
1	9.19 \pm 0.46
5	6.28 \pm 0.69
10	3.81 \pm 0.87

La linealización logarítmica que se observa en el gráfico superior de la Ilustración 18 tiene un buen ajuste indicando que el orden del proceso de inactivación es 1.

RESULTADOS

El ajuste de los datos y la estimación del parámetro k_i se realizó utilizando el software Origin® 6.1. Se realizó el ajuste lineal utilizando la herramienta de ajuste $yscale(Y) = A + B * xscale(X)$ donde $yscale(Y)$ representa los valores de los logaritmos naturales de las mediciones AMMFP listados en la Tabla V. El tiempo esta representado por la variable $xscale(X)$. El parámetro B es la pendiente de la recta de ajuste y su valor absoluto es el valor estimado de k_i .

Se obtuvo $B = -0,08185 \pm 0,01903$ con $R^2 = 0,99387$

Estos resultados mejoran levemente cuando se realiza el ajuste no lineal utilizando el modelo $ExpDecay1 \ y_0+A1*\exp(x/t1)$ que provee la biblioteca del Origin ®. Cuando se fija $y_0 = 0$ y $A1 = 9.19$ resulta que $\frac{1}{t1} = k_i$.

El software estimó el valor $t1 = 11.96417 \pm 0.58213$ con $R^2 = 0.99429$.

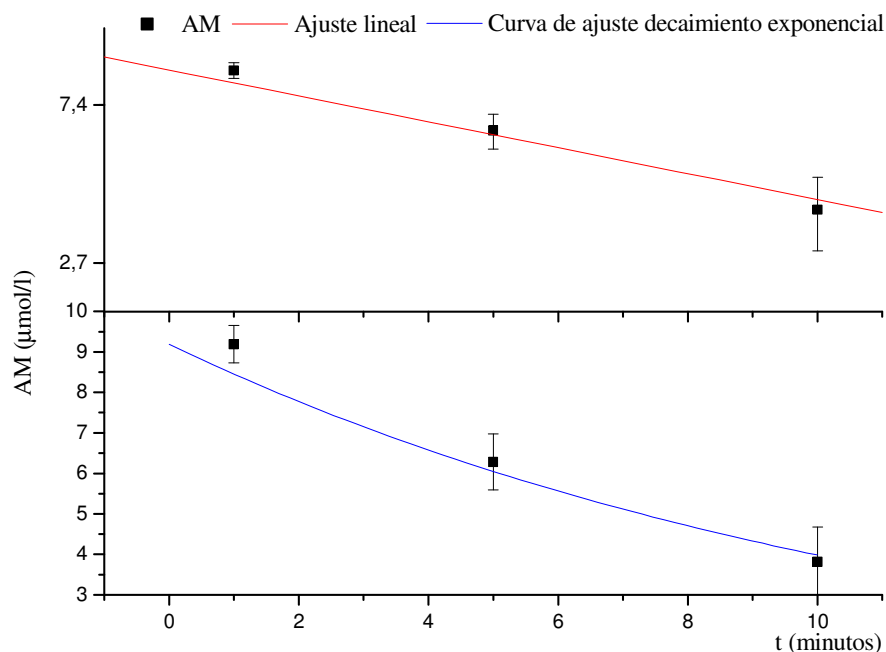


Ilustración 18: Concentración de AM remanente luego de una dosis intravenosa de MFP. En el gráfico superior se utilizó una escala logarítmica en base e.

RESULTADOS

Bajo estas hipótesis, asumiendo que la reacción entre AM y MFP es un proceso de orden uno y resultados previos que indican una relación molar 1:1 entre MFP y AM, respetando la ley de acción de masas, resulta que

$$v_i = k_i AM . MFP$$

E 4-13

El valor estimado de la constante de inactivación es $k_i = 0,083583 \pm 0,01998\text{min}^{-1}$.

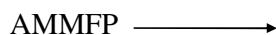
4.3.2 Estudio del proceso de captación del complejo AMMFP

En los experimentos donde se investigó la captación AMMFP por los receptores, se inyectaron 75 μmoles del complejo AMMFP (ver 3.7.1 Pág. 41) por el catéter ubicado en la arteria femoral y por el mismo catéter se extrajeron muestras de sangre a los tiempos indicados en la Tabla VI.

Tabla VI: Concentración de AMMFP. Los resultados se expresan en media \pm ES

Tiempo (minutos)	AMMFP ($\mu\text{mol/l}$)
0	92.9 \pm 90.51
15	14.1 \pm 13.36
30	4.2 \pm 3.42
45	0.46 \pm 0.22
60	0.27 \pm 0.10
75	0.51 \pm 0.44

La etapa limitante del proceso es la captación del mismo por los receptores. Este proceso esta inicialmente representado por la ecuación



RESULTADOS

cuya ley de velocidad es

$$v_c = -k_c AMMFP^{\delta_{AMMFP}}$$

y k_c es constante de captación del complejo AMMFP in vivo y δ_{AMMFP} es el orden de la reacción para el complejo AMMFP.

La velocidad de formación del complejo en estas condiciones es cero, ya que se inyectó el complejo AMMFP purificado *in vitro*.

Se realizaron regresiones entre las concentraciones de AMMFP y el tiempo o sus transformaciones con el objeto de determinar el orden del proceso de captación del complejo. (Ver 1.3.4 Pág. 32). Las gráficas obtenidas se muestran en la Ilustración 19.

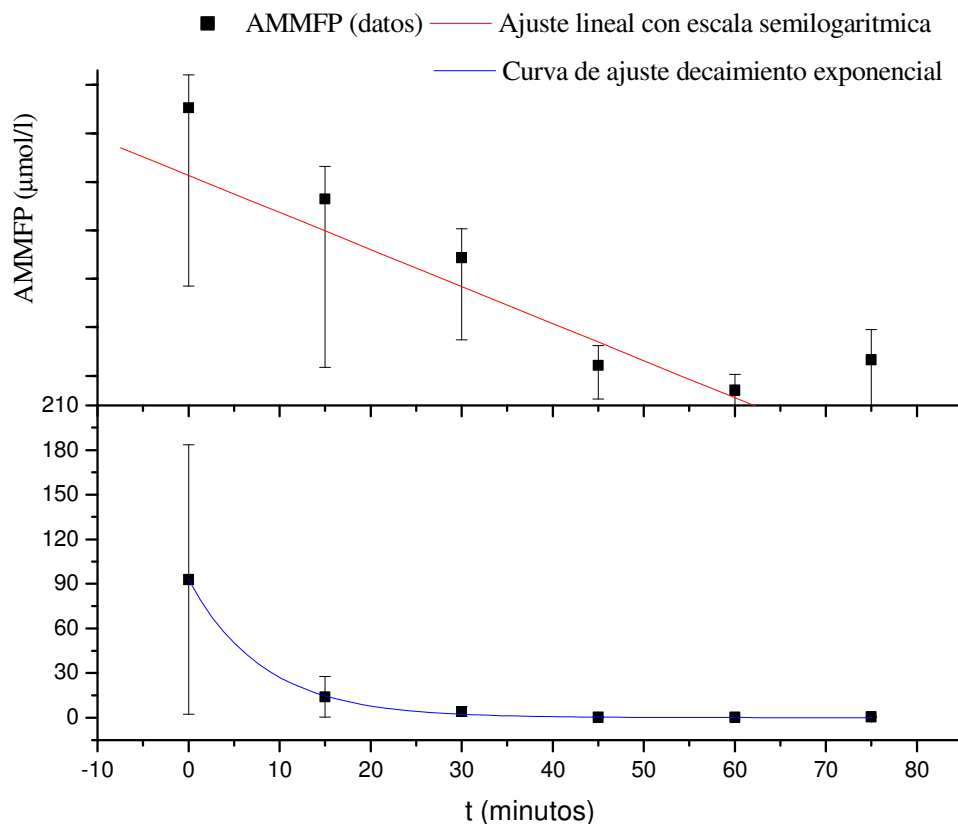


Ilustración 19: Concentración de AMMFP inyectado. En el gráfico superior se utilizó una escala logarítmica en base e.

RESULTADOS

Del análisis realizado se pudo deducir que la cinética de desaparición del complejo del plasma es de primer orden.

En el gráfico superior de la Ilustración 19 se utilizó, en el eje vertical, una escala logarítmica en base e. Utilizando la herramienta de ajuste $y_{scale}(Y) = A + B * x_{scale}(X)$ que provee Origin ® se obtuvo que la pendiente de la recta de ajuste es $B = -0,07644 \pm 0,03453$ con $R^2 = 0,848996$.

Estos resultados mejoran cuando se realiza el ajuste no lineal utilizando el modelo $ExpDecay1 y_0 + A1 * \exp(x/t1)$ que provee la biblioteca del Origin ®.

Se fija $y_0 = 0$. El software estimó el valor de $A1 = 92.85196 \pm 0.99969$ y de $t1 = 8.13905 \pm 0.28914$ con $R^2 = 0.99938$.

La constante de captación es $1/t1 = k_c = 0,12286 \pm 0,00436 \text{ min}^{-1}$.

En trabajos anteriores el valor obtenido para k_c por inyección del complejo fue $0.057 \pm 0.0028 \text{ min}^{-1}$ [58].

También se realizó la experiencia de determinar el valor de k_c a partir de los valores medidos de concentración de AMMFP luego de la inyección intravenosa de MFP. El análisis del proceso se realizó a tiempos posteriores al máximo de concentración del complejo. Se utilizaron los valores de la Tabla IV.

En la linealización logarítmica se trabajó como en los casos anteriores. Se obtuvo un valor estimado de $k_c = 0,05371 \pm 0,02435$ calculado con $R^2 = 0,947118$ (ver Ilustración 20)

En el ajuste exponencial quedó verificado que el proceso de captación del complejo AMMFP es de orden uno y se obtuvo que el valor de la constante cinética de captación es $k_c = 0,062253 \pm 0,049367 \text{ min}^{-1}$ con $R^2 = 0.98936$ (ver Ilustración 20)

Se observa que los valores de k_c obtenidos no son diferentes independientemente del método de ajuste. En los estudios posteriores se utilizan los valores de la Tabla IV, por lo tanto se elige $k_c = 0,062253 \pm 0,049367 \text{ min}^{-1}$.

Luego

$$v_c = -k_c AMMFP$$

E 4-14

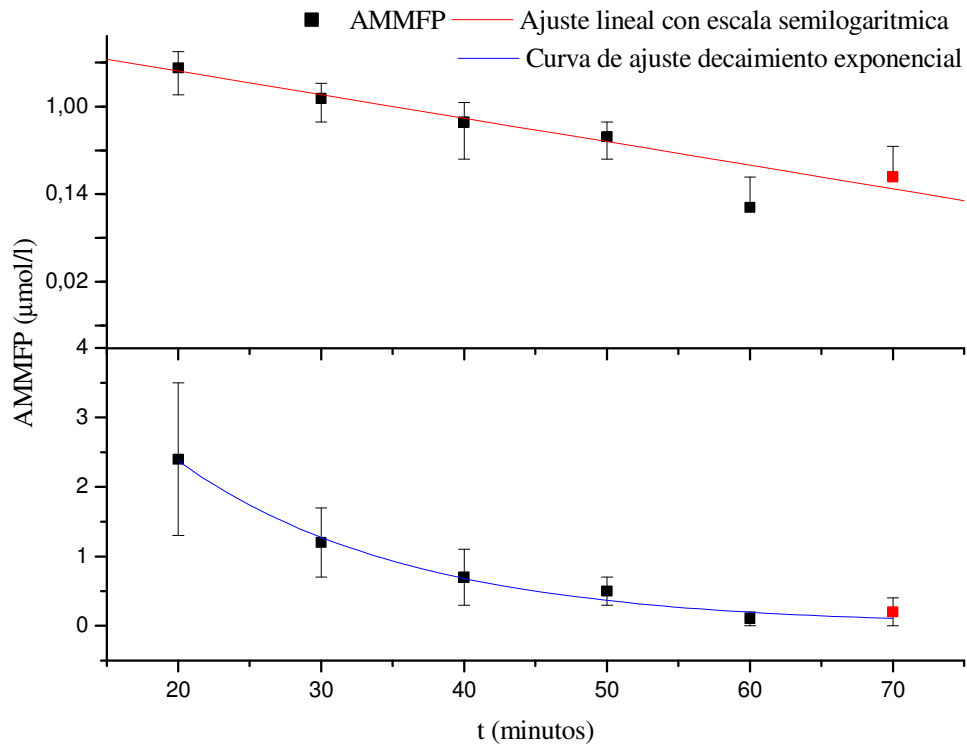


Ilustración 20. Concentración de AMMFP tras una dosis intravenosa de MFP. En el gráfico superior se utilizó una escala logarítmica en base e.

En el desarrollo de las estimaciones realizadas es relevante señalar la validez de los métodos tradicionales de linealización y destacar la agilidad de las nuevas tecnologías en la aplicación de métodos más precisos en los procesos de ajuste no lineal.

4.3.3 Formulación del modelo matemático

La información obtenida sobre constantes de velocidad y ordenes de reacción permitió reescribir el sistema E 4-11 (Pág. 60) y formular el siguiente sistema de ecuaciones para modelizar los cambios en la concentración plasmática de AM, MFP y el

 RESULTADOS

complejo AMMFP, tras una inyección intravenosa de MFP. En el sistema E 4-11 las velocidades v_i y v_c se reemplazaron según las ecuaciones E 4-13 y E 4-14. El sistema de ecuaciones diferenciales y las condiciones iniciales que describen la homeostasis de la AM tras una dosis intravenosa de MFP determinan el siguiente problema de Cauchy

$$\begin{cases} \frac{dAM}{dt}(t) = v_S(AM(t)) - v_I(AM(t)) - k_i AM(t)MFP(t) \\ \frac{dMFP}{dt}(t) = -k_i AM(t)MFP(t) - k_e MFP(t) \\ \frac{dAMMFP}{dt}(t) = k_i AM(t)MFP(t) - k_c AMMFP(t) \end{cases}$$

$$AM(0) = AM_0 \quad MFP(0) = MFP_0 \quad AMMFP(0) = 0$$

E 4-15

Los parámetros que aparecen en este modelo son las siguientes constantes cinéticas:

k_e es la suma de todas las constantes cinéticas de eliminación de MFP (depuración renal e hidrólisis plasmática) sin incluir su unión a AM.

k_i es la constante de velocidad de inactivación de AM por su unión a MFP.

k_c es la constante de velocidad de depuración plasmática del complejo AMMFP.

Todos estos parámetros son positivos.

En la primera ecuación de E 4-15, los dos primeros términos del segundo miembro corresponden al balance de la concentración plasmática de AM en ausencia de perturbaciones externas (resuelto en 4.1 Pág. 45). El tercer término corresponde a la velocidad de inactivación (v_i) escrita según la ecuación E 4-13 (Pág. 65).

En la segunda ecuación diferencial de E 4-15, el primer término de la derecha indica que la depuración de MFP es una función de AM y MFP según lo explicitado en la ecuación E 4-13. El segundo término responde a otros procesos de depuración plasmática del MFP como pueden ser la excreción renal y la hidrólisis producida por las fosfatasas plasmáticas. En ambos términos el orden del proceso respecto del MFP se

RESULTADOS

supuso igual a 1. La imposibilidad técnica de medir MFP libre en plasma impide los estudios para verificar dicho orden.

La tercera ecuación diferencial de E 4-15 modeliza la razón de cambio de la concentración plasmática del complejo cuando v_i y v_c se reemplazan por las ecuaciones E 4-13 y E 4-14.

4.3.4 Análisis cualitativo del sistema

En la descripción matemática se adopta la siguiente nomenclatura para las respectivas concentraciones

$$x_1 = AM(t) , x_2 = MFP(t) , x_3 = AMMFP(t)$$

Las concentraciones iniciales se anotan

$$x_{1_0} = AM_0 , x_{2_0} = MFP_0 , x_{3_0} = AMMFP_0 = 0$$

El problema a valores iniciales E 4-15 de la Pág. 69 se escribe:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = v_s(x_1) - v_I(x_1) - k_i x_1 x_2 \\ \dot{x}_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 \\ \dot{x}_3 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3 \\ x_1(0) = x_{1_0} \quad x_2(0) = x_{2_0} \quad x_3(0) = x_{3_0} = 0 \end{cases}$$

E 4-16

El sistema E 4-16 se escribe en notación vectorial

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{X}} = \mathbf{F}(\mathbf{X}) \\ \mathbf{X}(0) = \mathbf{X}_0 \end{cases}$$

E 4-17

donde $\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{bmatrix}$ es la variable vectorial que representa las concentraciones de los tres

compuestos en el instante t , $\mathbf{X}_0 = \begin{bmatrix} x_{10} \\ x_{20} \\ 0 \end{bmatrix}$ es el vector de las condiciones iniciales,

$$\mathbf{F}(\mathbf{X}) = \begin{bmatrix} f_1(\mathbf{X}) \\ f_2(\mathbf{X}) \\ f_3(\mathbf{X}) \end{bmatrix} \quad \text{siendo} \quad \begin{aligned} f_1(\mathbf{X}) &= v_S(x_1) - v_I(x_1) - k_i x_1 x_2 \\ f_2(\mathbf{X}) &= -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 \\ f_3(\mathbf{X}) &= k_i x_1 x_2 - k_c x_3 \end{aligned}$$

Un aspecto por resaltar es el hecho que el dominio de definición de la ecuación del sistema E 4-17 con sentido biológico es el conjunto

$$\Omega = \left\{ [x_1; x_2; x_3]^T \in \mathbb{R}^3 / x_{1min} \leq x_1 \leq x_{1max} \quad , \quad 0 \leq x_2 \leq x_{20} \quad , \quad 0 \leq x_3 \leq x_{3max} \right\}$$

E 4-18

Aquí x_{1min} y x_{1max} representan las concentraciones máxima y mínima de AM compatibles con la vida y x_{3max} es la máxima concentración que puede alcanzar el complejo AMMFP en el plasma.

Asumiendo que v_I y v_S son continuamente diferenciables, el campo vectorial $\mathbf{F} : \Omega \subseteq \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}^3$ es diferenciable en Ω y las derivadas parciales $\frac{\partial f_i}{\partial x_j}$ $i, j = 1, 2, 3$ existen y son continuas en Ω .

El conjunto Ω es un invariante positivo con respecto al sistema E 4-16, en el sentido que toda trayectoria solución del mismo con condiciones iniciales en Ω permanece en Ω para todo $t > 0$.

En los siguientes lemas se prueba que el campo vectorial \mathbf{F} no apunta hacia afuera de Ω . En cada demostración se elige un vector que apunta hacia afuera y es normal a la frontera de Ω . El producto escalar entre dicho vector y el campo vectorial debe resultar no positivo para validar el enunciado.

RESULTADOS

Lema 1: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_2 = 0$

Demostración: Sea $n_1 = (0, -1, 0)$

$$\dot{X} \cdot n_1 = k_i x_1 x_2 + k_e x_2 \Big|_{x_2=0} = 0 \quad \forall x_1 \text{ y } x_3$$

Luego, las trayectorias son tangentes al plano $x_2 = 0$

Lema 2: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_2 = x_{2_0}$

Demostración: Sea $n_2 = (0, 1, 0)$

$$\dot{X} \cdot n_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 \Big|_{x_2=x_{2_0}} = -x_{2_0} (k_i x_1 + k_e) < 0 \quad \forall x_1 \text{ y } x_3$$

Lema 3: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_3 = 0$

Demostración: Sea $n_3 = (0, 0, -1)$

$$\dot{X} \cdot n_3 = -k_i x_1 x_2 + k_c x_3 \Big|_{x_3=0} = -k_i x_1 x_2 < 0 \quad \forall x_1 \text{ y } x_2$$

Lema 4: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_3 = x_{3_{max}}$

Demostración: Sea $n_4 = (0, 0, 1)$

$$\dot{X} \cdot n_4 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3 \Big|_{x_3=x_{3_{max}}} = -k_i x_1 x_2 - k_c x_{3_{max}} \leq 0 \quad \forall x_1 \text{ y } \forall x_2$$

Lema 5: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_1 = x_{1_{min}}$ si $v_s(x_{1_{min}}) - v_I(x_{1_{min}}) \geq k_i x_{1_{min}} x_{2_0}$

Demostración: Sea $n_5 = (-1, 0, 0)$

$$\dot{X} \cdot n_5 = -v_s(x_1) + v_I(x_1) + k_i x_1 x_2 \Big|_{x_1=x_{1_{min}}} = -v_s(x_{1_{min}}) + v_I(x_{1_{min}}) + k_i x_{1_{min}} x_2 \leq 0$$

$$\text{si } k_i x_{1_{min}} x_2 \leq v_s(x_{1_{min}}) - v_I(x_{1_{min}}) \quad \forall x_2$$

Luego, para $x_2 = x_{2_0}$ resulta $v_s(x_{1_{min}}) - v_I(x_{1_{min}}) \geq k_i x_{1_{min}} x_{2_0}$

RESULTADOS

A partir de este lema se obtiene que para $x_2 = 0$ es $v_s(x_{1min}) \geq v_I(x_{1min})$

Cuando $x_1 = x_{1min}$ se está en una situación límite en que la concentración de AM no debería disminuir para mantenerse dentro de los valores fisiológicos; por lo tanto es aceptable que la velocidad de secreción supere a la velocidad de inactivación a concentraciones mínimas de AM.

Lema 6: El campo vectorial F no apunta hacia fuera de Ω sobre el plano $x_1 = x_{1max}$ si $v_s(x_{1max}) \leq v_I(x_{1max})$

Demostración: Sea $n_6 = (1,0,0)$

$$\dot{X} \cdot n_6 = v_s(x_1) - v_I(x_1) - k_i x_1 x_2 \Big|_{x_1=x_{1max}} = v_s(x_{1max}) - v_I(x_{1max}) - k_i x_{1max} x_2 \leq 0$$

$$\text{si } v_s(x_{1max}) - v_I(x_{1max}) \leq k_i x_{1max} x_2 \quad \forall x_2$$

Luego, para $x_2 = 0$ resulta $v_s(x_{1max}) \leq v_I(x_{1max})$

Cuando $x_1 = x_{1max}$ se está en una situación límite en que la concentración de AM no debería aumentar para mantenerse dentro de los valores fisiológicos; por lo tanto es aceptable que la velocidad de inactivación supere a la velocidad de secreción a concentraciones máximas de AM.

El problema a valores iniciales E 4-17 tiene solución única $\varphi(t)$ en $[0; \infty)$ ya que se verifican las hipótesis del Teorema Fundamental de Existencia y Unicidad sobre el conjunto Ω . Además, las soluciones que comienzan en Ω permanecerán allí $\forall t \geq 0$.

Los estados de equilibrio del sistema E 4-17, es decir, las trayectorias solución de las ecuaciones diferenciales de E 4-16 tal que $\dot{X} = \bar{0}$ se obtienen resolviendo el sistema de ecuaciones algebraicas.

$$\begin{aligned} v_s(x_1) - v_I(x_1) - k_i x_1 x_2 &= 0 \\ -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 &= 0 \\ k_i x_1 x_2 - k_c x_3 &= 0 \end{aligned}$$

E 4-19

RESULTADOS

La segunda ecuación de E 4-19 se factora así

$$-x_2(k_i x_1 + k_e) = 0$$

E 4-20

La primera solución que se obtiene de E 4-20 es $x_2^* = 0$. Sustituyéndola en la primera ecuación de E 4-19 se obtiene $v_S(x_1) - v_I(x_1) = 0$. Previamente se supuso que las velocidades de secreción e inactivación no son constantes, luego existe x_1^* tal que $x_{1min} \leq x_1^* \leq x_{1max}$ y verifique

$$v_S(x_1^*) = v_I(x_1^*)$$

E 4-21

Sustituyendo $x_2^* = 0$ en la tercer ecuación de E 4-19 resulta $-k_c x_3 = 0$ luego $x_3^* = 0$.

Luego un punto crítico es $X^* = \begin{bmatrix} x_1^* \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ donde x_1^* verifica E 4-21.

La segunda solución de E 4-20 es $x_1^{**} = -\frac{k_e}{k_i}$ que se obtiene igualando a cero el segundo factor de dicha ecuación.

Se observa que $x_1^{**} < 0$ pues $k_e > 0$ y $k_i > 0$.

Luego, el segundo punto crítico obtenido es $X^{**} = \begin{bmatrix} -\frac{k_e}{k_i} \\ x_1^{**} \\ x_3^{**} \end{bmatrix}$ que no pertenece a Ω .

Su estudio carece de interés biológico ya que el valor en que se equilibra la concentración de AM sería negativo.

RESULTADOS

A continuación se procede al estudio de la estabilidad asintótica local del estado de

$$\text{equilibrio } \mathbf{X}^* = \begin{bmatrix} x_1^* \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}.$$

La matriz Jacobiana del sistema E 4-16 en cualquier punto del espacio de fase Ω está dada por

$$DF(\mathbf{X}) = \left[\frac{\partial f_i}{\partial x_j}(\mathbf{X}) \right] = \begin{bmatrix} v'_S - v'_I - k_i x_2 & -k_i x_1 & 0 \\ -k_i x_2 & -k_i x_1 - k_e & 0 \\ k_i x_2 & k_i x_1 & -k_c \end{bmatrix}$$

E 4-22

donde v'_S y v'_I son respectivamente las derivadas de v_S y v_I respecto de x_1 .

La matriz Jacobiana E 4-22 evaluada en el punto estacionario \mathbf{X}^* resulta ser

$$DF(\mathbf{X}^*) = \begin{bmatrix} v'_S(x_1^*) - v'_I(x_1^*) & -k_i x_1^* & 0 \\ 0 & -k_i x_1^* - k_e & 0 \\ 0 & k_i x_1^* & -k_c \end{bmatrix}$$

E 4-23

Resulta evidente que los autovalores de E 4-23 son

$$\lambda_1 = v'_S(x_1^*) - v'_I(x_1^*)$$

E 4-24

$$\lambda_2 = -(k_i x_1^* + k_e)$$

E 4-25

$$\lambda_3 = -k_c$$

E 4-26

 RESULTADOS

Todos los autovalores de la matriz Jacobiana E 4-23 tienen parte real no nula si y solo si $v'_S(x_1^*) - v'_I(x_1^*) \neq 0$. Luego, X^* es un punto de equilibrio hiperbólico cuando $v'_S(x_1^*) \neq v'_I(x_1^*)$

Es obvio que $\lambda_2 < 0$ y $\lambda_3 < 0$.

Por lo tanto X^* es un punto de equilibrio hiperbólico asintóticamente estable si y solo si

$$\lambda_1 = v'_S(x_1^*) - v'_I(x_1^*) < 0$$

E 4-27

Los principales resultados obtenidos se resumen a continuación:

El punto crítico o estacionario X^* es el único punto hiperbólico contenido en el dominio de definición biológico Ω si y solo si $v'_S(x_1^*) \neq v'_I(x_1^*)$ con $x_{1min} \leq x_1^* \leq x_{1max}$.

Si $v'_S(x_1^*) < v'_I(x_1^*)$ resulta que X^* es asintóticamente estable (nodo atractor).

Si $v'_S(x_1^*) > v'_I(x_1^*)$ resulta que X^* es un punto de equilibrio inestable (saddle point).

Se continúa el análisis del sistema retomando la simplificación lineal para las velocidades de inactivación y secreción de AM planteadas en las ecuaciones E 4-1 y E 4-2, Pág. 46 del párrafo 4.1.

De la ecuación E 4-1 resulta que $v'_S(x_1) = h_S \quad \forall x_1$, luego $v'_S(x_1^*) = h_S$.

De la ecuación E 4-2 resulta que $v'_I(x_1) = h_I \quad \forall x_1$, luego $v'_I(x_1^*) = h_I$.

RESULTADOS

Bajo estos supuestos, y teniendo en cuenta la relación obtenida en E 4-27 \mathbf{X}^* es un punto estacionario asintóticamente estable si y solo si $h_S < h_I$.

Por otro lado, de las ecuaciones E 4-1 y E 4-2 resulta $v_S(x_1) - v_I(x_1) = -kx_1 + A$

donde $k = h_I - h_S > 0$ y $A = A_S - A_I$

La primera componente de \mathbf{X}^* es $x_1^* = \frac{A}{k}$. Se observa que éste es el valor estacionario que se obtuvo en el párrafo 4.1 (Pág.50).

Los resultados centrales debido a estas restricciones se resumen a continuación.

Si $k = h_I - h_S > 0$ y $A = A_S - A_I$ el siguiente problema de valores iniciales

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = -k_i x_1 x_2 - kx_1 + A \\ \dot{x}_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 \\ \dot{x}_3 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3 \\ x_1(0) = x_{10} \quad x_2(0) = x_{20} \quad x_3(0) = x_{30} \end{cases}$$

E 4-28

es un modelo factible para modelizar la homeostasis de la AM en presencia de una dosis

intravenosas de MFP. Tiene un único estado estacionario $\mathbf{X}^* = \begin{bmatrix} A \\ \frac{A}{k} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ en el dominio de

definición biológico Ω (ver E 4-18 Pág.71)

Si $k < 0$ entonces \mathbf{X}^* es un punto de equilibrio asintóticamente inestable en Ω , más precisamente es un saddle point.

Si $k = 0$ no hay puntos críticos aislados en Ω

Si $k > 0$ este modelo admite un único punto de equilibrio \mathbf{X}^* asintóticamente estable en Ω si $x_{1\min} \leq \frac{A}{k} \leq x_{1\max}$.

RESULTADOS

Se distinguen tres diferentes situaciones:

a) Si $0 < x_{10} < \frac{A}{k}$ el modelo predice que el sistema alcanza un punto de equilibrio en el que el nivel basal de AM es mayor que el valor medido a tiempo 0. Esta relación determina que la AM secretada por el hígado es mayor que la depurada por los tejidos después de unirse a proteinasas.

b) El sistema regresa a las condiciones anteriores a la perturbación cuando $x_{10} = \frac{A}{k}$. Esta situación corresponde a un estado metabólico donde la producción hepática y la inactivación de proteinasas están en equilibrio.

c) Cuando $\frac{A}{k} < x_{10}$ el modelo predice que el sistema alcanza el equilibrio con un valor basal de concentración de AM menor que el valor medido antes de la perturbación. En esta situación el hígado produce menos AM que la necesaria para la inactivación de proteinasas.

A continuación se ejemplifican estas tres posibles situaciones. Para ello se construye un diagrama de bloques utilizando la biblioteca Simulink de MatLab (ver 3.8 Pág. 43).

En la Ilustración 21 se muestra el diagrama de bloques desarrollado a partir del modelo matemático E 4-28 (Pág.77).

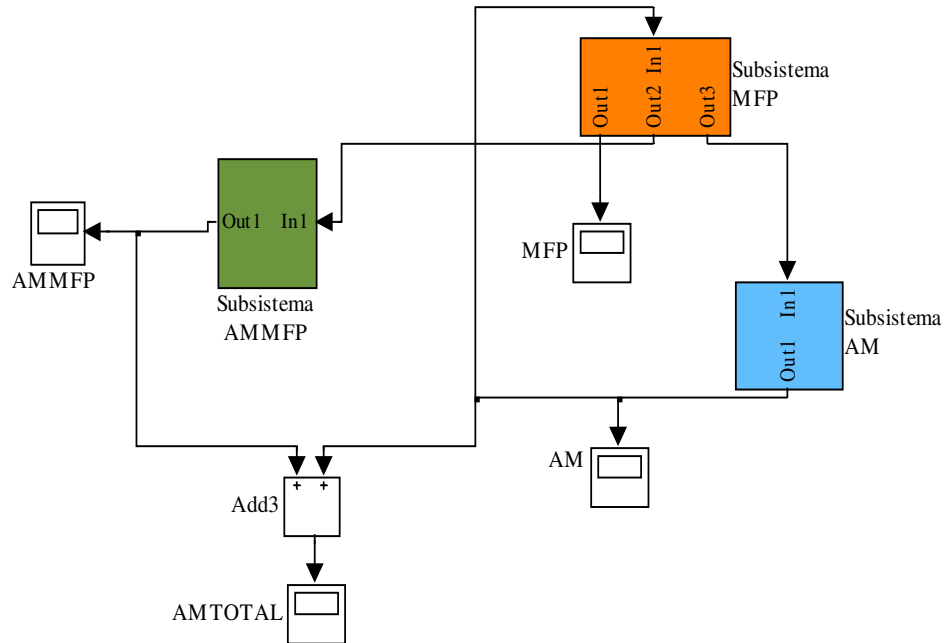


Ilustración 21: Diagrama en bloques del sistema intravenoso

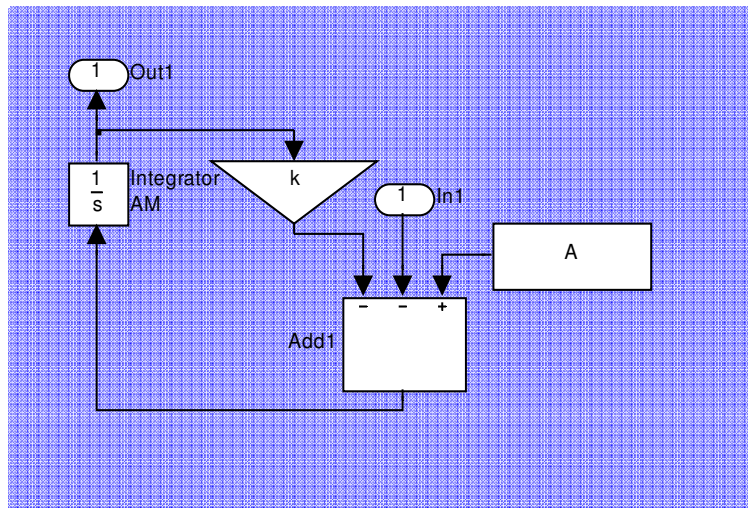
Se distinguen tres subbloques que se corresponden con cada una de las ecuaciones de dicho sistema.

Se agregaron tres Scopes para visualizar el comportamiento de las concentraciones de cada una de las variables y un cuarto bloque de visualización que muestra el comportamiento de la suma de las concentraciones de AM ligada y no ligada a MFP.

En las siguientes ilustraciones se muestra el algoritmo de cada uno de los bloques de cada subsistema. Las entradas señaladas In w ($w = 1, 2 \dots$) y las salidas Out v ($v = 1, 2 \dots$) de la Ilustración 21 se corresponden con las indicadas en el correspondiente subbloque.

RESULTADOS

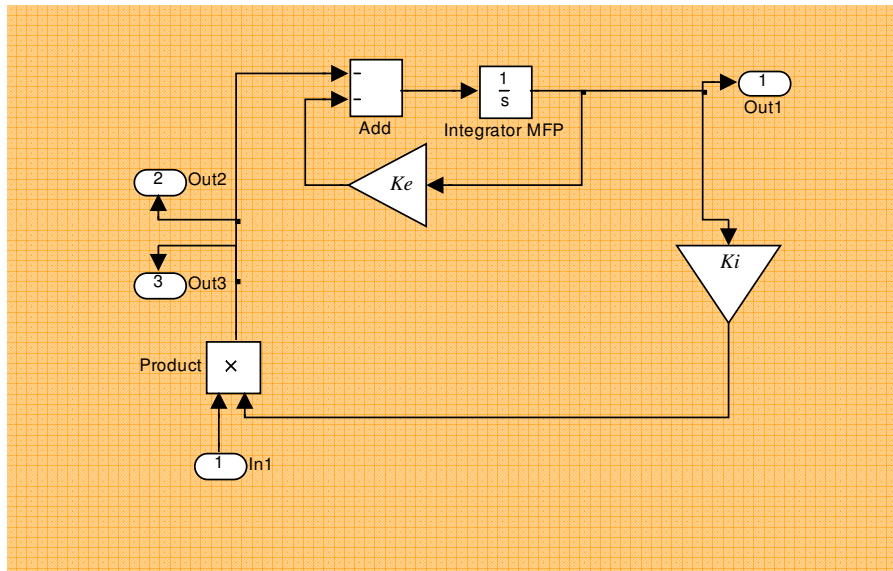
El subsistema AM está representado por el bloque azul (Ilustración 22) y corresponde a la primera ecuación de E 4-28. En el bloque suma (Add1) donde las entradas son la variable x_2 y las constantes A y k , se realizan las operaciones que definen \dot{x}_1 . Esta es la variable entrada del bloque Integrator1, la salida x_1 se visualiza en la Scope AM que se observa en la Ilustración 21.



$$\dot{x}_1 = -k_f x_1 x_2 - kx_1 + A$$

Ilustración 22: Subsistema AM. Las líneas orientadas representan a la variable x_1 . En el bloque Integrator se ingresa el valor de x_{1_0}

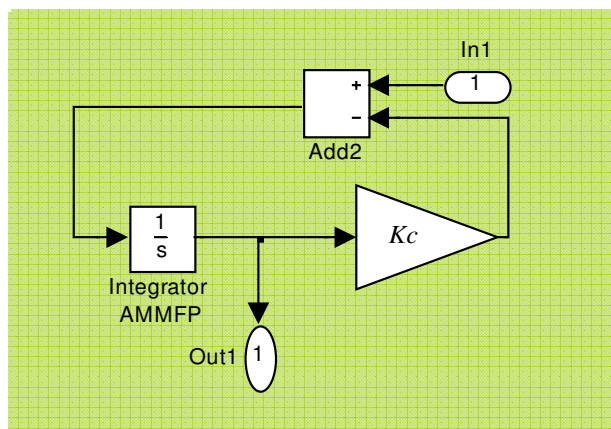
El subsistema MFP está representado por el bloque naranja (Ilustración 23) y corresponde a la segunda ecuación de E 4-28. La construcción de este bloque requiere la entrada de x_1 en el bloque multiplicador (Produc) cuya salida, $-k_f x_1 x_2$, se suma al segundo término, $-k_e x_2$, en el bloque Add. La salida de este bloque es la entrada al bloque Integrator.



$$\dot{x}_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2$$

*Ilustración 23: Subsistema MFP. Las líneas orientadas representan a la variable x_2 .
En el bloque Integrator se ingresa el valor de x_{20}*

El subsistema AMMFP está representado por el bloque verde (Ilustración 24) y corresponde a la tercera ecuación de E 4-28. Se construyó en forma similar a los anteriores.



$$\dot{x}_3 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3$$

*Ilustración 24: Subsistema AMMFP. Las líneas orientadas representan la variable x_3 .
En el bloque Integrator se ingresa el valor de x_{30}*

RESULTADOS

En las siguientes gráficas se ejemplifica la evolución de la concentración plasmática de la AM, de la concentración de MFP y del complejo AMMFP.

A los parámetros k_i y k_c se le asignaron los valores ya estimados: $k_i = 0,083583 \pm 0,01998 \text{ min}^{-1}$ y $k_c = 0,062253 \pm 0,049367 \text{ min}^{-1}$ obtenidos en párrafos anteriores (Pág. 65 y 67).

Se sugieren valores para k_e , k y A sujetos a las restricciones teóricas establecidas. Se eligió el valor de $k_e = 0.5 \text{ min}^{-1}$.

Las condiciones iniciales se establecieron en $x_{1_0} = 10 \mu\text{mol/l}$, $x_{2_0} = 100 \mu\text{mol/l}$ y $x_{3_0} = 0 \mu\text{mol/l}$.

La Ilustración 25 y la Ilustración 26 corresponden a $k = 1$ y $A = 12$. En este caso el equilibrio se alcanza cuando la concentración de AM es de $12 \mu\text{mol/l}$ (caso a). La respuesta es la esperada.

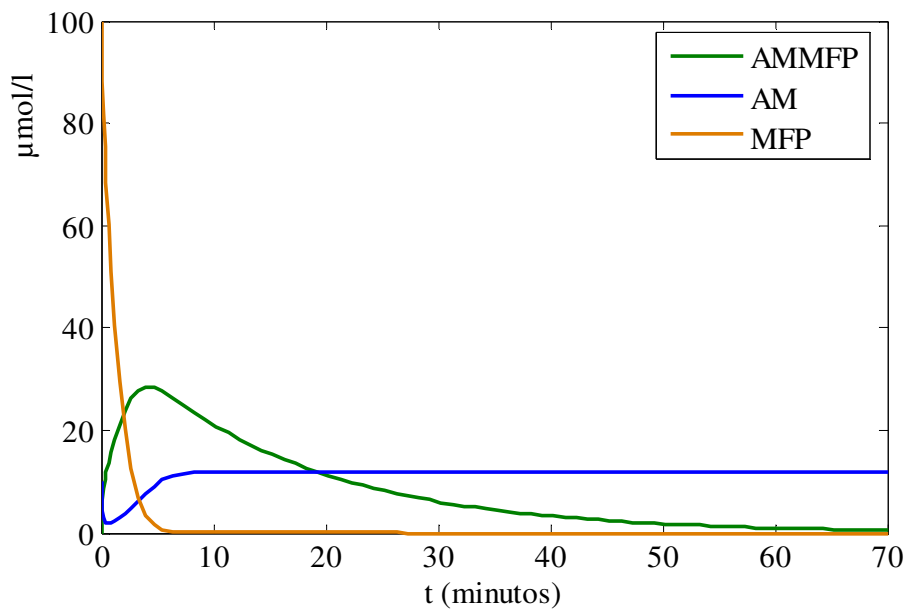


Ilustración 25: Simulación para $0 < x_{1_0} < \frac{A}{k}$

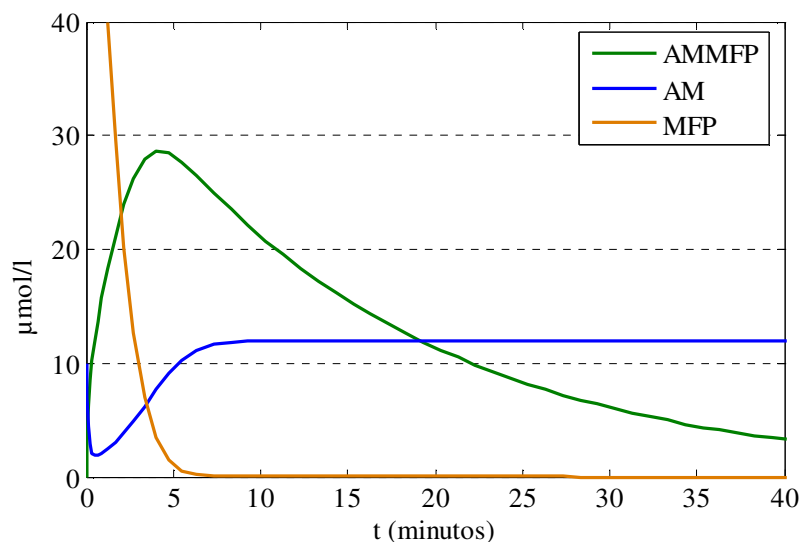


Ilustración 26: Detalle amplificado de Ilustración 25

El sistema planteado y el simulador construido se utilizan para investigar, *in silice*, la respuesta del modelo a modificaciones de los valores de los parámetros. En cada experimento, se perturba el valor de un solo parámetro en un factor 10^1 y 10^{-1} , a los restantes parámetros se les asigna los valores del ejemplo.

Cuando la constante k_i es diez veces mayor ($k_i = 0,83583 \text{ min}^{-1}$) se observa que aumenta la formación del complejo AMMFP, disminuye la concentración de AM y la depuración del MFP es más rápida.

En la Ilustración 27 se observa cómo se modifica el comportamiento de las variables con respecto a la situación ejemplificada (en líneas de puntos y con los mismos colores).

Cuando la constante k_i es diez veces menor ($k_i = 0,0083583 \text{ min}^{-1}$) se observa que disminuye la formación del complejo AMMFP, la concentración de AM disminuye levemente y la depuración del MFP es más lenta.

En la Ilustración 28 se observa como se modifica el comportamiento de las variables con respecto a lo observado en el gráfico de la Ilustración 25 (líneas de puntos).

RESULTADOS

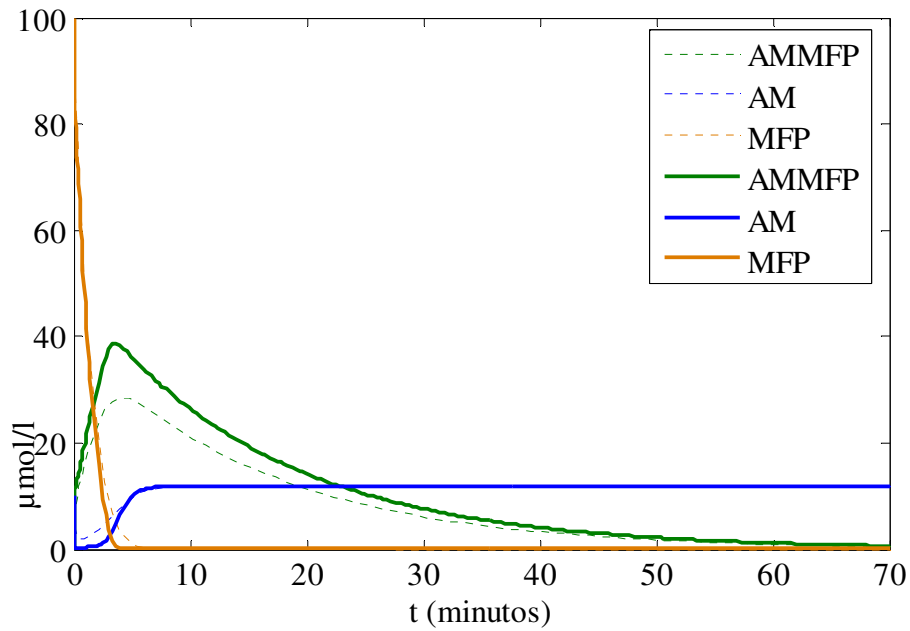


Ilustración 27: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_i aumenta en un factor 10 (líneas continuas)

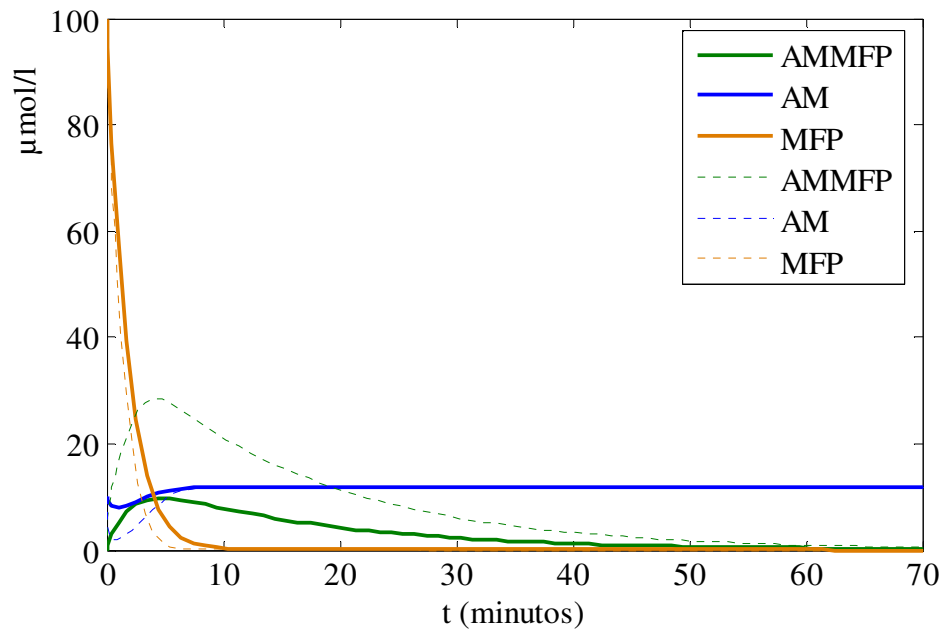


Ilustración 28: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_i disminuye en un factor 10 (líneas continuas)

RESULTADOS

Si se altera el valor de k_e aumentándolo 10 veces ($k_e = 5$) se observa que el MFP es depurado casi en forma instantánea del torrente sanguíneo, la unión a la AM es inmediata y por un periodo de tiempo muy acotado. Esta perturbación sólo es posible observarla en experimentos *in silice*. (Ver Ilustración 29)

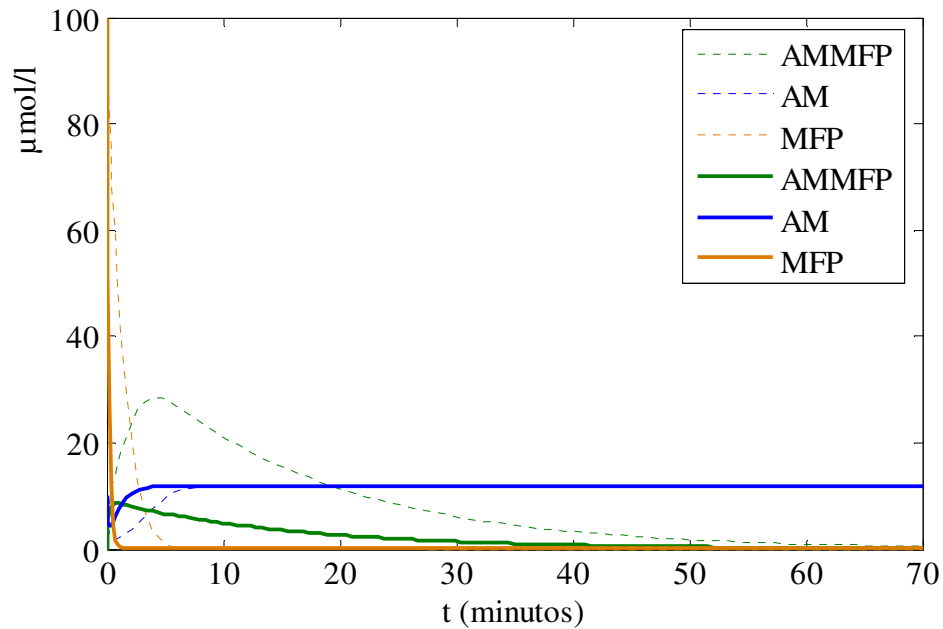


Ilustración 29: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_e aumenta en un factor 10 (líneas continuas)

Si se altera el valor de k_e disminuyéndolo 10 veces ($k_e = 0.05$) se observa que la depuración del MFP es lenta, se une a la AM inactivándola durante un periodo de tiempo mas prolongado. Por este motivo aumenta considerablemente la formación del complejo AMMFP (Ilustración 30) y el valor máximo de la concentración se alcanza más tardíamente.

RESULTADOS

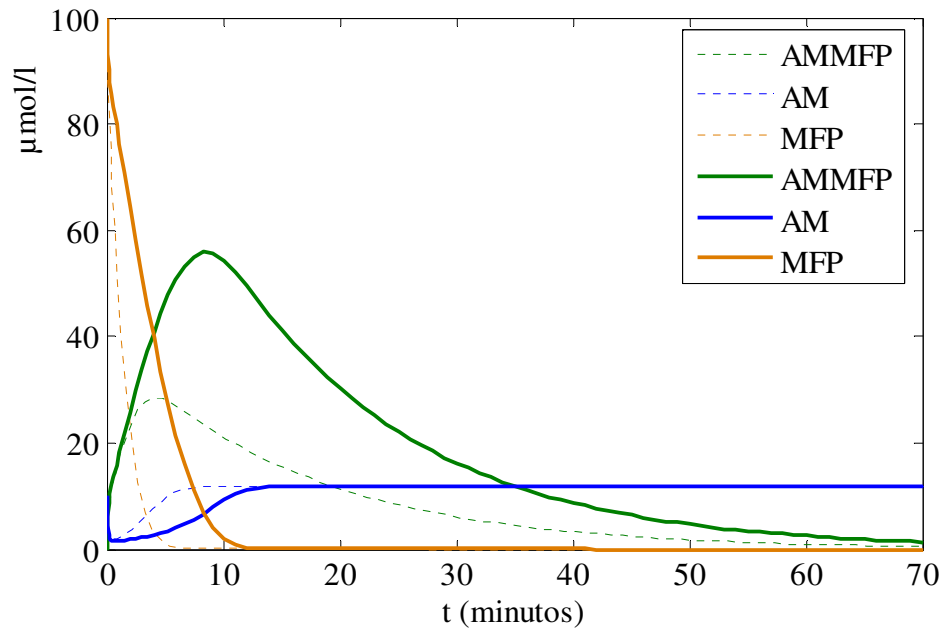


Ilustración 30: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_e disminuye en un factor 10 (líneas continuas)

Si se altera el valor de k_c aumentándolo 10 veces ($k_c = 0.62253$, ver Ilustración 31) o disminuyéndola con un factor de 10 ($k_c = 0.0062253$, ver Ilustración 32) se observa que esta constante de velocidad sólo modifica la depuración del complejo AMMFP.

Las otras variables del sistema permanecen estables respecto de la simulación de referencia.

RESULTADOS

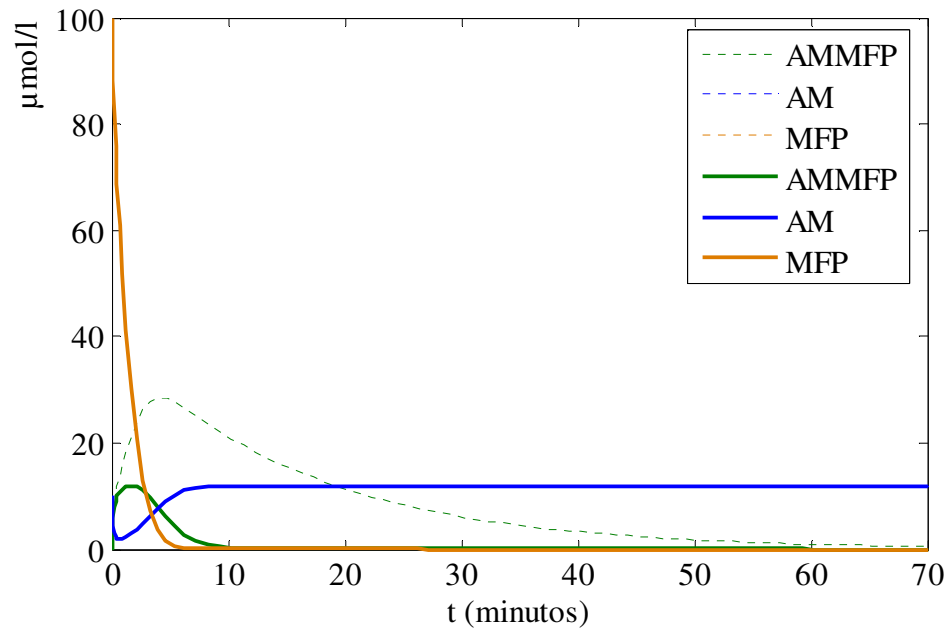


Ilustración 31: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_c aumenta en un factor 10

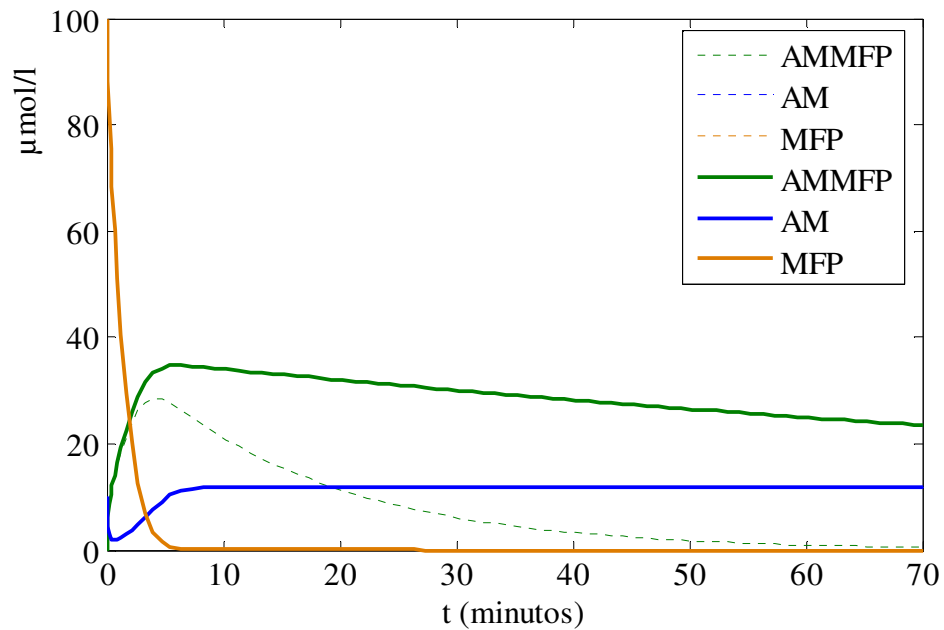


Ilustración 32: Gráfico comparativo entre las variables cuando la constante de velocidad k_c disminuye en un factor 10

RESULTADOS

A continuación se ejemplifican los resultados de la perturbación simultánea de los parámetros k y A . Esta perturbación se realiza conservando la constante de proporcionalidad entre A y k , por lo tanto no se modifica el punto de equilibrio del sistema (Pág. 77).

Cuando se incrementan los valores se observa que disminuye la inhibición de AM, este resultado está explicado por el aumento de la constante A que se relaciona con la secreción de AM, a mayor concentración de AM hay mayor unión al MFP y mayor formación del complejo. (ver Ilustración 33).

Si disminuyen los valores de k y A disminuye la secreción de AM lo que implica una menor formación del complejo y una menor inhibición de MFP (Ilustración 34).

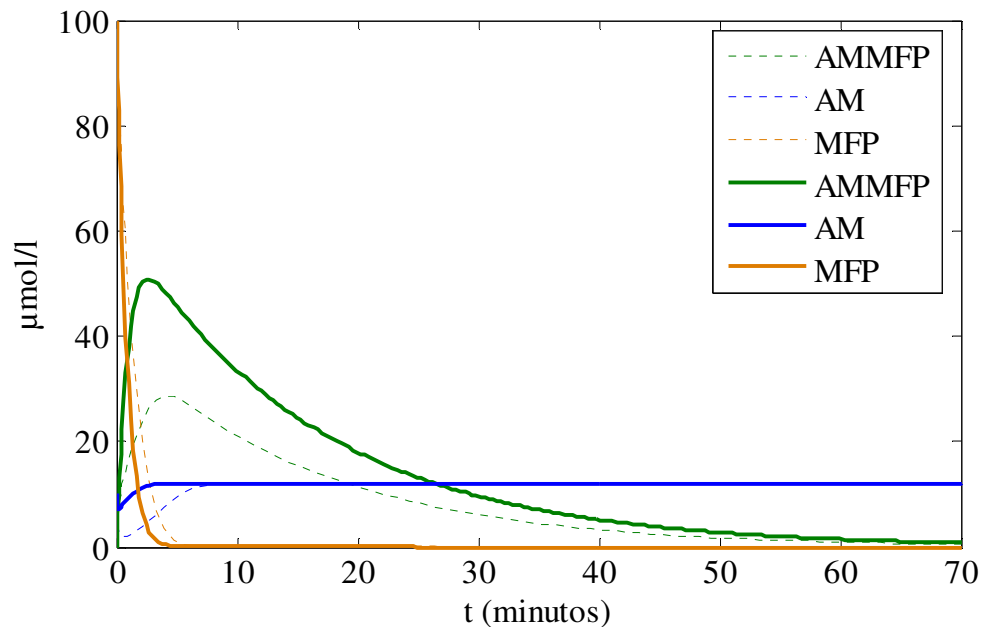


Ilustración 33: Gráfico comparativo entre las variables de estado cuando las constantes A y k aumentan en un factor 10

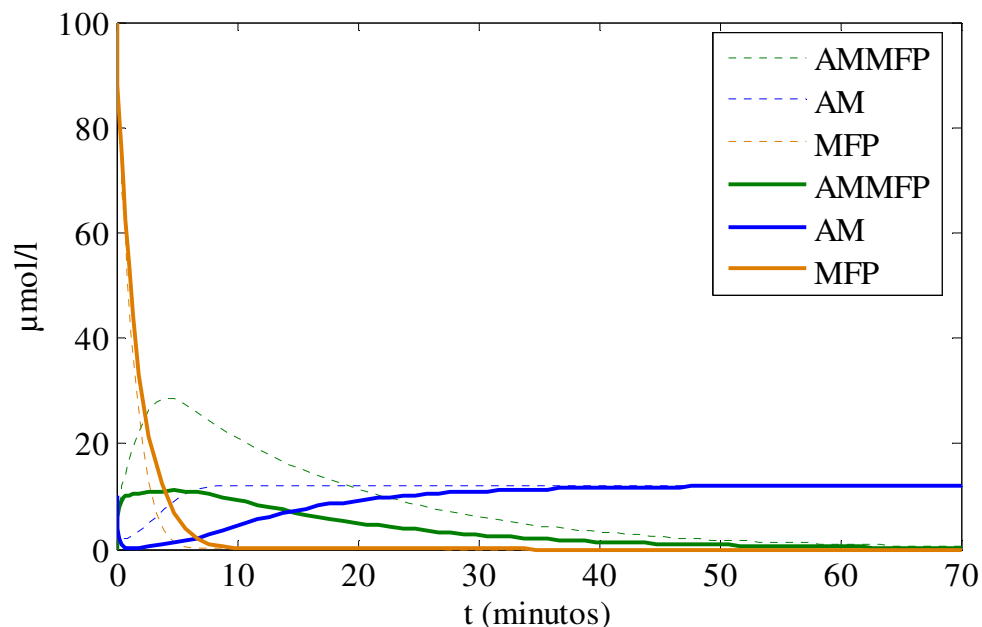


Ilustración 34: Gráfico comparativo entre las variables de estado cuando las constantes A y k disminuyen en un factor 10

A continuación se estudia el comportamiento del modelo cuando se modifican independientemente los valores de los parámetros A y k .

En todos los casos los restantes parámetros recuperan los valores propuestos inicialmente.

La alteración independiente de A y k provoca la variación del punto de equilibrio del sistema.

Se observa que el sistema reacciona de manera diferente aunque alcance el mismo punto de equilibrio si A aumenta en un factor de 10 (Ilustración 36) o k disminuye en el mismo orden (Ilustración 38).

RESULTADOS

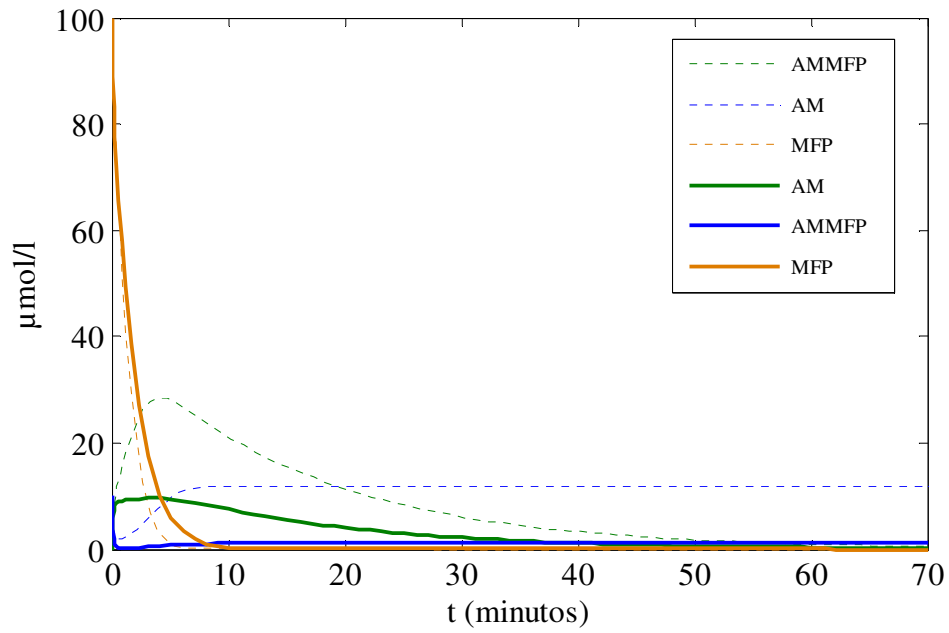


Ilustración 35: Gráfico comparativo entre las variables para $A = 1.2$

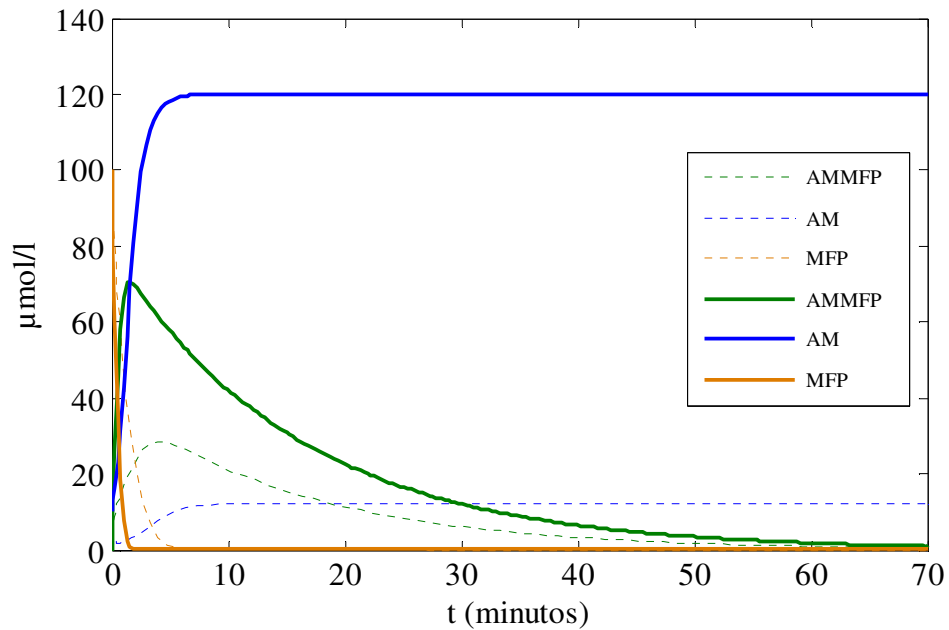


Ilustración 36: Gráfico comparativo entre las variables para $A = 120$

RESULTADOS

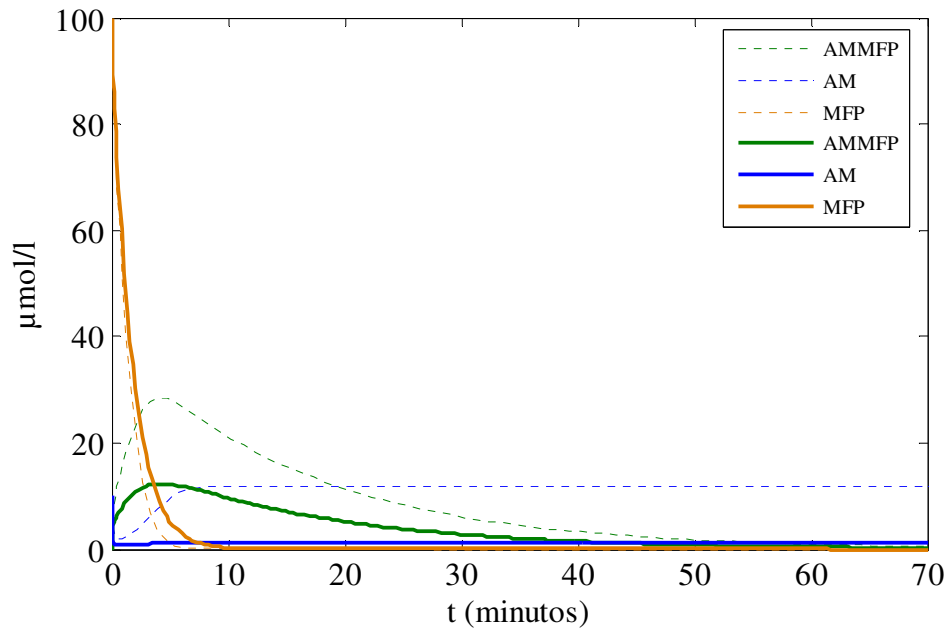


Ilustración 37: Gráfico comparativo entre las variables para $k = 10$

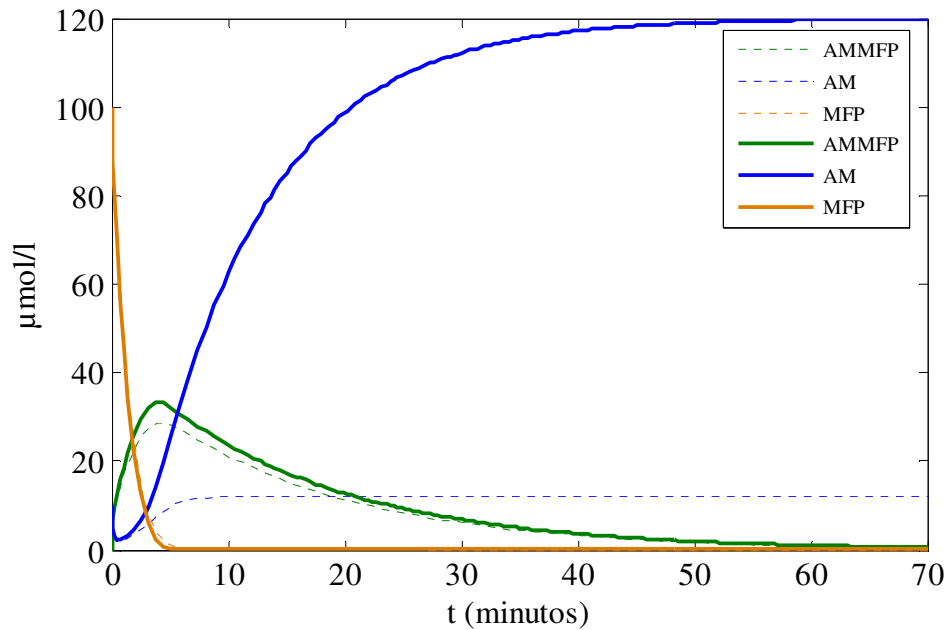


Ilustración 38: Gráfico comparativo entre las variables para $k = 0.1$

En todos los casos se observa que el sistema representa adecuadamente el comportamiento esperado al inyectar una dosis elevada de MFP.

4.3.5 Identificación y estimación de parámetros

La búsqueda de soluciones aproximadas como así también la estimación e identificación de los parámetros está basada en una aceptable valorización inicial en los métodos numéricos.

El modelo presentado establece la interrelación entre tres variables. Dos de ellas, la concentración de MFP y la concentración de AM no ligada a MFP o proteinasas, son variables cuya medición en el plasma sanguíneo no ha sido resuelta. Por lo tanto en la estimación de los parámetros se cuenta con mediciones de la concentración de AMMFP y de AM plasmática total. Esta situación lleva al planteo de un problema para la matemática, la estimación de parámetros conociendo datos parciales de las variables y algunas de las condiciones iniciales. Se recurre a los métodos de estimación de parámetros descriptos en 1.3.3 (Pág. 30). La aplicación de estos métodos iterativos se realiza utilizando DIFFPAR que es un software escrito en MatLab [87,88]. Está basado sobre un algoritmo tipo Gauss-Newton para encontrar un mínimo local de la función objetivo g definida en E 1-8.

El usuario debe proporcionar la siguiente información:

$$\text{El modelo } \dot{\mathbf{X}} = \begin{bmatrix} f_1(\mathbf{X}^T; k_i; k_e; k_c; k; A) \\ f_2(\mathbf{X}^T; k_i; k_e; k_c; k; A) \\ f_3(\mathbf{X}^T; k_i; k_e; k_c; k; A) \end{bmatrix}$$

Los Jacobianos del modelo

$$\left[\frac{\partial f_i}{\partial x_j}(\mathbf{X}^T) \right] = \begin{bmatrix} -k_i x_2 - k & -k_i x_1 & 0 \\ -k_i x_2 & -k_i x_1 - k_e & 0 \\ k_i x_2 & k_i x_1 & -k_c \end{bmatrix} \quad \text{y}$$

$$\begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial k_i}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_1}{\partial k_e}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_1}{\partial k_c}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_1}{\partial k}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_1}{\partial A}(\mathbf{X}^T) \\ \frac{\partial f_2}{\partial k_i}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_2}{\partial k_e}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_2}{\partial k_c}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_2}{\partial k}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_2}{\partial A}(\mathbf{X}^T) \\ \frac{\partial f_3}{\partial k_i}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_3}{\partial k_e}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_3}{\partial k_c}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_3}{\partial k}(\mathbf{X}^T) & \frac{\partial f_3}{\partial A}(\mathbf{X}^T) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -x_1 x_2 & 0 & 0 & -x_1 & 1 \\ -x_1 x_2 & -x_2 & 0 & 0 & 0 \\ x_1 x_2 & 0 & -x_3 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

RESULTADOS

La tabla de datos: Se utilizaron los datos de la Tabla IV (Pág. 61). Las mediciones de AMMFP corresponden a la variable x_3 y la diferencia entre las mediciones de AM y AMMFP se asocia con la variable x_1 .

La matriz de pesos: Se tienen datos parciales de las variables ya que solamente es posible medir las concentraciones de AM y AMMFP. Se asignó peso 1 a las variables x_1 y x_3 y peso 0 a x_2 que representa las concentraciones de MFP.

El vector de parámetros iniciales $\beta_0 = [k_i; k_e; k_c; k; A]$

El vector de condiciones iniciales $X_0 = \begin{bmatrix} x_{10} \\ x_{20} \\ 0 \end{bmatrix}$

DIFFPAR también realiza un análisis estadístico de la estimación final y calcula el intervalo de confianza de cada parámetro estimado.

El simulador explicitado en el párrafo 4.3.4 y los valores de las concentraciones de AMMFP y AM que se listan en la segunda columna Tabla IV permitieron obtener una primera aproximación de los parámetros para iniciar el proceso de optimización.

La optimización con DIFFPAR se inició con el vector de parámetros iniciales $\beta_0 = [k_i; k_e; k_c; k; A] = [0.083583; 0.08; 0.062253; 0.114; 0.8]$ y el vector de condiciones iniciales $X_0 = [10; 100; 0]^T$. En el proceso iterativo se utilizó la opción EDO's stiff con parámetros logaritmizados. Manteniendo fijos los valores de k_i , k_c y x_{10} se obtuvo vector $\beta_1 = [0.083583; 1.837; 0.062253; 0.078886; 0.64819]$, se reinició el proceso de aproximación con estas condiciones iniciales con la opción EDO's no stiff con parámetros logaritmizados. Los valores estimados de los parámetros se muestran en la columna central de la Tabla VII. Los intervalos de confianza se calcularon a un nivel del 95%. La concentración de AM alcanza su equilibrio en 8.4014 $\mu\text{mol/l}$, es decir un valor inferior al medido a tiempo inicial.

RESULTADOS

 Tabla VII: Intervalos de confianza a 95% de los parámetros estimados

Extremo inferior	Parámetros estimados	Extremo superior
2.833×10^{-4}	2.1390×10^{-3} (k_i)	3.9946×10^{-3}
1.3735×10^{-1}	1.5413×10^{-1} (k_e)	1.7092×10^{-1}
-1.1141×10^{-2}	7.5998×10^{-2} (k_c)	1.6314×10^{-1}
-3.1659×10^{-1}	2.1619×10^{-1} (k)	7.4897×10^{-1}
-2.4690	1.8163 (A)	6.1015
7.4362	10.471 (x_{1_0})	13.507

Los intervalos de confianza son adecuados. Hay que tener en cuenta que se estimaron cinco parámetros y dos condiciones iniciales conociendo solamente diez mediciones de las concentraciones de AMMFP y AM.

La matriz de correlación E 4-29 muestra la interrelación entre las constantes k_i , k_e y k_c .

También se observa una fuerte relación entre k y A consecuencia del hecho que la proporcionalidad entre ambas es el punto de equilibrio.

La correlación entre los valores de las constantes cinéticas y la concentración inicial de AM es despreciable.

RESULTADOS

	k_i	k_e	k_c	k	A	x_{1_0}
k_i	1	-0.64475	0.72432	0.36378	0.37718	0.026960
k_e	-0.64475	1	-0.55074	-0.32620	-0.33975	-0.16194
k_c	0.72432	-0.55074	1	0.38437	0.39940	0.13952
k	0.36378	-0.32620	0.38437	1	0.99711	0.016446
A	0.37718	-0.33975	0.39940	0.99711	1	0.010413
x_{1_0}	0.026960	-0.16194	0.13952	0.016446	0.010413	1

E 4-29

Los resultados anteriores arrojaron un valor de $g(\hat{\beta}) = 7.4778$

La evolución de las variables del sistema se muestra en la Ilustración 39.

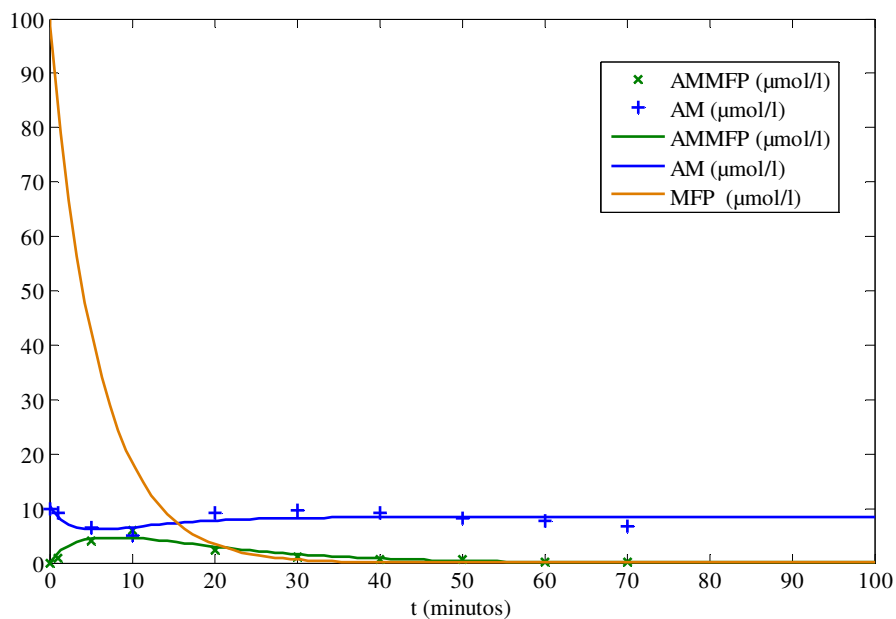


Ilustración 39: Resultados gráficos de la estimación de parámetros utilizando mediciones de AM y AMMFP. Las cruces representan los datos experimentales.

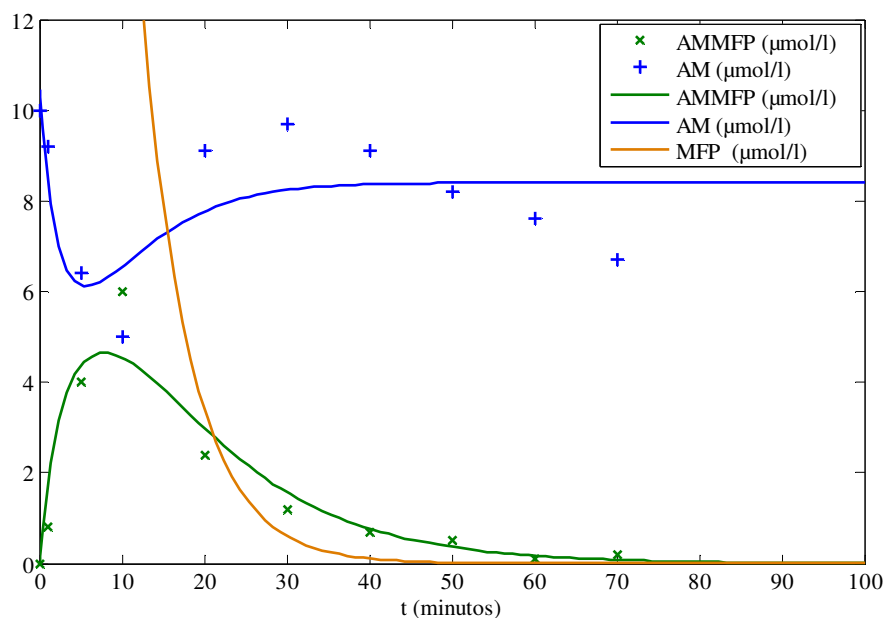


Ilustración 40: Detalle de la Ilustración 39

En gran parte de los experimentos no se realizaron mediciones de AM. El método de medición es complejo y costoso. A continuación se reinicia el proceso iterativo a partir de los valores de la Tabla IV (Pág.61) y utilizando el modelo E 4-28 asignando peso uno solamente a la variable de estado que representa la concentración de AMMFP. La búsqueda de un mínimo para la función objetivo se inició con el mismo vector de parámetros iniciales $\beta_0 = [k_i; k_e; k_c; k; A] = [0.083583; 0.08; 0.062253; 0.114; 0.8]$ y las mismas condiciones iniciales $X_0^T = [10; 100; 0]$. En el proceso iterativo se mantuvieron constantes los valores de los parámetros k y A que sólo participan en la ecuación de AM.

Los valores estimados de los parámetros con sus respectivos intervalos de confianza se muestran en la Tabla VIII. La Ilustración 41 muestra las curvas de ajuste obtenidas. La matriz de correlación E 4-30 presenta correlaciones similares al caso anterior. Los resultados anteriores arrojaron un valor de $g(\hat{\beta}) = 2.1012$ y $|\nabla g(\hat{\beta})| = 2.3696 \times 10^{-3}$. Los valores de los parámetros k_i , k_e y k_c estimados en cada caso se compararon utilizando el test de rachas y no se obtuvieron diferencias significativas.

RESULTADOS

	k_i	k_e	k_c
	1	-0.53264	0.57446
	-0.53264	1	-0.35774
	0.57446	-0.35774	1

E 4-30

Tabla VIII: Intervalos de confianza a 95% de los parámetros estimados

Extremo inferior	Parámetros estimados	Extremo superior
1.7084×10^{-3}	2.2763×10^{-3} (k_i)	2.8441×10^{-3}
1.2488×10^{-1}	1.2889×10^{-1} (k_e)	1.3289×10^{-1}
5.2876×10^{-2}	7.7121×10^{-2} (k_c)	1.0137×10^{-1}

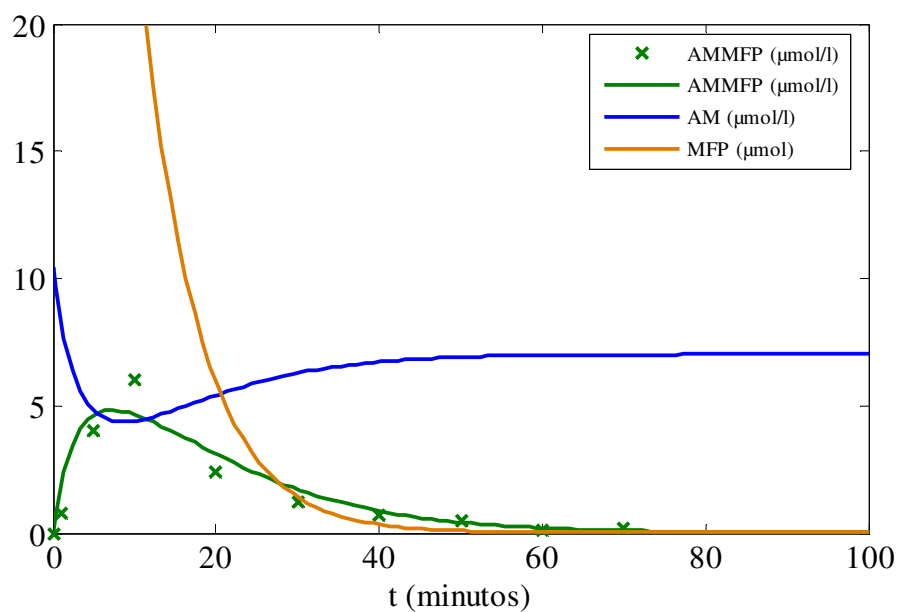


Ilustración 41: Ajuste utilizando mediciones de AMMFPP

4.4 Modelo matemático de la homeostasis de la A2M en presencia MFP administrado por sonda gástrica

Se retoma el sistema E 4-9 (Pág. 58):

$$\begin{cases} \frac{dAM}{dt} = v_S - v_I - v_i \\ \frac{dMFP}{dt} = v_a + v_d - v_i - v_e \\ \frac{dAMMFP}{dt} = v_i - v_c \\ \frac{dMFP_d}{dt} = -v_a - v_d - v_h \end{cases}$$

De acuerdo a lo desarrollado en 4.3.3 (Pág. 68) el sistema anterior se escribe como sigue:

$$\begin{cases} \frac{dAM}{dt} = v_S(AM(t)) - v_I(AM(t)) - k_i MFP(t) AM(t) \\ \frac{dMFP}{dt} = v_a + v_d - k_i MFP(t) AM(t) - k_e MFP(t) \\ \frac{dAMMFP}{dt} = k_i MFP(t) AM(t) - k_c AMMFP(t) \\ \frac{dMFP_d}{dt} = -v_a - v_d - v_h \end{cases}$$

Sujeto a las siguientes condiciones iniciales

$$AM(0) = AM_0 \quad MFP_d(0) = MFP_{d0} \quad MFP(0) = 0 \quad AMMFP(0) = 0$$

Cuando se utilizan las ecuaciones de E 4-28 (Pág. 77) y el hecho que las velocidades de absorción de MFP en la mucosa gástrica (v_a), la velocidad de absorción de MFP en la mucosa intestinal (v_d) y la velocidad de hidrólisis del MFP en el duodeno (v_h) responden a cinéticas de orden uno [53,54], las ecuaciones anteriores quedan escritas como sigue:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dAM}{dt}(t) = -k_i MFP(t) AM(t) - k AM + A \\ \frac{dMFP}{dt}(t) = -k_i MFP(t) AM(t) - k_e MFP(t) + k_a MFP_d(t) \\ \frac{dAMMFP}{dt}(t) = k_i MFP(t) AM(t) - k_c AMMFP(t) \\ \frac{dMFP_d}{dt}(t) = -(k_h + k_a) MFP_d(t) \end{array} \right.$$

E 4-31

Con las mismas condiciones iniciales

$$AM(0) = AM_0 \quad MFP_d(0) = MFP_{d0} \quad MFP(0) = 0 \quad AMMFP(0) = 0$$

4.4.1 Análisis cualitativo del sistema

Para la descripción matemática se retoma y amplía la nomenclatura utilizada en 4.3.4 (Pág. 70).

Luego $x_1 = AM$, $x_2 = MFP$, $x_3 = AMMFP$ y $x_4 = MFP_d$.

Las concentraciones iniciales se anotan

$$x_{1_0} = AM_0 \quad , \quad x_{2_0} = MFP_0 = 0 \quad , \quad x_{3_0} = AMMFP_0 = 0 \quad \text{y} \quad x_{4_0} = MFP_{d0}$$

El sistema E 4-31 puede ser escrito de la siguiente manera:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{x}_1 = -k_i x_1 x_2 - k x_1 + A \\ \dot{x}_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 + k_a x_4 \\ \dot{x}_3 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3 \\ \dot{x}_4 = -(k_h + k_a) x_4 \end{array} \right.$$

E 4-32

Este sistema satisface las siguientes condiciones iniciales

$$x_1(0) = x_{1_0} \quad , \quad x_2(0) = x_{2_0} = 0 \quad , \quad x_3(0) = x_{3_0} = 0 \quad \text{y} \quad x_4(0) = x_{4_0}$$

En notación matricial se tiene el siguiente problema de Cauchy:

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{X}} = \mathbf{F}(\mathbf{X}^T) \\ \mathbf{X}(0) = \mathbf{X}_0 \end{cases}$$

E 4-33

$$\text{con } \mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{X}_0 = \begin{bmatrix} x_{10} \\ 0 \\ 0 \\ x_{40} \end{bmatrix} \quad \text{y } \mathbf{F} = \begin{bmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \\ f_4 \end{bmatrix} \quad \text{siendo}$$

$$f_1(\mathbf{X}^T) = -k_i x_1 x_2 - k x_1 + A$$

$$f_2(\mathbf{X}^T) = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 + k_a x_4$$

$$f_3(\mathbf{X}^T) = k_i x_1 x_2 - k_c x_3$$

$$f_4(\mathbf{X}^T) = -(k_h + k_a) x_4$$

El dominio de definición con sentido biológico es el conjunto $\Omega \times \{0 \leq x_4 \leq x_{40}\} = \Omega \times [0; x_{40}]$ donde Ω es el conjunto definido en E 4-18 (Pág. 71).

El sistema E 4-32 es un sistema dinámico autónomo de primer orden. El Teorema fundamental de existencia y unicidad asegura que el problema con valores iniciales E 4-33 tiene solución única definida para $t \geq 0$.

Los estados de equilibrio del sistema E 4-32, es decir, las trayectorias solución tal que $\dot{\mathbf{X}} = \bar{\mathbf{0}}$ se obtienen resolviendo el sistema de ecuaciones algebraicas.

$$\begin{cases} -k_i x_1 x_2 - k x_1 + A = 0 \\ -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 + k_a x_4 = 0 \\ k_i x_1 x_2 - k_c x_3 = 0 \\ -(k_h + k_a) x_4 = 0 \end{cases}$$

E 4-34

De la última ecuación de E 4-34 resulta $x_4^* = 0$.

RESULTADOS

Las tres primera ecuaciones de E 4-34 se corresponden con las ecuaciones del sistema E 4-19 (Pag. 73). Por lo tanto las proyecciones de los puntos estacionarios de este nuevo sistema son los puntos estacionarios del sistema E 4-19 en el espacio Ω .

El sistema E 4-32 tiene un único punto crítico o estacionario $X^* = [\frac{A}{k}; 0; 0; 0]^T$ contenido en el dominio de definición biológico $\Omega \times [0; x_{4_0}]$ si y solo si $k \neq 0$.

Si $k < 0$ entonces X^* es un punto de equilibrio asintóticamente inestable en $\Omega \times [0; x_{4_0}]$, más precisamente es un saddle point.

Si $k > 0$ este modelo admite un único punto de equilibrio X^* asintóticamente estable en $\Omega \times [0; x_{4_0}]$ si $x_{1\min} \leq \frac{A}{k} \leq x_{1\max}$.

Se distinguen tres diferentes situaciones:

a) Si $0 < x_{1_0} < \frac{A}{k}$ el modelo predice que el sistema alcanza un punto de equilibrio en el que el nivel basal de AM es mayor que el valor medido a tiempo 0. Esta relación determina que la AM secretada por el hígado es mayor que la depurada por los tejidos después de unirse a proteínas.

b) El sistema regresa a las condiciones anteriores a la perturbación cuando $x_{1_0} = \frac{A}{k}$. Esta situación corresponde a un estado metabólico donde la producción hepática y la inactivación de proteínas están en equilibrio.

c) Cuando $\frac{A}{k} < x_{1_0}$ el modelo predice que el sistema alcanza el equilibrio con un valor basal de concentración de AM menor que el valor medido antes de la perturbación. En esta situación el hígado produce menos AM que la necesaria para la inactivación de proteínas.

A continuación se simulan estas tres posibles situaciones. Para ello se construye un simulador con la herramienta auxiliar de MatLab, Simulink (Ilustración 42). El simulador consta de cuatro bloques que se corresponden con cada una de las ecuaciones

RESULTADOS

del sistema (ver Ilustración 43: Bloque para MFP gástrico, Ilustración 44: Bloque para el MFP plasmático, Ilustración 45: Bloque para el AMMFP, Ilustración 46: Bloque para AM)

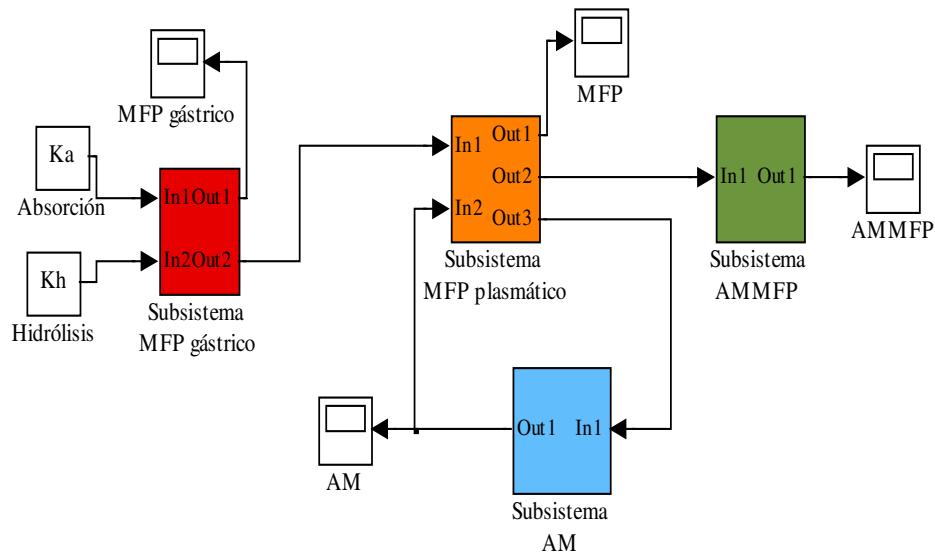
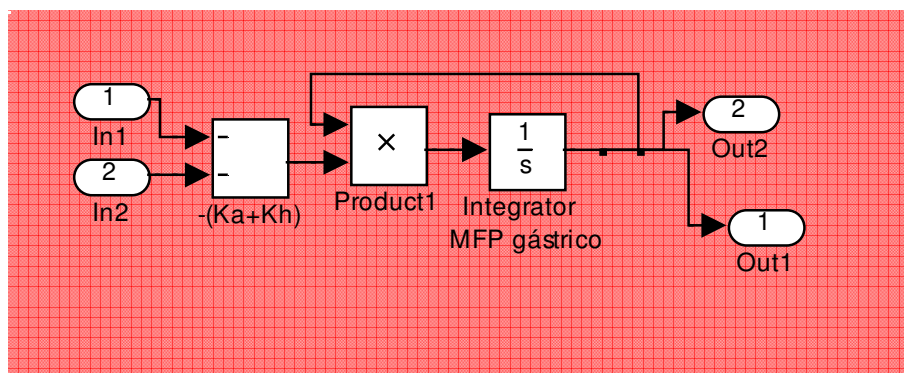


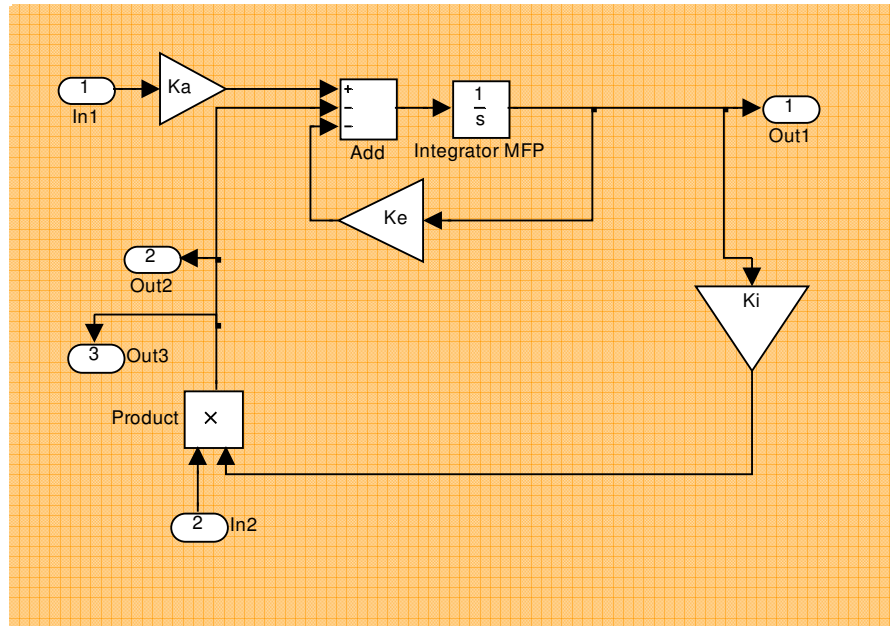
Ilustración 42: Modelo de bloques para el sistema de administración por sonda gástrica del MFP



$$\dot{x}_4 = -(k_a + k_h)x_4$$

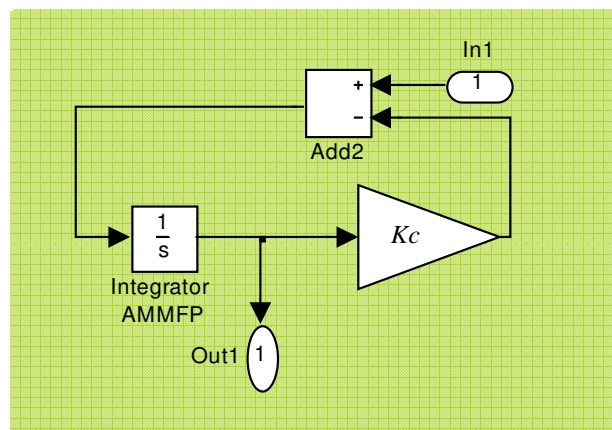
Ilustración 43: Bloque para MFP gástrico

RESULTADOS



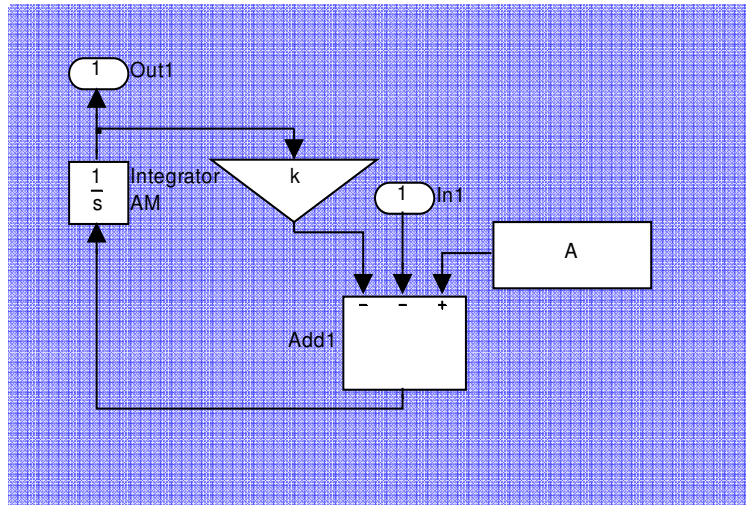
$$\dot{x}_2 = -k_i x_1 x_2 - k_e x_2 + k_a x_4$$

Ilustración 44: Bloque para el MFP plasmático



$$\dot{x}_3 = k_i x_1 x_2 - k_c x_3$$

Ilustración 45: Bloque para el AMMFP



$$\dot{x}_1 = -k_i x_1 x_2 - k x_1 + A$$

Ilustración 46: Bloque para AM

En las gráficas de la Ilustración 47 y la Ilustración 48 se muestra la evolución de cada una de las variables después de una dosis de 80 μmol de MFP suministrada por sonda gástrica en 1 ml de solución 80 mmol/l. A los parámetros ya conocidos se le asignaron los mismos valores que en el caso intravenoso: $k_i = 0.083583 \text{ min}^{-1}$, $k_e = 0.062253 \text{ min}^{-1}$, $k_a = 0.5 \text{ min}^{-1}$, $k = 1$, $A = 12$. En todos los casos se fijó $k_h = 0.054 \text{ min}^{-1}$ y $k_a = 0.0078 \text{ min}^{-1}$, valores obtenidos en experimentos *in vitro* [53,54].

Las condiciones iniciales se establecieron en $x_{1_0} = 10$, $x_{2_0} = 0$, $x_{3_0} = 0$, $x_{4_0} = 80$.

RESULTADOS

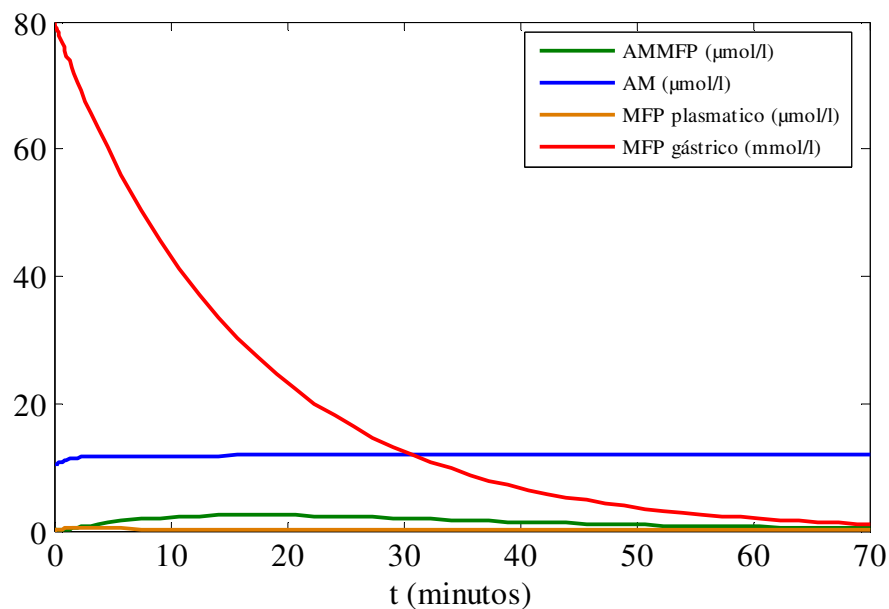


Ilustración 47: Simulación del proceso de homeostasis de la AM perturbada por una dosis oral de MFP

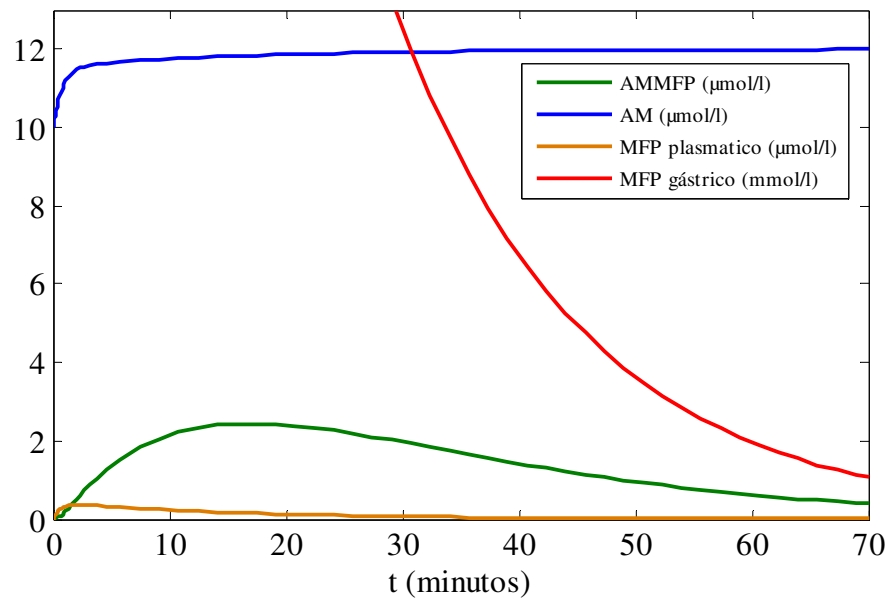


Ilustración 48: Detalle de Ilustración 47

RESULTADOS

El sistema planteado y el simulador construido se utilizan para investigar, *in silice*, la respuesta del modelo a modificaciones de los valores de los parámetros k_a y k_h . En cada experimento, se perturbó el valor de un sólo parámetro en un factor 10^1 y 10^{-1} , a los restantes parámetros se les asigna los valores del ejemplo.

En las gráficas siguientes en línea de puntos y manteniendo los colores se observa el comportamiento de las variables con los valores asignados en el ejemplo.

Cuando la constante k_a es diez veces mayor ($k_a = 0,078 \text{ min}^{-1}$) se observa (Ilustración 49) cómo se modifica el comportamiento de las variables con respecto a la situación anterior.

En la Ilustración 50 se muestra el comportamiento para $k_a = 0.00078 \text{ min}^{-1}$. Este valor próximo a cero disminuye notablemente la inhibición de la AM por el MFP. Hay muy poca formación del complejo (Ilustración 51). La depuración del MFP plasmático es consecuencia del proceso de eliminación.

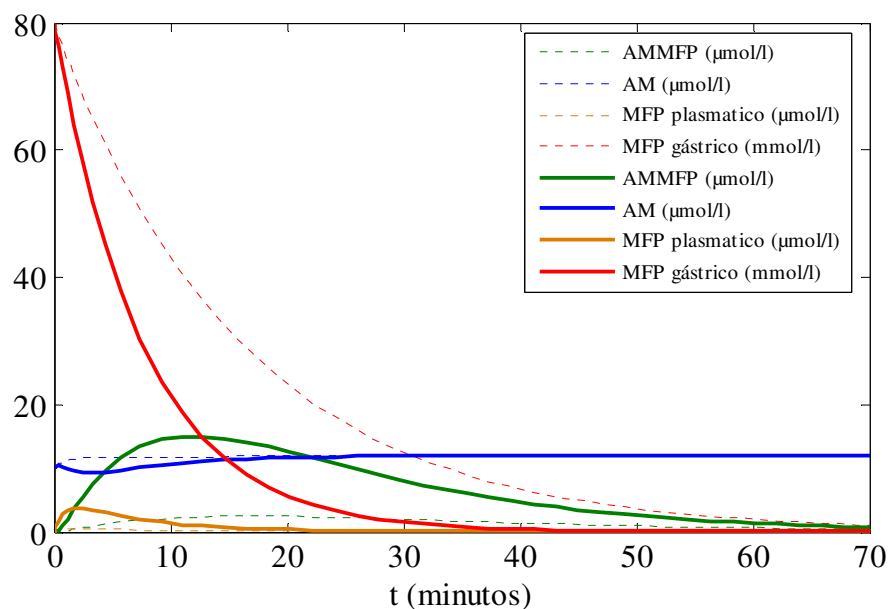


Ilustración 49: Comparación de las curvas de ajuste al aumentar el valor de k_a

RESULTADOS

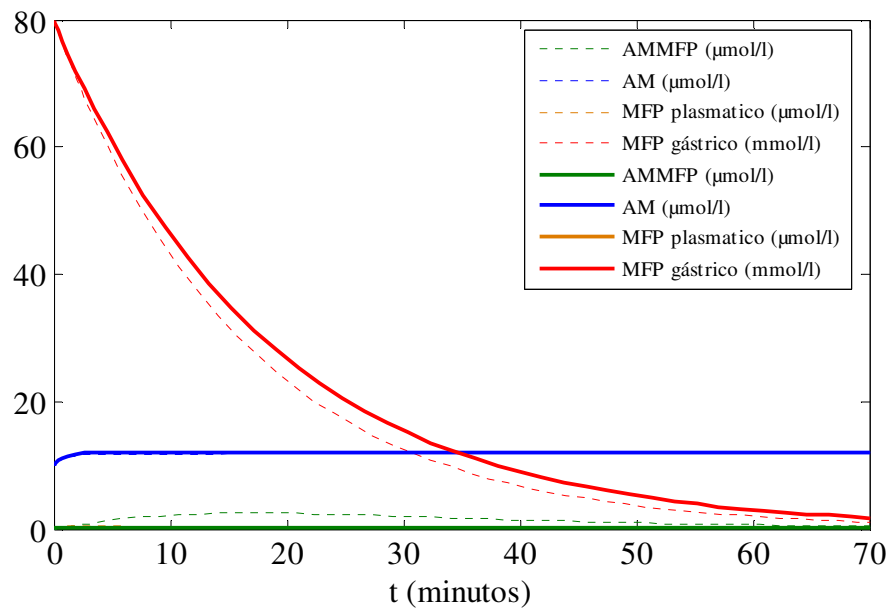


Ilustración 50 Comparación de las curvas de ajuste al disminuir el valor de k_a

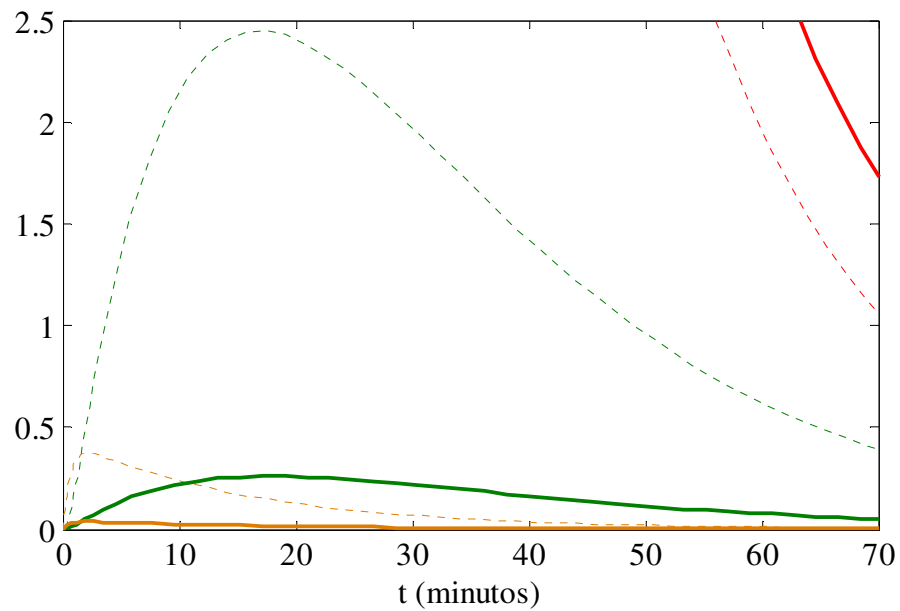


Ilustración 51: Detalle de la Ilustración 50

RESULTADOS

Cuando la constante k_h es diez veces mayor ($k_h = 0,54 \text{ min}^{-1}$) se observa (Ilustración 52 y Ilustración 53) cómo se modifica el comportamiento de las variables con respecto a la situación inicial. El decaimiento de la concentración de MFP gástrico aumenta, aparece menos MFP en plasma y disminuye la formación del complejo AMMFP.

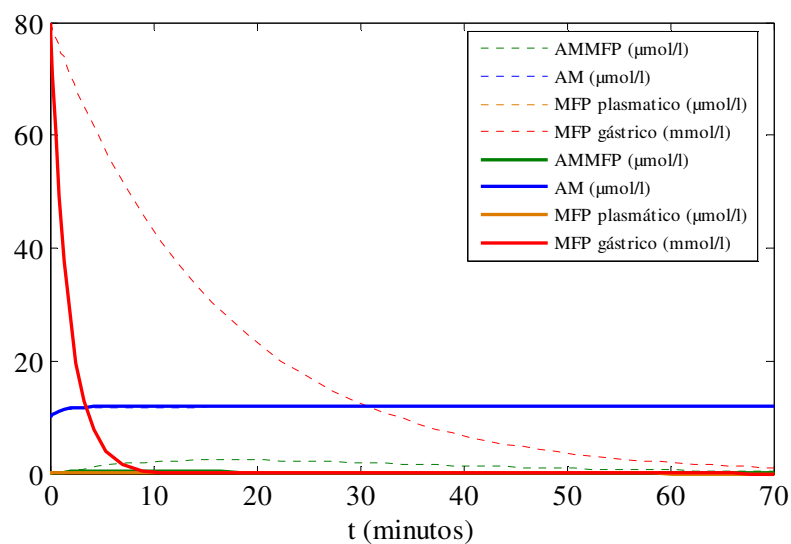


Ilustración 52: Comparación de las curvas de ajuste al aumentar el valor de k_h

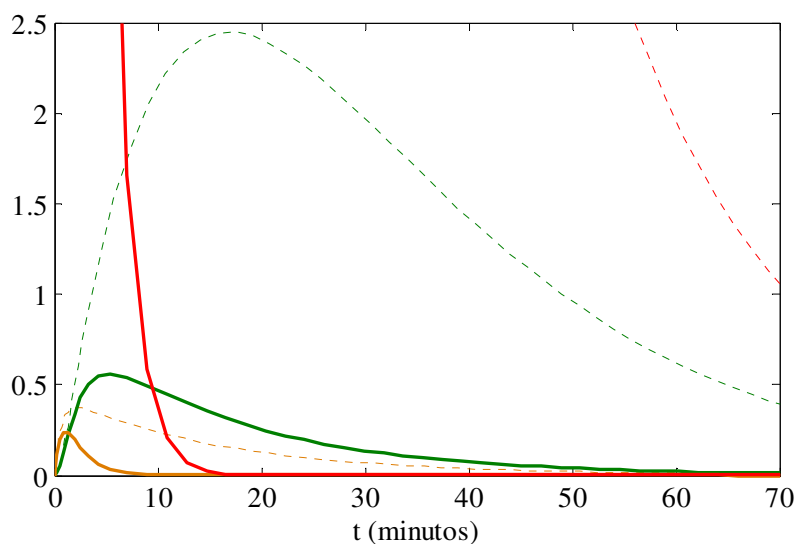


Ilustración 53: Detalle de la Ilustración 52

RESULTADOS

En la Ilustración 54 se muestra el comportamiento para $k_h = 0.0054 \text{ min}^{-1}$. En la Ilustración 55 se observa con detalle como evolucionan las concentraciones plasmáticas de MFP y AMMFP. El decrecimiento de la concentración de MFP gástrico es menor aumentando su absorción y manteniendo durante más tiempo elevada la concentración plasmática

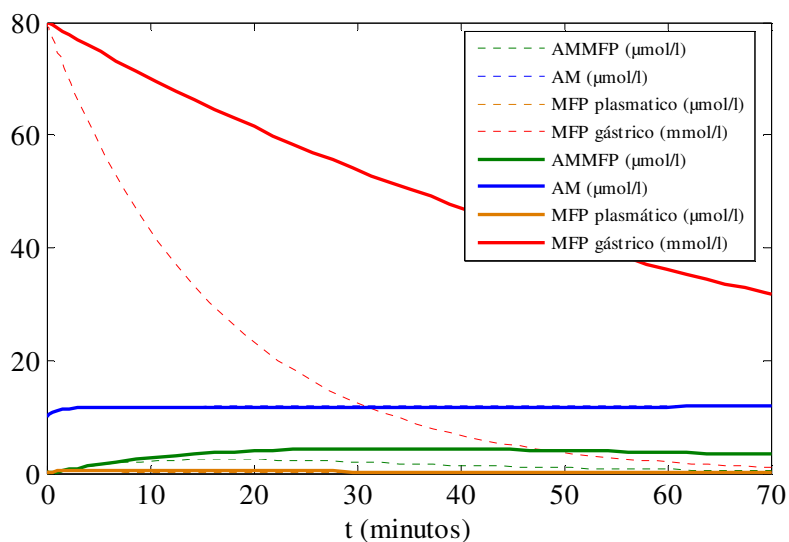


Ilustración 54: Comparación de las curvas de ajuste al disminuir el valor de k_h

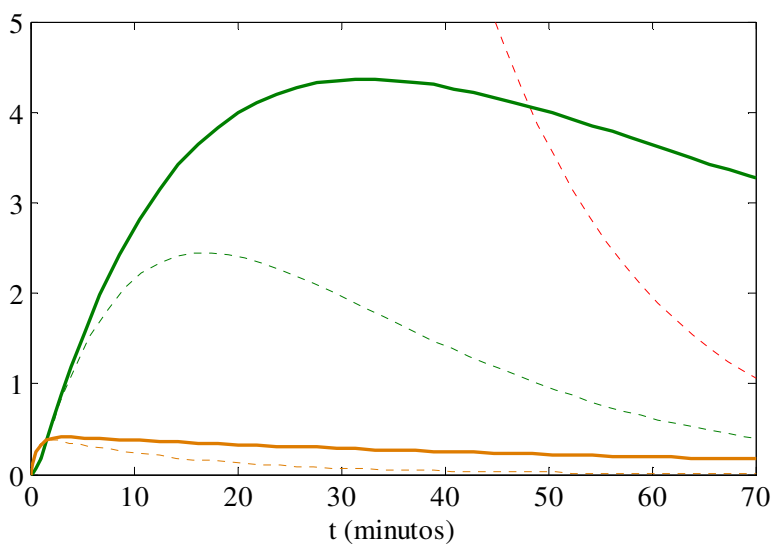


Ilustración 55: Detalle de la Ilustración 54

RESULTADOS

4.4.2 Identificación y estimación de parámetros

Se obtuvieron los datos promedios que figuran en la Tabla IX después de suministrar 80 μ mol de MFP (1ml de MFP 80 mmol/l) por sonda gástrica a 8 ratas.

Tabla IX : Valores promedios obtenidos tras una dosis oral de MFP. (n = 8)

Tiempo (minutos)	AM	AMMFP
0	10.00	0.00
5	9.92	4.54
10	10.22	5.83
15	10.19	11.38
20	10.76	30.89
30	10.00	36.21
40	11.53	54.34
50	11.76	58.50
60	14.44	85.24
70	11.94	60.00
80	11.87	56.32
90	9.81	30.00
100	11.44	27.00
110	11.08	26.65
120	11.30	20.76

El simulador explicitado en el párrafo 4.4.1, los valores de los parámetros estimados para el caso de inyección intravenosa de MFP y los valores de las concentraciones de AM y AMMFP que se listan en la Tabla IX permiten obtener una primera aproximación de los parámetros para iniciar el proceso de optimización. La

RESULTADOS

optimización con DIFFPAR se inició con el vector de parámetros iniciales $\beta_0 = [k_i; k_e; k_c; k; A; k_a; k_h]$ = $[0.02139; 0.0015413; 0.075998; 0.21619; 2.5; 0.078; 0.0054]$ y el vector de condiciones iniciales $X_0 = [10; 0; 0; 80]^T$. Se asignó peso 1 a las variables AM y AMMFP. A las variables que corresponden a la concentración de MFP gástrico y plasmático se les asignó peso 0. En este caso se consideró que las concentraciones de AM plasmática son similares a las concentraciones de AM no ligada a MFP representada por la variable x_1 . En el proceso iterativo se utilizó la opción EDO's no stiff con parámetros logaritmizados.

Los valores estimados de los parámetros se muestran en la columna central de la Tabla X. Los intervalos de confianza se calcularon a un nivel del 95%.

La AM alcanza su equilibrio en 12.8034 $\mu\text{mol/l}$, es decir un valor superior al medido a tiempo inicial.

La matriz de correlación E 4-35 muestra una menor correlación de k_i con k_e y k_c respecto de lo observado en el caso intravenoso, se mantiene la fuerte relación entre k y A consecuencia del hecho que la proporcionalidad entre ambas es el punto de equilibrio.

La alta correlación entre los valores de las constantes cinéticas k_a y k_h es evidente, también están fuertemente correlacionadas con k_e lo que implica que el modelo reacciona a la perturbación provocada por MFP modificando la constante de eliminación según sea la capacidad del sistema de absorberlo e hidrolizarlo a nivel intestinal.

La correlación negativa entre k_a y k_h es adecuada ya que un aumento en la hidrólisis del MFP se reflejará en una menor absorción a nivel de la mucosa gástrica. La misma conclusión se puede sacar para la correlación entre k_h y k_e . Una menor hidrólisis conducirá a una mayor absorción de MFP y por consiguiente a una mayor eliminación del mismo.

RESULTADOS

	k_i	k_e	k_c	k	A	k_a	k_h
k_i	1	-0.087131	0.084813	-0.59286	-0.68828	-0.093618	0.073208
k_e	-0.087131	1	-0.70253	-0.17312	-0.18922	0.85530	-0.92283
k_c	0.084813	-0.70253	1	0.14701	0.16578	-0.51452	0.41684
k	-0.59286	-0.17312	0.14701	1	0.98455	-0.14475	0.12707
A	-0.68828	-0.18922	0.16578	0.98455	1	-0.15701	0.13703
k_a	-0.093618	0.85530	-0.51452	-0.14475	-0.15701	1	-0.84473
k_h	0.073208	-0.92283	0.41684	0.12707	0.13703	-0.84473	1

E 4-35

Tabla X: Intervalos de confianza a 95% de los parámetros estimados utilizando mediciones de AM y AMMFP

Extremo inferior	Parámetros estimados	Extremo superior
-1.6600×10^{-3}	8.1866×10^{-3} (k_i)	1.8033×10^{-2}
-8.3418×10^{-2}	3.5416×10^{-4} (k_e)	8.4126×10^{-2}
4.6243×10^{-5}	1.0225×10^{-2} (k_c)	2.0403×10^{-2}
-1.0414	3.9580×10^{-1} (k)	1.8330
-10.783	5.0676 (A)	20.918
2.1089×10^{-2}	7.3067×10^{-2} (k_a)	1.2505×10^{-1}
-6.0210×10^{-2}	6.3436×10^{-4} (k_h)	6.1479×10^{-2}

En la Ilustración 56 se ven las curvas de ajuste.

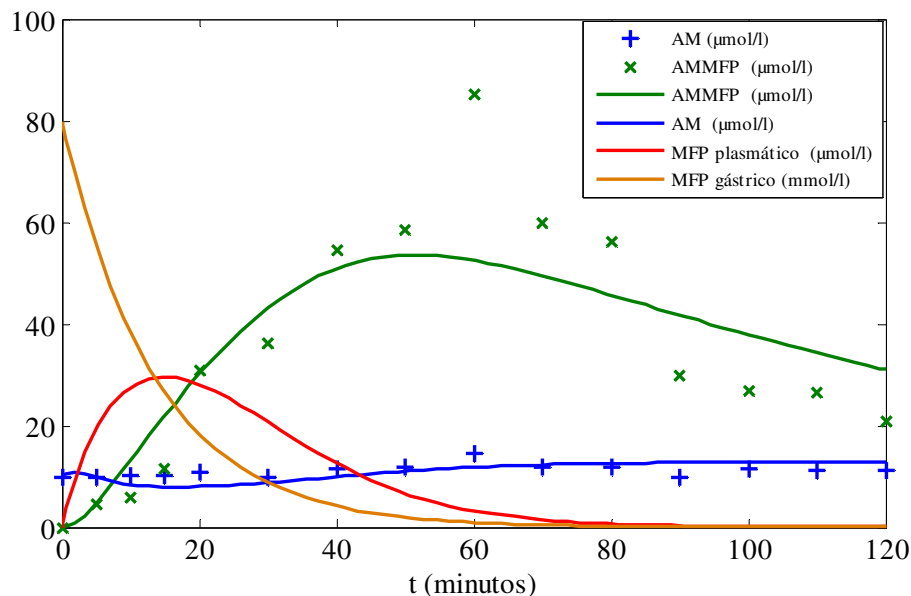


Ilustración 56: Curvas de optimización

A continuación se reinicia el proceso iterativo a partir de los valores de la Tabla IX y asignando peso uno solamente a la variable que representa la concentración de AMMFP.

La búsqueda de un mínimo para la función objetivo se inició con el mismo vector de parámetros iniciales

$$\beta_0 = [0.02139; 0.0015413; 0.075998; 0.21619; 2.5; 0.078; 0.0054]$$

y las mismas condiciones iniciales $X_0 = [10; 0; 0; 80]^T$.

En el proceso iterativo se mantuvieron constantes los valores de los parámetros k y A que sólo participan en la ecuación de AM.

Se obtuvo el vector

$$\beta_1 = [0.015772; 0.00035501; 0.010551; 0.21619; 2.5; 0.075531; 0.00041731]$$

a partir del cual se reinicia el proceso de optimización con parámetros logaritmizados y EDO's no stiff. El vector de condiciones iniciales se mantiene constante.

RESULTADOS

Los valores estimados de los parámetros se muestran en la columna central de la Tabla XI. Los intervalos de confianza se calcularon a un nivel del 95%.

Los valores de los parámetros estimados en cada caso se compararon utilizando el test de rachas y no se obtuvieron diferencias significativas.

Tabla XI: Intervalos de confianza a 95% de los parámetros estimados utilizando mediciones de AMMFP

Extremo inferior	Parámetros estimados	Extremo superior
-1.3769×10^{-2}	$1.5772 \times 10^{-2} (k_i)$	4.5313×10^{-2}
-6.5979×10^{-2}	$3.5501 \times 10^{-4} (k_e)$	6.6689×10^{-2}
1.1727×10^{-3}	$1.0552 \times 10^{-2} (k_c)$	1.9931×10^{-2}
-2.3123×10^{-1}	$2.1619 \times 10^{-1} (k)$	6.6361×10^{-1}
-1.2447	2.3925 (A)	6.0298
3.4290×10^{-2}	$8.3382 \times 10^{-2} (k_a)$	1.3247×10^{-1}
-5.7803×10^{-2}	$4.1731 \times 10^{-4} (k_h)$	5.8637×10^{-2}

4.4.3 Validación del modelo

El modelo es testeado usando los efectos de drogas que perturban la absorción de MFP a nivel gastrointestinal y la captación del complejo AMMFP tales como la administración oral de calcio que aumenta la absorción intestinal de MFP y la formación del complejo AMMFP [56] y el ácido [5'] poli-inosínico (inhibidor del receptor de AMMFP) [89].

En cada uno de los casos se estima el valor de los parámetros del sistema. Como valores iniciales se utilizan los valores estimados obtenidos en párrafos anteriores.

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando la administración orogástrica de MFP es perturbada con la administración de calcio. Se trabaja con dos grupos, un grupo testigo de 4 ratas que permite obtener mediciones de concentraciones del complejo AMMFP sin administración de calcio y un grupo experimental también de cuatro ratas a las que se les suministró calcio según lo explicado en 3.7.4 (Pág. 42) . Los tiempos y los valores medidos se leen en la Tabla XII.

Tabla XII: Mediciones de AMMFP

Tiempo (minutos)	AMMFP (sin calcio)	AMMFP (con calcio)
0	0	0
30	1.3	30,14
60	2.7	96,25
90	8.1	64,18
120	10.63	47,83
150	9.17	32,34
180	6.23	14,24
210	5.51	22,40
240	4.21	6,27
270	3.64	4,87

Los datos se ajustan con la interfase DIFFPAR. En la Tabla XIII se muestran los valores óptimos obtenidos en el ajuste. Se observa un aumento de la constante de absorción y la constante cinética de hidrólisis se redujo notablemente. Por otro lado la mayor absorción de MFP podría estar modificando la cinética de inactivación de AM, que se refleja en el aumento de k_j .

RESULTADOS

Tabla XIII: parámetros estimados sin y con calcio

Parámetro	Sin calcio	Con calcio
k_i	8.1866×10^{-3}	1.1002×10^{-1}
k_e	3.5416×10^{-4}	3.5416×10^{-4}
k_c	1.61184×10^{-2}	7.0700×10^{-3}
k	1	1
A	2.1218	2.0797
k_a	6.1194×10^{-3}	8.7239×10^{-2}
k_h	9.4378×10^{-3}	6.3436×10^{-7}

A continuación se muestra como se comporta el modelo cuando el sistema es perturbado por una dosis de ácido [5'] poli-inosínico (Poli-I).

En la Tabla XIV se listan los valores medidos de la concentración de complejo AMMFP luego de administrar 80 μ moles de MFP por sonda gástrica y Poli-I a ocho ratas. El grupo control (n = 8) recibió 80 μ mol de MFP pero no recibieron Poli-I.

Los valores de los parámetros que mejor ajustan estos datos se pueden leer en la Tabla XV.

Se observa que se modifican los valores de las constantes de eliminación del MFP plasmático y de captación del complejo AMMFP.

RESULTADOS

Tabla XIV: Mediciones de AMMFP luego de una dosis de MFP por sonda gástrica.

Tiempo (minutos)	AMMFP sin Poli-I	AMMFP con Poli-I
0	0	0
5	14.75	12.2
15	15.43	30.14
30	93.81	96.25
40	94.2	94.2
50	110.2	110.2
60	128.18	104
70	130.2	130.2
80	134.2	134.2
90	135	144
105	126.5	143
120	127	209
130	94.2	200
150	61	195
160	40	160

RESULTADOS

Tabla XV: parámetros estimados sin y con poli-inosínico

Parámetro	Sin ácido [5'] poli-inosínico	Con ácido [5'] poli-inosínico
k_i	8.1866×10^{-3}	1.3204×10^{-3}
k_e	3.5416×10^{-4}	2.9209×10^{-9}
k_c	1.4883×10^{-4}	1.1097×10^{-6}
k	1	1
A	13.848	70.609
k_a	1.3824×10^{-1}	4.3740×10^{-1}
k_h	6.3436×10^{-4}	4.3264×10^{-5}

El modelo predice el cambio esperado en la constante de captación del complejo. Se observan modificaciones no esperadas en las constantes de velocidad de eliminación plasmática e hidrólisis intestinal del MFP. Estos cambios podrían atribuirse a otros efectos desconocidos del Poli-I.

5 DISCUSIÓN

Esta tesis plantea un modelo matemático para investigar la homeostasis de la alfa-macroglobulina (AM). El modelo desarrollado puede ser aplicado a la rata, especie en la que fue validado y sienta las bases para su aplicación en seres humanos. Este modelo incluye los factores perturbadores internos de la homeostasis y un perturbador externo, como es el MFP. Las variables del sistema son parcialmente conocidas y los parámetros, constantes de velocidad, tienen significado fisiológico. El MFP al ser administrado por **vía oral** permite modificar los niveles plasmáticos de la AM y del complejo AMMFP, cuya concentración puede ser medida con precisión. A partir de estos datos es posible estimar las constantes de velocidad del modelo utilizando métodos numéricos iterativos para la estimación de parámetros. Específicamente se adaptó el software DIFFPAR al sistema planteado. El sistema propuesto responde adecuadamente a situaciones experimentales cuyos resultados son previsibles según estudios previos, como son la inhibición de los receptores encargados de la depuración del complejo AMMFP y la hidrólisis del MFP a nivel intestinal.

El modelo matemático fue utilizado para la simulación de los procesos metabólicos. Se recurrió a la herramienta Simulink de MatLab para construir un simulador que permite estudiar *in silice* los cambios del modelo biológico.

La obtención de este modelo fue precedido por la resolución de un sistema más simplificado como es la **administración endovenosa** de MFP que no incluye los procesos digestivos derivados de la administración orogástrica de MFP. Si bien esta situación no es la ideal, por la complejidad de la técnica y porque no podría, al menos en el momento, ser aplicado a seres humanos, permitió obtener valores de constantes de velocidad que se utilizaron como valores iniciales en la estimación de los parámetros que intervienen en el modelo final con administración de MFP por vía oral.

El análisis cualitativo del sistema permitió determinar el punto de equilibrio del modelo y los valores de algunas constantes imposibles de determinar por métodos de laboratorio.

DISCUSIÓN

En el estudio del sistema simplificado (administración endovenosa de MFP), se estimaron valores de las constantes de velocidad utilizando recursos experimentales y matemáticos para independizarse de alguna de las variables y que permitieron reducir el número de parámetros. Entre estos recursos se pueden mencionar la administración endovenosa de MFP, el análisis de datos en intervalos de tiempo donde alguno de los procesos homeostáticos pueden ser considerados despreciables, suposición sobre los órdenes de reacción de determinados procesos y la inyección intravenosa del complejo AMMFP purificado. Todos estos recursos fueron aplicados in vivo lo que garantiza valores confiables para las constantes obtenidas.

Por otro lado, el planteo y resolución de un modelo en ausencia de factores externos, donde la velocidad de secreción e inactivación por agentes endógenos sólo se supone función de la concentración de AM, permite hallar algunas constantes y relaciones. En este modelo matemático se supone que la AM se inactiva por factores endógenos (como las proteinasas) y se secreta a la circulación, manteniendo el equilibrio en la concentración plasmática. En este modelo, se obtuvo que el valor de la concentración de AM de equilibrio sería $AM_E = \frac{A_S - A_I}{h_I - h_S}$ (Pág. 50).

Asumiendo que las velocidades de secreción e inactivación de AM tienen comportamiento lineal respecto de la concentración de AM, la única opción posible para mantener dicha concentración en un valor regulado es que $|h_S| < |h_I|$. Posteriormente, cuando se realizó el análisis cualitativo del sistema perturbado por efecto del MFP se estableció que $h_I - h_S > 0$. Como la intersección de ambas rectas ocurre en el primer cuadrante, $A_S > A_I$ está garantizando un valor de AM_E positivo lo que es biológicamente correcto.

Cuando se administra MFP a ratas y seres humanos se observa la presencia de flúor ligado a proteínas. Ha sido demostrado que este flúor se origina por la absorción de MFP a nivel gástrico y la unión a AM [53, 54]. La unión de MFP a AM perturba su homeostasis produciendo cambios en la concentración plasmática de la misma [55, 58], que se reflejan en modificaciones en el curso de la pancreatitis [42] y en la viscosidad sanguínea [25, 26]. Sin embargo, no todos los animales involucrados en el estudio

DISCUSIÓN

tienen las mismas modificaciones de la concentración de AM ni los efectos deseados o no deseados del MFP. Esto hace suponer que la homeostasis no es perturbada de la misma manera en todos los casos.

El modelo planteado en esta tesis que simula las modificaciones de las variables involucradas en la homeostasis de la AM también predice que no siempre la administración de MFP tendrá los mismos efectos sobre la concentración de AM. Como ha sido demostrado, el modelo predice que luego de una dosis de MFP, la concentración de AM puede alcanzar un nuevo valor de equilibrio igual, menor o mayor que el valor basal inicial dependiendo de la relación entre los parámetros involucrados en el control de la secreción.

La aplicación de este modelo permitirá seleccionar aquellos animales que se comportarán de una manera determinada. Para el caso de la pancreatitis, donde la actividad de AM es requerida para inhibir las proteinasas liberadas por el páncreas dañado, permite seleccionar aquellos animales en que el MFP producirá aumento de AM y estarán más protegidos con respecto a la enfermedad. También el modelo permitirá seleccionar en qué animales la administración de AM producirá fenómenos de aumento o disminución de la viscosidad sanguínea.

Una ventaja del modelo es que permite obtener valores de las constantes de velocidad de cada uno de los procesos involucrados en la homeostasis de la AM a partir de datos de la concentración del complejo AMMFP. Por supuesto que la aproximación y el cálculo de constantes se verán enriquecidos si además se incluye en el cálculo los valores de las mediciones de AM.

Este modelo permite simular condiciones experimentales que modifiquen la homeostasis de la AM, hecho que ha sido validado con drogas específicas que modifican algún parámetro del sistema. En esta tesis se utilizó el calcio como inhibidor de la fosfatasa alcalina intestinal que hidroliza el MFP en la luz del intestino y el ácido [5'] poli-inosínico que inhibe la captación del complejo AMMFP por los receptores.

Para el caso del calcio coadministrado por vía oral con el MFP, el modelo predice una disminución de aproximadamente 10000 veces en la constante de velocidad de hidrólisis del MFP en intestino (Pág. 114) acompañado de un aumento de 10 veces en la

DISCUSIÓN

constante de absorción del MFP a nivel intestinal. Este resultado es totalmente compatible con el aumento de flúor ligado a proteínas del plasma en ratas que reciben MFP por vía oral coadministrado con calcio [56]. Se puede observar que también existen cambios en las otras constantes, quedando para estudiar si son cambios reales de los procesos o consecuencias del proceso de ajuste numérico. Es interesante observar que la constante de inactivación k_i es otro parámetro que aumenta en un factor de 10.

Cuando se administró ácido [5'] poli-inosínico en ratas luego de una dosis oral de MFP, como era de esperar, se obtuvo una constante de velocidad de depuración del complejo, k_c , aproximadamente 100 veces menor. También se observó un cambio en el valor de k_h que no tendría en principio explicación. Se desconoce si el ácido [5'] poli-inosínico tiene efectos que puedan influir sobre los procesos homeostáticos relacionados a esta constante de velocidad.

El cálculo de las constantes de velocidad utilizando los valores de las concentraciones de AM y de AMMFP no discrepó de los valores obtenidos cuando sólo se utiliza AMMFP. Este hecho es relevante dado que la concentración de AMMFP puede ser medida a muy bajo costo de manera rápida, con alta precisión y obteniendo valores comparables entre laboratorios. Contrariamente la determinación de la concentración de AM no comparte estas características.

Ha sido común el hallazgo en trabajos previos, que luego de una dosis de MFP, mientras en algunos animales se producía disminución de la AM plasmática en otros aumentaba. Este modelo muestra que cambios en alguna de las constantes puede llevar a la presentación de estos resultados, muchas veces inexplicables. Por citar, la Ilustración 49 (Pág. 106) muestra que luego de una misma dosis de MFP si la constante de absorción intestinal esta aumentada, la concentración plasmática de AM minutos después de la dosis en lugar de aumentar decrece.

El sistema metabólico en diagrama de bloques realizado con la biblioteca Simulink representa correctamente el comportamiento de las variables medibles que involucra el sistema (AM y AMMFP) y permite simular la de otras que no son posibles de analizar en animales intactos (MFP plasmático y gastrointestinal). Con respecto a las segundas,

DISCUSIÓN

si bien no existen datos experimentales para contrastar los valores, los efectos hallados son convincentes y razonables.

El modelo matemático formulado describe apropiadamente el comportamiento del modelo biológico estudiado. Los resultados obtenidos permiten concluir que las simplificaciones realizadas no desestimaron procesos primordiales involucrados en la homeostasis y que las suposiciones efectuadas (que no pudieron ser sometidas a comprobación) han sido certeras.

6 REFERENCIAS

[1] Harpel PC, Brower M. (1983). Alpha-2-macroglobulin: an introduction. In: Chemistry and biology of Alpha-2-macroglobulin. Feinman R Ed. Ann N Y Acad Sci. Vol 421. New York. USA

[2] Petersen KM. (1993). Alpha-2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Danish Medical Bulletin 40:409-446.

[3] Van Leuven F, Umans L, Lorent K, Hilliker C, Serneels L, Overbergh L, Stas L, Raymakers L. (1994). Molecular analysis of the human and mouse alpha-2-macroglobulin family. In: Biology of Alpha-2-macroglobulin its receptor, and related proteins. Borth W, Feinman R, Gonias SL, Quigley J and Strickland D Ed. Ann N Y Acad Sci. Volume 737. Ney York. USA.

[4] Harpel PC. (1977). Plasmin inhibitor interactions: the effectiveness of alpha-2-plasmin inhibitor in the presence of alpha-2-macroglobulin. J Exp Med 146:1033-1040.

[5] Virca GD, Travis J. (1984) Kinetics of association of human proteinases with human alpha-2-macroglobulin. J Biol Chem 259:8870-8874.

[6] Borth W, Feinman R, Gonias S, Quigley S, Strickland D. (Ed.) (1994). Biology of the alpha-2-macroglobulin. Its receptor and related proteins. Ann N Y Acad Sci. NY. Vol 737.

[7] Borth W, Feinman R, Gonias S, Quigley S, Strickland D. (Ed.) (1994). Biology of the alpha-2-macroglobulin. Its receptor and related proteins. Ann N Y Acad Sci. NY. Vol 737.

[8] Salvesen GS, Sayers CA, Barret AJ. (1981) Further characterization of the covalent linking reaction of Alpha-2-macroglobulin. Biochem J 195:453-461.

[9] Sottrup-Jensen LT, Petersen Magnusson. (1981). Trypsin-induced activation of the thiol esters in Alpha-2-macroglobulin generates a short-lived intermediate ('nascent'

alpha 2-M) that can react rapidly to incorporate not only methylamine or putrescine but also proteins lacking proteinase activity. FEBS Lett. 128:123-126.

[10] Van Berkel TJ, De Rijke YB, Kruijt JK. (1991) Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. J Biol Chem. 266:2282-2289.

[11] Boers W, Linthorst C, van Dijk MCM, Berkel TJC. (1994) Uptake of Methylamina activated alpha-2-macroglobulin by rat liver. In Biology of alpha-2-macroglobulin, its receptor and related proteins. Ann N Y Acad Sci. Vol 737. Wolfgang B Ed. N Y.

[12] Van Dijk MCM, Boers W, Linthorst C, Berkel TJC. (1992) Role of the scavenger receptor in the uptake of methylamine-activated alpha-2-macroglobulin by rat liver. Biochem J 287:447-455.

[13] Sottrup-Jensen L. (1987) Alpha-2-macroglobulin and related thiol ester plasma proteins. In The plasma proteins. Structure, function and genetic control. Vol V. FW Putman Ed. 191-291. Academic Press. New York .

[14] Sottrup-Jensen L. (1989) Alpha-macroglobulins: structure, shape and mechanism of proteinase complex formation. J Biol Chem 264:11539-11542

[15] Gordon AH. (1976). The alpha macroglobulins of rat serum. Biochem J 159:643-650.

[16] Okubo H, Miyanaga O, Nagano M, Ishibashi H, Kudo J, Ikuta T, Shibata K. (1981) Purification and immunological determination of alpha-2-macroglobulin in serum from injured rats. Biochem Biophys Acta 668:257-267.

[17] Koj A, Dubin A, Kasperczyk H, Bereta J, Gordon AH (1982). Changes in the blood level and affinity to concanavalin A of rat plasma glycoproteins during acute inflammation and hepatoma growth. Biochem J 206:545-553

[18] Northemann W, Andus T, Gross V, Heinrich PC. (1983). Cell-free synthesis of rat alpha-2-macroglobulin and induction of its mRNA during experimental inflammation. *Eur J Biochem* 137:257-262.

[19] Lonberg-Holm K, Reed DL, Hebert RC, Roberts RC, Hillman MC, Kutney RM. (1987). The high molecular weight protease inhibitors of rat plasma. Isolation, characterization, and acute phase changes. *J Biol Chem* 262:438-445.

[20] Gehring MR, Shiels BR, Northemann W, Bruijn MHL, Kan C, Chain AC, Noonan DJ, Fey GH. (1987) Sequence of rat liver alpha-2-macroglobulin and acute phase control of its messenger RNA. *J Biol Chem* 262:446-454.

[21] Ufkes JGR, Zeegers A, Boers W, Van Gool J. (1983). Inhibitory effects of BaSO₄ on experimentally induced inflammation in the rat mediated by alpha M-foetoprotein. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 262:287-298.

[22] Zhang P, Yang Z, Wan CL, Zheng WD, Zhang CF, Li S, Lu ZP, Zheng CG, Jin F, Wang L. (2004) Neither the tumor necrosis factor alpha-308 A/G polymorphism nor the alpha-2-macroglobulin polymorphism was associated with late-onset Alzheimer's disease in the Chinese population. *Yi Chuan Xue Bao*.31:1-6.

[23] Tooyama I, Kawamatta T, Akiyama H, Moestrup SK, Gliemann J, McGeer L. (1993) Immunohistochemical study of alpha-2-macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem brain. *Mol Chem Neuropathol* 18:153-160.

[24] Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. (2004) The hemostatic system. *Curr Med Chem* 11:2245-2260.

[25] Di Loreto V, Rigalli A, Cinara L, Hernández G. (2008) Effect of disodium monofluorophosphate on plasma and blood viscosity in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 40(4):259-265.

- [26] Anwar MA, Rampling MW. (2004) Erythrocyte hyper-aggregation in a patient undergoing orthotopic transplantation for primary sclerosing cholangitis complicated by biliary structure. *Clin Hemorheol Microcirc* 31:169-172.
- [27] Tseng YL, Wu WB, Hsu CC, Peng HC, Huang TF. (2004) Inhibitory effects of human alpha-2-macroglobulin and mouse serum on the PSGL-1. and glycoprotein Ib proteolysis by a snake venom metalloproteinase, triflamp. *Toxicon* 43:769-777.
- [28] Halfon P, Ouzan D, Cattan L, Cacoub P. (2004) The prognostic tools of hepatitis C virus infections *Presse Med.* 33:542-543.
- [29] Sevaljevic L, Dobric S, Bogojevic D, Petrovic M, Koricanac G, Vulovic M, Danzir D, Ribarac-Stepic N. (2003) The radioprotective activities of turpentine-induced inflammation and alpha-2-macroglobulin: the effect of dexamethasone on the radioprotective efficacy of the inflammation. *J Radiat Res* 44:59-67.
- [30] Araújo-Jorge TC, Luz MRM, Coutinho CMLM, Medrano N, Soeiro MNC, Meirelles MNL, Isaac L, Van Leuven F. (1994) Alpha-2-macroglobulin in experimental and human Chagas Disease. In *Biology of alpha-2-macroglobulin, its receptor and related proteins.* Ann N Y Acad Sci. Vol 737. Ed Borth W. New York, USA.
- [31] Ramos AM, Duschak VG, Gerez de Burgos NM, Barboza M, Remedi MS, Vides MA, Chiabrando GA. (2002) Trypanosoma cruzi: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human alpha-2-macroglobulin and pregnancy zone protein. *Exp Parasitol* 100:121-130.
- [32] Sobajima H, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sakai Y, Ishiguro H, Tanikawa M, Nakae Y. (1994) Monitoring serum tryptic activity and effect of trypsin inhibitor on rat acute pancreatitis. *Digestion* 55:90-96.
- [33] Kato M, Hayakawa S, Naruse S, Kitagawa M, Nakae Y, Hayakawa T. (1996) Plasma alpha-2-macroglobulin-trypsin complexlike substance (MTLS) in pancreatic disease. *J Clin Lab Anal* 10:399-402.

[34] Umans L, Serneels L, Overbergh L, Stas L, Van Leuven F. (1999) Alpha-2-macroglobulin- and murinoglobulin-1- deficient mice. A mouse model for acute pancreatitis. *Am J Pathol.* 155:983-993.

[35] Bisaro de Lorenc L, Ramos AM, Sanchez MC, Montenegro R, Chiabrando GA. (2005) Structural evaluation of plasma alpha-2-macroglobulin in acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* 43:1183-1189.

[36] Ruaux CG, Atwell RB. (1999) Levels of total alpha-macroglobulin and trypsin-like immunoreactivity are poor indicators of clinical severity in spontaneous canine acute pancreatitis. *Res Vet Sci* 67:83-87.

[37] Kruse P, Lasson A, Hage E. (1999) Proteases and protease inhibitors in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 85:294-300.

[38] Kruse P, Hage E, Lasson A. (1999) Proteases and protease inhibitors in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 25:113-121.

[39] Wilson C, Imrie CW. (1990) Effective intraperitoneal antiprotease therapy for taurocholate-induced pancreatitis in rats. *Br J Surg* 77:1252-1255.

[40] Banks RE, Evans SW, Alexander D, Van Leuven F, Whicher JT, McMahon MJ. (1991) Alpha-2-macroglobulin state in acute pancreatitis. Raised values of alpha-2-macroglobulin-protease complexes in severe and mild attacks. *Gut* 32:430-434.

[41] Nakae Y, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sakai Y, Sobajima H, Ishiguro H, Tanikawa M, Suzuki T, et al. (1991) Diagnostic value of serum level of alpha-2-macroglobulin-trypsin complex in pancreatic diseases using a colorimetric assay with a synthetic chromogenic substrate. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 88:2853-2860.

[42] Di Loreto V, Roma SM, Menoyo I, Rigalli A. (2008) Effect of the administration of monofluorophosphate on alpha-macroglobulin levels and clinical course of pancreatitis in rats. *Arzneimittelforschung.* 58(3):136-140.

- [43] Sobajima H, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sakai Y, Ishiguro H, Tanikawa M, Nakae Y. (1994) Monitoring serum tryptic activity and effect of trypsin inhibitor on rat acute pancreatitis. *Digestion* 55:90-96.
- [44] Tooyama I, Kawamatta T, Akiyama H, Moestrup SK, Gliemann J, McGeer L. (1993) Immunohistochemical study of alpha-2-macroglobulin receptor in Alzheimer and control postmortem brain. *Mol Chem Neuropathol* 18:153-160.
- [45] Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. (1989) A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 38:858-868.
- [46] Farley JR, Tarbaux N, Hall S, Baylink DJ. (1990) Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells. Determinants of the response in vitro. *J Bone Miner Res* 5:S107-S113.
- [47] Briancón D, Meunier PJ. (1981) Treatment of osteoporosis with fluoride calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am* 12:629-648.
- [48] Brazier M, Fardelonne P, Bellony R, Sebert JL, Desmet G, Hary L, Richard MO. (1990) Comparison of the fluoride bioavailability from two oral preparations of monofluorophosphate disodium in comparison with various calcium salts. *Therapie* 45:235-241
- [49] Chaleil D, Mauras Y, Allain P. (1986) Oral pharmacokinetics of an enteric coated sodium fluoride preparation. *Trace Elements in Medicine* 3:11-13
- [50] Setnikar I, Maurer H. (1990). Bioequivalence of sodium monofluorophosphate with sodium fluoride and compatibility with calcium. *Arzneimittelforschung* 40:994-999.
- [51] Fuchs C, Haase W, Maurer H. (1984) Pharmacokinetics of a fluoride-calcium preparation for the treatment of osteoporosis. *Arzneimittelforschung* 34:832-835.

[52] Warneke G, Setnikar I. (1993) Bioavailability and pharmacokinetics of fluoride from two glutamine. *Arzneimittelforschung*. 43:584-590.

[53] Rigalli A, Ballina JC, Beinlich A, Alloatti R, Puche RC. (1994) Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittelforschung* 44:762-766.

[54] Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. (1994) Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 44:651-655.

[55] Rigalli A, Esteban L, Pera L, Puche RC. (1997) Binding of monofluorophosphate to alpha-2-macroglobulin and C3. *Calcif Tissue Int* 60:86-89.

[56] Beinlich AD, Brun LRM, Rigalli A, Puche RC. (2003) Intestinal absorption of disodium monofluorophosphate in the rat as affected by concurrent administration of calcium. *Arzneimittelforschung* 53:584-589.

[57] Brun LRM, Brance ML, Rigalli A, Puche RC. (2006) Effect of calcium on rat intestinal alkaline phosphatase activity and molecular aggregation. *J Enzyme Inhib Med Chem* 21:757-763.

[58] Esteban L, Rigalli A, Puche RC. (1999) Metabolism of the complex monofluorophosphate-alfa-2-macroglobulin in the rat. *Medicina (B Aires)* 59:151-156.

[59] Pera LI, Brun LRM, Rigalli A, Puche RC. (2003) Identificación de proteínas derivadas de la alfa-2-macroglobulina en el hueso de ratas tratadas con monofluorofosfato de sodio. Rol de estas proteínas en la biodisponibilidad de flúor. *Rev Med Rosario* 69:36-43.

[60] Brun L, Pera L, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother*. In Press.

[61] Rigalli A, Morosano M, Puche RC. (1996) Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human. *Arzneimittelforschung* 46:531-533.

[62] Rigalli A, Beinlich A, Puche RC. (2001) Intestinal absorption of fluoride at high luminal concentration of fluoride. *Arzneimittelforschung* 51:151-155.

[63] de la Sota M, Puche RC, Rigalli A, Fernandez LM, Benassati S, Boland R. (1997) Modificaciones en la masa ósea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahía Blanca con alta ingesta espontánea de flúor. Bone mass and glucose homeostasis of subjects with high spontaneous fluoride intake. *Medicina (B Aires)* 57: 417-420.

[64] Lau KMW, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. (1989) A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells. Inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 38:858-868.

[65] Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. (1983) Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline fosfatase activiti in bone forming cells. *Science* 282:330-332

[66] Briançon D, Meunier PJ. (1981) Treatment of osteoporosis with fluoride calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am* 12:629-648.

[67] Farley JR, Tarbaux N, Hall S, Baylink DJ. (1990) Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells. Determinats of the response in vitro. *J Bone Miner Res* 5:S107-S113.

[68] Burgener D, Bonjour JP, Caverzasio J (1995). Fluoride increases tyrosine kinase activity in osteoblast-like cells: regulatory role for the stimulation of cell proliferation and Pi transport across the plasma membrane. *J Bone Miner Res* 10:164-171.

[69] Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. (1998) Fluoride: mode of action. *Bone* 22:585-589.

- [70] Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. (2005) Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittelforschung* 55:455-460
- [71] Krishnan V, Bryant HU, MacDougald A. (2006) Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 226:1202-1209.
- [72] Farrow SP, Baar S. (1973) The metabolism of alpha-2-macroglobulin in mildly burned patients. *Clin Chim Acta* 46:39-48.
- [73] Apostol TM. (1992) *Calculus Volumen 2* Editorial Reverte S.A.
- [74] Perko L. (1991) *Differential Equations and Dynamical Systems.- Springer – Verlag. New York.*
- [75] Font MT, Garroq O, Martinez SM, Morini JC, Puche RC, Tarrés MC. (1991) The inbred IIM/Fm stock. *Rat Newslett.* 25:28-29
- [76] Guy Poumeau-Delille. (1953) *Technique Biologiques en endocrinologie Experimentale Chez le Rat* Masson et Cie, Ed. Paris.
- [77] Sugimoto M, Takada T, Yasuda H. (2004). A new experimental pancreatitis by incomplete closed duodenal loop. *Pancreas* 28:112-119.
- [78] Grewal R, Mahmood A. (2004) Coordinated secretion of alkaline phosphatase into serum and intestine in fat-fed rats. *Indian J Gastroenterol* 23:175-177.
- [79] Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. (1999) Measurement of total and diffusible serum fluoride. *J Clin Lab Anal* 13:151-157.
- [80] Hallsworth AS, Weatherell JA, Deutsch D. (1976) Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode. *Anal Chem* 48:1660-1664.
- [81] Rigalli A, Pera LI, Di Loreto V, Brun LR. (2007) *Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas.* 1º Ed. Editorial de la Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina. ISBN 978-950-673-616-3

- [82] Swenson RP, Howard JB. (1979) Structural characterization of human alpha-2-macroglobulin subunits. *J Biol Chem* 254:4452-4456.
- [83] Perko L (1991) *Differential Equations and Dynamical Systems.*- Springer – Verlag. New York.
- [84] Strogatz SH. (1994) *Nonlinear Dynamics and Chaos.*-Addison-Wesley Publishing Company. USA.
- [85] Edwards CH. et al (2001) *Ecuaciones diferenciales*, 2da. Ed. – Pearson Educacion, Mexico.
- [86] Hunt BR, Lipsman RL, Osborn JE, Rosenberg JM (2005) *Differential Equations with MATLAB® Second Edition* John Wiley and sons, Inc. USA.
- [87] Edsberg L, Wedin P A. (1995) Numerical Tools for Parameters Estimation in ODE-systems. *Optimization Methods and software*. 6: 193-217
- [88] MATLAB ® The language of Technical Computing. Version 7.0.0.19920 (R14) The MathWorks. Inc.
- [89] Van Berkel TJ, De Rijke YB, Kruijt JK. (1991) Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors of Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* 266:2282-2289.