

USO DE HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS PARA LA RECOPIACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS DE INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS

Módulo 7 Formulación de Modelos Matemáticos de Fenómenos Biológicos

**Alfredo Rigalli
Maela Lupo**

**Centro Universitario de Estudios Medioambientales
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario**

2022



**USO DE HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS PARA LA RECOPIACIÓN, ANÁLISIS E
INTERPRETACIÓN DE DATOS DE INTERÉS EN LAS CIENCIAS BIOMÉDICAS**

MODULO 7

Fundamentos para la formulación de modelos matemáticos de fenómenos biológicos

**Alfredo Rigalli
Maela Lupo**

**Centro Universitario de Estudios Medioambientales
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario**



Uso de herramientas informáticas para la recopilación, análisis e interpretación de datos de interés en las ciencias biomédicas : módulo 6 : formulación de modelos matemáticos de fenómenos biológicos / Alfredo Rigalli ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Rosario : Alfredo Rigalli, 2020.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: online

ISBN 978-987-86-3474-6

1. Matemática Aplicada. 2. Matemática Estadística. I. Rigalli, Alfredo

CDD 510

AUTORES

Lupo, Maela: Licenciada en biotecnología y Doctora en Ciencias Biomédicas. Investigadora del Laboratorio de Biología Ósea y del Centro Universitario de Estudios Medioambientales y docente de la cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario.

Rigalli, Alfredo: Bioquímico y Doctor en bioquímica. Investigadora del Laboratorio de Biología Ósea y del Centro Universitario de Estudios Medioambientales y docente de la cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Investigador independiente del Consejo de Investigaciones de la UNR y del CONICET

Tabla de contenidos

ORGANIZACIÓN DE LA OBRA.....	7
Links videos y planillas de cálculo para desarrollo de clases.....	1
Clase 1.....	1
Clase 2.....	1
Clase 3.....	1
Clase 4.....	1
Clase 5.....	1
Clase 6.....	1
Clase 7.....	1
Clase 8.....	1
Clase 9.....	1
Clase 1.....	2
Paradigmas de la modelización matemática.....	2
Modelo de fijación de un ligando a una macromolécula.....	2
Ejercicio.....	9
Cinética enzimática.....	9
Desarrollo del modelo básico de Michaelis Menten.....	9
Rectificación de Lineweaver-Burk.....	15
Rectificación de Eadie-Hofstee.....	17
Cálculo de los parámetros enzimáticos.....	19
Aplicación.....	19
Clase 2.....	21
Medida de constantes totales y parciales.....	21
Resolución con R.....	25
Análisis de orden y cálculo de constante global.....	25
Análisis del orden y cálculo de la constante k_1	27
Análisis de orden y cálculo de la constante k_2	28
Aplicación a datos reales.....	30
Determinación de la constante de depuración total (k_d).....	31
Medida de la constante de depuración hepática.....	32
Medida de la constante de depuración sérica.....	35
Clase 3.....	36
Gradientes de concentración.....	36
Gradiente manual sin ecuación.....	37
Gradiente manual con modelización.....	38
Obtención de una ecuación general.....	42
Creación de gradiente con válvulas controladas por ordenador.....	43
Creador de gradiente continuo.....	44
Simuladores de gradiente.....	49
Ejercicios.....	51
Clase 4.....	52
Infusión continua.....	52
Desarrollo del modelo.....	53
Concentración máxima de la infusión.....	55
Vida media de infusión.....	55
Utilización de la derivada para el cálculo de parámetros.....	56
Calibración de minibomba osmótica.....	59
Aplicaciones y cálculos.....	60
Calibración minibomba osmótica.....	60
Calculo de parámetros.....	61

Ejercicios de aplicación.....	64
Clase 5.....	65
Estudios de absorción en órganos aislados.....	65
Modelo de estómago aislado.....	66
Desarrollo del modelo matemático.....	71
Ejercicio.....	73
Modelo de intestino aislado.....	74
Clase 6.....	89
Farmacocinética del fluoruro de sodio.....	89
Absorción gástrica de fluoruro.....	91
Absorción intestinal de fluoruro.....	94
Concentración plasmática de fluoruro.....	97
Comprobación de los supuestos.....	99
Cálculo del volumen de distribución.....	107
Resumen final de los parámetros y modelo.....	108
Posibilidades.....	108
Excreción urinaria de Fluoruro después de una dosis oral.....	111
Clase 7.....	111
Medición del Remodelado óseo en ratas.....	111
Modelo matemático a partir de una dosis endovenosa.....	112
Definición de etapas del estudio.....	112
Desarrollo antes de la administración de la dosis.....	112
Desarrollo luego de administrar una dosis endovenosa.....	115
Procedimiento de cálculo de R_o y F_o	118
Cálculos del remodelado óseo con R	119
Clase 8.....	126
Resolución de sistemas de ecuaciones diferenciales.....	126
Descripción del modelo.....	129
Estimación de parámetros en ratas sanas.....	130
Estimación de k_a	133
Estimación de k_0	137
Estimación de k_1	140
Estimación de k_6	143
Estimación de I_{pi}	146
Estimación de k_2 y k_3	151
Estimación de k_4	153
Clase 9.....	157
Resolución de sistemas de ecuaciones diferenciales.....	157
Optimización de los parámetros.....	158
Optimización de dos parámetros: k_0 y k_1	161
Optimización de k_0 , k_1 , k_2 y k_3	163
Optimización con k_0 , k_1 , k_2 , k_3 y k_6	165

ORGANIZACIÓN DE LA OBRA

Esta obra está dividida en módulos y clases. Cada módulo agrupa temas diferentes. Brevemente

Módulo 1: Instalación e introducción a R

Módulo 2: gráficas con R

Módulo 3: introducción a la estadística básica.

Módulo 4: análisis multivariado de datos numéricos y análisis especiales de datos.

Módulo 5: desarrollo de scripts y programación en R.

Módulo 6: Matemática con R

Módulo 7: Modelización matemática con R

Módulo 8: Aprendizaje automatizado

Cada módulo se divide en 9 clases, las cuales constan de tablas específicas para cada clase, así como de un vídeo y una ejercitación. Al final de las 9 clases existe un examen final del módulo.

Las planillas de cálculo en formatos ods o xls llevarán la denominación tablaR1-3.ods por ejemplo si es la planilla de cálculo para la clase 3 del módulo 1. En el interior de la planilla hallará tablas con los nombre tablaR131, tablaR132, tablaR133, etc. Todas tablas para el módulo 1 (primer número), de la clase 3 (segundo número) y el tercer número indica el número de tabla. Con estos nombres serán introducidos como objetos en el espacio de trabajo.

Al principio de la obra hallará los links a un vídeo sobre la clase y tendrá un link a la planilla de cálculo con las tablas para el desarrollo de la clase.

Resaltado en este color hallará los textos que representan códigos de R. A su vez estos códigos se identifican porque comienzan con el caracter ">" . Estos códigos puede copiarlos y ejecutarlos. Para ello no copie el caracter ">".

Links videos y planillas de cálculo para desarrollo de clases

Clase 1

vídeo: <https://youtu.be/luKjoOjaTRM>

Tabla de datos:

Clase 2

vídeo: <https://youtu.be/bI6H8rJmWu8>

Clase 3

vídeo: <https://youtu.be/98e3LSo7mxw>

Clase 4

Video: <https://youtu.be/SnPzww4QJ4E>

Clase 5

Video: <https://youtu.be/CVSuz9C0O0A>

tablas:

Clase 6

Video: https://youtu.be/DlerTgs_cHU

Clase 7

Vídeo: https://youtu.be/qQK3SE_8RZQ

tablas:

Clase 8

Vídeo: <https://youtu.be/1kmly1GyQ4w>

tablas:

Clase 9

Vídeo: <https://youtu.be/7Nwp1tLo0VQ>

Tablas:

Clase 10

Examen final: <https://forms.gle/BPpb5w7g6cpuqcpQ8>

Clase 1

Paradigmas de la modelización matemática

En esta clase se desarrollarán algunos modelos matemáticos clásicos, de amplia vigencia en la investigación biológica. El objetivo de la clase es introducir para quien aun no ha trabajado en el tema, qué es un modelo matemático y que beneficios puede traernos. Como se observará, estos modelos gozan de una gran simplicidad en lo que se refiere a los recursos matemáticos utilizados. Sin embargo su utilización es muy amplia debido a que permiten realizar una rápida interpretación de un fenómeno biológico o la obtención de información a partir de un experimento. A partir de estos modelos básicos se han desarrollado otros de mayor complejidad, pero cuyas aplicaciones son más específicas, permitiendo utilizarlos en situaciones no previstas en el modelo inicial. Existen muchos modelos que gozan de las mismas cualidades. La elección de estos para su discusión, se debe a que han sido utilizados en nuestro laboratorio, y se transmitirá la experiencia personal.

Modelo de fijación de un ligando a una macromolécula

Cálculo del número de sitios de fijación de un ligando a una macromolécula

Uno de los problemas comunes en la investigación biológica es estudiar la interacción entre macromoléculas, como las proteínas, y pequeños ligandos (cationes, aniones, ácidos grasos, etc). En este tipo de estudios entre los primeros conocimientos que perseguimos, es conocer cuantas moléculas de ligando se unen por mol de macromolécula y con que afinidad lo hacen.

Existen diferentes maneras a través de las cuales se puede reconocer o sospechar la fijación de una sustancia a otra. Por ejemplo, la falta de una sustancia en orina, luego de administrarla a un animal de experimentación, puede ser un indicio aunque no una prueba confirmatoria de la unión a una macromolécula. Una sustancia puede no aparecer en orina por diferentes razones además de la fijación. Puede no filtrar a nivel glomerular o puede filtrar libremente pero ser reabsorbida en un 100% a nivel tubular. Otra razón es que sea metabolizada totalmente a un compuesto diferente al original.

Otro indicador de ligamiento es el valor del volumen de distribución (V_d) de la sustancia. Este valor es hallado al realizar un estudio farmacocinético de la droga. Si bien este valor puede sugerir ligamiento, no necesariamente la sustancia tiene que estar uniéndose a una macromolécula.

La prueba final de que una sustancia se liga a otra se logra a través de pruebas *in vitro*. Para este tipo de comprobaciones se pueden utilizar variadas técnicas como ser la ultrafiltración, diálisis, electroforesis y cromatografía sobre tamiz molecular. Estas experiencias deben ser realizadas con las dos sustancias involucradas en la unión, en un alto grado de pureza.

Uno de los modelos más sencillos y más difundidos para un primer estudio de la fijación entre pequeñas moléculas y macromoléculas fue desarrollado por Scatchard a mediados del siglo XX, que por su simplicidad mantiene actualmente amplia vigencia.

Supongamos una macromolécula con n sitios de fijación para un ligando dado, al que llamamos: **L**, Figura 1.

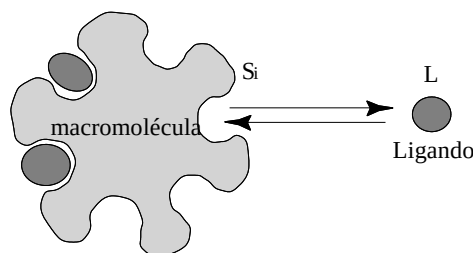


Figura 1

En adelante se utilizará el término ligando cuando se hace referencia a la pequeña molécula que se fija a la macromolécula. Como se esquematiza en la Figura 1, el ligando puede estar fijado a un sitio de la macromolécula o bien hallarse libre en la solución. Por otra parte la macromolécula puede tener más de un sitio de fijación. Además estos sitios pueden ser iguales entre sí o diferentes. Para el desarrollo se utilizarán las siguientes abreviaturas:

m: concentración de la macromolécula

l: concentración total del ligando (es la suma del ligando unido a los sitios de la macromolécula y el ligando que se halla libre en la solución).

c: concentración del ligando libre.

b: concentración del ligando fijado a los sitios de la macromolécula.

r: número de moles de ligando por mol de macromolécula.

El razonamiento que se hará para un sitio es similar para los **n** sitios que tiene la macromolécula. Se considera una molécula del ligando (L) que se fija a uno de los sitios (S_i) de la macromolécula. Si esta fijación es reversible y se asume que cumple con la ley de acción de masas, es posible escribir la ecuación de fijación como un equilibrio.



En una reacción química se pueden escribir leyes para la velocidad de reacción directa e inversa¹, como lo indican las ecuaciones siguientes donde S_i , L y S_iL representan las concentraciones de dichas sustancias

$$v_d = k_{+1} * S_i * L$$

$$v_i = k_{-1} * S_iL$$

En base a estas leyes se puede escribir una expresión para la constante de equilibrio² del proceso de fijación que tendrá la expresión

$$k_i = \frac{S_iL}{S_i * L}$$

donde el término S_iL es la concentración de sitios **i** de la macromolécula que se hallan ocupados por el ligando, al que también se puede llamar **b_i**

En el denominador se encuentra S_i , que es la concentración de sitios **i** vacíos en la macromolécula. Como **b_i** es la concentración de sitios **i** unidos al ligando y **m** es la concentración de la macromolécula, es posible escribir

$$S_i = m - b_i$$

¹En general para una reacción del tipo $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$

la velocidad directa de la reacción se puede escribir $v_d = k_{+1} * [A]^a * [B]^b$

y la velocidad inversa de la reacción $v_i = k_{-1} * [C]^c * [D]^d$

En ambas ecuaciones los términos entre corchetes representan las concentraciones de esas sustancias.

²Al llegar una reacción al equilibrio, $v_d = v_i$, por lo tanto

$$k_{+1} * [A]^a * [B]^b = k_{-1} * [C]^c * [D]^d$$

reordenando se obtiene la expresión para la constante de equilibrio

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[C]^c * [D]^d}{[A]^a * [B]^b} = K$$

Por lo tanto la constante de equilibrio de una reacción se puede escribir como el producto de las concentraciones de los productos elevados a sus coeficientes estequiométricos, dividido por el producto de las concentraciones de los reactivos elevados a sus coeficientes estequiométricos.

En el denominador también se halla **L**, que representa al ligando libre al que se indica con **c**. Reemplazando los valores con estos nuevos símbolos resulta

$$k_i = \frac{b_i}{(m - b_i) * c}$$

dividimos a la derecha numerador y denominador por **m**

$$k_i = \frac{(b_i/m)}{(1 - b_i/m) * c}$$

reordenando la expresión, al reemplazar b_i/m por r_i , que sería el número de moles de ligando por mol de sitio i , resulta

$$k_i = \frac{r_i}{(1 - r_i) * c}$$

reordenando esta expresión, se obtiene

$$k_i - k_i * r_i = \frac{r_i}{c}$$

reagrupando

$$k_i = k_i * r_i + \frac{r_i}{c}$$

La expresión anterior se puede escribir como

$$k_i * c = k_i * r_i * c + r_i$$

si sacamos factor común en el miembro de la derecha

$$k_i * c = r_i * (k_i * c + 1)$$

y despejamos r_i , obtenemos

$$r_i = \frac{k_i * c}{(k_i * c + 1)}$$

r_i representa el número de moles de ligando fijado por mol de macromolécula en el sitio **i**. Por lo tanto el número total de moles de ligando ligado en los **n** sitios, expresado por mol de macromolécula será la sumatoria de los moles fijos en cada uno de los **n** sitios, esto se puede obtener sumando los valores r_i , para todos los sitios. Esto queda expresado

$$r = \sum_{i=1}^n r_i = \sum_{i=1}^n \frac{k_i * c}{(k_i * c + 1)}$$

Si se considera que los **n** sitios son equivalentes en afinidad, **k_i** tendrá un único valor que podemos llamar **k** y la expresión anterior se puede escribir:

$$r = \sum_{i=1}^n \frac{k * c}{(k * c + 1)}$$

que equivale a sumar **n** veces el término de la sumatoria

$$r = \frac{n * k * c}{(k * c + 1)}$$

reordenando obtenemos

$$r * k * c + r = n * k * c$$

al dividir miembro a miembro por **c**

$$r * k + \frac{r}{c} = n * k$$

se obtiene una de las expresiones finales de este modelo

$$\frac{r}{c} = k * n - k * r$$

Esta expresión corresponde a una recta, donde r/c es la variable dependiente, r la variable independiente, $k * n$ la ordenada al origen y k la pendiente de la recta. La expresión contiene dos datos del proceso de fijación que nos propusimos conocer: el número de sitios de unión: n y la afinidad, medida por su constante: k

Si tomamos $r/c = 0$, la expresión anterior resulta

$$0 = k * n - k * r$$

despejando y simplificando, se obtiene

$$r = n$$

es decir que $r = n$ cuando $r/c = 0$, esto equivale a decir que la intersección de la recta con el eje horizontal permite conocer el valor del número de sitios de fijación (n).

En la Figura 2 se grafica la recta que se obtiene, el valor de k se obtiene a partir de la pendiente de la recta y n a partir de la abscisa al origen. También puede obtenerse n a partir del valor de la ordenada al origen conociendo previamente k .

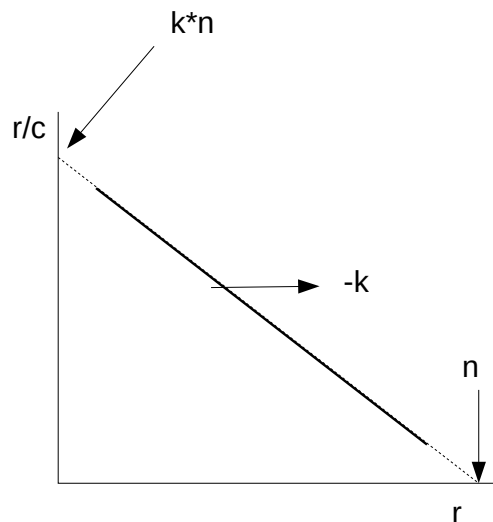


Figura 2

Existen otras formas de realizar estos análisis, que se detallan a continuación. A partir de la fórmula obtenida anteriormente

$$r = \frac{n * k * c}{(k * c + 1)}$$

se puede obtener la siguiente expresión, invirtiendo ambos miembros y distribuyendo el denominador

$$\frac{1}{r} = \frac{k * c}{n * k * c} + \frac{1}{n * k * c}$$

reordenando obtenemos

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{n \cdot k} \cdot \frac{1}{c}$$

que también es la ecuación de una recta donde $1/r$ es la variable dependiente, $1/c$ la variable independiente, $1/n$ la ordenada al origen y $1/n \cdot k$ la pendiente de la recta.

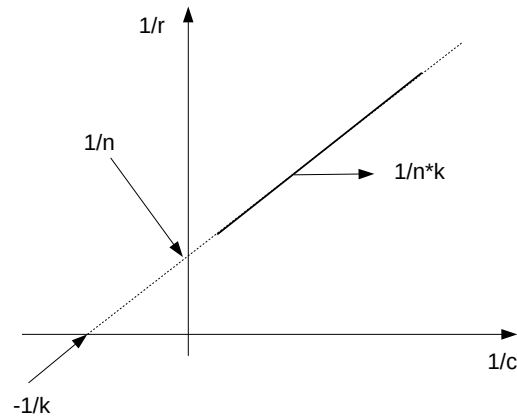


Figura 3.

Graficando los valores experimentales en base a estas variables (Figura 3), se pueden obtener los valores de n y k a partir de la ordenada al origen y la pendiente. La intersección de la extrapolación de la recta con los ejes coordenados permite obtener n o k . Este procedimiento es el que se conoce como gráfica o método de las dobles recíprocas.

A continuación veremos la aplicación de este modelo a datos experimentales.

Cálculo de la constante de afinidad y número de sitios de fijación del calcio a la enzima fosfatasa alcalina intestinal de rata

Se aplicará este modelo al estudio de la fijación del calcio (el ligando) a la enzima fosfatasa alcalina intestinal (la macromolécula, en este caso una proteína). En este análisis se calcularán el número de sitios de fijación y la constante de afinidad entre el ligando y la proteína. Para cumplir con este objetivo se prepararon soluciones con igual contenido molar de fosfatasa alcalina intestinal purificada de rata. A las soluciones se les agregó CaCl_2 de manera de fijar la concentración total del ligando (Ca^{++}) en valores preestablecidos. La solución de CaCl_2 fue suplementada con trazas de Ca^{45} (isótopo radioactivo emisor beta, que se utiliza para determinar la concentración de calcio). Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente para permitir que el proceso de fijación alcance el equilibrio. Luego se ultrafiltraron las soluciones a través de membranas que permiten el paso de partículas de peso molecular menor a 30000 Da. La fosfatasa alcalina supera este valor de peso molecular, por lo que no podrá atravesar la membrana, en cambio si lo hará el calcio por su pequeño tamaño. De esta manera en el ultrafiltrado que se obtiene, sólo existe calcio sin ligar con la misma concentración que tiene el calcio libre junto con la fosfatasa alcalina. Midiendo el calcio en el ultrafiltrado se conoce el valor de concentración de calcio libre (c). Como la cantidad total del ligando (I) agregado es conocida, se puede calcular por diferencia la cantidad de calcio fijado (b). La cantidad de moles por litro de proteína (m) también es conocida, por lo tanto se puede calcular la variable r (b/m) y r/c , necesarias para realizar el gráfico r/c vs r . La tabla siguiente muestra los valores obtenidos

Fijación de calcio a fosfatasa alcalina de rata. Se muestra media±desvío estándar		
r	r/c M ⁻¹	n
4.0	96840±15967	3
3.3	74200±14004	3
1.2	88285±18006	3
0.6	92040±12000	3
0.3	224701±25005	3

y en la Figura 4 se muestra la representación de los mismos y los valores obtenidos del ajuste lineal con la función correspondiente.

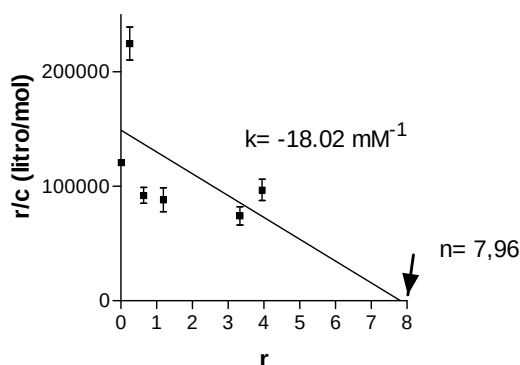


Figura 4

Como se puede observar en la Figura 4, los valores experimentales fueron ajustados por una recta con significado estadístico ($r=0.512$ $p<0.05$). El ajuste de los datos por una recta, indica que la fijación del calcio a la fosfatasa alcalina es compatible con un modelo de 8 sitios independientes y equivalentes en afinidad ($k= 18 \text{ mM}^{-1}$). Es importante destacar que si los datos no fueran ajustados por una recta, no indican un fracaso del experimento, sino que estaría indicando que el proceso de fijación no es compatible con el mencionado modelo. Se deberían en tal caso analizar los datos con otros modelos, por ejemplo modelos que presentan cooperatividad positiva o negativa entre sitios, modelos de dos sitios de diferente afinidad, etc.

Veamos un ejemplo resuelto con R

Introduzca la tablaR711 de la planilla de cálculo tablaR71.ods/xls. Esta tabla incluye los valores de m, l y c, y los valores calculados de b, r y r/c

```
> tablaR711<-read.table("clipboard",header=TRUE,sep="\t",dec=',',encoding='latin1')
```

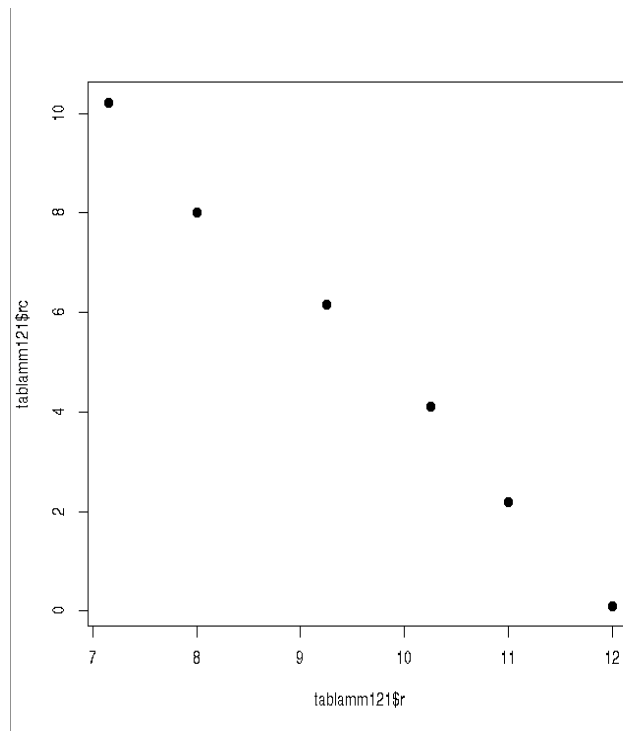
verifiquemos que los datos ingresaron

```
> tablaR711
```

```
  m l  c    b    r    rc
1 2 15 0.7 14.3 7.15 10.214286
2 2 17 1.0 16.0 8.00  8.000000
3 2 20 1.5 18.5 9.25  6.166667
4 2 23 2.5 20.5 10.25  4.100000
5 2 27 5.0 22.0 11.00  2.200000
6 2 144 120.0 24.0 12.00  0.100000
```

graficamos los datos

```
> plot(tablaR711$r,tablaR711$rc,pch=19)
```



realizamos la regresión lineal entre **r/c** y **r**, aplicando la función `lm()` y asignamos su resultado al objeto `lmtablaR711`

```
> lmtablaR711<-lm(rc~r,data=tablaR711)
```

pedimos un `summary` para observar los parámetros

```
> summary(lmtablaR711)
```

Call:

```
lm(formula = rc ~ r, data = tablaR711)
```

Residuals:

```
      1      2      3      4      5      6
0.07971 -0.40424  0.30705  0.27608 -0.09715 -0.16145
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	24.68981	0.72874	33.88	4.53e-06 ***
r	-2.03570	0.07472	-27.25	1.08e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3065 on 4 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9946, Adjusted R-squared: 0.9933

F-statistic: 742.3 on 1 and 4 DF, p-value: 1.079e-05

Vemos que el ajuste con un modelo lineal es muy bueno, así lo indica el valor $R\text{-squared} = 0.9946$ y el $p\text{-value} = 1.079e-05$.

Si el ajuste no fuera aceptable una de las posibilidades es que algunos de los supuestos sobre los que se fundamenta el modelo no sean correctos y por ende no es adecuado el modelo. Pero como en este caso sí es aceptable, podemos calcular los parámetros: **k** y **n**

La pendiente de la recta nos da el valor de la constante de afinidad, por lo tanto en este caso

$k = 2.03570 \pm 0.07472$

como la ordenada al origen de esta función, como lo indica el desarrollo es igual a **k*n**, resulta que

$k*n = 24.68981$

de donde

$n = 24.68981/k$
 $n = 24.68981/2.03570$
 $n = 12$

Así caracterizamos en base a un modelo la fijación de un ligando a una macromolécula, determinando que bajo los supuestos aceptados, esta macromolécula tiene 12 sitios de unión al ligando, todos con afinidad representada por su constante de valor : 2.03570.

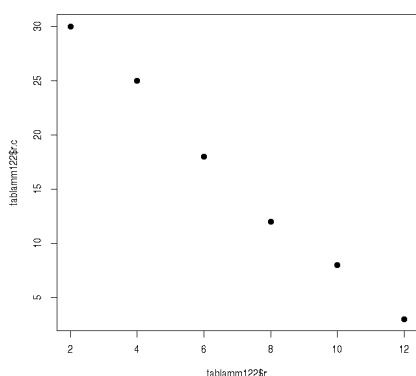
Ejercicio

Utilizado la tablaR712 que da los valores de ligando libre y total, además de la concentración de macromolécula:

- a- indique si el modelo desarrollado en la clase es adecuado para el estudio de fijación del ligando a la macromolécula.
- b- calcule el número de sitios de fijación y su constante de afinidad
- c- grafique r/c vs r y la recta obtenida con el modelo

Respuesta

- a- el modelo es adecuado $R\text{-squared} = 0.9936$, $p\text{-value} = 1.521e-0,5$
- b- $k = 2.7429$, $n = 13$
- c-



Antes de pasar al próximo ejemplo de modelos matemático se refuerza el concepto de los supuestos. Para el modelo utilizado se realizaron dos supuestos, que quedaron expresados durante el desarrollo:

- 1- La unión del ligando a un sitio es reversible y sigue la ley de acción de masas.
- 2- La afinidad de todos los sitios es igual y no es afectada por la unión previa de un ligando a otro sitio.

Entonces si los datos experimentales son ajustados por la ecuación matemática del modelo, nos indica que el procesos de fijación cumple con esos supuestos.

Cinética enzimática

Desarrollo del modelo básico de Michaelis Menten

Las enzimas son catalizadores³ biológicos. No existe prácticamente proceso químico en los organismos vivos que no requiera la participación de una o más enzimas. Estas moléculas, de naturaleza proteica, hacen posible las reacciones químicas en el ambiente compatible con la vida. Conocer la velocidad de la reacción y los factores que sobre ella influyen es valioso al trabajar experimentalmente con enzimas. L. Michaelis y M.L. Menten desarrollaron en 1913 un modelo

3 Un catalizador es una sustancia que interviene en las reacciones químicas aumentando la velocidad de las reacciones, recuperándose inalterada al finalizar el proceso.

matemático para una reacción catalizada por una enzima. Este modelo, el más sencillo planteado, es aplicable a una reacción con un sustrato⁴ y supone reversibilidad de los procesos químicos involucrados. Este modelo luego fue ampliado y aplicado a otras situaciones. Por su validez aún hoy, más de un siglo después de su planteo merece una mención especial como paradigma de la modelización matemática.

Supongamos una reacción en la que un sustrato S, se transforma en un producto P. En presencia de la enzima coexisten diferentes procesos que podemos representar por la siguiente reacción

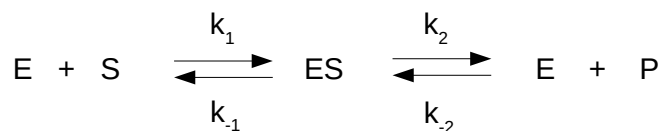


Figura 5

donde

E: concentración de enzima libre

ES: concentración de complejo enzima-sustrato

S: concentración de sustrato

k_1 : constante de velocidad de la reacción de formación del complejo enzima sustrato a partir de la E y el S libre

k_{-1} : constante de velocidad de la reacción de descomposición del complejo ES en E y S.

k_2 : constante de velocidad de formación del producto P a partir del complejo ES.

k_{-2} : constante de velocidad de formación del complejo ES a partir de los productos P.

Supuestos del modelo:

1- Durante todo el tiempo se supone que existe presente una gran concentración de sustrato, siendo el S mucho mayor que ES.

$ES \ll S$ (1)

Por lo tanto el modelo es aplicable a situaciones en las que se mide la velocidad inicial de la reacción, es decir un momento en que no se ha consumido prácticamente nada de S.

2- La concentración del sustrato es muy superior a la concentración de la enzima para todo tiempo

$S \gg E$ (2)

3- Las reacciones descriptas son reversibles

4- La velocidad de la reacción, esto es la rapidez con que se forman los productos es proporcional a la concentración del complejo enzima sustrato. Para que la formación de ES a partir de P sea despreciable se debe trabajar a tiempos cercanos a cero, esto es trabajar con velocidades iniciales (v_0).

5- orden del proceso de formación de producto=1.

Bajo este último supuesto la velocidad inicial de la reacción catalizada por enzima se puede escribir

$$v_0 = k_2 * ES^{p_{ES}}$$

Donde p_{ES} es el orden del proceso respecto de ES. Si se supone que el orden del proceso es 1, la ecuación resultará

$$v_0 = k_2 * ES \quad (3)$$

Si bien el planteo de la ecuación para la velocidad es sencillo, es obvio que se tendrán dificultades en conocer la constante k_2 y la concentración del complejo ES. Si se inicia la reacción a partir de S y se cumplen las suposiciones (1) y (2), la formación del complejo ES a partir de los productos es despreciable cuando $t \rightarrow 0$ ya que P es aproximadamente igual a cero. La velocidad de cambio del ES queda dada por la siguiente ecuación diferencial

4 Se entiende por sustrato de una reacción a un reactivo de la misma. Es la sustancia que se ubica en el sitio activo de la enzima y es transformada a producto.

$$\frac{dES}{dt} = k_1 * E * S - k_2 * ES - k_{-1} * ES$$

Representamos con ET a la cantidad total de enzima, ya sea que se halle libre (E) o unida al sustrato (ES), por lo tanto

$$ET = E + ES$$

entonces

$$E = ET - ES$$

utilizando esta igualdad se puede escribir la expresión anterior como

$$\frac{dES}{dt} = k_1 * (ET - ES) * S - k_2 * ES - k_{-1} * ES$$

en el estado estacionario⁵ la concentración de ES permanece constante y entonces se cumple que

$$\frac{dES}{dt} = 0$$

por lo tanto

$$0 = k_1 * (ET - ES) * S - k_2 * ES - k_{-1} * ES$$

reordenando y operando sobre la ecuación anterior

$$k_1 * (ET - ES) * S = k_2 * ES + k_{-1} * ES$$

$$k_1 * (ET - ES) * S = ES * (k_2 + k_{-1})$$

$$\frac{(ET - ES) * S}{ES} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = KM$$

La constante KM se denomina constante de Michaelis-Menten y es una operación entre las constantes de velocidad de los procesos intervinientes. Como se puede observar es el cociente entre la suma de las dos constante involucradas en la degradación del complejo ES y la constante de velocidad de la reacción de formación del complejo ES, en las condiciones impuestas para el modelo. Por lo tanto un valor elevado de KM indica que el complejo tiene tendencia a degradarse, dicho de otra manera la afinidad de la enzima y el sustrato es pequeña.

Reordenando la ecuación anterior

$$(ET - ES) * S = KM * ES$$

distribuyendo S respecto de los dos sumandos de la izquierda, resulta

$$ET * S - ES * S = KM * ES$$

agrupando los términos con ES a la derecha

$$ET * S = KM * ES + S * ES$$

obtenemos ES como factor común a la derecha

$$ET * S = ES * (KM + S)$$

Reordenando, se obtiene una expresión para la concentración del complejo ES,

5 En el estado estacionario, la concentración de ES permanecerá constante ya que se degradará para formar P a la misma velocidad que se forma a partir de la E y el S.

$$\frac{ET * S}{(KM + S)} = ES$$

reemplazando el miembro de la izquierda de la ecuación anterior en el valor de ES de la ecuación (3), se obtiene la ley de velocidad para la reacción

$$v_o = \frac{k_2 * ET * S}{(KM + S)}$$

Si toda la enzima estuviera formando parte del complejo ES, se tendría la velocidad máxima, por lo tanto el producto $k_2 * ET = V_{max}$. Reemplazando esta igualdad en la última expresión resulta

$$v_o = \frac{V_{max} * S}{KM + S}$$

La ecuación anterior es una de las formas más conocidas de la ecuación de Michaelis-Menten. Esta ecuación corresponde a una función homográfica aunque carece del término independiente del numerador y responde gráficamente a una hipérbola con un valor asintótico horizontal a V_{max} cuando la concentración de S tiende a infinito.

Como se deduce de la ecuación, los parámetros V_{max} y KM tienen un significado biológico.

El término: $V_{max} = k_2 * ET$, nos muestra que la V_{max} es directamente proporcional a la concentración total de la enzima, por lo que el valor de V_{max} es una medida de la concentración total de la enzima.

Por su parte KM es una medida de la afinidad enzima sustrato. Ambos parámetros pueden obtenerse a partir de los datos de velocidad (v) y concentración de sustrato (S), realizando un ajuste de los datos con la función obtenida. Volvamos a la ecuación obtenida:

$$v_o = \frac{V_{max} * S}{KM + S}$$

de la ecuación anterior se deduce que KM es una concentración de sustrato, ya que en el denominador se halla sumado a S . ¿Cuál es su significado? Nos planteamos que $S = KM$ y reemplazamos en la ecuación

$$v_o = \frac{V_{max} * KM}{KM + KM} = \frac{V_{max} * KM}{2 KM} = \frac{V_{max}}{2}$$

es decir que el KM es la concentración de sustrato con la cual la velocidad de la reacción es igual a la mitad de la V_{max} .

Utilizando R, veamos el cálculo de parámetros para una reacción catalizada por una enzima. Introduzcamos los valores de la tablaR713 de la planilla de cálculo [tablaR71.ods/xls](#)

```
> tablaR713<-read.table("clipboard",header=TRUE,dec=".",sep="\t",encoding="latin1")
```

verificamos que los datos estén correctamente introducidos

```
> tablaR713
```

```
  S  v
1  0 0.0
2 25 10.0
3 50 13.0
4 100 15.0
5 150 16.0
6 200 16.5
```

verificamos que estén en formato numérico

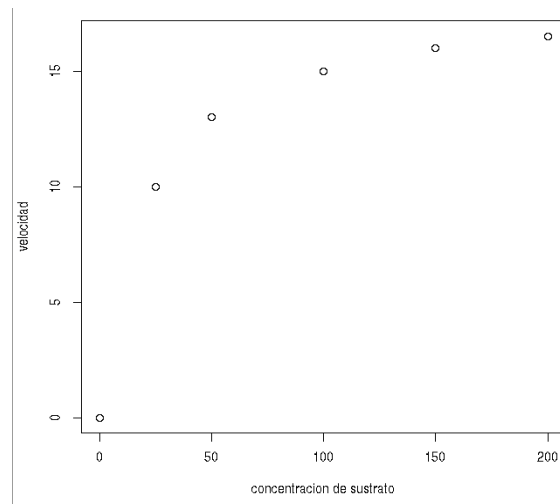
```
> summary(tablaR713)
```

```
      S          v
Min.   : 0.00   Min.   : 0.00
1st Qu.: 31.25  1st Qu.:10.75
```

Median : 75.00 Median :14.00
Mean : 87.50 Mean :11.75
3rd Qu.:137.50 3rd Qu.:15.75
Max. :200.00 Max. :16.50

graficamos los datos para poder observarlos

```
> plot(tablaR713$$,tablaR713$v,ylab="velocidad",xlab="concentracion de sustrato")
```



Podemos aproximar visualmente que los datos siguen un comportamiento hiperbólico clásico de estos casos. Planteemos una función de ajuste siguiendo el modelo de Michaelis Menten. Por cuestiones de simplicidad utilizaremos variables y parámetros con letras minúsculas

```
> funcionR711<-function(s){vmax*s/(km+s)}
```

En base a la tablaR713 podemos aproximar valores a los parámetros KM y Vmax. El proceso de optimización que realizaremos para obtener los valores de los parámetros mencionados requiere de valores iniciales de ambos parámetros. Estos valores si son cercanos a los valores que finalmente obtendremos es mejor para facilitar el proceso. En caso que no podamos estimarlos, utilizaremos valores que consideremos puedan ser buenos para el inicio, aunque en estas situaciones puede ocurrir que el proceso no se pueda llevar adelante por estar estos valores muy alejados de los valores de los parámetros. Por la tabla los valores de velocidad (v) van acotándose superiormente, que podríamos considerar cercano a 17 (Este valor es solo una aproximación del parámetro para tener un valor inicial. Bien podría ser otro valor). Se lo asignamos a la variable vmax

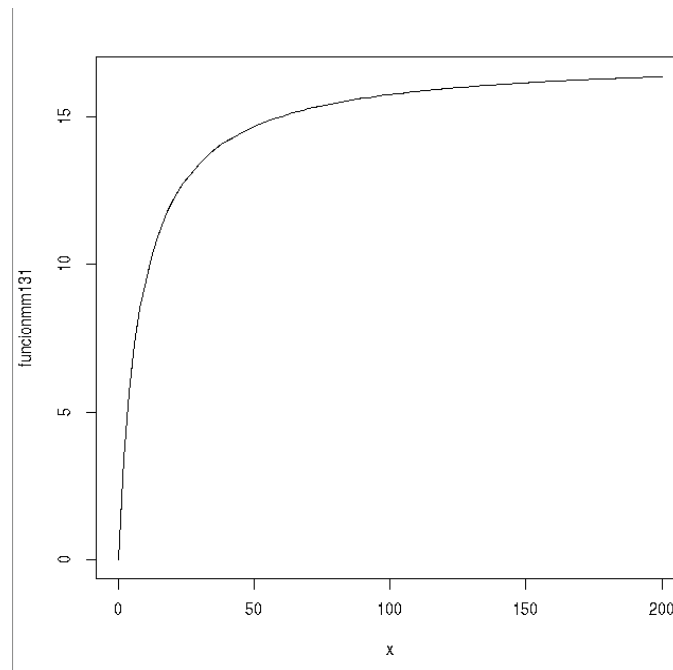
```
> vmax<-17
```

para km, pensando en su definición que es un valor de concentración de sustrato con el que tengo la mitad de la Vmax. Observando la tablaR713, podríamos estimar que una velocidad mitad de la máxima, es decir 8.5 podría estar alrededor de S=20, valor que le asignamos

```
> km<-20
```

graficamos la función en el intervalo de nuestra tabla, para ver que la misma tenga el formato adecuado

```
> plot(funcionR711,0,200)
```



La imagen anterior nos garantiza que la función planteada será adecuada para modelizar el proceso, dado su similitud con la distribución de los datos experimentales. Realizamos el ajuste con la funcionR711 a los datos de la tablaR713, con alguno de los mecanismos conocidos. En este caso es muy apropiado el uso de la función nls() de la biblioteca stats, que se instala por defecto durante la instalación de R. Recuerde que cuando escriba la ecuación dentro de nls() debe utilizar los mismos símbolos que utilizó para las variables en la tablaR713

```
> ajusteR713<-nls(v~vmax*S/(km+S),data=tablaR713,star=c(vmax=vmax,km=km),trace=TRUE)
```

```
3.830756 (1.52e+01): par = (17 20)
0.01659466 (3.57e-02): par = (18.14089 20.22791)
0.01657351 (2.37e-05): par = (18.14096 20.21452)
0.01657351 (3.49e-08): par = (18.14096 20.21453)
```

La tabla anterior nos muestra al principio de cada línea la suma de los cuadrados de los desvíos, para cada iteración del proceso de ajuste. Como puede ver se reduce drásticamente en cada iteración indicando un proceso de buena aproximación. Luego figura par=, entre paréntesis se muestran los parámetros del modelo. En la primer línea verá los valores iniciales de los valores, que aportamos al proceso. Luego vemos los valores en cada iteración y la última línea tiene los valores obtenidos. Note en la sentencia anterior al aplicar nls() que también lo podría haber escrito como

```
> ajusteR713<-nls(v~vmax*S/(km+S),data=tablaR713,star=c(vmax=17,km=20),trace=TRUE)
```

La primer forma tiene algunas ventajas que no discutiremos ahora, pero obviamente requiere primero haber definido e inicializado las variables vmax y km.

pedimos un resumen del análisis

```
> summary(ajusteR713)
```

Formula: $v \sim \text{vmax} * S / (\text{km} + S)$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
vmax	18.14096	0.07108	255.2	1.41e-09 ***
km	20.21453	0.37230	54.3	6.89e-07 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.06437 on 4 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 4

Achieved convergence tolerance: 6.741e-07

Resaltado en color amarillo observamos los valores hallados para los parámetros luego del proceso de optimización. Podemos ahora graficar la función con estos parámetros y nuestros resultados experimentales.

Asignamos los valores hallados a los parámetros de la funcionR713

```
> km<-20.21453
```

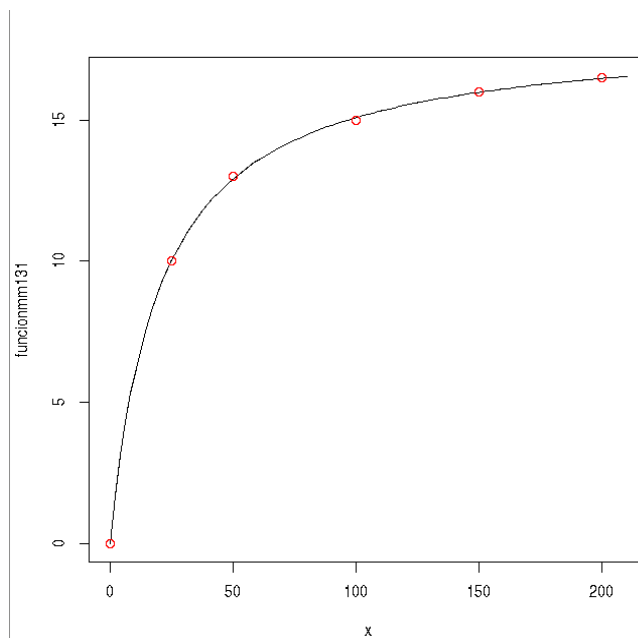
```
> vmax<-18.14096
```

Veremos a continuación si la función planteada, con los parámetros hallados por el proceso de optimización genera una gráfica que ajusta los valores de la tablaR713. Para ello graficamos la función para un intervalo acorde a los datos de la tablaR713

```
> plot(funcionR711,0,210)
```

Luego colocamos los puntos de la tablaR713

```
> points(tablaR713$S,tablaR713$v,col="red")
```



La gráfica nos muestra el buen ajuste de la función con los parámetros hallados en el proceso de optimización.

Cabe destacar algo importante y básico en este punto. Cuando desarrollamos un modelos matemático y la gráfica del modelo con los parámetros estimados, ajusta los datos experimentales, es un buen indicio que estamos en el camino acertado. Si el modelo no ajusta los datos experimentales, no necesariamente el modelo no ajusta los datos. Puede tratarse de algún error en los procedimientos. Primero revise ellos, antes de desestimar el modelo.

Rectificación de Lineweaver-Burk

La ecuación de Michaelis Menten es por lo tanto muy útil, si se ajusta a los datos experimentales, para estimar los parámetros KM y Vmax. Sin embargo, experimentalmente, en la mayoría de los casos es dificultoso llegar a valores de concentración como para que la reacción alcance un valor cercano a la Vmax, como en el ejemplo planteado. Por lo tanto puede ser dificultoso estimar en base a los datos cual podría ser el valor inicial de este parámetro. Por lo tanto se trabaja con rectificaciones de esta función que permiten conocer los parámetros Vmax y KM aun cuando la

enzima no se ha saturado por el sustrato. Veremos a continuación nuevas ecuaciones, para lo cual partimos de la ecuación de Michaelis-Menten

$$v_o = \frac{V_{max} * S}{K_M + S}$$

invertimos ambos miembros de la igualdad, obteniendo

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max} * S} + \frac{S}{V_{max} * S}$$

simplificando y reordenando obtenemos

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Aunque a primera vista puede no parecer, la ecuación anterior puede ser la función de una recta. Si tomamos a $1/v_o$ como la variable dependiente y $1/S$ como la variable independiente, esta ecuación representa una recta con pendiente K_M/V_{max} y ordenada al origen $1/V_{max}$.

Podemos resolver nuevamente el problema de hallar los parámetros, utilizando los datos ya introducidos de la tablaR713, agregamos dos columnas que contengan $1/v$ y $1/S$, a las que llamaremos inversa de v : $invv=1/v$ e inversa S : $invS=1/S$

Utilizamos para esto la función `cbind()` que permite fácilmente agregar columnas a una `data.frame`. Entonces a la tablaR713, le agregamos las columnas `invv` e `invS`, que surgen de dividir 1 por v y 1 por S

```
> tablaR713<-cbind(tablaR713,invv=1/tablaR713$v,invS=1/tablaR713$S)
```

Controlamos que la tabla esté correcta

```
> tablaR713
```

	S	v	invv	invS
1	0	0.0	Inf	Inf
2	25	10.0	0.10000000	0.04000000
3	50	13.0	0.07692308	0.02000000
4	100	15.0	0.06666667	0.01000000
5	150	16.0	0.06250000	0.00666667
6	200	16.5	0.06060606	0.00500000

la primer fila, como involucró divisiones por 0, nos dio como resultado: Inf, valores que no incorporaremos en el siguiente análisis.

Realizamos directamente un modelo lineal, ya que aplicaremos una función lineal, tomando como variable dependiente a `invv` e independiente a `invS`. En este caso no necesitamos valores iniciales de los parámetros

```
> lmtablaR713<-lm(inv~invS,data=tablaR713[c(2:6),])
```

pedimos un `summary()` del objeto hallado, donde tendremos los valores de los parámetros

```
> summary(lmtablaR713)
```

Call:

```
lm(formula = invv ~ invS, data = tablaR713[c(2:6), ])
```

Residuals:

2 3 4 5 6

1.644e-04 -5.212e-04 4.181e-04 -1.668e-05 -4.467e-05

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.055053	0.000287	191.85	3.12e-07 ***
invS	1.119567	0.013776	81.27	4.11e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0003982 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9995, Adjusted R-squared: 0.9994

F-statistic: 6605 on 1 and 3 DF, p-value: 4.106e-06

Debemos recordar que la ordenada al origen es $1/V_{max}$, por ende $V_{max} = 1/\text{ordenada al origen}$. Así entonces asignamos el valor al parámetro en cuestión

```
> vmax<-1/0.055053
```

cuyo valor comprobamos

```
> vmax
```

```
[1] 18.16431
```

por otra parte la pendiente de la función lineal como vimos es KM/V_{max} , de donde hallamos que $KM = \text{pendiente}/V_{max}$. Hallamos entonces el valor KM con los valores de nuestro ajuste.

```
> km=1.119567*vmax
```

verificamos el valor hallado

```
> km
```

```
[1] 20.33617
```

los valores de KM y V_{max} hallados vemos que son próximos a los obtenidos con el ajuste `nls()` a partir de los datos de v vs S .

Rectificación de Eadie-Hofstee

La rectificación de Eadie-Hofstee, es otra rectificación utilizada para hallar los valores de KM y V_{max} . Esta ecuación se obtiene partiendo de la ecuación de Michaelis Menten, utilizando un simple reordenamiento

$$v_o = \frac{V_{max} * S}{KM + S}$$

reordenando la ecuación

$$v_o * KM + v_o * S = V_{max} * S$$

dividimos ambos miembros por S

$$\frac{v_o}{S} * KM + v_o = V_{max}$$

se obtiene una expresión donde v es una función lineal de $v/[S]$

$$v_o = V_{max} - KM * \frac{v_o}{S}$$

Si deseáramos obtener los parámetros con esta ecuación deberíamos tener valores de v_0 como variable dependiente y de v_0/S para la independiente. Podemos agregar a nuestro data.frame la variable v_0/S utilizando nuevamente la función `cbind()`. Llamaremos a la variable v_0/S : `vos`

```
> tablaR713<-cbind(tablaR713,vos=tablaR713$v/tablaR713$S)
```

```
> tablaR713
```

	S	v	invv	invS	vos
1	0	.0	Inf	Inf	NaN
2	25	10.0	0.10000000	0.04000000	0.40000000
3	50	13.0	0.07692308	0.02000000	0.26000000
4	100	15.0	0.06666667	0.01000000	0.15000000
5	150	16.0	0.06250000	0.00666667	0.10666667
6	200	16.5	0.06060606	0.00500000	0.08250000

nuevamente observamos que en la fila 1 tenemos valores que no podemos incluir en el análisis. Realizamos entonces el modelo lineal con los valores de la tabla utilizando las columnas `v` como variable dependiente y `vos` como variable independiente. Es interesante resaltar nuevamente que a diferencia de la situación cuando utilizamos la función `nlm()` para optimizar los parámetros, en que requeríamos valores iniciales de KM y V_{max} . Al aplicar `lm()` no los necesitamos.

```
> lmtablaR713<-lm(v~vos,data=tablaR713[c(2:6),])
```

pedimos un `summary()` del análisis

```
> summary(lmtablaR713)
```

Call:

```
lm(formula = v ~ vos, data = tablaR713[c(2:6), ])
```

Residuals:

	2	3	4	5	6
	-0.04419	0.11911	-0.10973	0.01224	0.02257

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	18.1491	0.0867	209.33	2.40e-07 ***
vos	-20.2622	0.3743	-54.13	1.39e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.09805 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.999, Adjusted R-squared: 0.9986

F-statistic: 2930 on 1 and 3 DF, p-value: 1.388e-05

Recordamos que en esta rectificación la ordenada al origen = V_{max} y la pendiente = $-KM$. De la tabla anterior entonces obtenemos que

$V_{max} = 18.1491$

$-KM = -20.2622$

es decir

$KM = 20.2622$

Concentremos en la Tabla 1, los valores de KM y V_{max} obtenidos con cada metodología

Tabla 1. Valores de los parámetros obtenidos por diferentes metodologías de ajuste

	con función nls()	rectificación Lineweaver Burk	rectificación Eadie-Hofstee
KM	20.21453	20.33617	20.2622
Vmax	18.14096	18.16431	18.1491

Como observamos en la tabla, los valores hallados por las tres metodologías son muy cercanos. Estará en la disponibilidad de datos, elegir una u otra metodología. Los valores de p-value y R-squared nos indicarán cual produce el mejor ajuste.

Es importante resaltar también que hemos utilizado "un solo modelos matemático" y hemos hallados sus parámetros por tres metodologías matemáticas distintas.

Cálculo de los parámetros enzimáticos

La determinación de los parámetros enzimáticos, KM y Vmax, entre otras bondades ofrecen la posibilidad de distinguir qué tipo de inhibición ejerce una sustancia sobre una enzima. La comparación de los valores de KM y Vmax, en ausencia y en presencia del supuesto inhibidor nos estará indicando el mecanismo utilizado por la sustancia para interferir en la acción de la enzima. Las formas más comunes de inhibición se dan en la Tabla 2, en la que mostramos como se modifica el valor de KM y Vmax respecto del valor de los mismo parámetros en ausencia de la sustancia.

Tabla 2. Tipos de inhibición enzimática		
tipo de inhibición	KM	Vmax
competitivo	aumenta	no cambia
no competitiva	no cambia	disminuye
anticompetitiva	disminuye	disminuye

Esta tabla informa sobre la modificación del valor de cada uno de los parámetros, respecto de la reacción realizada en ausencia del inhibidor.

La determinación de los parámetros, se realiza a través del ajuste de los valores de velocidad obtenidos con diferentes concentraciones de sustrato, con la función de Michaelis Menten o las rectificaciones obtenidas a partir de ellas, como se desarrolló anteriormente.

Aplicación

Veremos a continuación la aplicación de este modelo a un estudio concreto de interacción entre una enzima: la fosfatasa alcalina y un supuesto inhibidor: el calcio. La fosfatasa alcalina es una enzima de la mucosa intestinal que hidroliza los enlaces éster fosfórico de diferentes sustratos. Esta enzima hidroliza el monofluorofosfato de sodio [6] y se ha demostrado que en presencia de calcio la actividad de la fosfatasa alcalina disminuye. En la Tabla 3 se muestran los valores de velocidad enzimática de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina intestinal, para diferentes concentraciones del sustrato p-nitrofenilfosfato (pNFF) en presencia y ausencia de calcio (supuesto inhibidor).

6 Fernley, H.N., Walker, P.G. Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. Biochem. J. 104, 1011. 1967.

Tabla 3: medidas de actividad de la enzima fosfatasa alcalina. mmol/min.L. media±SD (n)		
[pNFF] mM	[Ca ⁺⁺]= 0 mM	[Ca ⁺⁺]=50mM
0.500	0.29±0.05 (3)	0.13±0.08 (3)
0.600	0.26±0.01 (2)	0.21±0.04 (2)
0.900	0.49±0.08 (2)	0.22±0.10 (2)
1.000	0.55±0.13 (3)	0.30±0.08 (3)
2.000	0.63±0.001 (2)	0.58±0.12 (2)
4.000	1.10±0.11 (2)	1.03±0.16 (2)
5.000	0.81±0.07 (3)	0.84±0.39 (3)
10.000	1.23±0.22 (3)	0.85±0.61 (3)
15.000	1.40±0.03 (3)	0.57±0.32 (3)
20.000	1.81±0.10 (2)	0.81±0.45 (2)
25.000	1.97±.45 (3)	1.28±0.41 (3)

La Figura 6 muestra la gráfica de los valores de la Tabla 3. En la Tabla 4 se muestran los valores de KM y Vmax, obtenidos para esta enzima en presencia y ausencia de calcio, utilizando el modelo de Michaelis Menten.

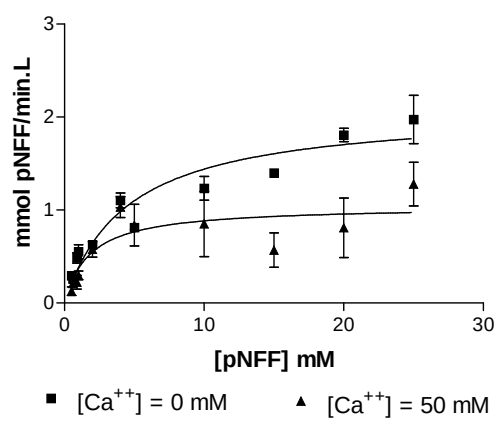


Figura 6

Tabla 4: Efecto del calcio sobre los parámetros de la fosfatasa alcalina		
parámetro	[Ca ⁺⁺] = 0 mM	[Ca ⁺⁺] = 50 mM
Vmax	0.009805	0.004915
KM	5.038	2.010

Los resultados hallados indican que el calcio produciría una inhibición de tipo anticompetitiva. Puede comprobar a modo de ejercicio los valores de los parámetros hallados, utilizando los conceptos vertidos en esta clase.

Clase 2

Medida de constantes totales y parciales

Cuando una sustancia A es eliminada de un compartimiento, la velocidad de desaparición de ésta se puede expresar por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A^{\rho}$$

donde k_d es la constante de depuración, A la concentración o cantidad de la sustancia en estudio y ρ es el orden del proceso. La depuración puede ser un solo proceso o bien una sumatoria de procesos. En la Figura 1 vemos un proceso de eliminación que cuenta con 4 componentes caracterizados por las constantes k_1 , k_2 , k_3 y k_4

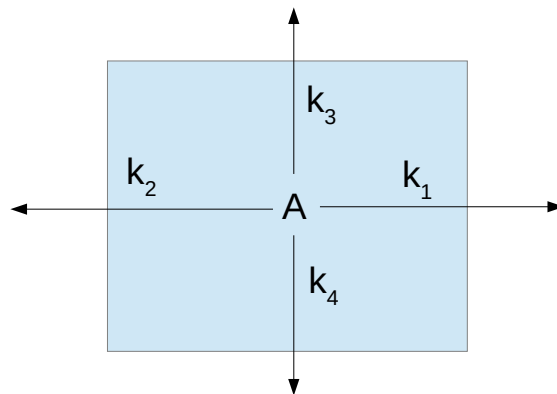


Figura 1. Eliminación de A por múltiples vías

En este caso la variación de la concentración de la sustancia A se puede expresar como una sumatoria de cada uno de los procesos, donde cada término será el producto de la concentración de la sustancia A elevada a su orden de reacción multiplicado por una constante de velocidad. En este caso lo resolvemos para cuatro procesos

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 * A^{\rho_1} - k_2 * A^{\rho_2} - k_3 * A^{\rho_3} - k_4 * A^{\rho_4}$$

Si los procesos involucrados dependen de la concentración de A, afectados por el mismo orden, la expresión se puede escribir como se muestra a continuación

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 * A^{\rho} - k_2 * A^{\rho} - k_3 * A^{\rho} - k_4 * A^{\rho}$$

como todos los términos son una constante multiplicado por la concentración de A elevado al mismo índice, podemos sacar $-A^{\rho}$ como factor común

$$\frac{dA}{dt} = -A^{\rho} * (k_1 + k_2 + k_3 + k_4)$$

donde llamamos k_d a la suma de las constantes

$$k_d = k_1 + k_2 + k_3 + k_4$$

la expresión quedaría

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A^{\rho}$$

por lo tanto la constante global de depuración k_d es una sumatoria de las constantes de depuración parcial de los diferentes órganos o procesos metabólicos involucrados.

En algunas circunstancias puede ser necesario determinar en qué porcentaje participa un órgano en particular en el proceso de depuración.

Para conocer cada una de las constantes parciales se pueden anular los otros procesos dejando solo uno en funcionamiento, en este caso la constante que mediremos será la que representa al único proceso en funciones. Si en estas circunstancias medimos la concentración de **A** en función del tiempo y luego analizamos diferentes regresiones lineales podremos conocer la constante del proceso y el orden del mismo. Cabe explicar en este momento que anular procesos químicos, biológicos o fisiológicos, como pueden ser transporte a través de una membrana, acciones enzimáticas, procesos de filtración, etc, en sí constituyen un desafío extra a la matemática y la informática. Para lograr esto se trabaja con inhibidores específicos de procesos, cambios en propiedades físicas, procedimientos quirúrgicos, etc, que no son competencia de este curso. Sin embargo al final de la clase mostraremos un ejemplo concreto y las dificultades enfrentadas.

Supongamos que en primer lugar contamos con los recursos experimentales que nos permiten anular los procesos cuyas constantes son **k1**, **k3** y **k4**, Figura 2. La variación en **A** solo se deberá al proceso cuya constante es **k2**. Si la concentración de **A** se ajusta con una función lineal del tiempo, el orden del proceso será cero y la constante de velocidad será la pendiente de la recta. En cambio, si el logaritmo de la concentración es una función lineal del tiempo, el proceso será de orden 1 y la constante de velocidad es la pendiente de la recta. En el caso que ninguno de los dos ajustes anteriores sean significativos y sea **1/A** quien se ajusta con una función lineal del tiempo, el orden del proceso será 2 y la constante, como en los otros casos es la pendiente de la recta. Por supuesto que si ninguno de los ajustes se pudiera realizar estaría indicando otro orden para el proceso en estudio, pero, como sabemos a nivel biológico prácticamente el 100% de estos casos se corresponden con órdenes 0 o 1.

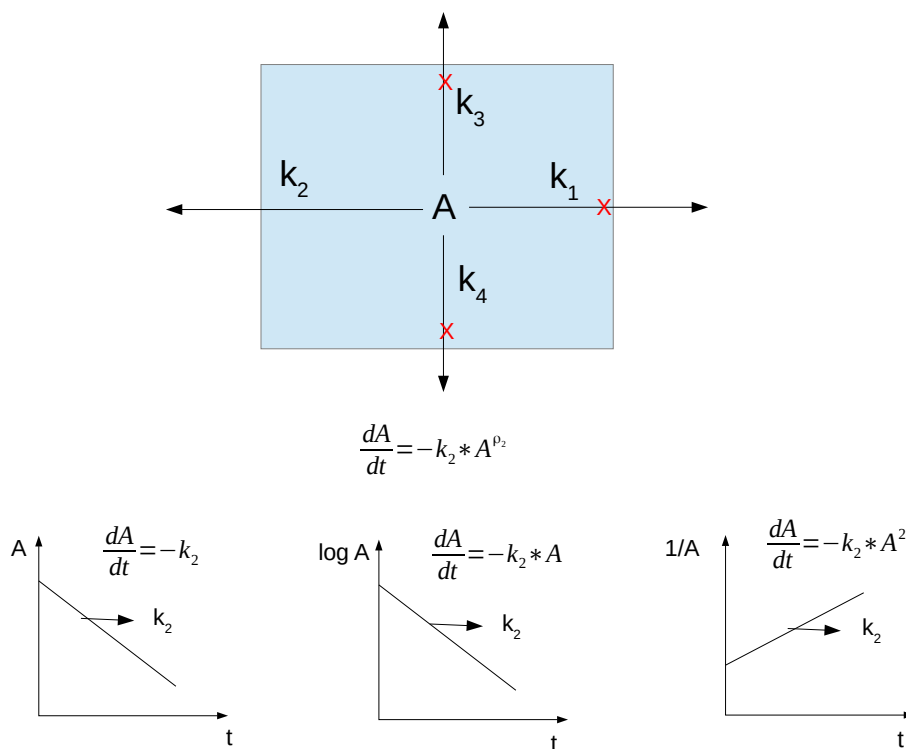


Figura 2. Cálculo de orden y constante del proceso 2.

Supongamos que a través del mecanismo anterior logramos conocer el orden y la constante del proceso 2, hallando por ejemplo que el orden del proceso 2 es igual a 1 y que $k_2 = 0.01 \text{ min}^{-1}$.

Podemos ahora anular los procesos 1, 2 y 4 y dejar que **A** dependa solamente del proceso 3. Repetiríamos nuevamente un experimento en que medimos **A** a lo largo del tiempo solo con el proceso 3 y evaluaríamos las regresiones lineales mencionadas: **A**, **log A** y **1/A** vs el tiempo, Figura 3.

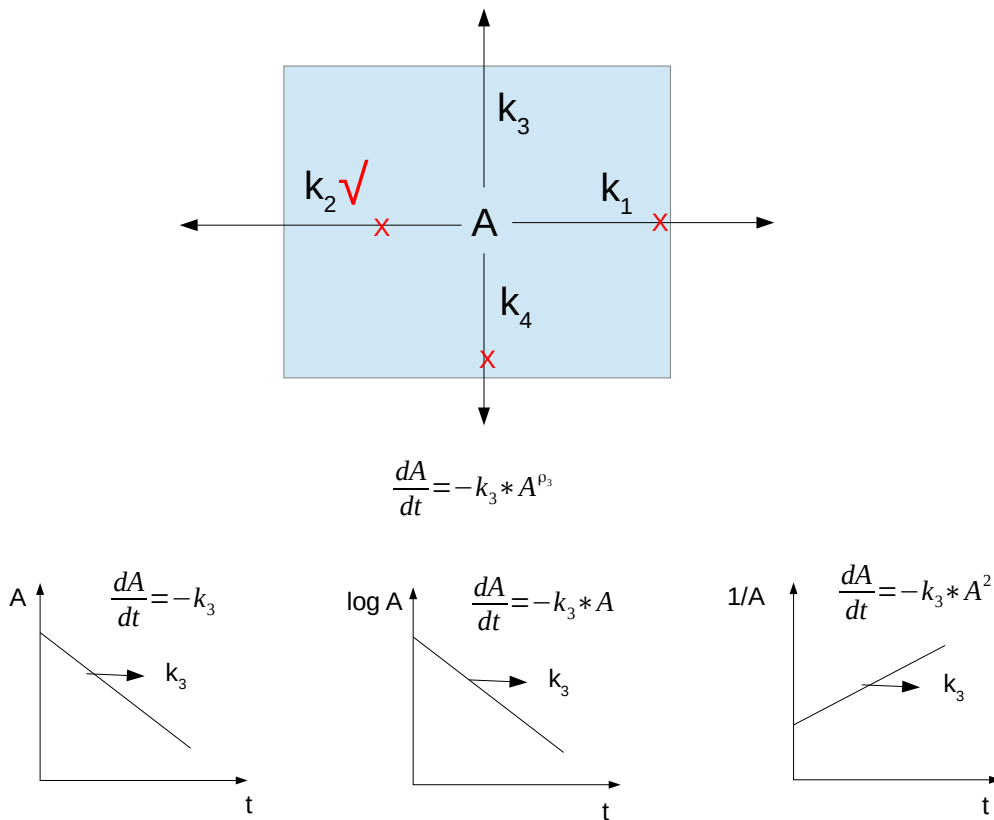


Figura 3. Estudios de los parámetros del proceso 3.

Supongamos que nuevamente hallamos que la mejor correlación la hallamos para $\log A$ vs tiempo, que nos indica orden del proceso 3 es 1 y hallamos un valor $k_3 = 0.02 \text{ min}^{-1}$.

Ya conociendo k_2 y k_3 podemos bloquear los procesos correspondientes a k_2 , k_3 y 4 y así averiguar k_1 , midiendo la variación de A en función del tiempo, analizando las correlaciones ya explicadas, Figura 4.

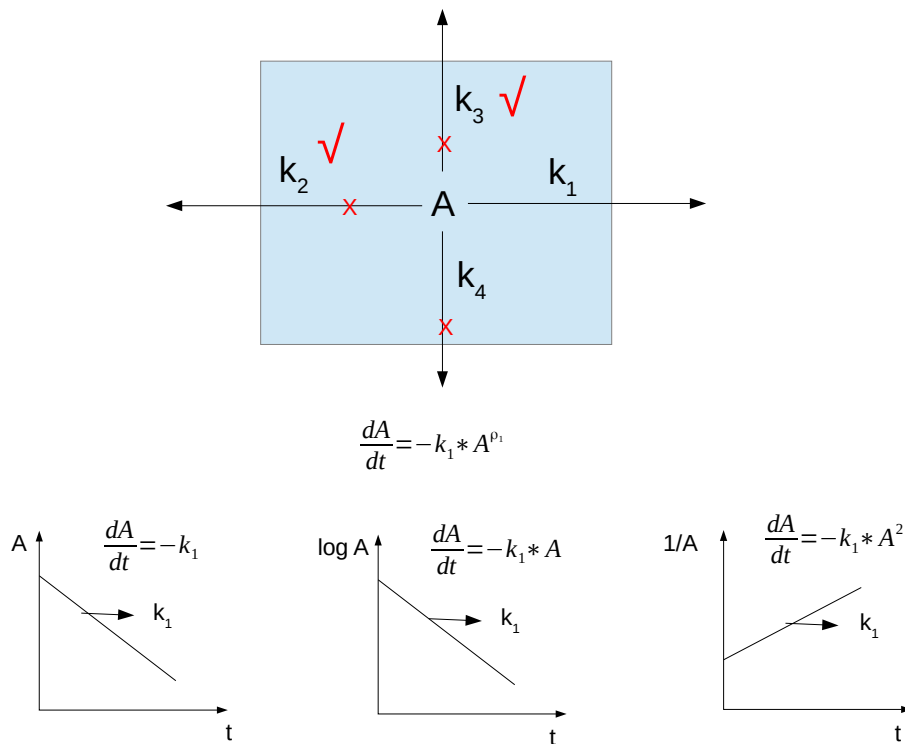


Figura 4. Búsqueda de orden y constante del proceso k_1 .

Al igual que los casos anteriores, supongamos que el orden del proceso 1 fue igual a 1 y $k_1 = 0.07 \text{ min}^{-1}$.

Como ya conocemos k_1 , k_2 y k_3 y si suponemos que el orden de k_4 es también 1, coincidiendo con los órdenes de los procesos 1, 2 y 3, entonces podríamos calcular k_4 sin necesidad de realizar un experimento en que anulemos algún proceso.

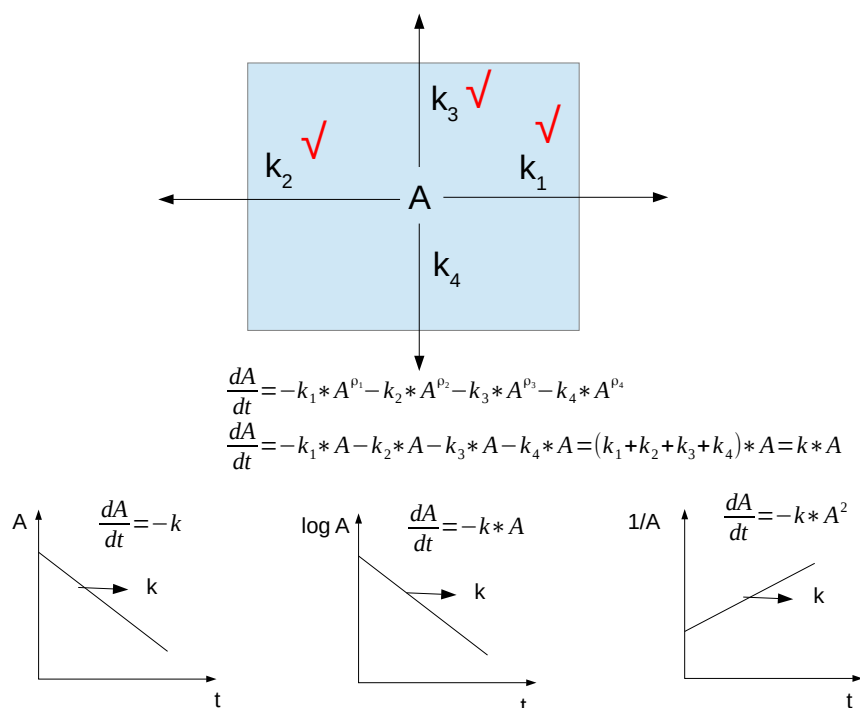


Figura 5. búsqueda de orden y constante de proceso global

Necesitaremos la constante global de depuración, que obtendremos sin anular ningún proceso, Figura 5. Con la concentración de A en función del tiempo, analizaremos la regresión de A vs tiempo y sus transformaciones $\log A$ y $1/A$, para hallar el valor de la constante y orden. Supongamos que nuevamente hallamos orden 1 y su constante: 0.12 min^{-1} . Entonces sabiendo que

$$k = k_1 + k_2 + k_3 + k_4$$

despejamos k_4

$$k_4 = k - k_1 - k_2 - k_3$$

y hallamos su valor reemplazando en la expresión los valores ya conocidos

$$k_4 = 0.12 - 0.07 - 0.01 - 0.02 = 0.02 \text{ min}^{-1}$$

En base a estos datos podemos estimar qué porcentaje de la desaparición de la sustancia se debe a cada proceso.

proceso 1: $k_1 = 0.07 \text{ min}^{-1}$. Hallamos qué porcentaje es k_1 respecto de k y este valor es la participación del proceso 1 en la depuración total. El porcentaje se obtendrá con el cociente de cada constante y la constante global. En este caso: $0.07 * 100 / 0.12 = 58.3\%$ de la desaparición total podemos asignarlas al proceso 1. De la misma manera podemos calcular el % para los otros procesos:

proceso 2: 8.3%

proceso 3: 16.7%

proceso 4: 16.7%

Estos conocimientos toman aun más interés cuando tenemos alguna patología o sustancia que puede afectar la desaparición de la sustancia A. Supongamos que utilizamos un fármaco que al analizar la desaparición de A en función del tiempo hallamos que k pasa a tomar el valor 0.11 min^{-1} , siendo este valor significativamente diferente del valor anterior: 0.12 min^{-1}

Entonces deducimos fácilmente que de no haberse alterado el sistema, es decir permanecer funcionando los procesos 1, 2, 3, 4, la droga en cuestión afecta a uno o algunos de los procesos involucrados. Repetimos el experimento y si hallamos los valores

$k_1 = 0.07$

$k_2 = 0.01$

$k_3 = 0.02$

comprobamos que 1, 2 y 3 no han sido afectados. Podríamos anticipar que la droga afecta el proceso 4, siendo ahora su constante $k_4 = 0.01$, habiendo decrecido su participación en el proceso de eliminación de A a la mitad del valor inicial. Por supuesto, que lo adecuado sería tratar de medir k_4 anulando los procesos 1, 2 y 3.

Resolución con R

Hagamos un ejemplo en que una sustancia se depura de un compartimiento y conocemos que hay tres procesos participantes que llamamos 1, 2 y 3. Los datos se hallan en la hoja tablaR721 de la planilla tablaR72.ods/xls. En estos experimentos medimos la concentración de la sustancia en presencia de los tres procesos (columna k), solo en presencia de 1 (columna k_1) y en presencia del proceso 2 únicamente (columna k_2).

Introduzca los valores de la tablaR721

```
> tablaR721<-read.table("clipboard",header=TRUE,dec=".",sep="\t",encoding="latin1")
```

realizamos la auditoria para comprobar el formato de datos

```
> summary(tablaR721)
```

t	k1	k2	k
Min. : 0.0	Min. : 53.00	Min. : 76.00	Min. : 10.54
1st Qu.: 22.5	1st Qu.: 62.25	1st Qu.: 81.75	1st Qu.: 18.61
Median : 45.0	Median : 72.50	Median : 88.00	Median : 32.72
Mean : 45.0	Mean : 74.30	Mean : 87.70	Mean : 41.50
3rd Qu.: 67.5	3rd Qu.: 85.50	3rd Qu.: 93.25	3rd Qu.: 57.30
Max. : 90.0	Max. : 100.00	Max. : 100.00	Max. : 100.00

vemos que se han introducido correctamente las columnas como variables cuantitativas.

Análisis de orden y cálculo de constante global

En primer lugar realizaremos las tres regresiones lineales para el proceso total, utilizando las columnas k y t

regresión A vs t

```
> lm(tablaR721$korden0~lm(k~t,data=tablaR721)
```

regresión $\log A$ vs t

```
> lm(tablaR721$korden1~lm(log(k)~t,data=tablaR721)
```

regresión $1/A$ vs t

```
> lm(tablaR721$korden2~lm(1/k~t,data=tablaR721)
```

ahora vemos los detalles de cada análisis, resaltando en amarillo el valor de R-squared, ya que el ajuste con mayor valor nos permitirá elegir el orden del proceso y seleccionar la constante que también se halla resaltada en amarillo en la columna Estimate, fila t de la tabla Coefficients

para orden cero

```
> summary(lm(tablaR721$korden0)
```

Call:

```
lm(formula = k ~ t, data = tablaR721)
```


Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-9.421	-7.364	-2.482	4.614	16.098

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	83.9023	5.4883	15.288	3.33e-07 ***
t	-0.9423	0.1028	-9.166	1.62e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 9.338 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9131, Adjusted R-squared: 0.9022

F-statistic: 84.02 on 1 and 8 DF, p-value: 1.62e-05

para orden 1

```
> summary(lm(tablaR721korden1))
```

Call:

```
lm(formula = log(k) ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.563e-12	-8.311e-13	1.559e-13	9.280e-13	2.774e-12

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.605e+00	9.649e-13	4.773e+12	<2e-16 ***
t	-2.500e-02	1.807e-14	-1.383e+12	<2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 1.642e-12 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 1, Adjusted R-squared: 1

F-statistic: 1.913e+24 on 1 and 8 DF, p-value: < 2.2e-16

para orden 2

```
> summary(lm(tablaR721korden2))
```

Call:

```
lm(formula = 1/k ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.008938	-0.006986	-0.002355	0.004378	0.015273

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-8.614e-04	5.207e-03	-0.165	0.873
t	8.941e-04	9.754e-05	9.166	1.62e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.008859 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9131, Adjusted R-squared: 0.9022

F-statistic: 84.02 on 1 and 8 DF, p-value: 1.62e-05

Resumimos los datos de las pendientes de las rectas y los valores de R-squared, para los tres ajustes realizados

orden 0 k= -0.9423 R-squared: 0.9131

orden 1 k= -2.500e-02 R-squared: 1

orden 2 k= 8.941e-04 R-squared: 0.9131

De la comparación de los datos anteriores, aceptamos que la desaparición de la sustancia en presencia de todos los procesos es de orden 1 y su $k=0.025$, ya que para ese caso el R-squared tomó el valor más alto. Cabe destacar que el signo de la constante que nos muestra el análisis, es negativo porque hablamos de desaparición o eliminación.

Análisis del orden y cálculo de la constante k_1

Debemos repetir ahora el mismo procedimiento para la columna k_1 de la tabla, que nos muestra los valores de concentración de la sustancia en función del tiempo cuando los procesos k_2 y k_3 se hallan inhibidos. En primer lugar realizamos las regresiones lineales

```
> lmtablaR721k1orden0<-lm(k1~t,data=tablaR721)
> lmtablaR721k1orden1<-lm(log(k1)~t,data=tablaR721)
> lmtablaR721k1orden2<-lm(1/k1~t,data=tablaR721)
```

luego pedimos los análisis, resaltando en amarillo los valores de R-squared y pendiente.

```
> summary(lmtablaR721k1orden0)
```

Call:

```
lm(formula = k1 ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.8909	-0.9364	-0.3000	0.7682	2.3818

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	97.61818	0.90275	108.13	5.98e-14 ***
t	-0.51818	0.01691	-30.64	1.40e-09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 1.536 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9916, Adjusted R-squared: 0.9905

F-statistic: 939 on 1 and 8 DF, p-value: 1.397e-09

```
> summary(lmtablaR721k1orden1)
```

Call:

```
lm(formula = log(k1) ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.0054595	-0.0012276	-0.0000672	0.0012747	0.0073046

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.604e+00	2.223e-03	2070.8	< 2e-16 ***
t	-7.030e-03	4.165e-05	-168.8	1.7e-15 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.003783 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9997, Adjusted R-squared: 0.9997

F-statistic: 2.849e+04 on 1 and 8 DF, p-value: 1.698e-15

```
> summary(lmtablaR721k1orden2)
```

Call:

```
lm(formula = 1/k1 ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.309e-04	-2.029e-04	-7.299e-05	1.435e-04	4.543e-04

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	9.620e-03	1.656e-04	58.08	8.57e-12 ***
t	9.771e-05	3.102e-06	31.49	1.12e-09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0002818 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.992, Adjusted R-squared: 0.991

F-statistic: 991.9 on 1 and 8 DF, p-value: 1.124e-09

Resumimos los valores de pendiente y R-squared para la regresiones realizadas

orden 0 k1= -0.51818 R-squared: 0.9916

orden 1 k1= -7.030e-03 R-squared: 0.9997

orden 2 k1= 9.771e-05 R-squared: 0.992

En este caso también podemos decir que el proceso en análisis tiene orden 1 y el valor de la pendiente es: **k1**=0.00703

Análisis de orden y cálculo de la constante k2

repetimos el análisis para la eliminación de la sustancia con el proceso 2 (columna **k2**)

```
> lmtablaR721k2orden0<-lm(k2~t,data=tablaR721)
```

```
> lmtablaR721k2orden1<-lm(log(k2)~t,data=tablaR721)
```

```
> lmtablaR721k2orden2<-lm(1/k2~t,data=tablaR721)
```

y pedimos los summary() de cada análisis realizado

```
> summary(lmtablaR721k2orden0)
```

Call:

```
lm(formula = k2 ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.67273	-0.26061	0.00303	0.25909	0.62424

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	99.618182	0.246407	404.28	< 2e-16 ***
t	-0.264848	0.004616	-57.38	9.45e-12 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.4192 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9976, Adjusted R-squared: 0.9973

F-statistic: 3293 on 1 and 8 DF, p-value: 9.447e-12

```
> summary(lmtablaR721k2orden1)
```

Call:

```
lm(formula = log(k2) ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.007295	-0.002871	-0.001474	0.002541	0.010940

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.607e+00	3.381e-03	1362.36	< 2e-16 ***
t	-3.032e-03	6.334e-05	-47.87	4.01e-11 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.005753 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9965, Adjusted R-squared: 0.9961

F-statistic: 2292 on 1 and 8 DF, p-value: 4.01e-11

```
> summary(lmtablaR721k2orden2)
```

Call:

```
lm(formula = 1/k2 ~ t, data = tablaR721)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.697e-04	-6.336e-05	2.157e-05	6.990e-05	1.104e-04

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	9.920e-03	5.799e-05	171.08	1.52e-15 ***
t	3.487e-05	1.086e-06	32.11	9.64e-10 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 9.866e-05 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9923, Adjusted R-squared: 0.9913

F-statistic: 1031 on 1 and 8 DF, p-value: 9.644e-10

Resumen de los valores obtenidos de pendiente y R-squared para los análisis de k2

orden 0 k2= -0.264848 R-squared: 0.9976

orden 1 k2= -3.032e-03 R-squared: 0.9965

orden 2 k2= 3.487e-05 R-squared: 0.9923

Dados los buenos ajustes de los tres casos, nos daría prácticamente lo mismo elegir cualquier orden, aunque es ligeramente mejor el correspondiente a orden 0. A fines prácticos nos es conveniente el orden 1 y su $k_2 = 0.003032$. Recuerde que un orden 0 para un proceso es indicador de que el proceso está saturado a las concentraciones investigadas. En cambio el orden 1 indica que el proceso depende de la concentración. Puede ocurrir que con ciertas concentraciones el proceso sea de orden cero y con otras de orden 1, dependiendo esté o no saturado el proceso en estudio. Cuando las diferencias en los ajustes es tan pequeña, es conveniente inclinarse por el orden que es igual a los otros procesos. Si fuese muy diferente, ya no podríamos tomarnos esa libertad.

Resumiendo los valores hallados de las constantes de los procesos analizados

$k = 0.025$

$k_1 = 0.00703$

$k_2 = 0.003032$

y conociendo que

$k = k_1 + k_2 + k_3$

calculamos $k_3 = 0.025 - 0.00703 - 0.003032 = 0.014668$

Que respecto del total, el proceso 3 representa el 58,7 %. Valor que surge del siguiente cálculo

$\% = 0.014668 \cdot 100 / 0.025$

Aplicación a datos reales

En la práctica suelen ser más complicado implementar los recursos experimentales para aislar los diferentes procesos, que la matemática a aplicar en el caso en cuestión. En general la inhibición de diferentes procesos involucrados en la depuración de una sustancia puede realizarse a través del uso de inhibidores enzimáticos o bien recursos quirúrgicos, cuando el estudio es en animales. A continuación discutiremos datos reales obtenidos en nuestro laboratorio, donde se aplicó esta metodología. En este caso se analizará la metabolización del complejo α_2 macroglobulina-monofluorofosfato (A2MMFP).

Breve introducción del problema biológico: el monofluorofosfato de sodio (MFP), es una droga que en los años 90 del siglo pasado se utilizaba en el tratamiento de la osteoporosis [ⁱ, ⁱⁱ], actualmente solo se utiliza en pasta dentales con el fin de prevenir caries. El MFP se absorbe a nivel gástrico [ⁱⁱⁱ] y se liga a la α_2 -macroglobulina (A2M) plasmática formando el complejo plasmático A2MMFP [^{iv}]. Este complejo es captado *in vitro* por cortes de hígado y hueso principalmente por el receptor sensible al ácido [5']-poli-inosínico [^v].

En el trabajo que se detalla a continuación se muestra un método para determinar la participación del hígado sobre la depuración total del complejo mencionado, como así también los problemas experimentales y sus soluciones.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en ratas. En estos animales se inyectó el complejo purificado. El complejo se obtiene mezclando A2M con MFP *in vitro*. Luego de la incubación se purifica el complejo obtenido, utilizando una columna de tamiz molecular Sephadex G100. Con esta metodología logramos separar el complejo del MFP sin reaccionar, separación que hacemos por peso molecular. Esta técnica produce una solución diluida lo suficientemente pura del complejo para ser inyectada al animal de experimentación.

Determinación de la constante de depuración total (k_d)

El complejo A2MMFP fue purificado por la técnica anteriormente detallada y se inyectó a ratas anestesiadas por medio de un catéter colocado en la arteria femoral. Por el mismo catéter se obtuvieron muestras de sangre a los tiempos detallados en la Tabla 5. En las distintas muestras plasmáticas se determinó la concentración del complejo, obteniéndose los datos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: concentraciones de complejo A2MMFP en plasma de ratas luego de una inyección i.v del mismo.		
tiempo minutos	A2MMFP μ M	n
0	93 $\pm$ 8	4
15	14 $\pm$ 10	4
30	4 $\pm$ 3	4
45	0.5 $\pm$ 0.2	4
60	0.2 $\pm$ 0.1	4
75	0.1 $\pm$ 0.1	4

Sin los desvíos estándar, puede hallar los datos en tablaR722 de la planilla de cálculo tablaR72.ods/xls. Introduzca estos datos en su espacio de trabajo

```
> tablaR722<-read.table('clipboard',header=TRUE, dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

controlamos el correcto ingreso de los datos

```
> tablaR722
```

```
  t A2MMFP
```

```
1 0 93.0
```

```
2 15 14.0
```

```
3 30 4.0
```

```
4 45 0.5
```

```
5 60 0.2
```

```
6 75 0.1
```

Realizamos las regresiones lineales: A2MMFP vs. tiempo, logaritmo de A2MMFP vs. tiempo y 1/A2MMFP vs tiempo, asignando la salida de cada regresión a diferentes objetos.

```
> lmtablaR722A2MMFP<-lm(A2MMFP~t,data=tablaR722)
```

```
> lmtablaR722logA2MMFP<-lm(log(A2MMFP)~t,data=tablaR722)
```

```
> lmtablaR722invA2MMFP<-lm(1/A2MMFP~t,data=tablaR722)
```

para evitar excesiva cantidad de información, a continuación solo se muestran los valores de k , R-squared y p-value de cada summary() de los objetos

```
> summary(lmtablaR722A2MMFP)
```

k= -0.9703

Multiple R-squared: 0.5469, p-value: 0.09293

```
> summary(lm(tablaR722logA2MMFP))
```

k= -0.093335

Multiple R-squared: 0.9745, p-value: 0.0002463

```
> summary(lm(tablaR722invA2MMFP))
```

k= 0.12663

Multiple R-squared: 0.7992, p-value: 0.01626

Se observa que el mejor ajuste se logra con la rectificación logarítmica, lo que indica que el decaimiento de la concentración del complejo es proporcional a la concentración del mismo, es decir de orden 1. Por esta razón podemos plantear la siguiente ecuación diferencial para la variación de la concentración del complejo A2MMFP en una rata sin ningún tipo de intervención, más que la inyección del complejo A2MMFP.

$$\frac{d(A2MMFP)}{dt} = -k_d * A2MMFP$$

Por lo tanto los datos se ajustan con una función exponencial decreciente. Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene la ley que describe el comportamiento de A2MMFP en función del tiempo

$$A2MMFP = A2MMFP_0 * e^{-k_d * t}$$

De los análisis anteriores se puede obtener el valor de la constante de depuración, que es $k_d = 0.093335 \text{ min}^{-1}$ y su tiempo de vida media: $t_{1/2} = 7.4$ minutos. En este proceso participan diferentes tejidos, entre ellos el óseo y el hepático.

Medida de la constante de depuración hepática

Para determinar en qué porcentaje influye el hígado sobre el proceso de depuración se practicó una cirugía que permite que el animal durante una parte del estudio tenga la circulación sanguínea completa y durante otra parte, se evite el paso de sangre por el hígado. El objetivo que se persigue con estos experimentos es determinar el porcentaje del metabolismo que le corresponde al hígado con respecto al animal intacto. El porcentaje en que el hígado participa saldrá por diferencia entre la constante de depuración total (k_d) y la que se obtenga cuando el animal está con la circulación hepática anulada. Se inyecta por vía endovenosa una cantidad fija de complejo A2MMFP. Se obtienen por el mismo catéter muestras de sangre en las que se determina la concentración del complejo [vi]. Pasado un tiempo se ligan la arteria hepática y la vena porta anulando la circulación del hígado. Durante el resto del experimento el animal permanece vivo pero sin participar la circulación hepática y por lo tanto tampoco participa el hígado en el proceso de depuración. Durante este período la variación de la concentración plasmática se debe a la participación de todos los tejidos, menos el hígado.

El complejo A2MMFP se inyectó por un catéter insertado en la arteria femoral. Por el mismo catéter se extrajo sangre para determinar la concentración del complejo A2MMFP a los tiempos indicados en la Tabla 6.

Tabla 6. concentraciones de complejo A2MMFP en plasma de ratas luego de una inyección i.v del mismo	
tiempo (minutos)	A2MMFP, μM
0	1.3
5	6
10	4.5
15	1
20	1.2
25	0.9
30	1.5

Durante todo el experimento se mantuvo al animal bajo anestesia general. A los 15 minutos se anuló la circulación sanguínea hepática por clampeo de la arteria hepática y vena porta, manteniendo al animal en este estado por los 15 minutos restantes. El experimento duró 30 minutos. Del análisis de los resultados surge que a partir de los 15 minutos no existe decaimiento de la concentración del complejo. Sin embargo observando el valor basal al tiempo $t = 0$, la concentración del complejo A2MMFP = $1.3 \mu\text{M}$, se puede deducir que a los 15 minutos, cuando se ligan los vasos, aislando la circulación del hígado, ya todo el complejo ha sido metabolizado y la concentración del complejo A2MMFP, ha alcanzado su valor basal.

Sin considerar el valor basal, los datos indicarían que el hígado es el principal órgano de depuración, ya que luego de anular su circulación cesa el decaimiento plasmático de la concentración del complejo. Sin embargo esta conclusión es errónea. De este error surge la importancia de conocer un valor basal del metabolito cuya variación plasmática se estudia en el experimento. A continuación se explica como se solucionó experimentalmente el problema surgido en el experimento recientemente descrito. Una de las alternativas sería lograr una purificación del complejo que nos permita hallar concentraciones más elevadas, pero no se pudo lograr, por lo que se aplicó otro procedimiento.

Solución al problema: Conociendo que el máximo en la concentración plasmática del complejo A2MMFP se produce a los 60 minutos, se administraron $80 \mu\text{mol}$ de MFP por sonda gástrica de manera que el complejo se forme *in vivo*, obteniéndose en este caso concentraciones 50 veces mayor que el alcanzado en el experimento anterior. Con este diseño se obtiene un rango de variación de la concentración del complejo mayor que en experimento anterior, disminuyendo el error en la determinación y permitiendo tener más tiempo para la realización del experimento. A partir de los 70 minutos se obtienen muestras de sangre a los tiempos indicados en la Tabla 7.

Tabla 7: concentraciones del complejo A2MMFP en plasma de ratas luego de una dosis oral de MFP	
tiempo (minutos)	A2MMFP, μM
70	437 ± 243
75	373 ± 218
80	221 ± 129
85	221 ± 98
90	164 ± 29

En estas muestras se determina la concentración del complejo A2MMFP. A los 80 minutos se anula la circulación sanguínea del hígado, obteniéndose los datos que se muestran en la Tabla 7.

Puede hallar los datos de la Tabla 7 sin sus desvíos estándar en la hoja tablaR723 de la planilla de cálculo tablaR72.ods/xls. Introduzca dichos valores en el espacio de trabajo

```
> tablaR723<-read.table('clipboard',header=TRUE, dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

comprobamos el contenido de la tabla

```
> tablaR723
```

```
  t  A2MMFP
1 70   437
2 75   373
3 80   221
4 85   221
5 90   164
```

El bloqueo de la circulación sanguínea hepática se realizó en este experimento a los 80 min. Hallamos a continuación las dos constantes de depuración. utilizando modelos lineales. Debemos entonces recordar que el experimento tiene dos intervalos de tiempo:

70-80 min: con circulación completa

80-90 min: circulación sin hígado

seleccionamos solo los valores del intervalo 70-80 min, para ello tomamos $t < 81$ y realizamos las regresiones lineales probando directamente si los procesos son de orden 1

```
> lmtablaR723conhigado<-lm(log(A2MMFP[tabelaR723$t<81])~t[tabelaR723$t<81],data=tabelaR723)
```

vemos el contenido del objeto

```
> summary(lmtablaR723conhigado)
```

Call:

```
lm(formula = log(A2MMFP[tabelaR723$t < 81]) ~ t[tabelaR723$t < 81], data = tabelaR723)
```

Residuals:

```
      1      2      3
-0.06084 0.12169 -0.06084
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	10.91317	1.58310	6.894	0.0917 .
t[tabelaR723\$t < 81]	-0.06818	0.02108	-3.235	0.1909

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.149 on 1 degrees of freedom

Multiple **R-squared: 0.9128**, Adjusted R-squared: 0.8255

F-statistic: 10.46 on 1 and 1 DF, p-value: 0.1909

realizamos ahora el modelo lineal para los valores de 80 min en adelante, para ello utilizamos la selección fijando $t > 79$

```
> lmtablaR723sinhigado<-lm(log(A2MMFP[tabelaR723$t>79])~t[tabelaR723$t>79],data=tabelaR723)
```

```
> summary(lmtablaR723sinhigado)
```

Call:

```
lm(formula = log(A2MMFP[tablaR723$t > 79]) ~ t[tablaR723$t > 79], data = tablaR723)
```

Residuals:

```
    1      2      3  
-0.04972 0.09943 -0.04972
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)  
(Intercept)      7.83425    1.46557   5.346   0.118  
t[tablaR723$t > 79] -0.02983    0.01722  -1.732   0.333
```

Residual standard error: 0.1218 on 1 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.75, Adjusted R-squared: 0.5

F-statistic: 3 on 1 and 1 DF, p-value: 0.3333

Con los datos de 70 a 80 minutos se determina la constante de depuración total $k_d = 0.06818 \text{ min}^{-1}$ y con los datos de 80 minutos a 90 minutos se determina la constante de depuración sin la presencia del hígado, a la que llamamos $k_o = 0.02983 \text{ min}^{-1}$, por tratarse de la depuración ejercida por el tejido óseo.

Por lo tanto la constante de depuración hepática será: $kh = 0.06818 - 0.02986 = 0.03832 \text{ min}^{-1}$

Con estos datos podemos determinar el porcentaje en que el hígado participa en el proceso

% participación hepática = $0.03832 \times 100 / 0.06818 = 56\%$

Medida de la constante de depuración sérica

Conocida la constante hepática se procedió a analizar si parte de la metabolización por otros tejidos y sistemas tiene un componente plasmático, es decir si el complejo A2MMFP se metaboliza en la sangre. Para determinar la constante de hidrólisis en plasma se procedió a extraer sangre de ratas, centrifugarla para separar los glóbulos obteniéndose plasma el que fue incubado a 37°C . Las ratas habían recibido, 60 minutos antes de la extracción, una dosis de $80 \mu\text{mol}$ de MFP por sonda gástrica, de esta manera, al extraer la sangre la concentración sanguínea del complejo es elevada [vii]. Al separar el plasma del organismo el único proceso que actúa sobre la concentración del complejo es la acción de factores plasmáticos. En estas condiciones se determinó la concentración del complejo A2MMFP, Tabla 8.

Tabla 8: concentraciones del complejo A2MMFP en plasma de ratas incubado a 37°C	
tiempo (minutos)	A2MMFP, μM
60	14.1
120	12.8
180	10.4

Introduzca los datos de la tablaR724 para realizar el análisis

```
> tablaR724<-read.table('clipboard',header=TRUE, dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

compruebe el ingreso de los datos

```
> tablaR724
```

```
  t  A2MMFP
```

1 60 14.1
2 120 12.8
3 180 10.4

Realizamos las regresiones lineales entre la concentración de A2MMFP o sus transformaciones logarítmica e inversa y el tiempo, para estimar orden del proceso y su constante

Primero concentración vs. tiempo

```
> lmtablaR724A2MMFP<-lm(A2MMFP~t,data=tablaR724)
```

luego el logaritmo de la concentración vs tiempo

```
> lmtablaR724logA2MMFP<-lm(log(A2MMFP)~t,data=tablaR724)
```

y la inversa de concentración vs tiempo

```
> lmtablaR724invA2MMFP<-lm(1/A2MMFP~t,data=tablaR724)
```

A continuación pediremos summary() de cada objeto con los datos de la regresión y solo mostraremos el valor de k, R-squared y p-value

En primer lugar para el análisis de orden 0

```
> summary(lmtablaR724A2MMFP)
```

k= -0.030833

R-squared: 0.9714, p-value: 0.1082

para orden 1

```
> summary(lmtablaR724logA2MMFP)
```

k= -0.0025364

R-squared: 0.9576, p-value: 0.132

para orden 2

```
> summary(lmtablaR724invA2MMFP)
```

k= 2.103e-04

R-squared: 0.9422, p-value: 0.1546

Al realizar las regresiones A2MMFP vs tiempo, log(A2MMFP) vs tiempo y 1/A2MMFP vs tiempo, nos encontramos con una escasa diferencia entre los ajustes de las funciones a los datos y por la escasa cantidad de valores experimentales ninguna regresión ajusta significativamente a los datos. Nos inclinamos por aceptar que el orden es 1 y su $k = 0.0025364$

Teniendo en cuenta el valor de la constante global: $k_d = 0.093335$

La metabolización plasmática del complejo en plasma solo da cuenta del 2.7% del proceso, que surge del cálculo

$\% = 0.0025364 * 100 / 0.093335 = 2.7\%$

Así, hemos podido tener una estimación del porcentaje en que intervienen en la metabolización el hígado, el organismo sin el hígado y el plasma. Como se ha mostrado en más de una situación debemos darnos algunos permisos para aceptar supuestos o valores, que nos permitan arribar a una conclusión. Como mostramos esto nos permite tener estimaciones numéricas de procesos que seguramente requerirán más experimentación para sostener estos valores.

Clase 3

Gradientes de concentración

En ciertos trabajos de laboratorio es común la utilización de gradientes de concentración. Se entiende que en un proceso existe un gradiente de concentración cuando en un sistema se produce

una variación gradual de la concentración, cuya variación puede extenderse a lo largo de un dado tiempo o distancia. Se pueden crear por ejemplo un gradiente de sacarosa en un tubo de centrífuga, un gradiente de poliacrilamida en un gel para electroforesis, etc. El desarrollo que se muestra a continuación corresponde a una solución que fluye a través de una columna cromatográfica y en la cual se crea un gradiente de concentración de una de las sustancias. En esta solución hay una o más sustancias cuyas concentraciones van cambiando en el transcurso del tiempo. Existe la necesidad de crear un gradiente de concentración en los procesos de purificación de proteínas, por ejemplo cuando se utilizan columnas de intercambio iónico. En estos casos se trabaja con una columna (tubo de vidrio) que contiene una sustancia de relleno (por ej. dietilaminoetil celulosa o DEAE celulosa) que tiene cargas fijas, que en el caso de la DEAE celulosa son cargas positivas. Al pasar proteínas a través de ella, las que tengan cargas negativas serán retenidas en la columna por interacciones electrostáticas con las cargas fijas en la resina de relleno. Existirán proteínas que no serán retenidas y serán eluidas de la columna antes de iniciar el gradiente. En la Figura 1 se muestra un cromatograma donde se grafica en función del volumen de elución la concentración de la proteína en el fluido que sale de la columna. Cada pico corresponde a una o un grupo de proteínas con características comunes, según el tipo de cromatografía.

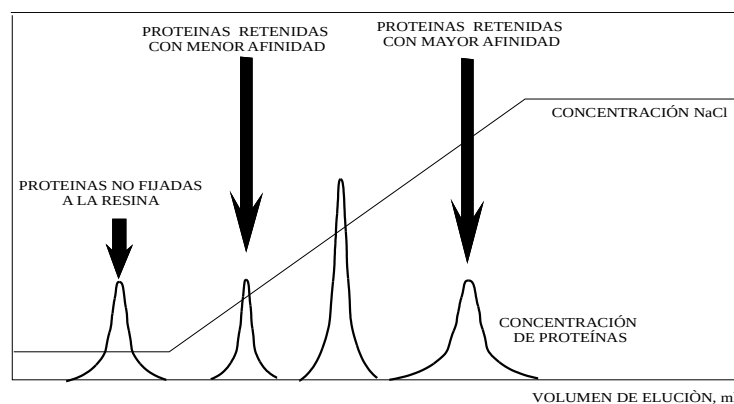


Figura 1. Elución de proteínas en cromatografía con gradiente de cloruro de sodio. La línea quebrada muestra la variación de la concentración de NaCl a lo largo del volumen eluido.

La elución de las proteínas que quedaron retenidas ocurre a una dada concentración de anión cloruro (Cl^-). Una vez que las proteínas están retenidas sobre las cargas del relleno de la columna, se inicia un gradiente de concentración para el anión cloruro (el fluido que pasa por la columna irá aumentando la concentración de Cl^-) que irá despegando a las proteínas de acuerdo a la fuerza de su unión electrostática. De esta manera se pueden separar proteínas aun cuando el peso molecular sea similar. No es nuestro objetivo desarrollar fundamentos o temas relacionados a la cromatografía sino sobre los recurso físicos y matemáticos para crear un gradiente de concentración.

Existen diferentes alternativas para generar un gradiente. Estas alternativas pueden ser simples en instrumental pero costosas en tiempo o complejas en instrumental y valiosas por el escaso tiempo insumido. A continuación se describen diferentes alternativas, algunas de las cuales no requieren conocimientos matemáticos y no implican ningún tipo de modelo.

Gradiente manual sin ecuación

Esta alternativa no tiene un desarrollo matemático, pero es útil para clarificar el proceso de creación de un gradiente. Para esta técnica se preparan soluciones de concentraciones crecientes, que se irán eluyendo por la columna a diferentes tiempos. De esta manera se obtendrá una variación escalonada de la concentración de la sustancia.

En el primer caso detallado en la Figura 2 se prepararon tres soluciones de 0, 0.15 y 0.3 moles/litro, concentración que representaremos con M. En el intervalo de 0 a 15 minutos se utiliza la solución 0 M, a los 15 minutos se cambia por la solución 0.15 M y a los 30 minutos se coloca la 0.3 M.

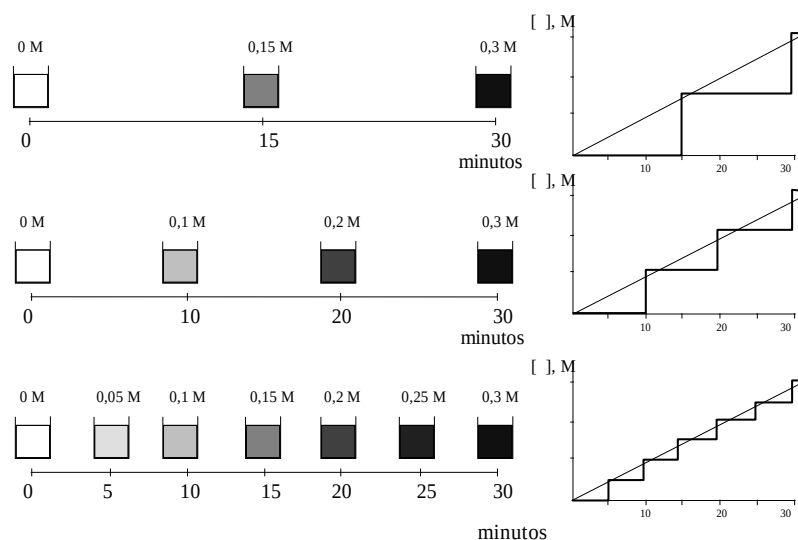


Figura 2. Tres alternativas para crear un gradiente de concentración discreto. En línea recta de puntos se muestra el gradiente esperado y en línea continua escalonada el cambio de concentración logrado.

En el segundo y tercer caso de la Figura 2 el número de soluciones utilizadas es mayor permitiendo una variación de la concentración con menos diferencias entre ellas.

En cualquiera de estos casos de la Figura 2, se observa que la concentración real de la sustancia, indicada por la línea escalonada se aproximará más al gradiente esperado, indicado con la línea recta inclinada, cuanto mayor sea el número de soluciones preparadas. Si bien en los tres gradientes mostrados, la concentración de la sustancia sufrió las variaciones deseadas, se puede observar que en el último caso, el ajuste a la concentración esperada es mejor. Técnicamente, puede no ser necesario un ajuste tan marcado. Por ejemplo si tenemos sólo dos sustancias fijas en una columna, una de ellas se eluye con una concentración 0.02 M de cloruro y la otra con 0.3 M, sería suficiente un gradiente con tres escalones: una solución con concentración de Cl^- menor a 0.02 M (en este caso ambas sustancias permanecerían unidas en la columna); la segunda solución de concentración entre 0.02 y 0.3 M (en este paso se eluiría una de las sustancias). Cuando terminara de salir la primera sustancia, se debería cambiar a otra solución de concentración de Cl^- mayor a 0.3 M, con lo que se lograría despegar la segunda. En el caso que la concentración de Cl^- al que se despegan las proteínas es muy próxima, la cantidad de soluciones puede ser muy grande o inclusive puede llegar a ser imposible la aplicación de este método.

Si bien este método no presenta posibilidad de fallas si las soluciones están bien preparadas, requiere mucho trabajo de cálculo y de preparación de soluciones. Además, puede implicar pérdidas económicas, ya que siempre prepararemos volúmenes mayores a los necesarios, siendo posiblemente descartado el excedente.

Gradiente manual con modelización

Otra posibilidad es lograr un gradiente con sólo dos soluciones. En este caso es necesario una modelización sencilla del proceso. Una de las soluciones está contenida en un recipiente de donde se obtienen las soluciones con el gradiente (solución A) y otra se va agregando en alícuotas fijadas de antemano (solución B).

Para simplificar la comprensión se realizará el desarrollo con valores numéricos. Se dispone de un recipiente de 100 ml con una solución 0 M de un dado soluto y el flujo de salida del recipiente es de 1 ml/min (Figura 3.a). A partir del tiempo 0, al transcurrir el primer minuto, habrá salido del recipiente 1 ml de solución 0 M (Figura 3.b).

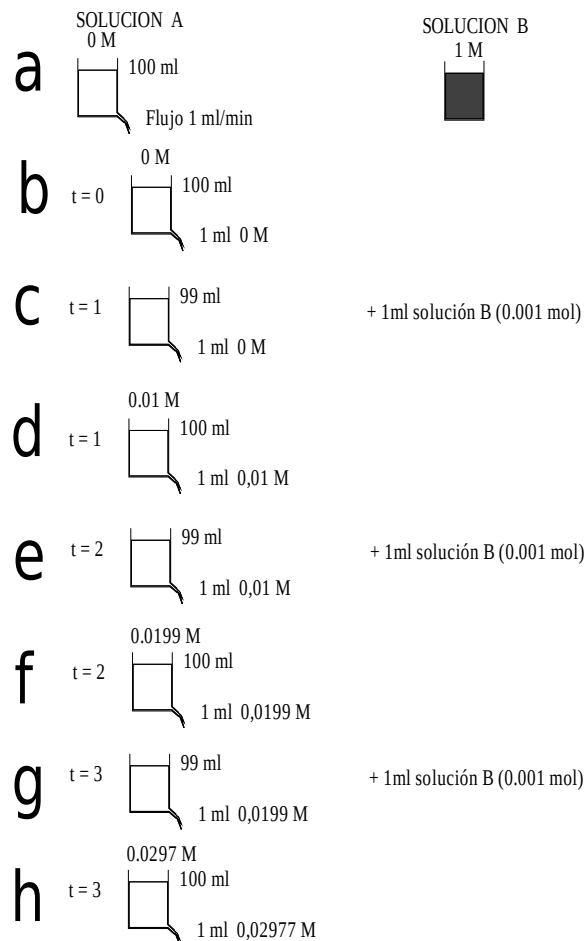


Figura 3. Creación de gradiente manual con dos soluciones

Al tiempo $t = 1$ min, el recipiente tendrá 99 ml (Figura 3.c). Si en este momento se agrega 1 ml de solución B de concentración 1 M, la solución A pasará a tener una concentración 0.01 M y durante 1 minuto fluirá 1 ml de solución 0.01 M (Figura 3.d). A $t = 2$ min el recipiente nuevamente tendrá 99 ml, si en este momento se agrega nuevamente 1 ml de solución B (1 M) Figura 3.e, la solución A volverá a tener 100 ml pero su concentración será 0.0199 M. Durante 1 minuto fluirá solución A con concentración 0.0199 M. A $t = 3$ min el volumen volverá a ser 99 ml y habrá fluido solución de la concentración antes mencionada. En este momento se agrega nuevamente 1 ml de solución B determinando que la solución A tenga ahora una concentración de 0.0297 M. Así, se podría continuar agregando 1ml de la solución B cada 1 minuto y la concentración de la solución A iría aumentando. Tratemos de generalizar los cálculos realizados. Analizando un tiempo en particular (t) se puede deducir que la cantidad de moles que hay en la solución A es

$$C_t = \left(\frac{99 * C_{t-1}}{1000} + 0.001 \right) * \frac{1000}{100}$$

El primer término en el interior del paréntesis es la cantidad de moles existentes en el recipiente A al finalizar el período anterior ($t - 1$), el segundo término es la cantidad de moles agregados con la alícuota de la solución B (1 ml de solución 1 M = 0.001 moles). Simplificando la expresión se obtiene

$$C_t = 0.99 * C_{t-1} + 0.01$$

Ecuación 1

Si construimos una planilla de cálculo con estos datos estratificando el tiempo cada 1 minuto, colocando la ecuación en una planilla de cálculo obtenemos la tabla siguiente

	A	B	C	D
1	t	C		
2		0	0	
3		1	0,01	
4		2	0,0199	
5		3	0,029701	
6		4	0,03940399	
7		5	0,04900995	
8		6	0,05851985	
9		7	0,06793465	
10		8	0,07725531	
11		9	0,08648275	
12		10	0,09561792	
13		11	0,10466175	
14		12	0,11361513	
15		13	0,12247898	
16		14	0,13125419	
17		15	0,13994165	
18		16	0,14854223	

Figura 4. Tabla de valores generados con la Ecuación 1

Llevamos estos datos a R, para ello introducimos en nuestro espacio de trabajo la tablaR731 de la planilla de cálculo tablaR73.ods/xls.

```
> tablaR731<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

y graficamos los valores

```
> plot(tablaR731$t,tablaR731$C,ty='s',xlab='min',ylab='concentración, M')
```

obteniendo la Figura 5

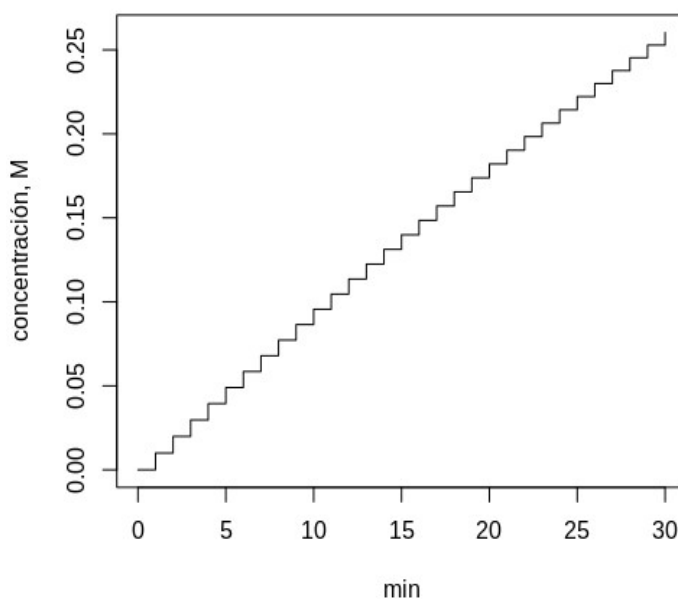


Figura 5. Gradiente de concentración creado

Se obtiene un gradiente de concentración cuya inclinación dependerá de la concentración utilizada en la solución agregada. El tamaño de los escalones dependerá del intervalo de tiempo adoptado. Con el ejemplo anterior llevaría aproximadamente 30 minutos llegar de 0 M a 0.3 M (Figura 5).

Si se utiliza la misma solución B, pero agregando 5 ml cada 5 minutos, la ecuación resultaría

$$C_t = 0.95 * C_{t-1} + 0.05$$

Ecuación 2

de la misma manera resultaría si cada 10 minutos agregáramos 10 ml

$$C_t = 0.9 * C_{t-1} + 0.1$$

Ecuación 3

Podemos introducir en la planilla de cálculo las tres ecuaciones obtenidas y luego importarla a R. Para ello introduzcamos los datos generados con la Ecuación 2, que corresponden a la tablaR732 y los datos generados con la Ecuación 3, que corresponden a la tablaR733

```
> tablaR732<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

```
> tablaR733<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

graficaremos los tres gradientes realizados con agregados de la misma solución cada 1, 5 y 10 minutos. Primero graficamos la tablaR731. Utilizamos el argumento `ty='s'`, que significa escalera

```
> plot(tablaR731$t,tablaR731$C,ty='s',xlab='min',ylab='concentración, M')
```

luego agregamos en el mismo gráfico los datos de la tablaR732 en rojo (`col=2`)

```
> points(tablaR732$t,tablaR732$C,ty='s',col=2,lwd=2)
```

y los de la tablaR733, en verde (`col=3`)

```
> points(tablaR733$t,tablaR733$C,ty='s',col=3,lwd=2)
```

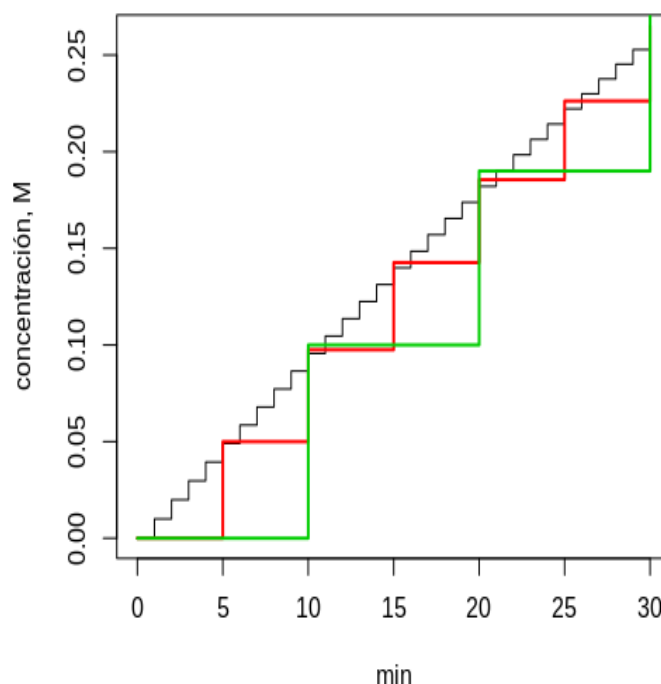


Figura 6. Gradientes creados en tres condiciones diferentes de tiempo de agregado.

Observando los resultados obtenidos con las tres ecuaciones, se puede deducir que el escalón entre dos concentraciones consecutivas es menor cuanto menor es el intervalo de tiempo entre los agregados (Figura 6). También observamos que el primer factor de las tres ecuaciones: 0.99, 0.95 y 0.9, valores que podemos expresar como $(1 - \text{volumen agregado}/100)$ y el sumando del término de la derecha: 0.01, 0.05 y 0.1 es $(\text{volumen agregado}/100)$, entonces llamamos a este término x y lo utilizaremos para generalizar la ecuación de creación de gradiente, la que expresamos de la siguiente manera

$$C_t = (1 - x) * C_{t-1} + x$$

Ecuación 4

donde

$$x = \frac{\text{volumen agregado de solución B}}{100}$$

Ecuación 5

Obtención de una ecuación general

Es posible obtener una ecuación general. Supongamos un recipiente A con una concentración inicial C_o y un volumen V , contiene una masa "m" de soluto. De este recipiente fluye un volumen V' en un dado período de tiempo Δt . A este recipiente se le agrega en el mismo período de tiempo un volumen V' de otra solución B, de concentración C , la masa agregada al recipiente A, será la que se obtiene por el siguiente cálculo

$$\begin{array}{lcl} 1000 \text{ ml} & \rightarrow & C \\ V' & \rightarrow & m = \frac{C * V'}{1000} \end{array}$$

Al cabo del período Δt , la masa de soluto en el recipiente A será m_1' , la que resulta del siguiente cálculo. Obtenemos primero la masa que queda al final del primer intervalo de tiempo

$$\begin{array}{lcl} 1000 \text{ ml} & \rightarrow & C_o \\ V - V' & \rightarrow & m_1' = \frac{C_o * (V - V')}{1000} \end{array}$$

por lo tanto la nueva masa será la suma de lo que quedó en el recipiente: m_1' , más el agregado: m
 $m_1 = m + m_1'$

si reemplazamos los valores obtenidos en función de concentraciones y volúmenes, resulta

$$m_1 = \frac{C_o * (V - V')}{1000} + \frac{C * V'}{1000}$$

esta masa m_1 estará contenida en un volumen V , ya que el volumen que fluyó y se agregó es el mismo. Por lo tanto su nueva concentración C_1 será:

$$V \quad ml \rightarrow \frac{C_o * (V - V')}{1000} + \frac{C * V'}{1000}$$

$$1000 \quad ml \rightarrow C_1 = \left[\frac{C_o * (V - V')}{1000} + \frac{C * V'}{1000} \right] * \frac{1000}{V}$$

reordenando la expresión se obtiene, para la concentración en el primer agregado

$$C_1 = \frac{C_o * (V - V')}{V} + \frac{C * V'}{V}$$

o bien

$$C_1 = C_o + \frac{C * V'}{V} - \frac{C_o * V'}{V}$$

reordenando

$$C_1 = C_o + \frac{V'}{V} * (C - C_o)$$

generalizando para el agregado n, la concentración en el recipiente será C_n

$$C_n = C_{n-1} + \frac{V'}{V} * (C - C_{n-1})$$

El escalón del gradiente estará dado por la razón V'/V . Como ésta puede hacerse prácticamente tan pequeña como se desee, el escalón también podrá modificarse a discreción. El único inconveniente es que si se disminuye V' , es más seguido el tiempo en que se deben realizar los agregados, requiriendo más control y participación del operador. Sin embargo este modelo tiene la gran ventaja de su simplicidad en lo que se refiere al equipamiento. Es clara la ventaja sobre el primer método, en que podemos tener cuantos escalones deseemos solo utilizando dos soluciones. Evidentemente el ahorro en tiempo e insumos será importante. Este proceso de agregado ha sido automatizado con el uso de electroválvulas que automáticamente hacen los agregados. El tema se desarrolla en el siguiente ítem.

Creación de gradiente con válvulas controladas por ordenador

Las electroválvulas o válvulas solenoides son válvulas que se pueden abrir o cerrar utilizando controladores electrónicos. En la actualidad se pueden adquirir o diseñar y construir los controladores con cierta facilidad, así como obtener las válvulas. Dos soluciones de diferentes concentraciones se conectan una a cada válvula y el ordenador controla el tiempo que cada entrada permanece abierta de acuerdo a la concentración que se desea obtener. Un sistema de mezcla ("mixer") se intercala entre las válvulas y la salida del catéter que lleva la solución con el gradiente (Figura 7). Por ejemplo si se desea un gradiente desde 0 M a 0.3 M, se puede conectar al sistema una solución 0 M y una 0.3 M. Programando el sistema, al principio, el ordenador mantendrá abierta continuamente la entrada a la solución 0 M, en este período la solución que se obtiene es 0 M. Luego se comenzará a abrir por un período de tiempo la vía que conecta a la solución 0.3 M y se cerrará la correspondiente a la solución 0 M. Este período de tiempo se irá incrementando de manera que la solución que sale será de una concentración creciente, hasta que al final del proceso se llegará a una solución 0.3 M.

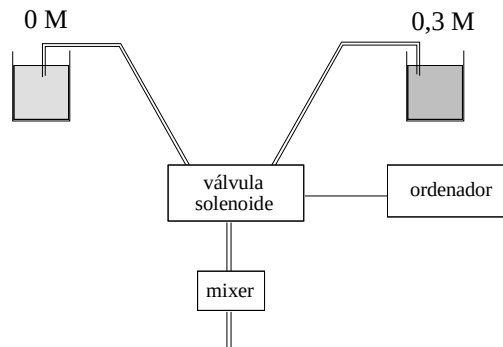


Figura 7. Creador de gradiente con controlador

Creador de gradiente continuo

Podemos utilizar un sistema creador de gradiente, como el que se muestra en la Figura 8.

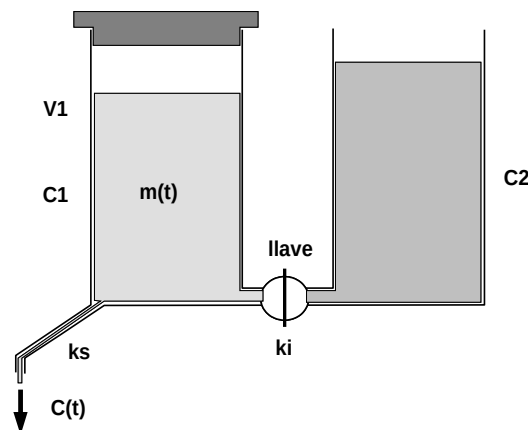


Figura 8. Dispositivo para creación de gradientes continuos.

Este sistema consta de dos compartimientos conectados por una llave. El sistema se puede utilizar en diferentes configuraciones. Tiene la ventaja de poder hacer un gradiente continuo y que no requiere ningún equipo electrónico o controladores.

Configuración de uso 1: El compartimiento de la izquierda se mantiene cerrado herméticamente, razón por la cual mantendrá constante su volumen (V_1). La concentración inicial es C_1 , que corresponde a la concentración inicial del gradiente. El flujo que se obtiene por la salida del compartimiento de la izquierda (k_s) será idéntico al que entre desde el compartimiento de la derecha (k_i). El compartimiento de la derecha se mantiene en equilibrio con la atmósfera y contiene una solución cuya concentración inicial es C_2 . La concentración C_2 puede ser mayor o menor que C_1 , de manera que al producirse la mezcla la concentración C_1 comenzará a variar, saliendo del recipiente una solución con una concentración $C(t)$, que podrá aumentar o disminuir con el transcurso del tiempo. El modelo que se describe a continuación genera una ecuación que relaciona esta $C(t)$ con los valores iniciales y las variables deseadas para el desarrollo del gradiente en función del tiempo.

En el recipiente de la izquierda existe una masa de sustancia disuelta que al comenzar a fluir solución (k_s) y entrar solución desde la derecha (k_i) comenzará a variar, por lo tanto la masa es una función del tiempo, $m = m(t)$.

La variación de m en función del tiempo viene dada por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dm}{dt} = k_i * C_2 - k_s * C$$

El primer sumando del término de la derecha indica que el incremento de la masa del recipiente de la izquierda será proporcional a la concentración que tenga el recipiente de la izquierda: C_2 . Por otro lado, el segundo término que se halla restando, indica que dicho término da cuenta de una disminución de la sustancia en el compartimiento. La cantidad de sustancia que se va del compartimiento de la izquierda es proporcional a la concentración de la sustancia en el mismo compartimiento. Si dividimos ambos miembros por el volumen V_1 , resulta

$$\frac{1}{V_1} * \frac{dm}{dt} = \frac{k_i * C_2}{V_1} - \frac{k_s * C}{V_1}$$

como $dm/V_1 = dC$, resulta

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_i * C_2}{V_1} - \frac{k_s * C}{V_1}$$

Dado que el compartimiento de la izquierda se halla cerrado, mantendrá el volumen aun cuando de él fluye la solución hacia el exterior, por dicha razón, lo que ingresa al compartimiento de la izquierda desde el compartimiento de la derecha es el mismo volumen. Por lo tanto $k_i = k_s$. Hacemos ese reemplazo, dejando solo la constante k_i . Además, sacamos factor común a k_i/V_1

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_i * C_2}{V_1} - \frac{k_i * C}{V_1} = \frac{k_i}{V_1} * (C_2 - C)$$

Expresamos ahora, quedándonos con el primero y tercer término de la igualdad anterior

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_i}{V_1} * (C_2 - C)$$

reordenamos

$$\frac{dC}{(C_2 - C)} = \frac{k_i}{V_1} * dt$$

Integrando esta expresión entre C_1 y C , para el intervalo de tiempo $(0, t)$ resulta

$$\int_{C_1}^C \frac{dC}{(C_2 - C)} = \frac{k_i}{V_1} \int_0^t dt$$

La integral de la izquierda la resolvemos por sustitución

sustituyendo $C_2 - C = z$

resulta $-dz = dC$

o bien $dC = -dz$

$$- \int_{C_2 - C_1}^{C_2 - C} \frac{dz}{z} = \frac{k_i}{V_1} * t$$

se obtiene

$$-\log z \Big|_{C_2 - C_1}^{C_2 - C} = \frac{k_i}{V_1} * t$$

$$-\log(C_2 - C) + \log(C_2 - C_1) = \frac{k_i}{V_1} * t$$

$$\log \frac{(C_2 - C_1)}{(C_2 - C)} = \frac{k_i}{V_1} * t$$

$$\frac{(C_2 - C_1)}{(C_2 - C)} = e^{\frac{k_i}{V_1} * t}$$

$$\frac{(C_2 - C_1)}{e^{\frac{k_i}{V_1} * t}} = (C_2 - C)$$

$$(C_2 - C_1) * e^{-\frac{k_i}{V_1} * t} = (C_2 - C)$$

Obtenemos así la función que nos da la concentración (C) que obtenemos a la salida del dispositivo creador de gradiente en función del tiempo con los parámetros k_i , V_1 , C_1 y C_2 .

$$C = C_2 - (C_2 - C_1) * e^{-\frac{k_i}{V_1} * t}$$

Ecuación 6

Realizamos una aplicación de esta ecuación en R para ello creamos una función Ct, que representa a la Ecuación 6

```
> Ct <- function(t){C2-(C2-C1)*exp(-k*t/V1)}
```

podemos graficar la función Ct, asignando valores arbitrarios a los parámetros

```
> C1<-0
> V1<-200
> k<- 0.2
> C2<-0.8
> plot(Ct,0,10,xlab='min',ylab='C, mol/l',lwd=2,las=1)
```

Obtenemos la gráfica del gradiente, Figura 9

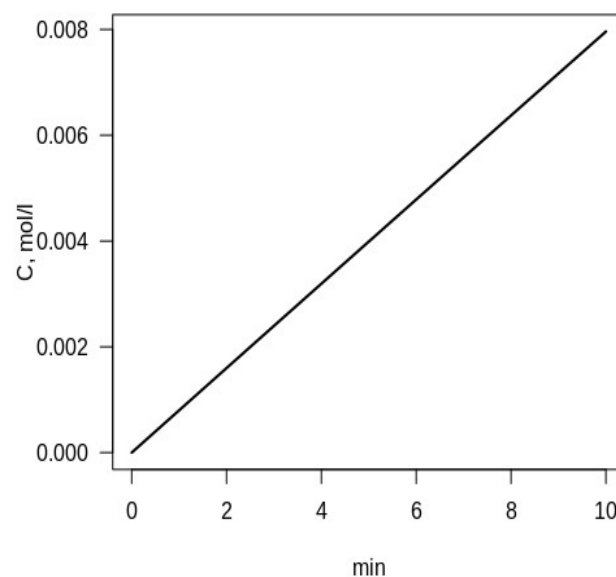


Figura 9

podemos modificar por ejemplo el flujo, al doble de su valor inicial

```
> k<-0.4
```

generamos un data.frame, al que llamamos gradiente, con los datos de concentración obtenidos con el nuevo valor de k. La primera columna será t (tiempo) en un intervalo de 0-10 en incrementos de 0.1. La segunda columna que llamaremos C, tendrá las concentraciones obtenidas con la función Ct, para el intervalo de 0-10 en incrementos de 0.1.

```
> gradiente<-data.frame(t=seq(0,10,0.1),C=Ct(seq(0,10,0.1)))
```

lo graficamos sobre la gráfica anterior, viendo en negro el primer gradiente y en rojo el segundo, Figura 10.

```
> points(gradiente$t,gradiente$C,ty='l',col=2,lwd=2)
```

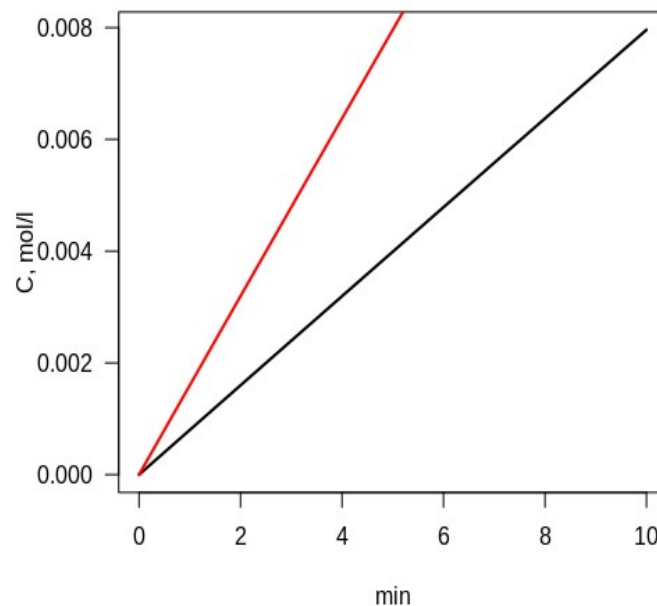


Figura 10

Teniendo ya resuelta la ecuación podemos programar un gradiente a nuestras necesidades. Supongamos que deseamos crear un gradiente que pase de 0.1 M a 0.3 M en 30 minutos con un flujo 1.3 ml/min. El volumen V1 lo fijaremos en 50 ml. En la ecuación

$$C = C_2 - (C_2 - C_1) * e^{-\frac{k_1 * t}{V_1}}$$

solo nos queda como incógnita C2. Para hallar el valor de C2, igualamos a cero la ecuación

$$0 = C_2 - (C_2 - C_1) * e^{-\frac{k_1 * t}{V_1}} - C$$

planteamos una nueva función que llamaremos funcionC, con el objetivo de hallar C2

```
> funcionC<-function(C2){C2-(C2-C1)*exp(-k*t/V1)-C}
```

fijamos los parámetros conocidos

```
> C1<-0.1
```

```
> C<-0.3
```

```
> k<-1.3  
> V1<-50  
> t<-30
```

con la función uniroot() hallamos el valor de la incógnita, en nuestro caso C2.

```
> uniroot(funcionC,c(-10,10))
```

\$root

```
[1] 0.4692803
```

\$f.root

```
[1] -1.110223e-16
```

\$iter

```
[1] 2
```

\$init.it

```
[1] NA
```

\$estim.prec

```
[1] 6.103516e-05
```

\$root, nos da el valor de C2 para que el gradiente se pueda desarrollar de la manera deseada.

Para pasar de 0.1 a 0.3 M en 30 min con un flujo de 1.3 ml/min teniendo un volumen de compartimiento V1= 50 ml tenemos que utilizar en el compartimiento 2 una concentración de 0.469 M.

Grafiquemos entonces nuestro gradiente con la función Ct y los valores hallados recordamos el formato de la función Ct

```
> Ct <- function(t){C2-(C2-C1)*exp(-k*t/V1)}
```

Asignamos entonces los parámetros, incluido ahora el valor de C2 hallado en el paso anterior

```
> C2<-0.469
```

```
> C1<-0.1
```

```
> k<-1.3
```

```
> V1<-50
```

graficamos el gradiente

```
> plot(Ct,0,30,lwd=2,col=2,las=1,xlab='min',ylab='concentración, mol/l')
```

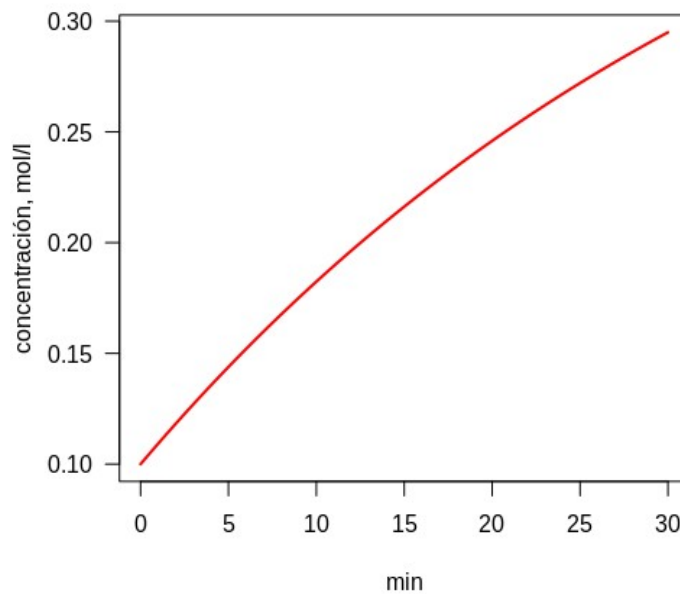


Figura 11

Como podemos observar, logramos crear un gradiente de 0.1 a 0.3 en los 30 minutos con las condiciones deseadas. El gradiente no es completamente lineal y podrá modificarse con otras modalidades de uso del creador de gradiente.

Simuladores de gradiente

Podemos realizar un simulador en tiempo real o ficticio. Para esto utilizaremos scripts diseñados en R, es decir un conjunto de instrucciones que mostrarán los cambios en la concentración en tiempo acelerado o real. Para probar el efecto de los simuladores copie las sentencias siguientes comprendidas entre dos signos #inicio y #fin y péguelas en R, luego oprima enter y se ejecutarán todas las órdenes. No es parte de este módulo del curso la construcción de scripts, pero puede consultar los vídeos en youtube con el nombre R5-# (donde # indica número de 1-9). El tema fue tratado en el módulo 5 de este curso.

Simulador 1

El script siguiente muestra el gradiente con las condiciones especificadas

```
#inicio
#función del gradiente
Ct<-function(t){C2-(C2-C1)*exp(-k*t/V1)}
# condiciones
C1<-0
V1<-200
k<-0.2
C2<-0.8
#duración del gradiente =30 min
```



```

i=0
plot(0,0,ty='n',xlim=c(0,30),ylim=c(0,0.35),xlab='min',ylab='conc, mol/l')
for(i in 0:30){
points(i,Ct(i))
Sys.sleep(1)
writeLines(paste('concentración= ',Ct(i)))
i=i+1
}
# fin

```

debería haber obtenido la siguiente gráfica

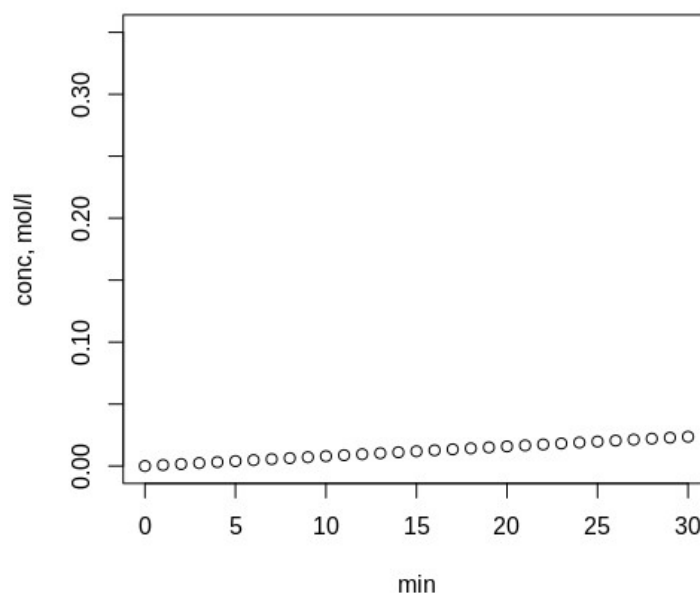


Figura 12

De esta manera puede verificar el funcionamiento del modelo desarrollado

Simulador 2

El script siguiente muestra el gradiente con las condiciones especificadas y varía la C2 de 0.2 a 0.8, de manera más acelerada. El gradiente con cada concentración será mostrado en diferente color

```

#inicio
#función del gradiente
Ct<-function(t){C2-(C2-C1)*exp(-k*t/V1)}
# condiciones
C1<-0
V1<-100

```

```

k<-0.2
C2<-0.2
#duración del gradiente =30 min
i=0
plot(0,0,ty='n',xlim=c(0,30),ylim=c(0,0.1),xlab='min',ylab='conc, mol/l')
for(j in 1 :4){
  for(i in 0:30){
    points(i,Ct(i),col=j)
    Sys.sleep(0.2)
    writeLines(paste('concentración= ',Ct(i)))
    i=i+1
  }
  C2<-C2+0.2
}
# fin

```

que nos proporciona la siguiente gráfica

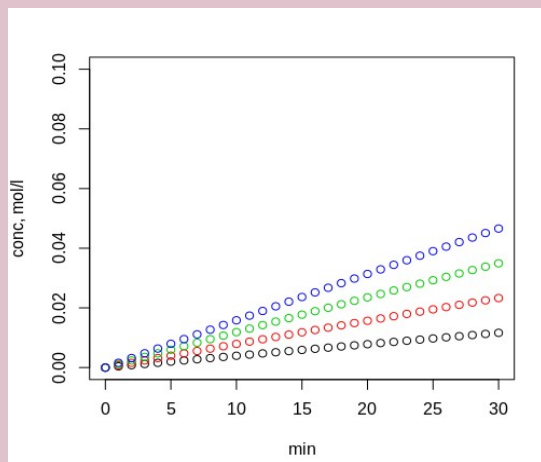
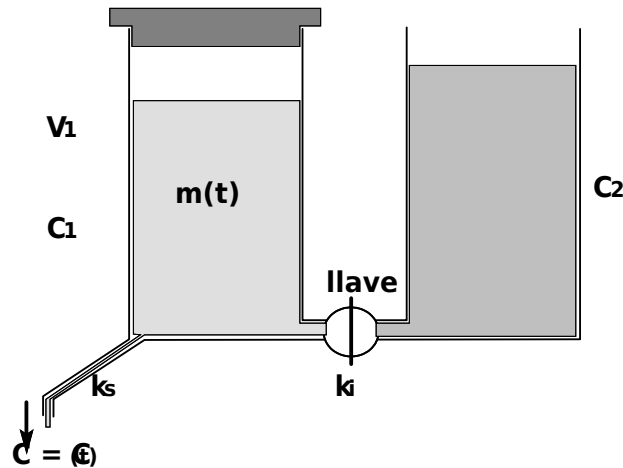


Figura 13

La combinación de conocimientos de matemática, modelización y programación nos permiten la simulación, herramienta que nos facilita anticipar mediciones, resultados y toma de decisiones.

Ejercicios

viii) Se dispone de un creador de gradiente como se muestra en la figura



$$C_2 = 3 \text{ eq/L}$$

$$C_1 = 0.01 \text{ eq/L}$$

$$k_i = 0.16 \text{ ml/min}$$

$$V_1 = 280 \text{ ml}$$

Graficar el gradiente de concentración que se obtiene en la salida del dispositivo, para los primeros 30 min.

ix) Con el mismo dispositivo del ejercicio anterior hallar qué valor debe tener C_2 para alcanzar una concentración de 0.3 eq/L en 60 minutos.

$$C_1 = 0.01 \text{ eq/L}$$

$$k_i = 0.1 \text{ ml/min}$$

$$V_1 = 280 \text{ ml}$$

¿Es posible preparar la solución de concentración C_2 ?

Clase 4

Infusión continua

La infusión continua es una práctica habitual para la administración de fármacos en pacientes o en animales de experimentación. Se emplea cuando se desea inyectar una cantidad conocida de una sustancia en un compartimiento durante un período de tiempo o cuando se desea mantener constante la concentración de una sustancia en un compartimiento. *In vivo*, esta técnica se realiza por cateterismo de una arteria o una vena, a través de la cual se inyecta una solución de concentración conocida a un flujo controlado. Por supuesto que en algunos diseños experimentales se podrán utilizar otras vías como ser subcutánea, rectal, orogástrica, etc. El objetivo es alcanzar una concentración determinada de una sustancia que permita mantener este valor con fines de tratamiento o bien medir la constante de velocidad de depuración (k_e) de la sustancia.

Si bien la infusión continua de una sustancia puede realizarse en cualquier compartimiento, es común su utilización cuando se desea mantener constante la concentración de una droga en sangre. En esta práctica se infunde la sustancia, proceso que tiene una constante de velocidad (k_a). Esta infusión mantiene en la sangre una concentración constante de la sustancia A, Figura 1. Por otro lado, de la sangre la sustancia A es removida, por uno o más procesos. Aunque sean más de uno los procesos, si son del mismo orden se pueden considerar como un único proceso cuya constante de velocidad de eliminación llamaremos k_e .

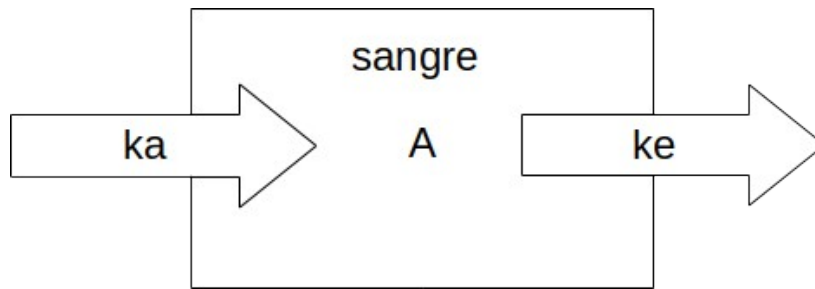


Figura 1

Para realizar la infusión se puede proceder de dos maneras diferentes

- Canalizando vena o arteria y utilizando una bomba de infusión de tipo peristáltica o a pistón⁷.
- Colocando una minibomba osmótica por ejemplo en la cavidad peritoneal del animal⁸
- Una forma que ofrece menor control y precisión pero que dentro de ciertas condiciones puede ser utilizada, es el goteo desde un reservorio o sachet. En esta metodología la velocidad de administración se controla por el número de gotas por minuto.

La correcta aplicación de estas metodologías y la exactitud de su manejo mejora si el proceso se modeliza matemáticamente, de manera que tengamos ecuaciones que vinculen a las variables involucradas.

Desarrollo del modelo

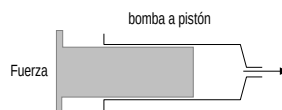
Analizaremos el caso en el cual una sustancia A es infundida al compartimiento sanguíneo. Pero podría ser aplicable para cualquier compartimiento en que se realice una infusión continua. La variación de la cantidad de la sustancia A en sangre estará dada por la siguiente ecuación diferencial, independientemente de cual sea el método elegido para realizar la infusión:

$$\frac{dA}{dt} = k_i * A^0 - k_e * A^1$$

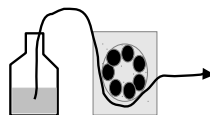
Ecuación 1

El primer término de la derecha, representa el ingreso de la sustancia y el segundo el egreso. Deducimos esto por las constantes involucradas y los signos de los procesos. En esta ecuación se está suponiendo que la velocidad de infusión es independiente de la cantidad presente en sangre, por

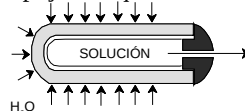
⁷ Las bombas de infusión, son dispositivos que presentan una jeringa y un mecanismo automático al que se le puede regular la velocidad de empuje del émbolo de la jeringa, de esta manera se puede obtener un flujo constante y conocido.



Las bombas peristálticas realizan el empuje por compresión de un catéter produciendo los mismos resultados que la bomba de infusión.



⁸ Las minibombas osmóticas son dispositivos que contienen una cavidad en la que se coloca la solución a infundir y ésta está relacionada con el compartimiento a infundir por un pequeño orificio. La cavidad está rodeada por una capa de una sustancia que se expande al estar en contacto con agua. La bomba tiene la cubierta exterior permeable al agua y rígida, mientras que la capa interior es impermeable y flexible. De esta manera al expandirse, comprime el compartimiento que contiene la solución y empuja el líquido a salir hacia el exterior.



lo tanto el proceso de infusión tiene orden cero. En cambio, suponemos que la eliminación de la sustancia es mayor cuanto mayor es la cantidad de la misma en sangre, por lo que el proceso de eliminación es de orden 1. Simplificando, la ecuación la podemos escribir

$$\frac{dA}{dt} = k_i - k_e * A$$

Ecuación 2

Podemos resolver la ecuación aplicando las transformadas de Laplace, que resultará

$$s * \bar{A} - A_0 = \frac{k_i}{s} - k_e * \bar{A}$$

Si la sustancia A no existe normalmente en la sangre, como puede ocurrir con un fármaco, la concentración inicial de A (A_0) será cero, por lo tanto se puede suponer que $A_0 \simeq 0$.

$$s * \bar{A} = \frac{k_i}{s} - k_e * \bar{A}$$

Reordenando la expresión anterior se obtiene

$$s * \bar{A} + k_e * \bar{A} = \frac{k_i}{s}$$

factorizando

$$\bar{A} * (s + k_e) = \frac{k_i}{s}$$

despejando la transformada de A obtenemos

$$\bar{A} = \frac{k_i}{s * (s + k_e)}$$

aplicando antitransformada

$$A = \frac{k_i}{k_e} * (1 - e^{-k_e * t})$$

Dividimos ambos miembros por el volumen de distribución (Vd) de la sustancia, obtenemos

$$\frac{A}{Vd} = \frac{k_i}{k_e * Vd} * (1 - e^{-k_e * t})$$

Como A/Vd es concentración, la ecuación resulta

$$C = \frac{k_i}{k_e * V_d} * (1 - e^{-k_e * t})$$

Esta es la ecuación a la que se ajustan los valores de la concentración de la sustancia A a lo largo del tiempo. La misma queda representada por una gráfica como se muestra en la Figura 2

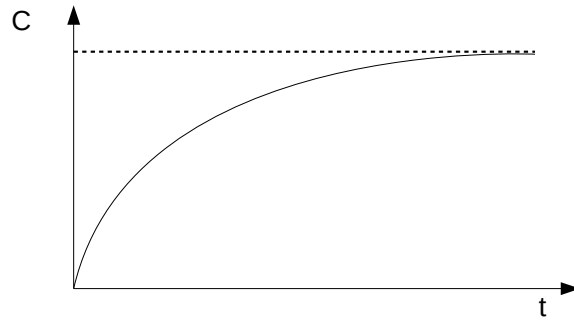


Figura 2

Concentración máxima de la infusión

A partir de esta ley se pueden obtener otras expresiones de gran utilidad. Si en la expresión anterior se calcula el límite cuando el tiempo tiende a infinito ($t \rightarrow \infty$)

$$\lim_{t \rightarrow \infty} C = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_i}{k_e * V_d} * (1 - e^{-k_e * t}) = C_{\infty}$$

se obtiene el valor de la concentración de la sustancia a tiempo infinito (C_{∞}), es decir el valor al cual tiende la concentración si la infusión se prolonga un tiempo muy largo. Cuando el tiempo tiende a infinito el término entre paréntesis en la expresión anterior tenderá al valor 1, por lo tanto la concentración de la sustancia A para tiempo infinito quedará dado por la siguiente ecuación

$$C_{\infty} = \frac{k_i}{k_e * V_d}$$

La expresión anterior vincula 4 variables farmacocinéticas y puede ser utilizada para hallar cualquiera de ellas. Si los valores de k_i , k_e y V_d son conocidos, se podrá saber a qué valor de C_{∞} se llegará. Esta expresión también es útil para elegir un valor de k_i para alcanzar una C_{∞} determinada. Si el objetivo es hallar las variables farmacocinéticas de la sustancia como la k_e y el V_d , se infundirá la sustancia hasta obtener la concentración constante, C_{∞} . A partir de este momento se suspende la infusión y de la curva de decaimiento de la concentración de la sustancia se halla el valor de k_e . Conociendo k_e , k_i y C_{∞} , se puede hallar el volumen de distribución de la sustancia, con la fórmula anterior.

Vida media de infusión

El modelo en discusión permite obtener el tiempo necesario para alcanzar un porcentaje de C_{∞} . Supongamos que deseamos conocer cuánto tiempo se demorará en alcanzar la mitad del valor máximo: $C_{\infty}/2$. Llamamos a este tiempo vida media o tiempo de vida media. Como conocemos que

$$C_{\infty} = \frac{k_i}{k_e * V_d}$$

y

$$C = \frac{k_i}{k_e * V_d} * (1 - e^{-k_e * t})$$

reemplazando ambos valores en la expresión anterior, resulta

$$\frac{C_{\infty}}{2} = C_{\infty} * (1 - e^{-k_e * t_{1/2}})$$

reordenando y simplificando C_{∞}

$$\frac{1}{2} = 1 - e^{-k_e * t_{1/2}}$$

reordenando

$$e^{-k_e * t_{1/2}} = \frac{1}{2}$$

aplicando las propiedades del logaritmo de potencia y cociente obtenemos

$$-k_e * t_{1/2} * \ln e = \ln 1 - \ln 2$$

resolviendo algebraicamente resulta

$$-k_e * t_{1/2} = -\ln 2$$

reordenando

$$-\ln 2 = -k_e t_{1/2}$$

despejando $t_{1/2}$, resulta la expresión para el tiempo medio o vida media del proceso en cuestión

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

Como se puede observar en la ecuación anterior, el tiempo para alcanzar una fracción (en este caso 50%) del valor máximo de la concentración es independiente de la k_i e inversamente proporcional al valor de k_e . Siguiendo una deducción similar se pueden obtener los tiempos necesarios que se debe infundir para alcanzar un determinado porcentaje (x%) del valor máximo de concentración. Por lo tanto se obtiene la siguiente ecuación general para un x% del valor máximo de concentración

$$t_x = \frac{\ln 100 - \ln(100 - x)}{k_e}$$

Utilización de la derivada para el cálculo de parámetros

Existe otra metodología para obtener los parámetros farmacocinéticos, especialmente útil cuando el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (C_{∞}) es muy largo. En este caso se utiliza la derivada de la función. Si se obtiene la deriva primera de la función representada por la siguiente expresión

$$C = \frac{k_i}{k_e * V_d} * (1 - e^{-k_e * t})$$

se obtiene

$$C' = \frac{k_i}{k_e * V_d} * (0 - e^{-k_e * t}) * (-k_e)$$

reordenando resulta

$$C' = \frac{k_i}{k_e * V_d} * k_e * e^{-k_e * t}$$

simplificando y pasando el término exponencial al denominador, se obtiene

$$C' = \frac{k_i}{V_d * e^{k_e * t}}$$

A tiempo cero, la función derivada toma el valor, dado que el término exponencial tomará el valor 1

$$C'(0) = \frac{k_i}{V_d}$$

Como indica la ecuación anterior, la derivada a tiempo cero es el cociente entre la constante de infusión (k_i) y el volumen de distribución de la sustancia (V_d). La ecuación guarda una lógica pensando que la ecuación se dedujo bajo el supuesto que a tiempo cero la concentración de la sustancia es cero. A mayor velocidad de infusión y menor volumen de distribución, mayor va a ser el cambio en la concentración, es decir mayor va a ser su derivada.

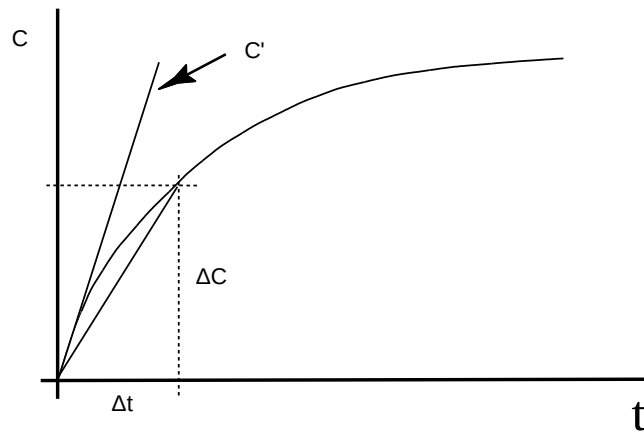


Figura 3

La derivada a tiempo cero a su vez es la pendiente de la recta tangente a la función en el punto en cuestión ($t=0$) y como se ve en la Figura 3, ésta es parecida a la pendiente de la recta secante calculada como el cociente entre ΔC y Δt , al que llamamos cociente incremental entre la concentración de la sustancia y el tiempo.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t}(0) = \frac{k_i}{V_d}$$

Ecuación 3

El valor obtenido del cociente incremental⁹ será tanto más próximo al valor de la derivada, cuanto más pequeño sea el valor de Δt . En este momento es importante resaltar que la amplitud del Δt puede estar restringida por diferentes motivos. Por ejemplo, se debe tener un Δt de dimensión suficiente como para que la técnica utilizada para medir C detecte diferencias significativas entre los valores, de manera que el ΔC sea un valor confiable y no una mera representación del error experimental de la determinación, y lo suficientemente pequeño para obtener una buena estimación de la derivada, ya que como se observa en la Figura 3, cuanto mayor sea el Δt , peor será la estimación que se obtendrá de la derivada.

Veamos algunas aplicaciones que podríamos hacer de la última expresión obtenida. Uno de los inconvenientes que se puede presentar en una infusión continua es alcanzar el valor C_∞ cuando k_e tiene un valor pequeño. Esto se deduce de la expresión de $t_{1/2}$ en la cual observamos que dicho tiempo es inversamente proporcional al valor de k_e . Podemos hallar una solución experimental que nos permita llegar en menos tiempo al valor de C_∞ . Observando la siguiente expresión

$$C'(0) = \frac{k_i}{V_d}$$

se deduce que la derivada a tiempo cero es directamente proporcional a k_i . En base a esto se puede modificar la infusión para alcanzar C_∞ en un menor tiempo de infusión. Para ello, al inicio se infunde a una velocidad mayor, de manera que k_i sea mayor que la que se utilizará en el resto de la infusión. Como se puede ver en la Figura 4, se muestra la evolución que seguiría la concentración de la sustancia A con la constante $k_{i,1}$, y la evolución que seguiría si utilizamos una constante $k_{i,2}$ mayor. Como lo muestran las flechas las tasas de infusión tienen una relación inversa con el tiempo necesario para alcanzar C_∞ .

⁹ es la pendiente de la recta s en la figura 5.2

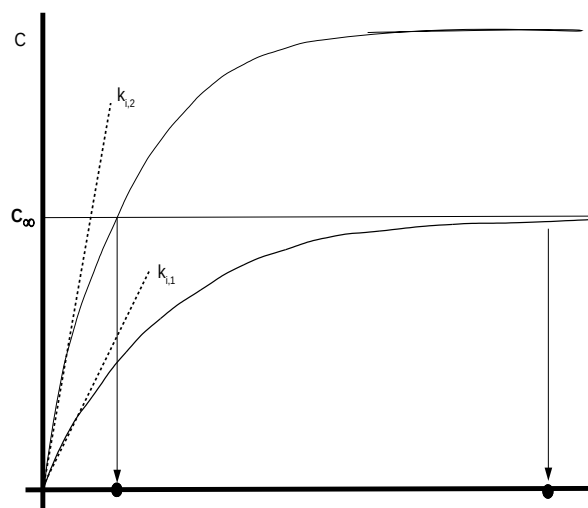


Figura 4

Si se infunde hasta un dado tiempo a velocidad $k_{i,2}$ y en el momento de alcanzar la concentración C_∞ se cambia la velocidad de infusión a un valor: $k_{i,1}$, se obtendrá un comportamiento como el mostrado en rojo en la Figura 5.

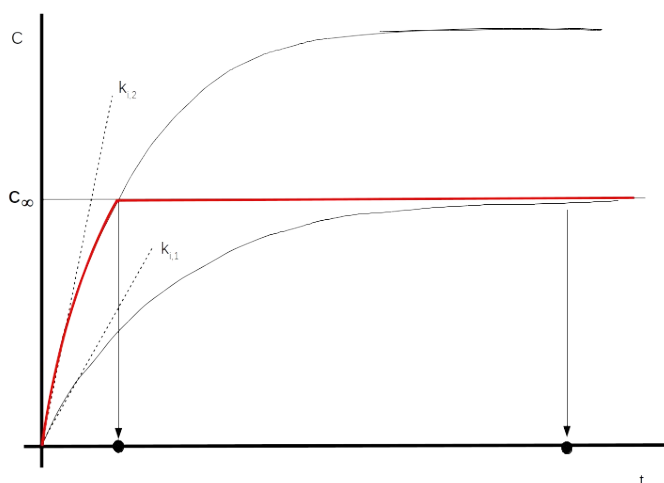


Figura 5

Otra manera de solucionar el problema es inyectando una dosis única inicial, D_0 , de tal manera que se cumpla que

$$\frac{D_0}{V_d} \simeq C_\infty$$

y simultáneamente infundir a velocidad k_i . De esta manera se alcanzaría el valor del plateau (C_∞) al inicio del experimento y luego la infusión continua lo mantiene, Figura 6. Se debe observar que con ambas metodologías se necesita tener una noción muy clara del proceso. En el primer caso se debería conocer cuándo se ha alcanzado la concentración constante y cambiar la velocidad de infusión al valor previsto. En el segundo caso se debería tener una buena estimación del volumen de distribución.

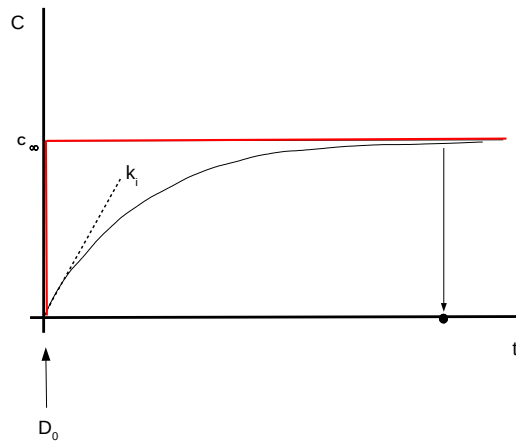


Figura 6

Al aplicar estas metodologías la constante k_i es un valor conocido. Para el caso de las bombas peristálticas y de infusión, este valor se puede conocer con precisión, apelando a los valores de velocidad de movimiento de las bombas de infusión y los grosores de los catéteres o jeringas utilizadas. Además es posible recolectar el líquido en tubos y con la ayuda de una balanza conocer exactamente el volumen emitido por la bomba de infusión. Para el caso de las minibombas osmóticas, es más dificultoso conocer el valor, ya que las mismas no se comportan homogéneamente y los volúmenes que las bombas emiten son muy pequeños. Además para que la bomba presente un flujo debe estar en contacto con una solución. De todas maneras k_i es un valor que se puede comprobar previo a la infusión. Para cumplir con este último objetivo, se coloca una minibomba osmótica en un recipiente con una solución de características fisicoquímicas (pH, fuerza iónica, temperatura y tipos de solutos) similares al medio en el cual se encontrará durante el experimento. Luego se mide la concentración de la sustancia A a lo largo del tiempo en el recipiente. Conociendo el volumen del recipiente se puede calcular con exactitud el flujo del dispositivo. A continuación se describe el proceso

Calibración de minibomba osmótica

Para conocer el flujo de una minibomba osmótica, ésta se puede colocar en un recipiente de volumen conocido y medir la concentración a lo largo del tiempo, Figura 7. La pendiente de la recta que puede ajustarse a tiempos cercanos al inicio es una medida de k_i . Las minibombas tienden a agotarse por ello la concentración tiende a un plateau que es una medida de su capacidad de carga de la sustancia.

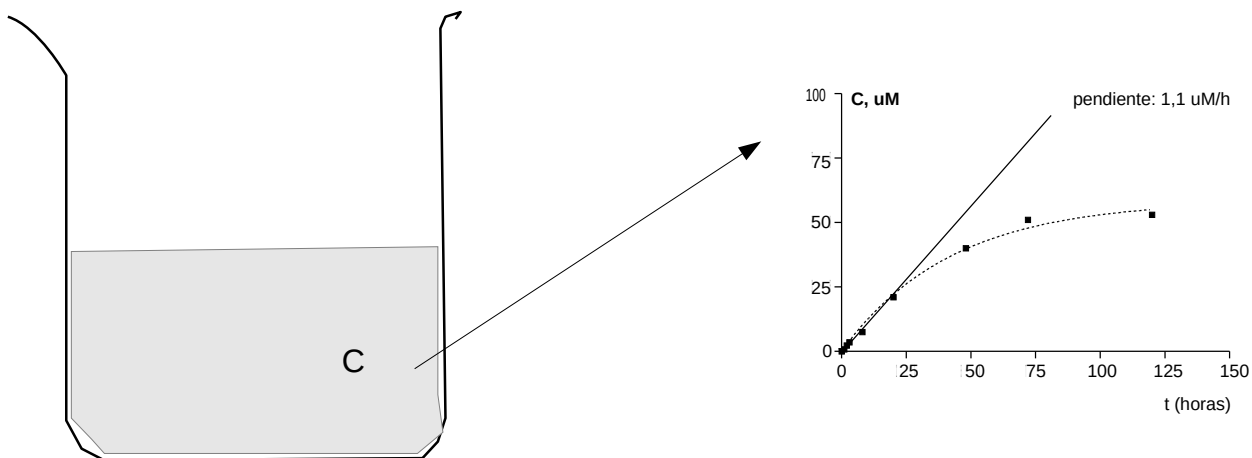


Figura 7

La línea de puntos muestra la variación real de la concentración de la sustancia A en el recipiente, mientras que la línea continua corresponde a la recta que ajusta los valores con un comportamiento lineal cuya pendiente es a modo de ejemplo de $1.1 \mu\text{M}/\text{hora}$. Si el recipiente en que se colocó la

minibomba tiene un volumen de 1 litro, esto indica que cada hora se vuelcan al recipiente $1.1 \mu\text{mol}$ de la sustancia. Este es el flujo de la bomba, el que proporciona un valor de $k_i = 1.1 \mu\text{mol/hora}$.

Aplicaciones y cálculos

Calibración minibomba osmótica

Introduzca en su espacio de trabajo los valores de la tablaR741 de la planilla de cálculo tablaR74.ods/xls. En esta tabla hallamos valores de concentración de un recipiente de 100 ml en que colocamos una bomba osmótica con una solución conteniendo glucosa.

```
> tablaR741<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

vemos nuestros datos

```
> tablaR741
```

	t	C
1	0	0.00
2	1	1.43
3	2	2.72
4	3	3.89
5	4	4.95
6	5	5.90
7	6	6.77
8	7	7.55
9	8	8.26
10	9	8.90
11	10	9.48

los graficamos

```
> plot(tablaR741$t,tablaR741$C,xlab='horas',ylab='mg glucosa/l',las=1,pch=20)
```

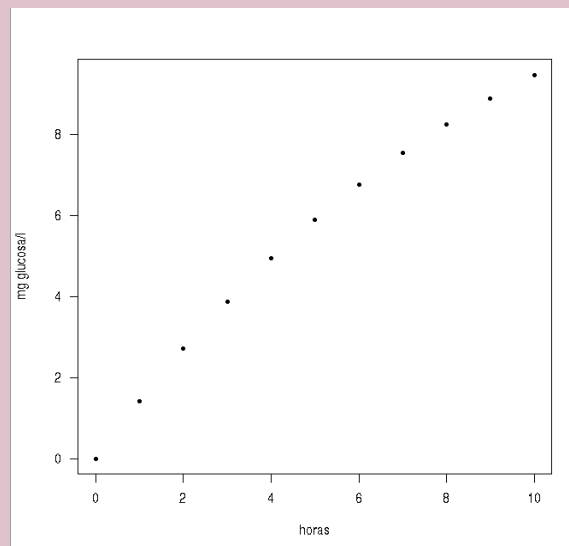


Figura 8

podemos comprobar por la gráfica que la bomba funciona casi linealmente en el tiempo analizado, sin embargo, existe una convexidad, curvatura que se acentúa a partir de las 5 h. Será decisión del investigador elegir el tiempo en que considera que la bomba funciona adecuadamente. Para este ejemplo tomaremos 5 h y calcularemos con esos datos la constante de infusión.

En primer lugar realizamos una regresión lineal, con ordenada al origen 0, ya que el recipiente originalmente no contenía glucosa. Introduciremos una serie de recursos de R para el manejo eficiente de tablas de datos. En primer lugar para hallar la pendiente de la recta aplicamos la función `lm()` que corresponde a un modelo lineal. En este modelo expresamos la concentración (C) en función (~) del tiempo (t). Como verá en la siguiente expresión, a continuación de t colocamos '-1'.

Este código indica a R que deseamos que la regresión pase por el origen de coordenadas y por lo tanto cuando nos de el resultado no nos mostrará la ordenada al origen ya que ésta será cero. Además solo seleccionamos una parte de la tabla que involucra valores para tiempos menores a 6 h, y utilizamos para hacerlo la función subset()

```
> lmtablaR741<-lm(C~t-1,subset(tablaR741,t<6))
```

vemos un detalle del modelo lineal

```
> summary(lmtablaR741)
```

Call:

```
lm(formula = C ~ t - 1, data = subset(tablaR741, t < 6))
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6
7.967e-16	1.965e-01	2.531e-01	1.896e-01	1.618e-02	-2.673e-01

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
t	1.23345	0.02766	44.6	1.07e-07 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.2051 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9975, Adjusted R-squared: 0.997

F-statistic: 1989 on 1 and 5 DF, p-value: 1.07e-07

Los valores resaltados en amarillo nos indican

1.23345: valor de la pendiente de la gráfica es decir cuantos mg/l cambia por hora la concentración del soluto en estudio.

1.07e-07 ***: nos indica que la pendiente mencionada discrepa significativamente de cero, es decir no es un mero error experimental o una suposición de cambio de la concentración en base a la observación del gráfico.

R-squared: 0.9975, nos indica un buen ajuste del modelo lineal a los puntos elegidos.

p-value: 1.07e-07, al ser mucho menor que el nivel de significación que elegimos, que habitualmente es 0.05, nos garantiza una buena elección de la recta como modelo.

Calculamos ahora la k_i , a la que deseamos expresar en mg/min. Para ello debemos recordar que la pendiente está expresada por hora, por lo cual el valor deberá ser dividido por 60. Además el valor de la pendiente está por litro y nuestra bomba fue colocada en un recipiente de 100 ml, 10 veces menor que el litro por lo que deberemos dividir por 10 también el resultados hallando así k_i en mg/min

```
> ki<-1.23345/(60*10)
```

```
> ki
```

```
[1] 0.00205575
```

Calculo de parámetros

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos en una infusión continua con un $k_i = 0.017 \mu\text{mol/min}$ ($1 \mu\text{mol/hora}$).

t	C
0	0,1
60	0,3
120	2,8
180	5,1
240	5,2
300	5,2
310	5,0
320	2,1
330	0,3
340	0,1

Tabla 9

Estos mismos valores se visualizan en la Figura 9. De 0 a 300 minutos se infunde a velocidad constante. En este período está presente la infusión y la excreción. A los 300 minutos se suspende la infusión.

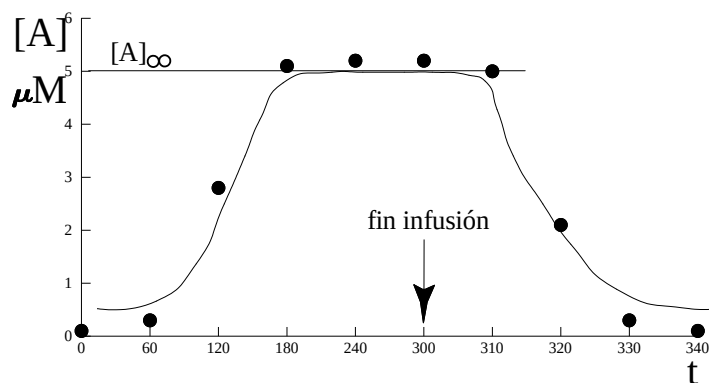


Figura 9

Introducimos los datos de la tablaR742 en R

```
> tablaR742<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

los visualizamos los valores introducidos

```
> tablaR742
```

```

  t    C
1  0  0.1
2 60  0.3
3 120 2.8
4 180 5.1
5 240 5.2
6 300 5.2
7 310 5.0
8 320 2.1
9 330 0.3
10 340 0.1
```

De la Tabla 9 se puede obtener el valor C_{∞} , en este caso podemos estimar que dicho valor es igual a $5.2 \mu\text{M}$.

Al transcurrir 300 minutos se finaliza la infusión, por lo que podemos suponer que a partir de los 310 min la ecuación que ajusta los datos solo contiene el parámetro k_e y su expresión será

$$C = C_0 * e^{-k_e * t}$$

Ecuación 4.

o bien

$$\log C = \log C_0 - k_e * t$$

Ecuación 5.

Si aplicamos un modelo lineal para $t > 300$ minutos se obtiene k_e .

```
> lmtablaR742<-lm(log(C)~t,subset(tablaR742,t>300))
```

vemos el resultado

```
> summary(lmtablaR742)
```

Call:

```
lm(formula = log(C) ~ t, data = subset(tablaR742, t > 300))
```

Residuals:

```
      7      8      9     10  
-0.15406  0.34663 -0.23108  0.03851
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	44.1776	4.5848	9.636	0.0106 *
t	-0.1368	0.0141	-9.704	0.0105 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3153 on 2 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9792, Adjusted R-squared: 0.9688

F-statistic: 94.18 on 1 and 2 DF, p-value: 0.01045

Vemos que la pendiente de la recta toma el valor: -0.1368 min^{-1} , que es significativamente diferente de cero como lo indica el valor 0.0105 del $\text{Pr}(>t)$ y que el ajuste lineal elegido que es bueno, como lo indica el R-squared y el p-value. Así obtenemos uno de los parámetros farmacocinéticos de la droga, es decir su constante de eliminación: $k_e = 0.1368 \text{ min}^{-1}$. Por otro lado el buen ajuste nos está indicando que la elección de orden 1 para el proceso de excreción fue acertado, ya que cuando el orden es 1 el ajuste del logaritmo de la concentración con una recta, debería ser el mejor ajuste. Si el orden del proceso de eliminación no fuera 1, como hemos asumido al elegir este modelo, el $\text{lm}()$ planteado como lo hicimos nos debería haber dado $\text{p-value} > 0.05$.

Conociendo los valores de $k_e = 0.1368 \text{ min}^{-1}$, $k_i = 0.017 \text{ } \mu\text{mol} * \text{min}^{-1}$ y $C_\infty = 5.2 \text{ } \mu\text{mol} * \text{litro}^{-1}$, aplicando la expresión

$$C_\infty = \frac{k_i}{k_e * V_d}$$

nos permitirá obtener el valor de V_d

$$V_d = \frac{k_i}{k_e * C_\infty} = \frac{0.017 \text{ } \mu\text{mol} * \text{min}^{-1}}{0.1368 \text{ min}^{-1} * 5.2 \text{ } \mu\text{mol} * \text{litro}^{-1}} = 0.023 \text{ litros}$$

Si en cambio se utiliza la derivada de la función a tiempo cero para obtener el valor del volumen de distribución, empleando la ecuación deducida anteriormente

$$\frac{\Delta C}{\Delta t}(0) = \frac{k_i}{V_d}$$

Ecuación 6

$$C'_{(0)} = \frac{k_i}{V_d} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{0.3 - 0.1}{60 - 0} = 0.00333 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

despejando V_d

$$V_d = \frac{k_i}{0.00333 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}} = \frac{0.017 \mu \text{mol} \cdot \text{min}^{-1}}{0.00333 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}} = 5.1 \text{ litros}$$

Como se puede observar, el valor del volumen de distribución obtenido usando ambas metodologías es notablemente diferente. La razón principal radica en que al utilizar el cociente incremental como una aproximación de la derivada a tiempo cero, y el intervalo de tiempo empleado ser 60 minutos, el cociente incremental no es una buena aproximación de la derivada para este intervalo de tiempo. Los cálculos anteriores indican que disponer de una ecuación no implica que la misma pueda ser utilizada indiscriminadamente y sin criterio.

Ejercicios de aplicación

¹⁰⁾ La ecuación siguiente expresa la concentración de una sustancia B en función del tiempo durante una infusión

$$[B] = \frac{k_i}{k_e \cdot V_d} * (1 - e^{-k_e * t})$$

donde:

k_i : velocidad de infusión

k_e : velocidad de excreción

V_d : volumen de distribución

a- Calcular V_d conociendo que $k_i = 5 \mu \text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_e = 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $C_{\infty} = [B]_{\text{plateau}} = 10 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

b- Calcular V_d conociendo que $k_i = 5 \mu \text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_e = 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $[B] = 0$ cuando $t = 0$ y $[B] = 0.3 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cuando $t = 2 \text{ min}$.

c- Calcular la velocidad de infusión (k_i), si se desea alcanzar una $[B]_{\text{máxima}} = 15 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, sabiendo que $k_e = 0.01 \text{ min}^{-1}$ y el $V_d = 0.3 \text{ L}$.

¹¹⁾ Se realizó una infusión continua utilizando una minibomba osmótica cuyo flujo medido *in vitro* fue $1 \mu \text{L/hora}$. La solución de llenado de la bomba osmótica tuvo una concentración de 1 mol/L .

10a- 50 litros

b- 33,3 litros

c- 0,045 $\mu \text{mol/min}$

11 a- se obtiene de la tabla: 6.1 $\mu \text{mol/L}$

b- 0.14 $\mu \text{mol/min}$

c- 0.017 $\mu \text{mol/min}$

d- cálculo V_d por C infinito= 0.0204 L. Cálculo por derivada a tiempo cero: 0.0378 L. Sería más confiable el primero ya que se utiliza el valor del plateau que se repitió durante varios minutos, mientras que la derivada se calcula una vez y con un intervalo de 10 minutos.

Se implantó la bomba durante 300 minutos. Luego se retiró y se estudió al animal durante los siguientes 40 minutos. Los valores de concentración plasmática de la sustancia investigada en función del tiempo fueron:

t (minutos)	[sustancia] $\mu\text{mol/L}$
0	0
10	4.5
20	5.7
30	5.9
60	6.1
120	6.1
180	6.1
240	6.1
300	6.1
310	5.0
320	2.1
330	0.3
340	0.1

t (minutos)	[A] mol.L^{-1}	t (minutos)	[A] mol.L^{-1}
0	0	360	0.006
120	0.002	480	0.008
240	0.004	600	0.01

Luego se implantó la bomba en la cavidad peritoneal de un animal. La bomba se llenó con solución 0,5 M. Se determinó en sangre la concentración de A durante 350 minutos. A los 300 minutos se retiró la bomba

t (minutos)	[A] mol.L^{-1}	t (minutos)	[A] mol.L^{-1}
0	0	310	0.01
60	0.34	320	0.008
120	0.45	330	0.0068
180	0.49	340	0.0055
240	0.49	350	0.0046
300	0.49		

- a- Determinar el orden del proceso de infusión y de excreción.
- b- Plantear la ecuación diferencial que expresa la variación de la concentración de la sustancia A en plasma en función del tiempo y hallar la función de ajuste.
- c- Hallar el valor de las constantes de excreción e infusión.

Clase 5

Estudios de absorción en órganos aislados

En este capítulo se describirán experimentos y se desarrollarán modelos aplicados a estudios de absorción y metabolismo de sustancias en órganos aislados *in situ*. La expresión "órgano aislado *in situ*" se refiere a un órgano que se encuentra en el animal, preservando total o parcialmente sus funciones, manteniendo en lo posible la inervación e irrigación sanguínea. A través de ciertas manipulaciones, químicas y quirúrgicas, se logran controlar algunos de los procesos que en él ocurren. Durante la realización del experimento el animal de experimentación permanece vivo, bajo los efectos de algún anestésico. Los modelos que se presentarán a continuación han sido

desarrollados para el estudio de los procesos de absorción del monofluorofosfato (MFP) y el fluoruro de sodio (NaF) en estómago e intestino en la rata. Se discutirán a continuación los experimentos y la interpretación de los datos que permitieron desarrollar los modelos definitivos.

Modelo de estómago aislado

A continuación se estudiará el proceso de absorción gástrica de una o más drogas. En particular serán analizados los procesos de absorción e hidrólisis del MFP. Si el MFP ingresa al estómago a través de la ingesta por vía oral, podemos asignarle al proceso una constante de velocidad k_1 , Figura 1. De la misma manera, el fluoruro que acompaña habitualmente al MFP ingresará al estómago con una constante de velocidad k_7 . Al llegar al estómago, el MFP puede absorberse a través de la mucosa gástrica con una constante k_2 o metabolizarse a fluoruro (F), proceso al que le podemos asignar una constante de velocidad: k_3 . A su vez el F podría absorberse (k_4) a través de la mucosa y pasar al torrente circulatorio. Por último el MFP y el F podrían pasar al duodeno, asignándole a cada proceso una constante de velocidad: k_5 y k_6 , respectivamente. Algunos de estos procesos son ya conocidos, otros son el motivo de la investigación.

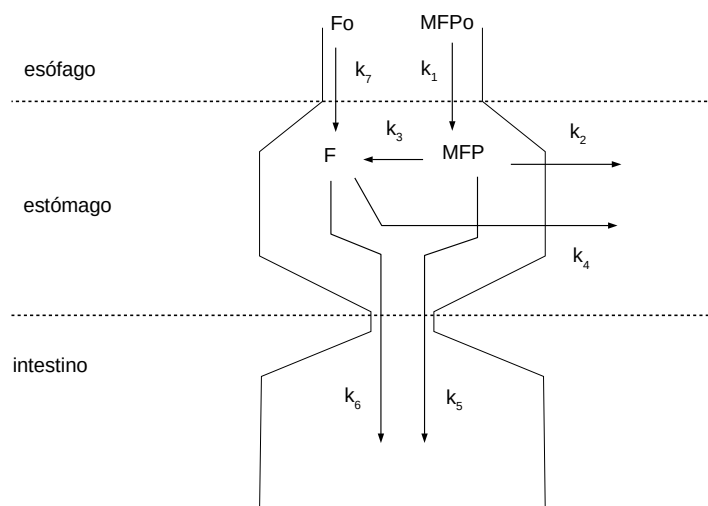


Figura 1

Si se desea conocer el metabolismo en la luz del estómago es conveniente restringir las variables intervinientes. Los siguientes recursos son aplicables con el objetivo de lograr dicha simplificación.

- Bloqueo del pasaje de las sustancias al duodeno mediante ligadura del tubo digestivo a la altura del píloro. Con esta ligadura se logra que k_5 y k_6 sean cero. El estómago se aísla del resto del tubo digestivo, pero mantiene su irrigación e inervación. Este modelo se denomina estómago aislado *in situ*. La ligadura del píloro implica una laparotomía o cirugía que consiste en abrir la pared abdominal, por lo que es imprescindible una anestesia total del animal utilizado.
- Administración de una dosis única a un dado tiempo, utilizando una sonda gástrica. Con esta maniobra, se logra que no exista un proceso continuo de aporte de la sustancia al estómago desde el esófago por lo tanto k_1 y k_7 toman el valor cero.

A la hora de plantear el problema, por supuesto son importantes los conocimientos previos. Al inicio de estos estudios se conocía que

- El MFP se hidroliza y da como productos fluoruro (F^-) y fosfato (P). Si bien este proceso está descrito en intestino no existía información sobre su existencia en estómago, en el momento de desarrollar el modelo.
- El fluoruro se absorbe a nivel gástrico, proceso que es favorecido por la formación de ácido fluorhídrico (HF). Este fenómeno es dependiente del pH, dado que este ácido es débil, su formación está favorecida por el bajo pH que presenta la luz del estómago.

En base a las observaciones anteriores y las restricciones impuestas, se pueden despreciar las constantes k_1 , k_5 , k_6 y k_7 . Sin embargo la posibilidad de absorción de MFP intacto y su metabolización a F^- , no pueden ser descartadas. Por otro lado la absorción de F^- , es un hecho ya comprobado.

Se realizó un experimento de estómago aislado *in situ* y se midió la concentración de MFP y F^- en la luz del estómago, cuyos datos se presentan en la Tabla 10

tiempo (min)	[MFP] mM	[F] mM
0	52 ± 5	12.6 ± 2
15	48 ± 4	13 ± 5
30	37 ± 7	10 ± 2
45	30 ± 4	9 ± 1
60	26 ± 6	8 ± 2
75	24 ± 1	8 ± 1
90	23 ± 2	7 ± 1

Tabla 10: concentraciones (media $\pm$ SD) de MFP y F^- en la luz del estómago luego de colocar 2 ml de MFP 60 mM

Como se puede observar tanto el MFP como el F^- disminuyen a lo largo del tiempo. La disminución de la concentración de MFP determina que no se puedan descartar los procesos de absorción y metabolización a fluoruro, cuyas constantes son k_2 y k_3 . En base a estas observaciones se estableció un modelo preliminar para someter al estudio. El mismo está representado en la Figura 2, donde la dosis F_0 y MFP_0 se coloca a través de sonda orogástrica en la luz del estómago

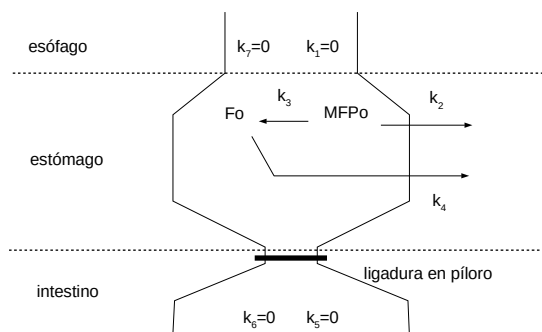


Figura 2

Con el objetivo de determinar la existencia del proceso cuya constante es k_3 se administraron 2 ml de MFP 80 mM a ratas cuyo estómago se había aislado *in situ*. Los animales se ayunaron previamente durante 24 horas para evitar la presencia de alimentos en la luz gástrica. A los 2 minutos de la administración se retiró el contenido del interior del estómago, se colocó en un tubo y se incubó a 37° C durante 385 minutos. Con esta maniobra se logra mezclar la solución de MFP con algún factor que pudiera existir en la luz gástrica y que participara en la metabolización del MFP a F^- . Así luego puede ser estudiado *in vitro*. Se debe notar que al incubarse el contenido gástrico *in vitro*, las constantes k_2 y k_4 se desprecian, ya que *in vitro*, el MFP y el F^- , como tales, no podrían salir del sistema, Figura 3.

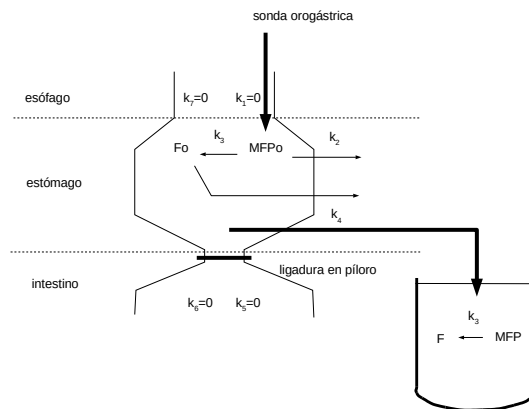


Figura 3

En estas condiciones se determinó la concentración de F^- en función del tiempo en el buffer de incubación. La hipótesis que se maneja es la siguiente: si en el estómago el proceso de transformación de MFP a F tiene lugar, la concentración de F *in vitro* debe aumentar. Los datos que se obtuvieron del proceso son los que se muestran en la Tabla 11.

tiempo (min)	[F] uM
0	5.4 ± 0.4
20	5.6 ± 0.6
70	5.4 ± 0.1
130	5.4 ± 0.5
385	5.1 ± 0.4

Tabla 11: $[F^-]$ en el contenido gástrico incubado *in vitro* ($n=3$)

Los datos de la Tabla 11, se hallan en la planilla de cálculo `tablaR75.ods/xls`, hoja `tablaR751`. Introducimos los datos en nuestro espacio de trabajo para hacer el análisis

```
> tablaR751<-read.table('clipboard',header=T,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

auditamos nuestros datos

```
> tablaR751
```

```
  t  F  sd
1  0 5.4 0.4
2 20 5.6 0.6
3 70 5.4 0.1
4 130 5.4 0.5
5 385 5.2 0.4
```

Se analizan los valores de la concentración de F en función del tiempo mediante regresión lineal. Una pendiente de la regresión significativamente diferente de cero, estaría indicando cambios en la misma. Contrariamente, una valor de pendiente que no discrepe de cero indicaría que el MFP no está transformándose en F. Para cumplir con este análisis utilizamos la función `lm()` que nos permite realizar una regresión lineal de F en función del tiempo

```
> lmtablaR751<-lm(F~t,data=tablaR751)
```

pedimos un resumen del modelo lineal y nos centramos en el valor de la pendiente (t), resaltada en amarillo

```
> summary(lmtablaR751)
```

Call:

```
lm(formula = F ~ t, data = tablaR751)
```

Residuals:

1	2	3	4	5
-0.090856	0.124162	-0.038295	0.006758	-0.001769

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	5.4908558	0.0542531	101.208	2.13e-06 ***
t	-0.0007509	0.0002939	-2.555	0.0836 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.09163 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.6852, Adjusted R-squared: 0.5802

F-statistic: 6.529 on 1 and 3 DF, p-value: 0.08356

se puede ver que la pendiente de la recta que ajusta a los valores de F en función del tiempo no discrepa de cero (-0.0007509 ± 0.0002939 $\mu\text{mol/litro.min}$, $p > 0,05$), por lo que se puede establecer que el proceso de transformación de MFP a F⁻ es despreciable, pudiendo considerar que el valor de $k_3 = 0$.

A esta conclusión también podemos llegar calculando el intervalo de confianza para la pendiente del modelo. Para ello utilizamos la función `confint()`.

```
> confint(lmtablaR751,level=0.95)
```

	2.5 %	97.5 %
(Intercept)	5.318198305	5.6635132768
t	-0.001686073	0.0001843241

La fila t de la tabla anterior tiene el intervalo de confianza para la pendiente con un nivel de confianza de 95%. Como podemos ver el intervalo de confianza incluye al valor cero, lo que nos da más evidencia aun que la pendiente de la recta no discrepa de cero, indicando que la concentración no cambia a lo largo del tiempo.

Con los resultados del experimento anterior se puede suponer que la presencia de algún factor soluble en la luz gástrica es despreciable, pero no se puede descartar la presencia de una enzima de membrana que produjera dicha metabolización o algún factor que fuera secretado a la luz no inmediatamente (dentro de los 2 minutos de preincubación *in situ*). Este último problema sería solucionable si se llenara la luz gástrica con las soluciones en estudio, se mantuvieran a las mismas durante diferentes tiempos y luego de retirar los contenidos de la luz gástrica, se incubaran las soluciones *in vitro* repitiendo el experimento anterior.

En base a los experimentos detallados anteriormente y con las limitaciones impuestas, el modelo para estómago aislado *in situ* luego de una dosis única de MFP queda representado por la Figura 4. Donde el pasaje de MFP a F ha sido descartado.

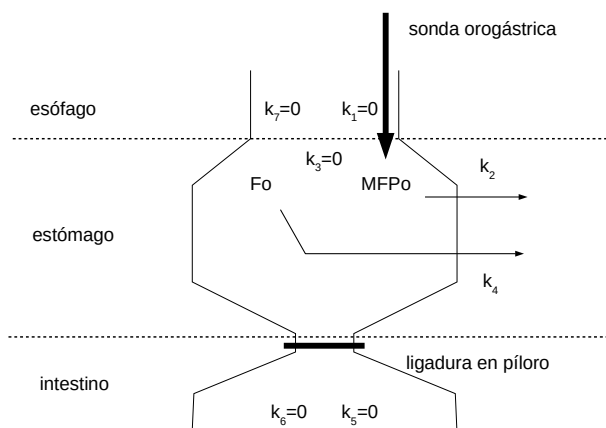


Figura 4

En base a los datos de la Tabla 10, que nos muestra que tanto el F como el MFP decrecen en su concentración a lo largo del tiempo, se puede concluir que el MFP y F desaparecen de la luz gástrica por absorción a través de la mucosa gástrica o bien por unión a algún componente de la pared gástrica. Para dilucidar si se trata de unión a la membrana o absorción se midió flúor en sangre por microdestilación isotérmica (μ DI) después de 15 minutos de haber llenado el estómago aislado *in situ* con las soluciones que se detallan en Tabla 12.

solución de llenado	[F] determinado por μ DI, μ M
MFP 0 mM, NaF 0 mM	1.6 ± 0.5
NaF 80 mM	79.0 ± 14
NaF 80 mM + Al^{+++} 80 mM	1.8 ± 1.0
MFP 80 mM, NaF 5 mM	5.8 ± 1.1
MFP 80 mM, NaF 5 mM + Al^{+++} 5 mM	3.9 ± 0.8

Tabla 12. $[F^-]$ determinada por μ DI en plasma luego de 15 minutos de llenar el estómago con 2 ml de las soluciones de la primer columna ($n=4$, media $\pm$ SD)

Cuando en la luz del estómago se colocó una solución de MFP 0 mM y NaF 0 mM, en el plasma se determinó una concentración de flúor de $1.6 \pm 0.5 \mu$ M. Esta sería la concentración basal en un animal no expuesto a una dosis de compuestos con flúor. Cuando el estómago se llenó con una solución de NaF 80 mM a los 15 minutos en el plasma la concentración de F alcanzó el valor de 79 μ M, lo que está confirmando la absorción de fluoruro a nivel gástrico. Esto indica que el decrecimiento de la concentración de fluoruro a nivel gástrico, se debe en parte a un proceso de absorción. Sin embargo la presencia de absorción no asegura la falta de un proceso de unión a alguna estructura. Cuando se utilizó la misma concentración de fluoruro de sodio, pero simultáneamente con concentraciones equimolares de aluminio, que forma un complejo no absorbible entre ambos elementos, concentraciones plasmáticas compatibles con esta inhibición fueron detectadas en plasma 15 minutos después de colocar la solución en la luz gástrica ($1.8 \pm 1.0 \mu$ M). Cuando se colocó una solución de MFP 80 mM que está acompañada por NaF 5 mM la concentración plasmática asciende a $5.8 \pm 1.1 \mu$ M. En este caso no podemos afirmar que el aumento de la concentración plasmática sea por absorción del MFP. Sin embargo si la solución además tiene aluminio: MFP 80 mM, NaF 5 mM + Al^{+++} 5 mM, la fluoremia es $3.9 \pm 0.8 \mu$ M. Este último dato

indica que aun cuando el F no se absorbe por la unión a aluminio, el MFP se absorbe y no forma complejo con el Al^{+++} .

En base a las observaciones realizadas hasta este momento se podría afirmar que la disminución de la concentración de MFP en la luz gástrica se debe a absorción a través de la mucosa gástrica y no por hidrólisis a fluoruro. Obviamente no se puede descartar que la unión a estructuras tisulares no existe, pero al menos se puede afirmar que ese no es el único proceso que determina la disminución de la concentración de MFP en el estómago.

Desarrollo del modelo matemático

A continuación se realiza la deducción de una ecuación para modelizar el proceso. Si bien este proceso es sencillo, utilizaremos herramientas matemáticas para llegar a la ecuación, utilizando una metodología que nos permitirá luego resolver casos más complejos. La ecuación diferencial que representaría el proceso de desaparición de MFP a nivel gástrico quedaría representada de la siguiente manera

$$\frac{dMFP}{dt} = -k_2 * MFP^0$$

En base a los datos de MFP de la Tabla 10, deduciremos el orden más adecuado para nuestro modelo. Utilizaremos los valores de las medias, los cuales puede hallar en la tablaR752 de la planilla de cálculo tablaR75.ods/xls. Introducimos los datos en nuestro espacio de trabajo

```
> tablaR752<-read.table('clipboard',header=T,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

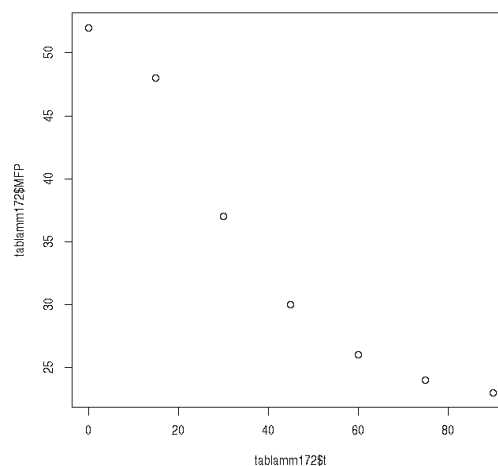
controlamos los datos introducidos

```
> tablaR752
```

	t	MFP	SD	F	SD
1	0	52	5	12.6	2
2	15	48	4	13.0	5
3	30	37	7	10.0	2
4	45	30	4	9.0	1
5	60	26	6	8.0	2
6	75	24	1	8.0	1
7	90	23	2	7.0	1

graficamos los datos de MFP en función del tiempo

```
> plot(tablaR752$t,tablaR752$MFP)
```



La gráfica no parece que pueda ser bien ajustada por una función lineal, indicando un orden 0. Por lo tanto en primer lugar probamos la regresión lineal del log(MFP) vs t para evaluar un posible orden 1

```
> lmtablaR752MFP<-lm(log(MFP)~t,data=tablaR752)
```

observamos el resultado. Vemos resaltado el valor del coeficiente de correlación: 0.9523 y el valor de k2 para este ajuste: 0.0099675

```
> summary(lmtablaR752MFP)
```

Call:

```
lm(formula = log(MFP) ~ t, data = tablaR752)
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6	7
0.016104	0.085574	-0.025196	-0.085403	-0.078991	-0.009521	0.097433

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.9351397	0.0539407	72.953	9.17e-09 ***
t	-0.0099675	0.0009974	-9.994	0.000171 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.07916 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9523, Adjusted R-squared: 0.9428

F-statistic: 99.88 on 1 and 5 DF, p-value: 0.0001715

ahora probamos la regresión entre MFP y t, evaluando el orden=0. De esta manera podremos verificar nuestra presunción.

```
> lmtablaR752MFP<-lm(MFP~t,data=tablaR752)
```

vemos el resultado y remarcamos el coeficiente de correlación: 0.9178 y un valor de k2= -0.34762, resaltado en el análisis que vemos a continuación

```
> summary(lmtablaR752MFP)
```

Call:

```
lm(formula = MFP ~ t, data = tablaR752)
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6	7
2.0714	3.2857	-2.5000	-4.2857	-3.0714	0.1429	4.3571

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	49.92857	2.51546	19.849	6e-06 ***
t	-0.34762	0.04651	-7.474	0.000677 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3.692 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9178, Adjusted R-squared: 0.9014

F-statistic: 55.86 on 1 and 5 DF, p-value: 0.0006771

El mayor coeficiente de correlación para la regresión lineal entre el log(MFP) comparado con la regresión lineal entre MFP y t, nos inclina por elegir un orden = 1, con un valor de $k_2 = 0.0099675$. De esta manera, aceptando como orden el valor 1, la ecuación diferencial se simplifica a

$$\frac{dMFP}{dt} = -k_2 * MFP$$

Esta última ecuación diferencial es posible de resolver utilizando el método a variables separables por lo tanto de sencilla resolución. Podemos hacerlo también aplicando transformadas de Laplace. Con esta última se obtiene:

$$s * \overline{MFP} - MFP_o = -k_2 * \overline{MFP}$$

reagrupando

$$\overline{MFP} * (s + k_2) = MFP_o$$

despejando la transformada de MFP

$$\overline{MFP} = \frac{MFP_o}{(s + k_2)}$$

y aplicando la antitransformada se obtiene la función para la cantidad de MFP en la luz gástrica en función del tiempo

$$MFP = MFP_o * e^{-k_2 * t}$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de la luz gástrica

$$\frac{MFP}{V} = \frac{MFP_o}{V} * e^{-k_2 * t}$$

obtenemos la ecuación para la concentración, que supone un orden 1 del proceso de absorción

$$C = C_o * e^{-k_2 * t}$$

Donde C es la concentración de MFP en la luz gástrica en un dado tiempo. C_o es la concentración inicial al colocar la solución en el estómago y k_2 la constante de velocidad de absorción del MFP en el estómago.

Ejercicio

¹³⁾ Se está evaluando la metabolización y absorción de una droga A en la luz del estómago. La droga se colocó en la luz del estómago, aislando el mismo del flujo gastrointestinal, por una ligadura a la altura del píloro. Se extrajeron muestras del contenido gástrico a los tiempos indicados en la

-
- 13 a) La droga A desaparece de la luz gástrica con orden 1. El mejor ajuste se logró con el log(A) vs t y su constante de absorción fue: $-0.0100610 \text{ min}^{-1}$. Siendo este valor significativamente diferente de cero, conclusión fundada en el valor de p: $1.917e-13$. Los ordenes cero y dos si bien también fueron significativos, tuvieron valores de R-squared menores que el logrado con el logaritmo: 0.9903, p-value: $1.917e-13$.
- b) La droga no sufre metabolización, al menos en el experimento de incubación. Avalan el resultado los valores de las constantes de decaimiento halladas para orden 0, 1 y 2, respectivamente: $k(\text{orden } 0) = -0.01429$, $p = 0.878$, $k(\text{orden } 1) = -0.0002153$, $p = 0.869$ y $k(\text{orden } 2) = 3.229e-06$, $p = 0.861$.
- c) La comparación de los valores de A de la solución 1 con la solución 2, no da diferencias significativas, aplicando t de Student. Para ello se utilizó la función `t.test()` de R con el siguiente código: `t.test(tablaR755$A[tablaR755$solucionLlenado==1], tablaR755$A[tablaR755$solucionLlenado==2])`. El valor de p-value=0,3685 indica que no hay diferencias entre la concentración sanguínea si el estómago está lleno con una solución sin A o con A..

tablaR753 de la planilla de cálculo tablaR75.ods/xls y se midió la concentración de la sustancia A. El experimento se realizó por duplicado.

En otro experimento se colocó una solución de la misma concentración y luego de 2 minutos se extrajo para su incubación durante 30 minutos en un tubo a 37°C. Los resultados de la incubación se muestran en la tablaR754.

Por otra parte se determinó la concentración en sangre de la sustancia A realizando un experimento de estómago aislado en que se utilizaron dos soluciones de llenado del estómago: solución 1: sin agregado de la droga A y solución 2: con la droga A en la concentración de 75 ppm, similar a la utilizada en los experimentos anteriores. Se realizaron mediciones a los 20, 30 y 40 minutos. Los resultados se muestran en la tablaR755.

a- Indicar si la droga A desaparece de la luz gástrica y de hacerlo con que orden es compatible el proceso

b- Indicar si la droga A sufre metabolización en la luz del estómago.

c- Indicar si la droga se absorbe o se fija a alguna estructura del órgano.

Modelo de intestino aislado

Para estudios de absorción o metabolización intestinal de una sustancia se puede utilizar el modelo de intestino aislado *in situ*. Este modelo es similar al realizado con el estómago aislado de la rata y se analizarán experimentos, desarrollando un modelo para el estudio de la absorción de MFP.

Luego de una dosis oral de MFP, al intestino llega una fracción del MFP y del F, provenientes del estómago. En el intestino existen las posibilidades de metabolización, excreción y absorción de las sustancias, procesos cuyas constantes de velocidad son k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , k_7 , Figura 5.

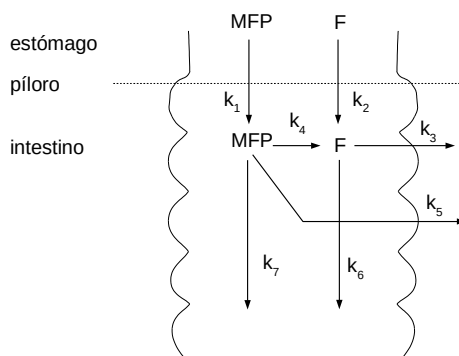


Figura 5

Con el propósito de simplificar el estudio y circunscribir el mismo al intestino, se aísla el intestino *in situ*. Para cumplir con este objetivo, se practican dos ligaduras, una en el píloro y otra aproximadamente 4 cm más adelante del mencionado esfínter. En una de las dos ligaduras se coloca un catéter, por el cual se introducirán las soluciones y se extraerán las muestras. Utilizando este recurso se logra independizar el estudio del pasaje del estómago al intestino y de la eliminación de ambas sustancias por materia fecal. De esta manera k_1 , k_2 , k_6 y k_7 se consideran iguales a cero. Con la operatoria mencionada el sistema en estudio queda reducido a lo representado por la Figura 6.

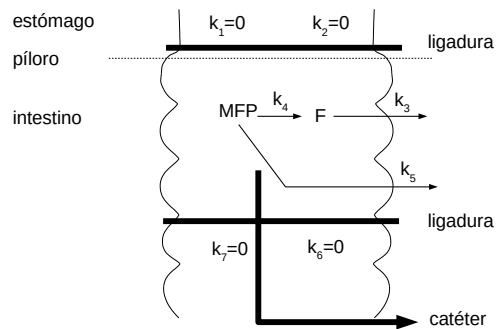


Figura 6

En este modelo se representará con k (constante total de desaparición) a la suma de las constantes de hidrólisis del MFP (k_4) y constante de absorción del MFP (k_5). La constante k es la constante de velocidad del proceso de desaparición del MFP de la luz intestinal, sin discriminar los procesos de hidrólisis y absorción

$$k = k_4 + k_5$$

Se realizó un experimento con fines exploratorios. Los resultados de éste serán posteriormente utilizados para obtener las constantes de velocidad. En este experimento se colocaron por el catéter 2 ml de una solución de MFP 80 mM en el interior del intestino aislado. Se debe recordar que aún en los casos de contar con la droga MFP de gran pureza, siempre estará presente el fluoruro. Durante 90 minutos se extrajeron muestras de 100 μ l. En estas soluciones, utilizando las técnicas descritas anteriormente, se determinaron las concentraciones de fluoruro y MFP. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 13.

t, min	MFP, mM	F, mM
0	64,5 $\pm$ 13	4,2 $\pm$ 2
15	40,9 $\pm$ 18	25,8 $\pm$ 9
30	15,4 $\pm$ 13	39,7 $\pm$ 4,7
45	9,5 $\pm$ 1	44,6 $\pm$ 8,5
60	3,1 $\pm$ 0,5	39,0 $\pm$ 12,5
75	0	26,9 $\pm$ 12,1
90	0	19,9 $\pm$ 9,8

Tabla 13. Concentraciones de MFP y F⁻ en la luz intestinal luego de llenarlo con MFP 80 mM

De la observación de los valores obtenidos, se puede deducir que no existen procesos que puedan ser despreciados. La disminución de la concentración de MFP, a lo largo del tiempo está indicando que k , no puede ser considerada cero. Los valores de la concentración de F⁻ correspondientes a los tiempos comprendidos en el intervalo 0 - 45 minutos, indican que k_4 es diferente de cero. Esta afirmación se basa en la observación de un incremento en la concentración del anión fluoruro. A priori es imposible deducir si k_5 será o no diferente de cero. Por otra parte el decaimiento de la concentración del fluoruro en tiempos superiores a los 45 minutos está indicando que el ion fluoruro desaparece de la luz intestinal, muy probablemente por absorción a través de la mucosa.

Utilizando los valores de MFP de la Tabla 13, se puede hacer un primer análisis. Utilizando las medias de MFP de la Tabla 13, podemos analizar el orden del proceso a través del análisis de las regresiones de MFP, log(MFP) y 1/MFP en función del tiempo. Estos datos se hallan en la tablaR756 de la planilla de cálculo tablaR75.ods/xls, que introducimos a nuestro espacio de trabajo.

```
> tablaR756<-read.table('clipboard',header=T,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

comprobamos el ingreso correcto

```
> tablaR756
```

	t	MFP	SD	F	SD
1	0	64.5	13.0	4.2	2.0
2	15	40.9	18.0	25.8	9.0
3	30	15.4	13.0	39.7	4.7
4	45	9.5	1.0	44.6	8.5
5	60	3.1	0.5	39.0	12.5
6	75	0.0	0.0	26.9	12.1
7	90	0.0	0.0	19.9	9.8

podemos comprobar los formatos numéricos

```
> summary(tablaR756)
```

t	MFP	SD	F	SD.1
Min. : 0.0	Min. : 0.00	Min. : 0.00	Min. : 4.20	Min. : 2.000
1st Qu.: 22.5	1st Qu.: 1.55	1st Qu.: 0.25	1st Qu.: 22.85	1st Qu.: 6.600
Median : 45.0	Median : 9.50	Median : 1.00	Median : 26.90	Median : 9.000
Mean : 45.0	Mean : 19.06	Mean : 6.50	Mean : 28.59	Mean : 8.371
3rd Qu.: 67.5	3rd Qu.: 28.15	3rd Qu.: 13.00	3rd Qu.: 39.35	3rd Qu.: 10.950
Max. : 90.0	Max. : 64.50	Max. : 18.00	Max. : 44.60	Max. : 12.500

realizamos las regresiones lineales para evaluar el orden del proceso de desaparición de MFP, comenzando con la regresión entre concentración y tiempo en búsqueda de comprobar si es de orden 0

```
> lm(tablaR756 ~ t, data = tablaR756[c(1:5),])
```

```
> summary(lm(tablaR756 ~ t, data = tablaR756[c(1:5),]))
```

Call:

```
lm(formula = MFP ~ t, data = tablaR756[c(1:5),])
```

Residuals:

1	2	3	4	5
6.98	-1.20	-11.28	-1.76	7.26

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	57.5200	6.8294	8.422	0.00351 **
t	-1.0280	0.1859	-5.531	0.01165 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 8.817 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9107, Adjusted R-squared: 0.8809

F-statistic: 30.59 on 1 and 3 DF, p-value: 0.01165

ahora verificamos los datos para orden 1

```
> lm(log(MFP) ~ t, data = tablaR756[c(1:5),])
```

```
> summary(lm(log(MFP) ~ t, data = tablaR756[c(1:5),]))
```

Call:

```
lm(formula = log(MFP) ~ t, data = tablaR756[c(1:5),])
```

Residuals:

	1	2	3	4	5
	-0.1384	0.1591	-0.0646	0.2054	-0.1615

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.305044	0.152902	28.16	9.84e-05 ***
t	-0.050202	0.004161	-12.06	0.00123 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1974 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9798, Adjusted R-squared: 0.9731

F-statistic: 145.5 on 1 and 3 DF, p-value: 0.001226

y orden 2

```
> lmtablaR756<-lm(1/MFP~t,tablaR756[c(1:5),])
> summary(lmtablaR756)
```

Call:

lm(formula = 1/MFP ~ t, data = tablaR756[c(1:5),])

Residuals:

	1	2	3	4	5
	0.04795	-0.01260	-0.04161	-0.07078	0.07704

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.032447	0.055018	-0.590	0.5968
t	0.004633	0.001497	3.094	0.0535 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.07103 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.7614, Adjusted R-squared: 0.6819

F-statistic: 9.574 on 1 and 3 DF, p-value: 0.05354

Resumen los análisis anteriores

orden 0 k= -1.0280 R-squared: 0.9107

orden 1 k= -0.050202 R-squared: 0.9798

orden 2 k= 0.004633 R-squared: 0.7614

El mejor ajuste se halló para orden 1, tomamos entonces para valor de k= 0.050202

Si el orden es 1 podríamos plantear una ecuación diferencial para la desaparición de MFP de la siguiente manera

$$\frac{dMFP}{dt} = -k * MFP$$

que es igual en su forma a la planteada para estómago aislado y cuya resolución (que omitiremos por ser igual) nos da la siguiente solución

$$C = C_0 * e^{-k * t}$$

A continuación se analizarán los datos de la concentración de fluoruro. De la observación de los valores de MFP de la Tabla 13, se puede deducir que más allá de los 60 minutos, el proceso de hidrólisis es despreciable, evidenciado por valores de MFP que no discrepan de 0. La ausencia casi total de MFP en la luz intestinal y el franco decaimiento de la concentración de fluoruro son las pruebas de esa afirmación. Por lo tanto para tiempos mayores a 60 minutos se puede afirmar que sólo estaría presente el proceso cuya constante de velocidad es k_3 .

Realizamos los análisis de las regresiones de la concentración de fluoruro para los tiempos indicados suponiendo orden 0, 1 y 2, como hemos realizado anteriormente

Para el caso de orden 0, que analizamos con la regresión lineal F vs t , obtenemos

```
> lmtablaR756<-lm(F~t,tablaR756[c(5:7),])
```

```
> summary(lmtablaR756)
```

Call:

```
lm(formula = F ~ t, data = tablaR756[c(5:7), ])
```

Residuals:

```
5    6    7
0.85 -1.70 0.85
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	76.35000	7.45872	10.236	0.0620 .
t	-0.63667	0.09815	-6.487	0.0974 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.082 on 1 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9768, Adjusted R-squared: 0.9536

F-statistic: 42.08 on 1 and 1 DF, p-value: 0.09738

para orden 1, es decir el análisis de la regresión $\log(F)$ vs t , hallamos

```
> lmtablaR756<-lm(log(F)~t,tablaR756[c(5:7),])
```

```
> summary(lmtablaR756)
```

Call:

```
lm(formula = log(F) ~ t, data = tablaR756[c(5:7), ])
```

Residuals:

```
5    6    7
0.01167 -0.02334 0.01167
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.997574	0.102417	48.80	0.0130 *
t	-0.022428	0.001348	-16.64	0.0382 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.02859 on 1 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9964, Adjusted R-squared: 0.9928

F-statistic: 276.9 on 1 and 1 DF, p-value: 0.03821

Analizamos ahora el orden 2

```
> lmtablaR756<-lm(1/F~t,tablaR756[c(5:7),])
```

```
> summary(lmtablaR756)
```

para orden 2, analizamos la regresión 1/F vs t

Call:

lm(formula = 1/F ~ t, data = tablaR756[c(5:7),])

Residuals:

	5	6	7
	0.0002571	-0.0005143	0.0002571

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-2.384e-02	2.256e-03	-10.56	0.0601 .
t	8.203e-04	2.969e-05	27.63	0.0230 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0006299 on 1 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9987, Adjusted R-squared: 0.9974

F-statistic: 763.3 on 1 and 1 DF, p-value: 0.02303

Resumiendo los datos de las regresiones tenemos

orden 0 k_3 : -0.63667 R-squared: 0.9768

orden 1 k_3 : -0.022428 R-squared: 0.9964

orden 2 k_3 : 8.203e-04 R-squared: 0.9987

Vemos que el mejor ajuste corresponde a orden 2, sin embargo siendo tan pequeña la diferencia con el orden 1 y considerando que el análisis está siendo realizado con un número reducido de datos como para afirmar con un alto grado de confianza qué orden tiene el proceso, se sugiere utilizar el orden 1 que es más explicable y entendible para un proceso de absorción de F, apoyado en parte que las experimentaciones anteriores indicarían que el proceso es una difusión simple, proporcional a la concentración. Con estos datos entonces aceptamos que k_3 tiene un valor de $-0.022428 \pm 0.001348 \text{ min}^{-1}$.

En base a estas observaciones se puede afirmar que la concentración de fluoruro en la luz del intestino es un proceso de primer orden ajustado por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF}{dt} = -k_3 * F$$

cuya resolución daría una función exponencial con el siguiente formato

$$C = C_o * e^{-k_3 * t}$$

donde C es la concentración de F a un dado tiempo y C_o la concentración inicial colocada en la luz intestinal.

Con el fin de verificar este valor de la constante k_3 se realizó un experimento en que se llenó el intestino *in situ* con una solución de F 80 mM, en ausencia de MFP, permitiendo observar solo el proceso de absorción de F, por un tiempo más prolongado, los datos se muestran en la Tabla 14

tiempo, min	F^- mM	n
0	75 ± 4	3
15	72 ± 7	3
30	61 ± 6	3
45	49 ± 5	3
60	40 ± 4	3
75	31 ± 6	3
90	23 ± 4	3
105	19 ± 5	3
120	19 ± 1	3

Tabla 14: concentración de F^- en la luz intestinal luego de llenar la luz con NaF 80 mM

El modelo queda representado en la Figura 7

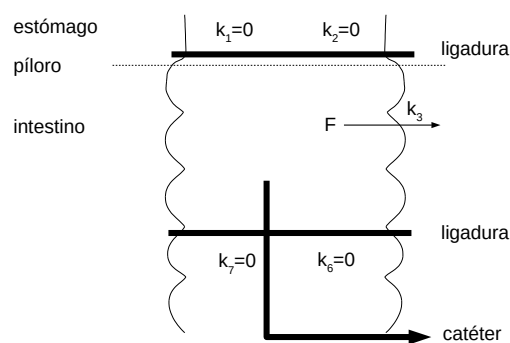


Figura 7

Estos datos se hallan en la hoja tablaR757 de la planilla de cálculo tablaR75.ods/xls de esta clase. Introdúzcala en su espacio de trabajo y luego realice las regresiones lineales de F vs t , $\log(F)$ vs t y $1/F$ vs t . No desarrollamos todo el proceso y solo resumimos los valores de k y R-squared para los tres órdenes investigados.

orden 0 k_3 : -0.53000 R-squared: 0.965
orden 1 k_3 : -0.0132194 R-squared: 0.9763
orden 2 k_3 : 3.772e-04 R-squared: 0.9365

vemos que el ajuste es mejor con orden 1, por lo que nos inclinamos por él y además comprobamos que el valor de k_3 hallado no es muy diferente del hallado en presencia del MFP.

Con el fin de investigar el proceso de hidrólisis del MFP en la luz intestinal, se llenó el intestino con una solución de MFP 80 mM, Figura 8.

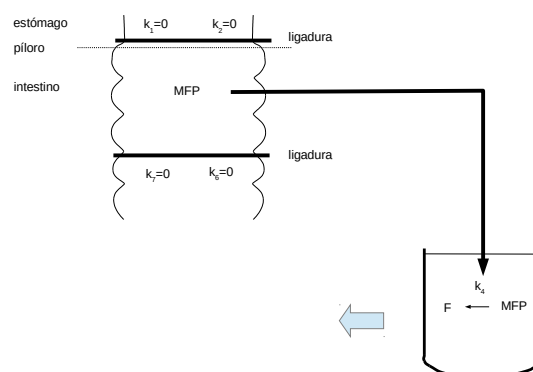


Figura 8

Luego de 5 minutos se extrajo el contenido y se lo incubó *in vitro* a $37^\circ C$ durante 90 minutos. De esta manera se pudo estudiar el proceso de hidrólisis anulando el proceso de absorción intestinal. A

intervalos de 15 minutos se extrajeron alícuotas del incubado y se determinó la concentración de fluoruro y monofluorofosfato de sodio. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tiempo	[F ⁻], mM	[MFP] mM
0	6 ± 3	74 ± 5
15	10 ± 9	63 ± 16
30	21 ± 4	58 ± 9
45	29 ± 10	45 ± 5
60	39 ± 4	39 ± 4
75	41 ± 15	30 ± 6
90	65 ± 1	20 ± 4

Tabla 15. Incubación de contenido de intestino

Estos resultados indican que el MFP se hidroliza a F⁻ en la luz intestinal. Una disminución de la concentración de MFP y aumento de F solo es compatible en este sistema *in vitro*, si existe un proceso de hidrólisis y el mismo es llevado a cabo de manera espontánea por un factor soluble.

El MFP es un sustrato de la fosfatasa alcalina. Para comprobar que el proceso de hidrólisis es llevado a cabo por dicha enzima, se realizó un experimento similar al descrito pero en presencia de L-fenilalanina (FAL, inhibidor específico de la fosfatasa alcalina intestinal). Se llenó el intestino con solución de MFP 80 mM en un grupo de animales en presencia de FAL 14 mM y en el grupo control en ausencia del aminoácido fenilalanina. A los 5 minutos se extrajo la solución y se incubó a 37 °C. A los tiempos indicados en la Tabla 16 se extrajeron alícuotas y se determinó la concentración de MFP remanente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

tiempo, min	[FAL]=0	[FAL]=14mM
0	99	97
1	97	97
2	94	96
5	85	96
10	71	93
15	56	89
20	50	85
25	43	82
30	30	77
45	22	72

Tabla 16. Concentración de MFP (mM) en asa intestinal aislada

Los datos de este experimento, sin sus SD se hallan en la tablaR758 de la planilla de cálculo tablaR75.ods/xls.

Introducimos los datos en nuestro espacio de trabajo

```
> tablaR758<-read.table('clipboard',header=T,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

```
> tablaR758
```

```
t fal0 fal14
```

```
1 0 99 97
2 1 97 97
3 2 94 96
4 5 85 96
5 10 71 93
6 15 56 89
```



```
7 20 50 85
8 25 43 82
9 30 30 77
10 45 22 72
```

Analizamos el orden 0 en primer lugar

```
> lmtablaR758<-lm(fal0~t,tablaR758)
> summary(lmtablaR758)
```

Call:

```
lm(formula = fal0 ~ t, data = tablaR758)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-9.261	-5.335	-1.261	5.268	12.858

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	93.3206	3.5004	26.66	4.22e-09 ***
t	-1.8706	0.1687	-11.09	3.91e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 7.477 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9389, Adjusted R-squared: 0.9313

F-statistic: 122.9 on 1 and 8 DF, p-value: 3.907e-06

ahora orden 1

```
> lmtablaR758<-lm(log(fal0)~t,tablaR758)
> summary(lmtablaR758)
```

Call:

```
lm(formula = log(fal0) ~ t, data = tablaR758)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.143034	0.000092	0.015171	0.018839	0.074052

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.598713	0.029153	157.75	2.92e-15 ***
t	-0.035149	0.001405	-25.02	6.97e-09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.06227 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9874, Adjusted R-squared: 0.9858

F-statistic: 625.8 on 1 and 8 DF, p-value: 6.975e-09

y finalmente orden 2

```
> lmtablaR758<-lm(1/(fal0)~t,tablaR758)
> summary(lmtablaR758)
```

Call:

```
lm(formula = 1/(fal0) ~ t, data = tablaR758)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.0039058	-0.0015703	0.0006232	0.0020815	0.0028666

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	7.879e-03	1.213e-03	6.493	0.000189 ***
t	7.713e-04	5.848e-05	13.190	1.04e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.002592 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.956, Adjusted R-squared: 0.9505

F-statistic: 174 on 1 and 8 DF, p-value: 1.04e-06

Si analizamos todos los valores para los tres ordenes investigados

orden 0: k4: -1.8706 R-squared: 0.9389

orden 1, k4: -0.035149 R-squared: 0.9874

orden 2, k4: 7.713e-04 R-squared: 0.956

vemos que el mejor ajuste es con orden 1. Por ello seguimos con este orden y a continuación analizamos el valor de k4 en presencia del inhibidor de fosfatasa alcalina, fenilalanina.

```
> lm(tablaR758 ~ log(fal14) + t, data = tablaR758)
```

```
> summary(lm(tablaR758 ~ log(fal14) + t, data = tablaR758))
```

Call:

```
lm(formula = log(fal14) ~ t, data = tablaR758)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.0283119	-0.0065842	-0.0009026	0.0110119	0.0178940

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.586000	0.006909	663.74	< 2e-16 ***
t	-0.007129	0.000333	-21.41	2.38e-08 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.01476 on 8 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9828, Adjusted R-squared: 0.9807

F-statistic: 458.4 on 1 and 8 DF, p-value: 2.384e-08

comparamos los valores de las constantes sin y con Fenilalanina

FAL=0 orden 1, k4= -0.035149 R-squared: 0.9874

FAL=14 orden 1, k4= -0.007129 R-squared: 0.9828

Vemos una reducción de la constante k_4 de aproximadamente 5 veces en presencia de fenilalanina. Esto en gran medida nos indica que el proceso analizado está catalizado por la enzima en cuestión. Los datos hacen ilusionar al investigador, pensando en la posibilidad de inhibir el proceso gobernado por k_4 y de esta manera poder observar el proceso de absorción de MFP intacto cuya constante es k_5 , Figura 9. Si la inhibición pudiera llevarse a cabo, el decaimiento de la concentración de MFP daría el valor de k_5 y la respuesta a la pregunta si el MFP se absorbe o no en el intestino.

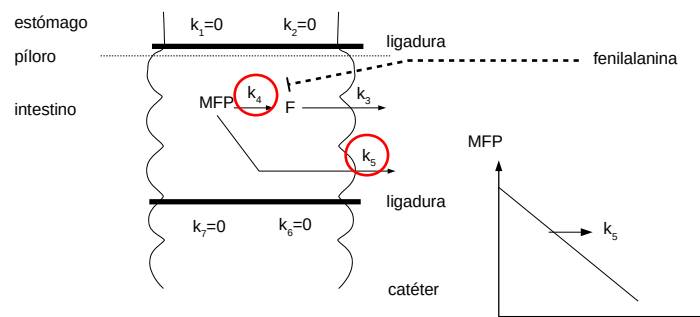


Figura 9

Aún con concentraciones muy elevadas de fenilalanina no se logró una inhibición completa de la hidrólisis. Esto puede deberse a que existe en intestino una fracción de la fosfatasa alcalina insensible a la inhibición por fenilalanina [x]. La imposibilidad de producir una hidrólisis completa no permite utilizar al aminoácido para inhibir la hidrólisis *in vivo* y medir de esta manera el proceso de absorción de MFP intacto cuya constante de velocidad llamamos k_5 . Por lo tanto si bien es posible afirmar que el proceso de hidrólisis de MFP a F^- existe, es imposible con estos datos verificar la presencia o ausencia del proceso de absorción de MFP intacto.

Por lo tanto, en base a las evidencias obtenidas con los experimentos descriptos se aceptó como modelo el planteado en Figura 10.

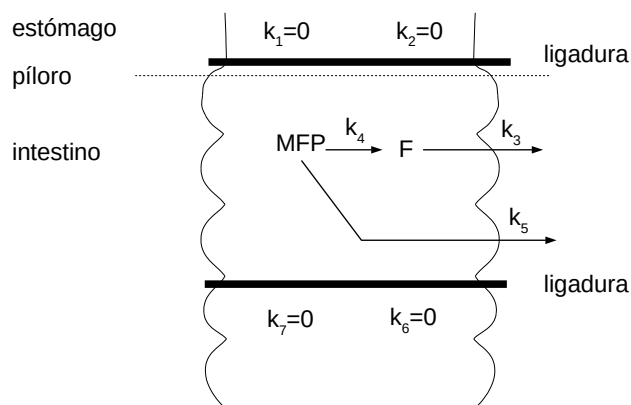


Figura 10

Las constantes k_3 y k_4 han sido verificadas mientras que el proceso cuya constante es k_5 no ha sido aún comprobado. Definimos una constante global de desaparición del MFP, como la suma de la constante de hidrólisis y la supuesta constante de absorción

$$k = k_4 + k_5$$

plantemos un modelo de orden 1

$$\frac{dMFP}{dt} = -k * MFP$$

aplicando Transformadas de Laplace

$$s * \overline{MFP} - MFP_o = -k * \overline{MFP}$$

$$\overline{MFP} * (s+k) = MFP_o$$

$$\overline{MFP} = \frac{MFP_o}{(s+k)}$$

Ecuación 1

aplicando antitransformadas

$$MFP = MFP_o * e^{-k*t}$$

dividiendo por volumen:

$$C = C_o * e^{-k*t}$$

que corresponde a la ley que ajusta la concentración de MFP en el intestino en función del tiempo. Para la cantidad de fluoruro en la luz del intestino podemos plantear la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF}{dt} = k_4 * MFP - k_3 * F$$

aplicando las Transformadas de Laplace correspondiente a cada miembro de la ecuación anterior, obtenemos:

$$s * \overline{F} - F_o = k_4 * \overline{MFP} - k_3 * \overline{F}$$

suponemos que $F_o = 0$ (si el MFP tiene un grado de hidrólisis pequeño esta aproximación es correcta)

$$s * \overline{F} = k_4 * \overline{MFP} - k_3 * \overline{F}$$

reemplazando la transformada de la cantidad de MFP en el intestino (Ecuación 1), resulta

$$s * \overline{F} = k_4 * \left(\frac{MFP_o}{s+k} \right) - k_3 * \overline{F}$$

$$(s+k_3) * \overline{F} = k_4 * \left(\frac{MFP_o}{s+k} \right)$$

$$\overline{F} = \frac{k_4 * MFP_o}{(s+k)(s+k_3)}$$

aplicando las antitransformadas para ambos miembros de la expresión anterior obtenemos:

$$F = \frac{k_4 * MFP_o}{k_3 - k} * (e^{-k*t} - e^{-k_3*t})$$

dividiendo ambos miembros por el volumen:

$$C_F = \frac{k_4 * C_{MFP0}}{k_3 - k} * (e^{-k*t} - e^{-k_3*t})$$

se obtiene la ley que ajusta la concentración de F⁻ en la luz del asa intestinal aislada. Se le debe sumar [F₀⁻] si el MFP tiene un porcentaje de hidrólisis importante. Si se analiza esta expresión para t > 45 minutos, se puede suponer que la desaparición del MFP fue total y por lo tanto el término e^{-kt} = 0. Por lo tanto la expresión queda reducida a

$$C_F = \frac{-k_4 * C_{MFP0}}{k_3 - k} * e^{-k_3*t}$$

Si aplicamos log a ambos miembros obtenemos una recta, cuya pendiente es -k₃. Como se puede observar esto fundamenta el modo en que se obtuvo la constante k₃ anteriormente.

El problema que se planteó a esta altura del análisis fue hallar el valor de k₄. Dado que los valores de k₃ y k han sido obtenidos de las correlaciones entre log(C_F) y log(C_{MFP}) y el tiempo, se puede calcular el valor de k₄ utilizando dichos valores, la ecuación para la concentración de F⁻ y los valores experimentales de la Tabla 13.

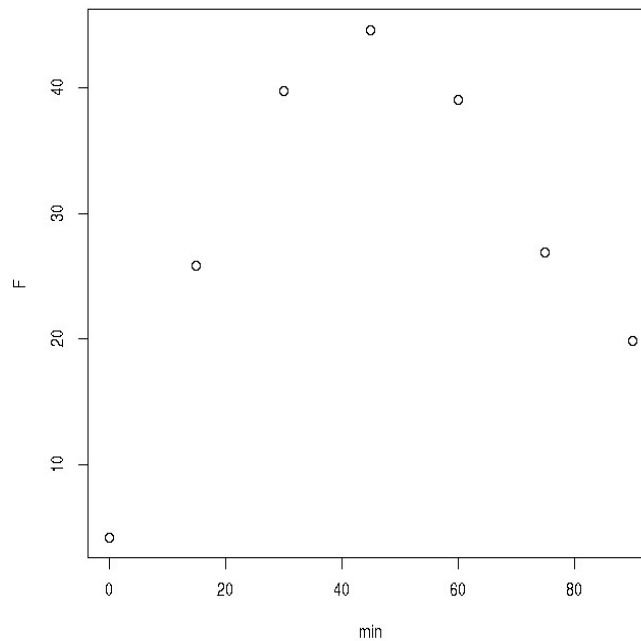
Calculo de k₄ *in vivo*.

Utilizamos los datos de tablaR756, que contiene los datos de F en función del tiempo.

```
> tablaR756
```

t	MFP	SD	F	SD.1
1 0	64.5	13.0	4.2	2.0
2 15	40.9	18.0	25.8	9.0
3 30	15.4	13.0	39.7	4.7
4 45	9.5	1.0	44.6	8.5
5 60	3.1	0.5	39.0	12.5
6 75	0.0	0.0	26.9	12.1
7 90	0.0	0.0	19.9	9.8

```
> plot(tablaR756$t,tablaR756$F,ylab='F',xlab='min')
```



realizamos el ajuste de los datos de F en función del tiempo utilizando la función nls() y la función obtenida para la concentración de F, que repetimos

$$C_F = \frac{k_4 * C_{MFP0}}{k_3 - k} * (e^{-k*t} - e^{-k_3*t})$$

expresaremos la función reemplazando k por su sumatoria

$$k = k_4 + k_5$$

ya que queremos hallar el valor de k5.

$$C_F = \frac{k_4 * C_{MFP0}}{k_3 - k_4 - k_5} * (e^{-(k_4 + k_5)*t} - e^{-k_3*t})$$

Asignamos a C_{MFP0} el valor 64.5, que es el valor inicial de la concentración de MFP a $t=0$ en la tabla R756.

```
> CMFP0<-64.5
```

Luego debemos darle valores iniciales a los parámetros de la ecuación: k_4 , k_3 y k , para que nls() pueda buscar los valores de dichos parámetros, que mejor ajusten a nuestros datos experimentales.

A k_3 , podemos asignarle el valor hallado anteriormente, k_3 : 0.022428. Si bien el valor es hallado con signo negativo, su valor lo utilizamos positivo, como todas las constantes de velocidad.

```
> k3<- 0.022428
```

A k , que es la constante global podemos asignarle el valor hallado anteriormente, $k = -0.050202$. Que también utilizamos con signo positivo.

```
> k<-0.050202
```

k_4 , será una de las constante que estimaremos a partir de nuestros datos, pero necesitamos darle un valor inicial para el proceso de calculo. Utilizaremos para k_4 como valor inicial el valor hallado en los experimentos *in vitro*. k_4 : 0.035149

```
> k4<-0.035149
```

k_5 no lo hemos podido medir, pero asumiremos que no se absorbe el MFP sin hidrolizar por lo que le daremos un valor inicial de 0

```
> k5<-0
```

Con estos valores iniciales de las constantes y los datos de la tablaR751, hallaremos el valor de k4 y k5 que se ajuste a los datos. nls() utilizarán los valores de CMFPo y k3 buscará el mejor valor para k4 y k5.

```
> ajusteR756<-nls(F~(k4*CMFPo)/(k3-k)*(exp(-k*t)-exp(-k3*t)),data=tablaR756,star=c(k4=k4,
k=k),trace=TRUE)
```

```
1617.814 : 0.035149    0.050202
200.6297 : 0.03674799 0.02709035
96.50169 : 0.04724678 0.03372790
93.16566 : 0.04667854 0.03225514
93.126 :    0.04693960 0.03253377
93.1251 :    0.04689620 0.03249085
93.12508 : 0.04690307 0.03249761
93.12508 : 0.04690199 0.03249655
93.12508 : 0.04690216 0.03249672
```

```
> summary(ajusteR756)
```

Formula: $F \sim (k4 * CMFPo) / (k3 - k) * (\exp(-k * t) - \exp(-k3 * t))$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
k4	0.046902	0.006262	7.49	0.000671 ***
k	0.032497	0.005681	5.72	0.002283 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 4.316 on 5 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 8

La lista anterior nos muestra: error y los valores de k4 y k, al finalizar el proceso de optimización

Verificamos si el ajuste fue bueno asignando a k4 y k los valores hallados. Creamos primero una función para representar la variación de la concentración de fluoruro

```
> CF<-function(t){(k4*CMFPo)/(k3-k)*(exp(-k*t)-exp(-k3*t))}
```

asignamos los valores de k4 y k

```
> k4<-0.04690206
```

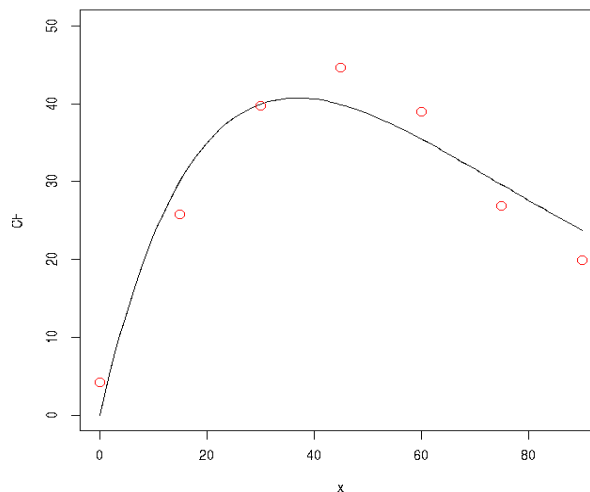
```
> k<-0.03249662
```

graficamos la función con estos parámetros

```
> plot(CF,0,90,ylim=c(0,50))
```

colocamos los puntos experimentales

```
> points(tablaR756$t,tablaR756$F,cex=1.5,col='red')
```



La gráfica nos muestra el buen ajuste de la función con los parámetros hallados.

Con los datos de los parámetros hallados podemos ahora hallar k_5

Como

$$k = k_4 + k_5$$

entonces

$$k_5 = k - k_4$$

$$k_5 = 0.03249662 - 0.04690206 = -0.01440544$$

que tratándose de un valor negativo, nos estaría indicando más que absorción secreción, en función como fue diseñado el modelo. Por ende podemos considerar que k_5 es cero y el MFP no se absorbe en el intestino sin sufrir hidrólisis.

Clase 6

Farmacocinética del fluoruro de sodio

El fluoruro de sodio (NaF) es una sustancia que se encuentra en la naturaleza y es utilizada desde hace décadas para el tratamiento de las caries y de la osteoporosis [14], aunque la última aplicación ha dejado ya hace años de utilizarse. Esta aplicación surgió de observaciones acerca de la incidencia de osteoporosis en zonas con agua de consumo con alto contenido de fluoruro comparadas con otras sin fluoruro [15]. Este beneficio se debe a que el fluoruro (F^-) reemplaza al oxhidrilo en el cristal de hidroxiapatita ósea, formando flúorapatita que tiene mayor cristalinidad [16], además de un efecto estimulador de las células formadoras de tejido óseo. El metabolismo del fluoruro ha sido muy estudiado tanto en seres humanos como en animales de laboratorio y una revisión extensa de este se encuentra disponible en la actualidad [17, 18]. La única forma posible de administración de fluoruro de sodio para actuar a nivel sistémico es a través de vía oral, como una dosis o bien en el agua de bebida. En la Figura 1 se esquematiza el metabolismo del F^- , luego de una dosis oral (D_o).

14 Bernstein, D.S., Cohen, D. J. Use of sodium fluoride in the treatment of osteoporosis. Clin. Endoc. 27:197-210. 1967.

15 Bernstein, D.S., Sadowsky, J. Prevalence of Osteoporosis in High and Low Fluoride Areas in North Dakota. Am. Med. Assoc (JAMA) 193: 499-504. 1966.

16 Baud, C.A., Bang, S. Fluoride and bone mineral substance. Fluoride in medicine. H. Huber. Bern. 1970.

17 Whitford, G.M. Monographs in Oral Science. Vol 13. The Metabolism and toxicity of Fluoride. Ed. Howard M. Myers. Karger. San Francisco Calif. 1989.

18 Review of water fluoridation and fluoride intake from discretionary fluoride supplements. Review for NHMRC (National Health and Medical Research Council. Melbourne 1999

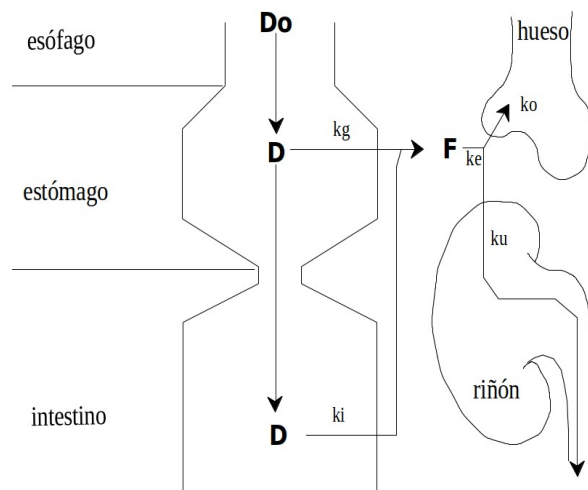


Figura 1

Luego de administrar la dosis D_o , en el tubo digestivo existe una cantidad de fluoruro: D que irá decreciendo a medida que progrese el proceso de absorción. Este proceso es influenciado por el pH de los compartimientos. Esta influencia se debe a que el F^- es una base conjugada fuerte, que puede generar HF ($pK_{a_{HF}} = 3.45$) que es más lipofílico y puede atravesar las membranas con más facilidad que el F^- . El fluoruro se absorbe a nivel gástrico, proceso cuya constante de velocidad será representada como k_g . El fluoruro que no es absorbido a nivel gástrico, se absorbe a nivel intestinal, cuya constante de velocidad es k_i . Ambos procesos contribuyen a la absorción gastrointestinal cuya constante de velocidad global es k_a . Si el orden de los procesos es el mismo podemos sumar ambas constantes

$$k_a = k_g + k_i$$

Luego de la absorción aparece una cantidad de fluoruro en plasma (F) y demás fluidos del organismo, depositándose mayoritariamente en el tejido óseo y excretándose en gran medida por orina. Su concentración plasmática será resultado de la sumatoria e intensidad de estos procesos y afectará su volumen de distribución (V_d)¹⁹.

El F^- se encuentra en el plasma sin ligarse a componentes del mismo. El F^- es depurado del plasma, proceso caracterizado por una constante de velocidad: k_e . Este proceso es llevado a cabo principalmente por el tejido óseo y los riñones. El F^- puede ser incorporado al tejido óseo por dos mecanismos: incorporación al hueso en formación y reemplazando al oxhidrilo del cristal de hidroxiapatita existente en ese tejido. En ambos casos la constante de velocidad del fenómeno se denominará k_o . A nivel glomerular, el F^- filtra libremente por ser un soluto de bajo peso molecular y no encontrarse ligado a las proteínas. Este proceso tiene una constante de velocidad, k_u . Por lo tanto se puede decir que la constante global de depuración plasmática podemos escribirla

19 El volumen de distribución de una sustancia es un valor teórico que surge del cálculo

$$[sustancia] = \frac{\text{cantidad de droga en un espacio}}{V_d}$$

Si de la cantidad de sustancia una parte se fija en membranas, su concentración en la solución será baja y como consecuencia el V_d elevado.

En el caso en que la sustancia no se fije a ninguna estructura el V_d será igual al volumen del espacio de distribución*, mientras que si la sustancia presenta fijación el V_d aumentará.

* el espacio de distribución es el compartimiento líquido en que se distribuye la sustancia. Como los volúmenes de los compartimientos líquidos pueden ser estimados, el cálculo del V_d puede dar idea de cuáles compartimientos alcanza la sustancia y si se liga o no a estructura.

$$k_e = k_u + k_o$$

si los procesos gobernados por k_u y k_o son del mismo orden. Una vez que el F^- filtró a nivel glomerular renal, puede ser reabsorbido, proceso que es dependiente del pH. Esta dependencia de la acidez se debe a que el HF es un ácido débil con características más hidrofóbicas que el F^- . Del balance entre el F^- filtrado y reabsorbido surgirá la masa de F^- en orina (U).

A continuación se analizarán los procesos mencionados, obteniéndose el orden de los mismos y sus constantes de velocidad en la rata.

Absorción gástrica de fluoruro

Con el objetivo de comprobar el orden del proceso de absorción gástrico se realizó un experimento de estómago aislado *in situ*. Si bien este tipo de estudios fue desarrollado en clases anteriores, en esta situación lo incluiremos para ver el desarrollo completo del modelo farmacocinético. En este experimento se utilizaron 6 ratas, a las que se colocó en el estómago una solución de NaF (58 ± 13) μM . Se realizaron dos ligaduras, una a la altura del cardias y otra en el píloro, antes de la inyección del NaF. En la ligadura del píloro se colocó un catéter para obtener muestras a los tiempos indicados en la Tabla 17.

Tiempo, minutos	[F ⁻] μM	n
0	58 ± 13	6
15	52 ± 3	6
30	42 ± 7	6
45	37 ± 8	6
60	34 ± 10	6
75	31 ± 10	6
90	26 ± 1	6

Tabla 17. Concentraciones de NaF en luz gástrica de ratas con estómago aislado

Estos datos puede hallarlos en la hoja tablaR761 de la planilla de cálculo tablaR76.ods/xls. En ella tendrá solo los valores de tiempo y concentración de fluoruro para realizar las regresiones lineales. Por supuesto el análisis correcto sería realizar las regresiones con los valores individuales de los 6 experimentos. Por razones de simplificación utilizaremos las medias en esta situación.

Introducimos en primer lugar los datos en nuestro espacio de trabajo

```
> tablaR761<-read.table('clipboard',header=T,sep='\t',dec=',',encoding='latin1')
```

comprobamos el ingreso de los mismos

```
> tablaR761
```

```
  t  F
1 0 58
2 15 52
3 30 42
4 45 37
5 60 34
6 75 31
7 90 26
```

y vemos si su formato es numérico

```
> summary(tablaR761)
```

```
      t      F
Min.   : 0.0   Min.   :26.0
1st Qu.:22.5   1st Qu.:32.5
```

Median :45.0	Median :37.0
Mean :45.0	Mean :40.0
3rd Qu. :67.5	3rd Qu. :47.0
Max. :90.0	Max. :58.0

Realizamos entonces las regresiones lineales de los datos experimentales (concentración vs tiempo, log(concentración) vs tiempo y 1/concentración vs tiempo.

Probamos el ajuste con orden cero

```
> lmtablaR761<-lm(F~t,data=tablaR761)
> summary(lmtablaR761)
```

Call:

```
lm(formula = F ~ t, data = tablaR761)
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6	7
2.3571	1.5714	-3.2143	-3.0000	-0.7857	1.4286	1.6429

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	55.64286	1.74292	31.93	5.66e-07 ***
t	-0.34762	0.03223	-10.79	0.000119 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.558 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9588, Adjusted R-squared: 0.9506

F-statistic: 116.4 on 1 and 5 DF, p-value: 0.0001188

probamos ajuste con orden 1, utilizando el log de la concentración

```
> lmtablaR761<-lm(log(F)~t,data=tablaR761)
> summary(lmtablaR761)
```

Call:

```
lm(formula = log(F) ~ t, data = tablaR761)
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6	7
0.014962	0.036222	-0.046892	-0.043185	0.002717	0.040803	-0.004628

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.0454807	0.0260240	155.45	2.09e-10 ***
t	-0.0086973	0.0004812	-18.07	9.52e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.03819 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9849, Adjusted R-squared: 0.9819

F-statistic: 326.7 on 1 and 5 DF, p-value: 9.524e-06

ahora probamos el orden 2 con la inversa de la concentración

```
> lmtablaR761<-lm((1/F)~t,data=tablaR761)
> summary(lmtablaR761)
```

Call:

lm(formula = (1/F) ~ t, data = tablaR761)

Residuals:

1	2	3	4	5	6	7
0.0006768	-0.0007380	0.0004366	0.0002499	-0.0007696	-0.0013275	0.0014718

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.656e-02	7.324e-04	22.62	3.14e-06 ***
t	2.269e-04	1.354e-05	16.76	1.38e-05 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.001075 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9825, Adjusted R-squared: 0.979

F-statistic: 280.9 on 1 and 5 DF, p-value: 1.382e-05

Si bien los valores de R-squared están indicando que los tres modelos pueden explicar la variación de la concentración de fluoruro en luz del estómago

orden 0: R-squared: 0.9588

orden 1: R-squared: 0.9849

orden 2: R-squared: 0.9825

Nos inclinaremos por la elección de un proceso de absorción de orden 1, por ser R-squared mayor.

En base a este análisis se puede plantear la siguiente ecuación diferencial, que expresa la variación de la cantidad de fluoruro (D) en la luz gástrica, que es igual a lo planteado en los capítulos referidos a absorción en estómago aislados *in situ*.

$$\frac{dD}{dt} = -k_g * D$$

aplicando transformadas de Laplace

$$s * \bar{D} - D_o = -k_g * \bar{D}$$

reagrupando y reordenando la expresión anterior tenemos

$$\bar{D} * (s + k_g) = D_o$$

y despejando, se obtiene

$$\bar{D} = \frac{D_o}{(s + k_g)}$$

cuya antitransformada es

$$D = D_o * e^{-k_g * t}$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de la solución

$$\frac{D}{V} = \frac{D_o}{V} * e^{-k_g * t}$$

se obtiene la función que describe la concentración de F en la luz gástrica a lo largo del tiempo

$$C = C_o * e^{-k_g * t}$$

Utilizaremos algunas de estas ecuaciones en el desarrollo del modelo completo que haremos más adelante.

Absorción intestinal de fluoruro

Para averiguar el orden del proceso de absorción intestinal se realizó un experimento utilizando el modelo de intestino aislado *in situ*. En este experimento se llenaron aproximadamente 4 cm de intestino delgado con una solución de NaF $74.8 \pm 4.8 \mu\text{M}$. El experimento se realizó con 6 ratas, que recibieron el mismo tratamiento. Durante el experimento los animales se mantuvieron con anestesia general. Se realizaron dos ligaduras del intestino delgado, uno en el píloro y otra ligadura distal, en la que se colocó un catéter para introducir la solución. Por este mismo catéter se obtuvieron las muestras a los tiempos indicados en la Tabla 18.

tiempo, minutos	[F ⁻] μM	n
0	$74,8 \pm 4,8$	6
15	$64,2 \pm 16,8$	6
30	$58,0 \pm 8,5$	6
45	$47,9 \pm 5,4$	6
60	$39,2 \pm 3,9$	6
75	$29,9 \pm 6,2$	6
90	$22,2 \pm 4,0$	6
105	$19,7 \pm 6,5$	6
120	$18,0 \pm 8,5$	6

Tabla 18. Concentraciones de NaF en luz del duodeno de ratas con intestino aislado in situ

Con los datos anteriores realizamos las regresiones correspondientes para analizar los ordenes previa introducción de los datos de la tablaR762 de la planilla de cálculo [tablaR76.ods/xls](#)

```
> tablaR762<-read.table('clipboard',header=T,sep='\t',dec=',',encoding='latin1')
```

auditamos el proceso de ingreso controlando los valores

```
> tablaR762
```

```

  t  F
1  0 74.8
2 15 64.2
3 30 58.0
4 45 47.9
5 60 39.2
6 75 29.9
7 90 22.2
8 105 19.7
```

9 120 18.0

```
> summary(tablaR762)
```

t	F
Min. : 0	Min. :18.00
1st Qu.: 30	1st Qu.:22.20
Median: 60	Median :39.20
Mean : 60	Mean :41.54
3rd Qu.: 90	3rd Qu.:58.00
Max. :120	Max. :74.80

Realizamos las regresiones para investigar el orden 0, 1 y 2

```
> lmtablaR762orden0<-lm(F~t,tablaR762)
```

```
> lmtablaR762orden1<-lm(log(F)~t,tablaR762)
```

```
> lmtablaR762orden2<-lm(1/F~t,tablaR762)
```

y vemos el detalle de cada análisis realizado

```
> summary(lmtablaR762orden0)
```

Call:

```
lm(formula = F ~ t, data = tablaR762)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-4.3344	-2.3444	0.1406	1.4456	6.4756

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	71.56444	2.29624	31.17	9.04e-09 ***
t	-0.50033	0.03215	-15.56	1.09e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3.736 on 7 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9719, Adjusted R-squared: 0.9679

F-statistic: 242.1 on 1 and 7 DF, p-value: 1.094e-06

Ahora vemos el resultado del análisis de orden 1

```
> summary(lmtablaR762orden1)
```

Call:

```
lm(formula = log(F) ~ t, data = tablaR762)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.11700	-0.04258	-0.01313	0.06379	0.07033

Coefficients:

Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
----------	------------	---------	----------

```
(Intercept) 4.3804817 0.0452418 96.82 3.3e-12 ***
t           -0.0129266 0.0006335 -20.41 1.7e-07 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.07361 on 7 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9835, Adjusted R-squared: 0.9811

F-statistic: 416.3 on 1 and 7 DF, p-value: 1.703e-07

y para orden 2

```
> summary(lm(tablaR762orden2))
```

Call:

```
lm(formula = 1/F ~ t, data = tablaR762)
```

Residuals:

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.005310 -0.003083  0.001880  0.002809  0.005381
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) 7.988e-03 2.461e-03  3.245  0.0141 *
t           3.805e-04 3.447e-05 11.041 1.11e-05 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.004005 on 7 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9457, Adjusted R-squared: 0.9379

F-statistic: 121.9 on 1 and 7 DF, p-value: 1.11e-05

comparando los R-squared de los tres ajustes

orden 0: R-squared: 0.9719

orden 1: R-squared: 0.9835

orden 2: R-squared: 0.9457

Obtenemos un mejor ajuste con el modelo de orden 1, entonces en base a esto podemos desarrollar nuestro modelo para intestino aislado, que planteamos de orden 1.

$$\frac{dD}{dt} = -k_i * D$$

aplicando transformadas de Laplace

$$s * \bar{D} - D_o = -k_i * \bar{D}$$

reagrupando y reordenando la expresión anterior obtenemos

$$\bar{D} * (s + k_i) = D_o$$

y despejando, se obtiene

$$\bar{D} = \frac{D_o}{(s + k_i)}$$

cuya antitransformada es

$$D = D_o * e^{-k_i * t}$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de la solución

$$\frac{D}{V} = \frac{D_o}{V} * e^{-k_i * t}$$

se obtiene

$$C = C_o * e^{-k_i * t}$$

Que es la función que describe la concentración de F en el intestino aislado en función del tiempo.

Concentración plasmática de fluoruro

Para obtener una ley que describa el comportamiento de la concentración plasmática del fluoruro luego de una dosis oral, se simplificará el esquema de la figura 7.1, utilizando en este punto el esquema de la Figura 2. En este caso se considerará la entrada desde el aparato digestivo como una única vía, cuya constante es k_a .

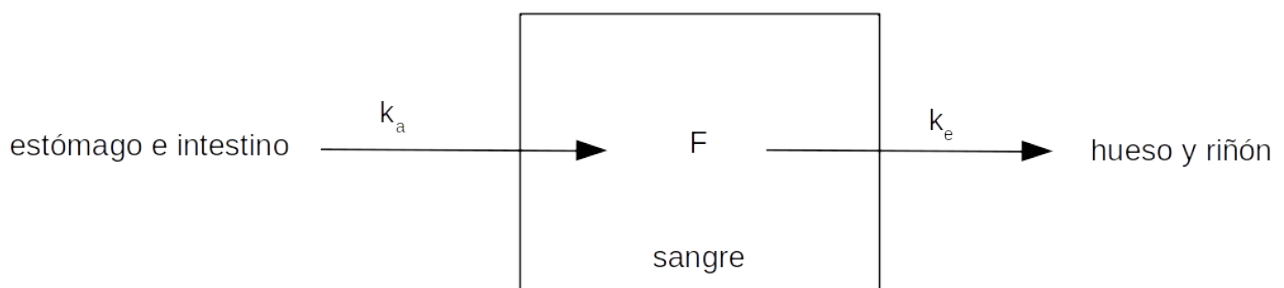


Figura 2

La eliminación de fluoruro del compartimiento plasmático se considerará como un único proceso, cuya constante de velocidad es k_e .

Si a priori se acepta que los órdenes de los procesos de excreción y absorción son iguales a uno, la variación de la cantidad plasmática de fluoruro, queda descrita por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF}{dt} = k_a * D - k_e * F$$

El ingreso es proporcional a D, es decir la cantidad de F en la luz del tubo digestivo y la salida de F del plasma es proporcional a F.

Aplicando transformadas de Laplace a la expresión anterior, tenemos

$$s * \bar{F} - F_o = k_a * \bar{D} - k_e * \bar{F}$$

En el tratamiento de esta expresión se considerará que la cantidad de fluoruro en plasma a tiempo cero es despreciable ($F_o = 0$). Afirmación que es correcta si el individuo al que se aplica el estudio no tuvo ingesta previa de fluoruro. En este caso esto es avalado por el valor de [F] a tiempo 0 de la Tabla 19

tiempo, min	[F] μ M	n
0	2 ± 0.6	5
7.5	60 ± 11	3
15	81 ± 17	2
30	110 ± 56	2
45	119 ± 56	2
60	105 ± 25	2
75	80 ± 24	2
90	50 ± 18	2
120	21 ± 13	2
180	18 ± 6	2
360	2 ± 1	2

Tabla 19. concentraciones de NaF en plasma en ratas luego de una dosis oral de NaF.

Si se desprecia F_0 por la razón expuesta más arriba y se reemplaza la transformada de la cantidad de fluoruro en el aparato digestivo ($\bar{D}$)²⁰, se obtiene

$$s * \bar{F} = \frac{k_a * D_o}{s + k_a} - k_e * \bar{F}$$

que reordenando, resulta

$$\bar{F} * (s + k_e) = \frac{k_a * D_o}{s + k_a}$$

despejando la transformada de la cantidad de fluoruro

$$\bar{F} = \frac{k_a * D_o}{(s + k_a) * (s + k_e)}$$

aplicando la antitransformada de la expresión anterior, se obtiene la función que ajusta la cantidad de fluoruro en plasma

$$F = \frac{k_a * D_o}{k_e - k_a} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

dividiendo por el volumen de distribución del fluoruro: V_d , se obtiene

²⁰ Variación de la cantidad de fluoruro en tubo gastrointestinal

$$\frac{dD}{dt} = -k_a * D$$

$$D - s * D_o = -k_a * \bar{D}$$

$$\bar{D} * (s + k_a) = D_o$$

$$\bar{D} = \frac{D_o}{s + k_a}$$

$$\frac{F}{Vd} = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

como la cantidad de fluoruro (F) dividido por el volumen de distribución (V_d) es la concentración de fluoruro en plasma (C), la expresión resulta

$$C = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

Es importante tener en cuenta que la expresión anterior se obtuvo bajo ciertas suposiciones, algunas de las cuales fueron ya mencionadas y posteriormente se demostrarán experimentalmente ($F_o = 0$ y órdenes de los procesos iguales a 1). Además se ha considerado que la absorción de fluoruro a nivel gastrointestinal es completa, es decir que el 100% del F administrado, se absorbe y pasa a la sangre. Esta última consideración determina que en la expresión la cantidad inicial de fluoruro es D_o , que es la dosis total administrada. Esta suposición es correcta dado que se ha comprobado experimentalmente que luego de una dosis oral de fluoruro la excreción por materia fecal es despreciable. Si la concentración basal de fluoruro en plasma no pudiera ser considerada igual a cero, la ecuación resultaría:

$$C = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t}) + C_o$$

es decir que simplemente a la expresión hallada se le suma el valor basal que tiene el fluoruro al momento de comenzar el estudio, C_o .

Comprobación de los supuestos

Absorción total del Fluoruro a nivel gastrointestinal: El planteo desarrollado tiene en cuenta que la absorción sea aproximadamente 100%. Para verificar esta suposición se realizó un experimento en el que se administró a ratas una dosis diaria de 80 μ moles de NaF por sonda gástrica. Se recolectó material fecal y se determinó la excreción de F en heces. Se pudo determinar que en estas condiciones la excreción de F no discrepaba de cero. Es importante tener en cuenta que esta suposición podría no cumplirse si la dosis fuera administrada simultáneamente con cationes como Fe^{+++} , Co^{+++} , Al^{+++} con los cuales el F^- forma compuestos de poca absorción, provocando un aumento de la pérdida de fluoruro por materia fecal.

Orden del proceso de excreción: Con el fin de obtener los órdenes de los procesos de excreción y absorción, se realizó un experimento con animales intactos. Se administró a ratas adultas ayunadas durante 24 hs, una dosis de NaF de 80 μ mol por sonda gástrica. Antes de la administración de la dosis y a los tiempos indicados en la Tabla 19, se extrajo sangre y se determinó la concentración de F en plasma, cuyos valores se pueden ver en la Figura 3. Como se puede observar en dicha tabla la fluoremia alcanza un máximo a los 45 minutos de administrada la dosis. A partir de este momento existe un decrecimiento de la concentración para alcanzar valores que no discrepan de los basales al cabo de 6 horas.

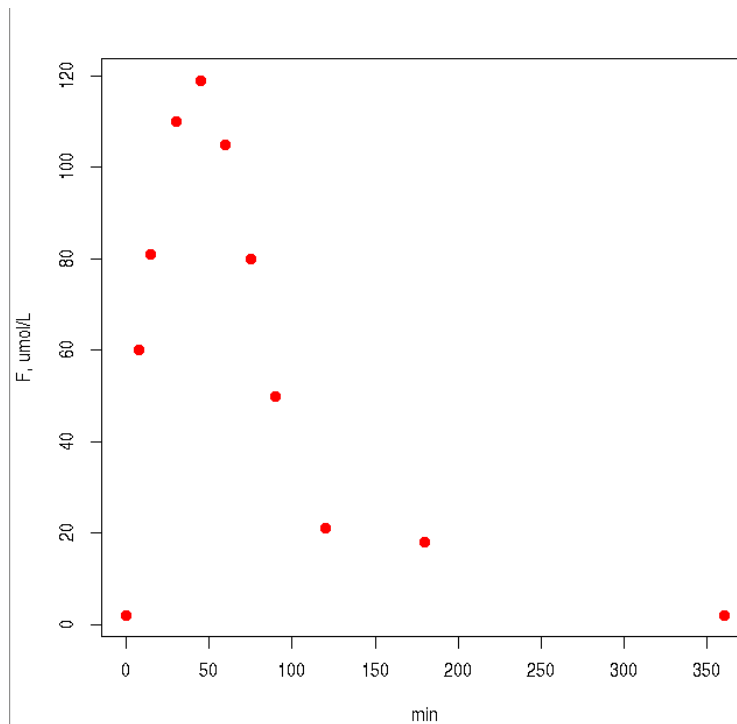


Figura 3

Evaluación del orden del proceso de eliminación

A partir del máximo en la concentración plasmática, se puede considerar que la excreción es el proceso dominante y la absorción gastrointestinal es despreciable. Se puede entonces plantear la ecuación diferencial para esta situación como

$$\frac{dF}{dt} = -k_e * F$$

En esta ecuación hemos supuesto que el orden es 1, situación que verificaremos a continuación. Para ello introduciremos los valores de la tablaR763 de la planilla de cálculo tablaR76.ods/xls en nuestro espacio de trabajo. La tabla solo contiene los valores de tiempo y concentración de fluoruro. Por simplicidad y para comprender el mecanismo utilizaremos las medias de las concentraciones para cada tiempo.

```
> tablaR763<-read.table('clipboard',header=T,sep='\t',dec=',',encoding='latin1')
```

```
> tablaR763
```

	t	F
1	0.0	2
2	7.5	60
3	15.0	81
4	30.0	110
5	45.0	119
6	60.0	105
7	75.0	80
8	90.0	50
9	120.0	21
10	180.0	18
11	360.0	2

realizamos las comprobaciones necesarias

```
> summary(tablaR763)
```

t	F
Min. : 0.00	Min. : 2.00
1st Qu.: 22.50	1st Qu.: 19.50
Median : 60.00	Median : 60.00
Mean : 89.32	Mean : 58.91
3rd Qu.: 105.00	3rd Qu.: 93.00
Max. : 360.00	Max. : 119.00

Ajustaremos ahora regresiones lineales con la función `lm()` para los valores de `t` posteriores al valor del máximo. Para asegurarnos que el proceso de absorción sea despreciable tomaremos desde los 75 minutos en adelante, es decir solo consideraremos de la `tablaR763` las filas 7 a 11.

Realizamos la regresión para verificar orden 0, es decir `F` vs `t`

```
> lm(tablaR763orden0<-lm(F~t,tablaR763[c(7:11),])
```

ahora para orden 1, utilizando el log de la concentración

```
> lm(tablaR763orden1<-lm(log(F)~t,tablaR763[c(7:11),])
```

y para orden 2, utilizando la inversa de la concentración

```
> lm(tablaR763orden2<-lm(1/F~t,tablaR763[c(7:11),])
```

Pedimos ahora los informes de cada regresión y elegimos el mejor modelo según el valor de `R-squared` del ajuste

```
> summary(lm(tablaR763orden0))
```

Call:

```
lm(formula = F ~ t, data = tablaR763[c(7:11), ])
```

Residuals:

7	8	9	10	11
27.0750	0.1958	-22.5625	-13.0792	8.3708

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	68.52917	18.65911	3.673	0.0349 *
t	-0.20806	0.09569	-2.174	0.1180

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 22.24 on 3 degrees of freedom

Multiple **R-squared: 0.6118**, Adjusted R-squared: 0.4824

F-statistic: 4.728 on 1 and 3 DF, p-value: 0.118

el resumen del análisis para orden 1

```
> summary(lm(tablaR763orden1))
```

Call:

```
lm(formula = log(F) ~ t, data = tablaR763[c(7:11), ])
```

Residuals:

7	8	9	10	11
0.32049	0.03001	-0.47845	0.08547	0.04248

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.959127	0.283181	17.512	0.000406 ***
t	-0.011968	0.001452	-8.241	0.003741 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.3375 on 3 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9577, Adjusted R-squared: 0.9436
 F-statistic: 67.92 on 1 and 3 DF, p-value: 0.003741
 y finalmente el ajuste de orden 2

```
> summary(lmtablaR763orden2)
```

```
Call:
lm(formula = 1/F ~ t, data = tablaR763[c(7:11), ])
Residuals:
    7      8      9     10     11 
0.041308 0.022817 -0.001545 -0.097570 0.034990 
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -0.158760  0.055183  -2.877  0.06369 .
t             0.001733  0.000283   6.123  0.00876 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Residual standard error: 0.06576 on 3 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9259, Adjusted R-squared:  0.9012 
F-statistic: 37.49 on 1 and 3 DF, p-value: 0.008758
```

de comparar los R-squared de los tres modelos ajustados

orden 0, R-squared: 0.6118

orden 1, R-squared: 0.9577

orden 2, R-squared: 0.9259

nos quedamos con el orden 1, verificando así el supuesto realizado al desarrollar el modelo, es decir que la desaparición de F del plasma es de orden 1. Al elegir este orden, tenemos entonces el valor de k_e que es la pendiente de la regresión lineal del modelo `lm()` para el $\log(F)$ vs t , $k_e = -0.011968 \pm 0.001452 \text{ min}^{-1}$, que es un valor significativamente diferente de cero como podemos observar en el `summary()` de dicho modelo.

Evaluación del orden del proceso de absorción

Como expresamos anteriormente, a tiempos posteriores al máximo en la concentración plasmática se puede considerar que el término de absorción no existe, pudiendo escribir la ecuación de la concentración plasmática, sin el término exponencial que representa al proceso de absorción con constante de velocidad k_a .

$$C = -\frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_e * t}$$

Ecuación 1

que representaría la concentración plasmática cuando solo hay eliminación.

Contrariamente en tiempos anteriores al máximo en la concentración plasmática, ambos procesos están presentes, siendo válida la expresión completa

$$C = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

Ecuación 2

que representa la concentración plasmática cuando existen los dos procesos: absorción y eliminación.

Por lo tanto si restamos a la Ecuación 1, la Ecuación 2, obtenemos una expresión que nos proporciona lo que conocemos como la concentración residual en el aparato digestivo

$$C = \left[-\frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_e * t} \right] - \left[\frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t}) \right]$$

Ecuación 3

reordenando y eliminando términos

$$C = -\frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_e * t} - \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_a * t} + \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} e^{-k_e * t}$$

Ecuación 4

eliminando primer y tercer término de la derecha obtenemos

$$C = \frac{-k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_a * t}$$

Ecuación 5

Para verificar el orden del proceso de absorción aplicaremos un método conocido como método de los residuales, que desarrollaremos a continuación

Lo que realizaremos es:

Con la expresión que representa solo eliminación

$$C = -\frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * e^{-k_e * t}$$

Ecuación 6

y que simplificamos reemplazando por A el primer término de la ecuación

$$C = A * e^{-k_e * t}$$

Ecuación 7

ajustaremos los valores de C para t mayores o iguales a 75 min con la función nls() en nuestros datos

```
> tablaR763
```

	t	F
1	0.0	2
2	7.5	60
3	15.0	81
4	30.0	110
5	45.0	119
6	60.0	105
7	75.0	80
8	90.0	50
9	120.0	21
10	180.0	18
11	360.0	2

realizamos el ajuste con nls() tomando como valores iniciales de los parámetros A=400 y ke=0.01.

```
> ajustenls<-nls(F~A*exp(-ke*t),tablaR763[c(7:11),],star=c(A=400,ke=0.01),trace=TRUE)
```

```
36845.44 (1.01e+01): par = (400 0.01)
```

```
1441.596 (1.98e+00): par = (219.0038 0.01228635)
```

```
289.0069 (5.51e-01): par = (262.5018 0.01713092)
```

```
230.9028 (4.23e-01): par = (358.9847 0.02156433)
```

```
197.9809 (1.80e-01): par = (446.5578 0.02381729)
```

```
191.5666 (3.08e-02): par = (484.74 0.02455458)
```

```
191.3584 (6.89e-03): par = (495.367 0.02478092)
```

```

191.3467 (2.09e-03): par = (498.3918 0.02485182)
191.3456 (6.48e-04): par = (499.3146 0.02487394)
191.3455 (2.01e-04): par = (499.6 0.02488082)
191.3455 (6.24e-05): par = (499.6885 0.02488296)
191.3455 (1.94e-05): par = (499.716 0.02488362)
191.3455 (6.01e-06): par = (499.7245 0.02488383)

```

La función nls() va ajustando la función a los valores experimentales, aproximando los valores de los parámetros A y ke, de manera de hacer mínimo el error. En la tabla anterior, el error figura en la primer columna. Cuando este valor ya no se puede disminuir más, finaliza el proceso y los valores optimizados de A y ke están resaltados en amarillo en la última línea de la tabla anterior

graficamos los datos de la tablaR763

```
> plot(tablaR763$t,tablaR763$F,ylab='F, umol/l',xlab='minutos',pch=19,col=2,ylim=c(0,500))
```

creamos un vector con tiempos en intervalo [0,360], que es la duración de nuestro experimento

```
> tfit<-seq(0,360,1)
```

con ese vector de tiempo y los parámetros A y ke obtenidos, construimos un vector con valores teóricos de concentración plasmática de F, como si solo existiera excreción, utilizando la Ecuación 7

```
> ffit<-499.72449982*exp(-0.02488383*tfit)
```

y graficamos sobre los puntos la línea creada con los datos de los vectores tfit y ffit.

```
> lines(spline(tfit,ffit),lwd=2)
```

que nos da la gráfica de la Figura 4

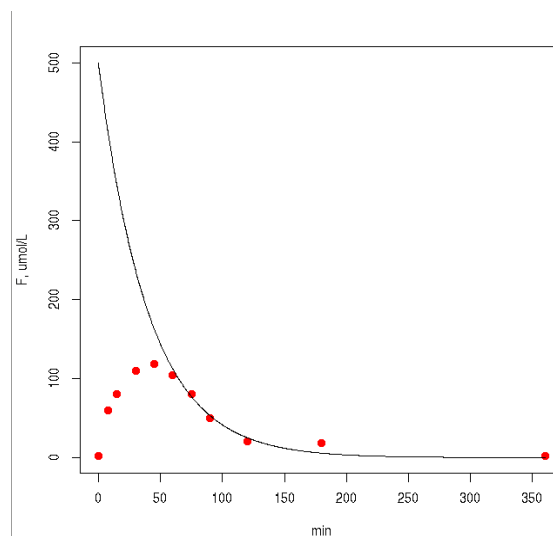


Figura 4

Ahora comenzaremos el trabajo para hallar las concentraciones residuales de F en el aparato digestivo. Para ellos creamos una tabla que solo tenga los valores de F de las primeras cuatro líneas, en que predomina el proceso de absorción

```
> tablaresidual<-tablaR763[c(1:4),]
```

verificamos

```
> tablaresidual
```

	t	F
1	0.0	2
2	7.5	60
3	15.0	81
4	30.0	110

creamos una función Fresidual, con los valores de los parámetros, que sería la ecuación que es representada por la línea en el gráfica anterior

```
> Fresidual<-function(t){499.72449982*exp(-0.02488383*t)}
```

agregamos a la tablaresidual los valores de F obtenidos con la función Fresidual, a los que llamamos FE y el agregado de la columna lo hacemos con la función cbind() que permite adosar columnas a una tabla

```
> tablaresidual<-cbind(tablaresidual,FE=Fresidual(tablaresidual$t))
```

```
> tablaresidual
```

	t	F	FE
1	0.0	2	499.7245
2	7.5	60	414.6473
3	15.0	81	344.0543
4	30.0	110	236.8772

finalmente agregamos otra columna que tendrá la diferencia entre FE y F para hallar la concentración residual que llamamos FR, la que estaría representando la concentración de F en el aparato digestivo a cada tiempo analizado

```
> tablaresidual<-cbind(tablaresidual,FR=tablaresidual$FE-tablaresidual$F)
```

comprobamos el correcto cálculo

```
> tablaresidual
```

	t	F	FE	FR
1	0.0	2	499.7245	497.7245
2	7.5	60	414.6473	354.6473
3	15.0	81	344.0543	263.0543
4	30.0	110	236.8772	126.8772

ahora realizamos los ajuste para comprobar orden de desaparición de FR

```
> lmresidualordencero<-lm(FR~t,tablaresidual)
```

```
> lmresidualordenuno<-lm(log(FR)~t,tablaresidual)
```

```
> lmresidualordendos<-lm(1/FR~t,tablaresidual)
```

y vemos los summary de cada objeto, poniendo la atención en el valor R-squared

```
> summary(lmresidualordencero)
```

Call:

```
lm(formula = FR ~ t, data = tablaresidual)
```

Residuals:

	1	2	3	4
	30.00	-23.28	-25.07	18.36

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	467.729	26.873	17.405	0.00328 **
t	-11.974	1.564	-7.657	0.01663 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 34.69 on 2 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.967, Adjusted R-squared: 0.9505
F-statistic: 58.63 on 1 and 2 DF, p-value: 0.01663

```
> summary(lmresidualordenuno)
```

Call:

```
lm(formula = log(FR) ~ t, data = tablaresidual)
```

Residuals:

```
      1      2      3      4  
-0.010259 -0.008543  0.033332 -0.014530
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error  t value Pr(>|t|)  
(Intercept)  6.220306   0.021216  293.19 1.16e-05 ***  
t             -0.045419   0.001235  -36.79 0.000738 ***
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.02739 on 2 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9985, Adjusted R-squared: 0.9978

F-statistic: 1353 on 1 and 2 DF, p-value: 0.0007381

```
> summary(lmresidualordendos)
```

Call:

```
lm(formula = 1/FR ~ t, data = tablaresidual)
```

Residuals:

```
      1      2      3      4  
0.0004918 -0.0001894 -0.0006994  0.0003971
```

Coefficients:

```
              Estimate Std. Error  t value Pr(>|t|)  
(Intercept) 1.517e-03  5.267e-04   2.881  0.1023  
t             1.989e-04  3.065e-05   6.490  0.0229 *
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0006799 on 2 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9547, Adjusted R-squared: 0.932

F-statistic: 42.12 on 1 and 2 DF, p-value: 0.02293

Si analizamos los valores de la constante y R-squared para cada ajuste tenemos

orden 0: -11.974 ± 1.564 R-squared: 0.967

orden 1: -0.045419 ± 0.001235 R-squared: 0.9985

orden 2: $1.989e-04 \pm 3.065e-05$ R-squared: 0.9547

comprobamos que el mejor ajuste para el proceso de absorción es uno, supuesto que habíamos establecido a la hora de desarrollar el modelo.

Resumen del análisis farmacocinético

Se verificaron los supuestos planteados al inicio del planteo

1- Absorción completa

2- Orden 1 para proceso de absorción

3- Orden 1 para proceso de excreción

Se hallaron las constantes de los procesos de absorción y excreción

ka: $-0.045419 \pm 0.001235 \text{ min}^{-1}$

ke: $-0.011968 \pm 0.001452 \text{ min}^{-1}$

Cálculo del volumen de distribución

El modelo planteado permitió hallar la ecuación que describe la concentración plasmática del fluoruro administrado por vía oral

$$C = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

Esta ecuación puede ser escrita de manera simplificada

$$C = A * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

siendo A

$$A = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)}$$

En la constante A figura el volumen de distribución que aun no conocemos. Algunos de los parámetros han sido obtenidos en el desarrollo, como es el caso de k_a y k_e . Otros son conocidos, como es el caso de D_o . Así, podemos hallar el valor de A utilizando la función nls(), los datos de la tablaR763 y los valores de las constantes indicadas más arriba, que debemos ingresar al espacio de trabajo

```
> ka= 0.045419
```

```
> ke=0.011968
```

realizamos el ajuste asignando a A un valor inicial de 400, bien podría haber sido otro. Puede ocurrir que con este valor el proceso no converja a un valor, en tal caso pruebe otro

```
> ajusteA<-nls(F~A*(exp(-ka*t)-exp(-ke*t)),tablaR763,star=c(A=400),trace=TRUE)
```

```
415241.9 (1.33e+01): par = (400)
```

```
2333.020 (8.67e-09): par = (-229.1881)
```

el valor resaltado en amarillo es el valor de A que nls() halló con la función obtenida y los valores de k_a y k_e

reemplazamos dicho valor en la expresión de A

$$\frac{0.045419 * 80}{(0.011968 - 0.045419) * V_d} = -229.1281$$

despejando Vd

$$\frac{0.045419 * 80}{(0.011968 - 0.045419) * (-229.1281)} = V_d$$

obtenemos un valor para Vd

Vd= 0.47 L

Este valor indica que el fluoruro no se distribuye uniformemente, dado que el volumen hallado es mayor que el volumen de la rata utilizada²¹.

Resumen final de los parámetros y modelo

ka: $-0.045419 \pm 0.001235 \text{ min}^{-1}$

ke: $-0.011968 \pm 0.001452 \text{ min}^{-1}$

Vd= 0.47 L

Ecuación del modelo

$$C = \frac{k_a * D_o}{Vd * (k_e - k_a)} * (e^{-k_a * t} - e^{-k_e * t})$$

Posibilidades

Qué se puede hacer de acá en adelante prácticamente es ilimitado y será cuestión de esperar a ver la necesidad, pero se plantean algunas.

1- Gráfica y ajuste:

En primer lugar presentar una gráfica con los valores experimentales y la curva de ajuste con los parámetros

Se deben introducir los valores de los parámetros, si no lo hemos hecho con anterioridad

```
> ka= 0.045419
```

```
> ke=0.011968
```

```
> Do=80
```

```
> Vd=0.47
```

y crear la función que representa la concentración plasmática de fluoruro luego de una dosis oral

```
> F<-function(t){ka*Do/(Vd*(ke-ka))*(exp(-ka*t)-exp(-ke*t))}
```

Podemos ahora graficar la función anterior

```
> plot(F,0,500,ylim=c(0,150))
```

y colocar los valores experimentales que se hallan en la tablaR763

```
> points(tablaR763$t,tablaR763$F,pch=19,cex=1.4,col=2)
```

obteniéndose la gráfica de la Figura 5

21 Para una rata de 200 g, como las utilizadas en estos experimentos, se puede suponer que el volumen total del animal es 200 ml, suponiendo una densidad promedio de 1 g/ml.

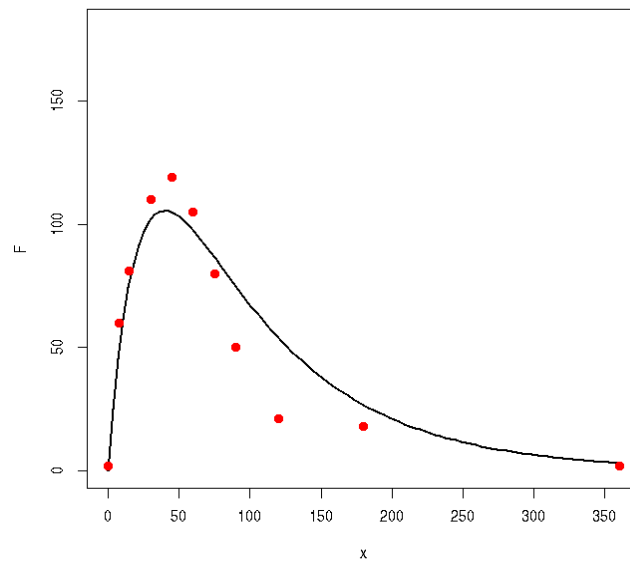


Figura 5

que nos muestra los valores experimentales y el ajuste de nuestro modelo

2- Simulaciones.

Podemos simular cambios que ocurrirán en la concentración plasmática ante modificaciones de valores de los parámetros. Esto es de gran valor, en primer lugar porque conocemos el significado fisiológico de cada parámetro y además seguramente conocemos la ventana terapéutica de la droga. De esta manera ante cambios en procesos fisiológicos podremos anticipar cambios en la farmacocinética de la droga y por ende en su farmacodinamia.

Ejemplo 1.

Con los valores experimentales hallamos los valores de los parámetros para una dosis de 80 umol. Estos valores posiblemente estén en su espacio de trabajo, pero introduciremos todo nuevamente para evitar confusiones

la dosis, parámetro D de nuestro modelo es 80

```
> D<-80
```

la constante de absorción obtenida con los datos experimentales fue

```
> ka<-0.045419
```

la ke obtenida fue

```
> ke<-0.011968
```

y el volumen de distribución hallado en base a la experimentación

```
> Vd<-0.47
```

introducimos la función del modelo

```
> F<-function(t){ka*Do/(Vd*(ke-ka))*(exp(-ka*t)-exp(-ke*t))}
```

graficamos los datos experimentales (en puntos rojos) para tener una idea donde se ubican los valores de concentración plasmática hallados en el experimento, fijando un rango del eje vertical más amplio que el rango de valores, especulando que la simulación puede escapar del rango experimental, Figura 6.

```
> plot(tablaR763$t,tablaR763$F,pch=19,col=2,ylim=c(0,250))
```

creamos un vector de tiempo del largo del experimento

```
> tfit<-seq(0,360,1)
```

Ahora creamos otro vector con valores de concentración para el intervalo tiempo que tenemos en tfit, utilizando la función F, que ajusta la concentración

```
> ffit<-F(tfit)
```

graficamos la línea (continua negra) que muestra los datos de nuestro modelo que, como la función F utilizará los valores calculados, deberá ajustarse a los puntos experimentales. Comparar puntos rojos (experimentales) con línea negra

```
> lines(spline(tfit,ffit),lwd=2,col=1)
```

Ahora simularemos una constante de absorción que sea el doble del valor calculado.

```
> ka<-2*ka
```

recalculamos ffit, con este valor de ka

```
> ffit<-F(tfit)
```

y graficamos una nueva línea (continua roja) que estaría simulando qué valores de concentración tendríamos con una absorción con un parámetro de valor doble.

```
> lines(spline(tfit,ffit),lwd=2,col=2)
```

elevamos el valor de ka nuevamente al doble, es decir cuatro veces mayor que al inicio

```
> ka<-2*ka
```

recalculamos los valores de ffit, ya que un parámetro se modificó

```
> ffit<-F(tfit)
```

y graficamos estos valores simulados, en coloazul

```
> lines(spline(tfit,ffit),lwd=2,col=4)
```

Claramente vemos que un aumento del proceso de absorción manteniendo los otros procesos constantes producen un aumento del máximo de concentración plasmático y un acortamiento del tiempo necesario para alcanzar la máxima concentración. No se observan grandes cambios para los valores de concentración a tiempos superiores a 150 min.

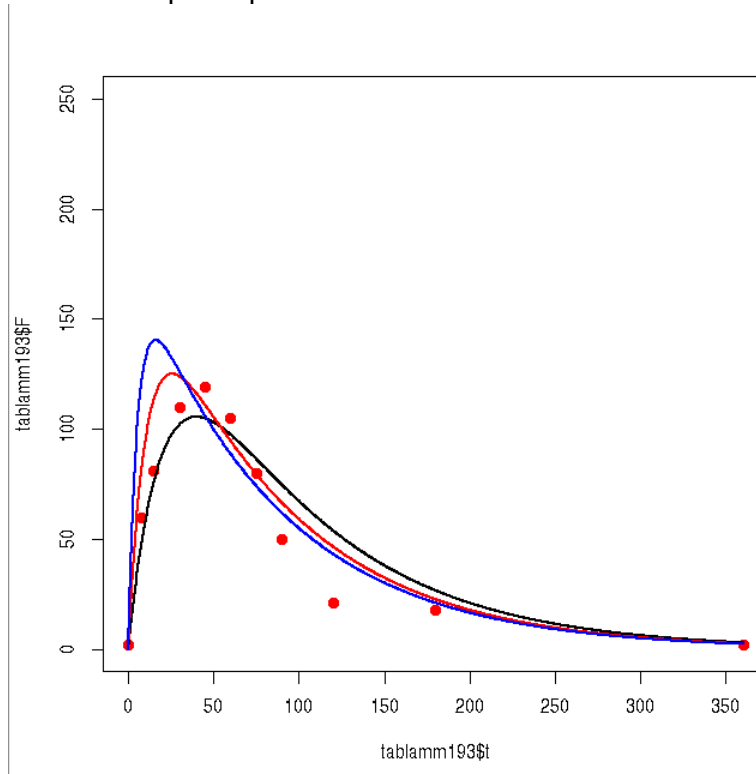


Figura 6

De esta manera se puede realizar simulaciones modificando otros parámetros, o varios a la vez. Por supuesto siempre los valores y curvas halladas serán en base a nuestro modelo y más cercana será la simulación si los supuestos se pudieron verificar y los ajustes a cada situación tuvieron elevado R-squared.

Excreción urinaria de Fluoruro después de una dosis oral

La cantidad de fluoruro en orina (U), depende de la concentración plasmática de fluoruro (F). La velocidad de cambio de U es proporcional a la cantidad de F en plasma. El fluoruro filtra libremente a nivel de los glomérulos renales, por tener bajo peso molecular y no estar ligado a proteínas del plasma. Por lo tanto la derivada de U respecto de t queda expresada como:

$$\frac{dU}{dt} = k_u * F$$

aplicando transformadas de Laplace a la expresión anterior, se obtiene

$$s * \bar{U} - U_o = k_u * \bar{F}$$

Si el animal no recibió previamente fluoruro, a $t = 0$ la cantidad de fluoruro en orina es despreciable, por lo que podemos considerar que $U_o = 0$. Con esta última suposición y reemplazando la transformada de la cantidad de F en plasma, hallada al desarrollar la ecuación de fluoremia

$$\bar{F} = \frac{k_a * D_o}{(s + k_a) * (s + k_e)}$$

se obtiene

$$s * \bar{U} = \frac{k_u * k_a * D_o}{(s + k_a) * (s + k_e)}$$

despejando la transformada de la excreción urinaria

$$\bar{U} = \frac{k_u * k_a * D_o}{s * (s + k_a) * (s + k_e)}$$

y aplicando la antitransformada a esta expresión, se obtiene

$$U = k_u * k_a * D_o * \left[\frac{1}{k_a * k_e} + \frac{1}{k_a * (k_a - k_e)} * e^{-k_a * t} - \frac{1}{k_e * (k_a - k_e)} * e^{-k_e * t} \right]$$

En la ecuación anterior U representa la cantidad de fluoruro en orina en función del tiempo luego de una dosis oral de fluoruro de sodio.

Si dispusiéramos de valores de excreción urinaria de fluoruro a lo largo del tiempo, como todos los parámetros de la función U son conocidos, excepto k_u , aplicando la función nls() de ajuste no lineal nos permitiría hallar dicho valor. Con el valor de k_u luego podríamos hallar k_o que es la constante de captación de F por el hueso dado que

$k_e = k_o + k_u$.

Veremos esto en clases venideras.

Clase 7

Medición del Remodelado óseo en ratas

En este capítulo adaptaremos un modelo matemático desarrollado para la farmacocinética a medidas de interés en el diagnóstico médico. En este caso utilizaremos la farmacocinética del anión fluoruro (F) para medida del proceso de remodelado óseo. Se mostrará en este capítulo el desarrollo y la obtención de datos, omitiendo otras comprobación que se desarrollaron para validar el mismo.

A modo de introducción podemos decir que el tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo que, como todos los tejidos tiene una constante renovación. Este proceso se denomina remodelado óseo y está compuesto por dos fases: una fase de remoción del tejido óseo existente conocida como resorción ósea y una fase de rellenado de la zona removida, el que se conoce como formación ósea. Ambos procesos están vinculados y llevados a cabo por células del tejido óseo bajo la acción de hormonas y factores locales del sistema autócrino y parácrino. En condiciones normales la resorción y formación ósea están acopladas. Cuando el tejido óseo sufre algún daño, se produce la resorción del sector, para eliminar el hueso dañado y luego se produce la formación rellenando nuevamente el espacio con hueso nuevo. En este caso hay una coincidencia espacial y un desfase temporal. Contrariamente en algunas situaciones puede ocurrir resorción en un sector como consecuencia que las células detectan que no es necesario un hueso tan fuerte para cumplir su función, mientras que otras células producen formación fortificando los sectores más solicitados del hueso. Esto es común durante el crecimiento o ante la aplicación de fuerzas sobre el esqueleto. Este proceso se conoce como modelado óseo.

Las patologías ósea normalmente se acompañan de cambios en el remodelado óseo y el conocimiento de la magnitud de este cambio es un dato importante para evaluar el tipo de tratamiento a aplicar y su duración. De la misma manera, el seguimiento en el tiempo del valor de los procesos de formación y resorción ósea nos indicará sobre el éxito del tratamiento y el progreso o retroceso de la patología.

Existen diferentes métodos para medir el remodelado óseo, siendo el método de elección la medición en sangre y/o orina de sustancia vinculadas a los procesos de formación y resorción. Se conocen a estas sustancia como marcadores de remodelación y se requieren al menos dos marcadores, uno de formación y otro de resorción. El uso de isótopos radiactivos como el calcio que tiene afinidad por el tejido óseo es también adecuado para la medición del remodelado óseo. Estos dos métodos dan medidas globales del esqueleto, sin poder evaluar qué ocurre de manera local en un hueso. Otro método es obtener una biopsia y se puede inferir sobre el remodelado en base al estudio histológico del hueso obtenido. Esta técnica nos permite evaluar el estado del remodelado en un sitio puntual, pero es inapropiada para estudios sistémicos.

El fluoruro es un ion con afinidad por el tejido óseo y por su inclusión en el cristal de hidroxapatita, su captación aumentará en casos que aumente la formación ósea y por otra parte aumentará la salida de fluoruro del hueso si hay un aumento en la resorción ósea. Este principio permite que el fluoruro sea utilizado como un marcador del remodelado. A continuación se plantea un modelo matemático que permite su utilización en este campo. Para este desarrollo nos basaremos en el desarrollo de la farmacocinética del fluoruro presentada en la clase anterior.

Modelo matemático a partir de una dosis endovenosa

Definición de etapas del estudio

El modelo matemático que se desarrolla a continuación tiene como principal finalidad permitir la medida del ingreso y egreso de F del hueso en la rata a partir de un dato de fluoremia y de datos de excreción urinaria de F. Para poder lograrlo se deben realizar mediciones antes y después de administrar una dosis endovenosa de NaF.

Desarrollo antes de la administración de la dosis.

El F, como hemos visto, puede ingresar por vía oral, siendo esta la vía más común de ingreso al organismo. En ausencia de ingesta habrá circulación de F entre el plasma, hueso y riñón, fundamentalmente. A fines prácticos de simplificar el desarrollo, los restantes tejidos pueden ser desestimados en el proceso. El intercambio de F entre los órganos mencionados queda representado en la Figura 1.

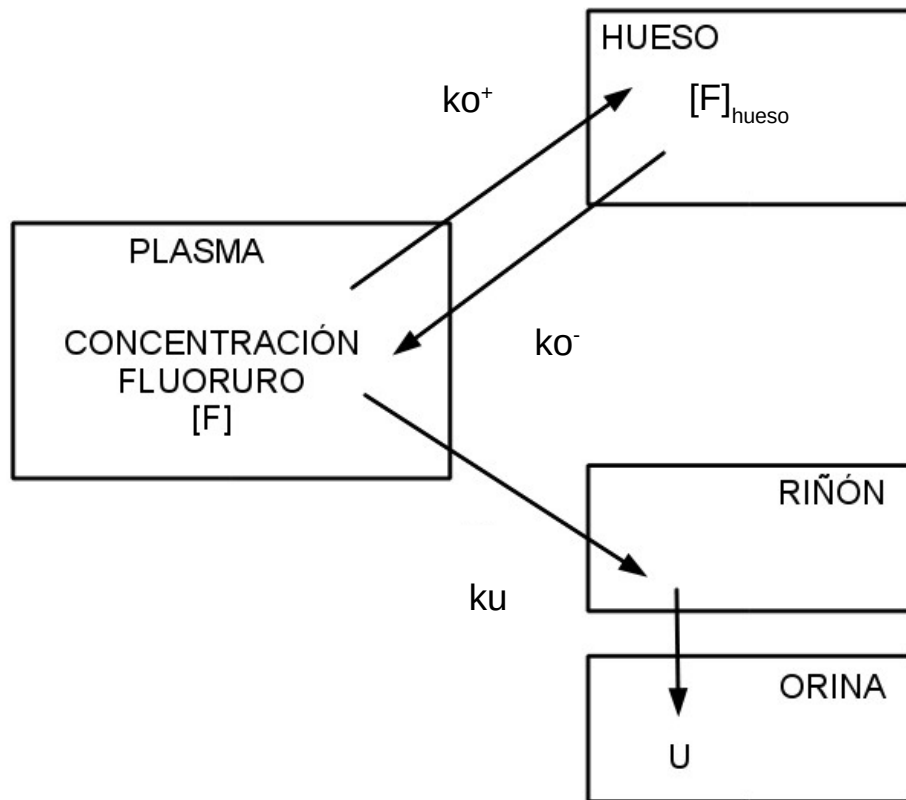


Figura 1. Distribución y eliminación plasmática del F luego de una dosis endonevosa.

Donde:

[F]: concentración plasmática de fluoruro.

[F]_{hueso}: concentración ósea de fluoruro.

k_o^+ : constante de velocidad de ingreso de F al hueso

k_o^- : constante de velocidad de salida de F del hueso

k_u : constante de velocidad de excreción urinaria de F

U: cantidad de μmol de F excretado en orina.

Si llamamos F_p a la cantidad de fluoruro en plasma, la variación de la cantidad de F en plasma podemos expresarla con la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF_p}{dt} = k_o^- * [F]_{\text{hueso}} - k_o^+ * [F] - k_u * [F]$$

Ecuación 1

Supuesto del modelo: los procesos involucrados son considerados de orden 1 respecto de las concentraciones involucradas. Esta decisión está tomada en base al estudio farmacocinético del F realizada anteriormente a este módulo del curso.

Podemos llamar F_o al proceso de ingreso de F al hueso, que queda representado por la siguiente ecuación

$$F_o = k_o^+ * [F]$$

Ecuación 2

Por otra parte llamamos R_o a la salida de F del hueso, quedando representada por la ecuación

$$Ro = k_o * [F]_{\text{hueso}}$$

Ecuación 3

y finalmente llamamos Vu a la velocidad de excreción urinaria, que se supuso directamente proporcional a la concentración plasmática basal de flúor y a una constante de velocidad de depuración urinaria, ku.

$$Vu = ku * [F]$$

Ecuación 4

Así la Ecuación 1 queda escrita

$$\frac{dFp}{dt} = Ro - Fo - k_u * [F]$$

Ecuación 5

Antes de administrar la dosis de F y en ausencia de otra fuente de F, la cantidad de fluoruro plasmático (Fp) permanece constante dependiendo exclusivamente de los valores de Ro, Fo y Vu. En esta situación el fluoruro plasmático se halla en estado estacionario, siendo el valor constante y por ende la derivada primera de Fp respecto del tiempo es cero:

$$0 = Ro - Fo - k_u * [F]$$

Ecuación 6

Llamamos Vo a la velocidad neta de salida de F al hueso

$$Vo = Ro - Fo$$

Ecuación 7

reemplazando Ecuación 7 en la Ecuación 6, se obtiene:

$$0 = Vo - k_u * [F]$$

Ecuación 8

De la cual resulta

$$Vo = ku * [F]$$

Ecuación 9

Por su parte la velocidad de excreción urinaria de F es proporcional a la concentración plasmática de fluoruro y a la constante de velocidad de excreción urinaria de F.

$$\frac{dU}{dt} = ku * [F]$$

Ecuación 10

Reordenando,

$$dU = ku * [F] * dt$$

Ecuación 11

resolviendo la ecuación diferencial entre t=0 y un tiempo t

$$\int_0^U dU = ku * [F] * \int_0^t dt$$

Se obtiene la excreción urinaria de F en un dado intervalo de tiempo, t.

$$U = k_u * [F] * t$$

Ecuación 12

Como k_u y $[F]$ son constantes, pueden expresarse como una sola constante, que llamamos k_b .

$$k_b = k_u * [F]$$

Ecuación 13

reemplazando la Ecuación 13 en la Ecuación 12 resulta

$$U = k_b * t$$

Ecuación 14

Siendo k_b la excreción urinaria basal de F, que corresponde a la pendiente de la regresión lineal entre la excreción urinaria de F (U) y el tiempo. Relacionando la Ecuación 9 y Ecuación 13, se obtienen:

$$V_o = k_b$$

Ecuación 15

o

$$R_o - F_o = k_b$$

Ecuación 16

y

$$k_u = \frac{k_b}{[F]_b}$$

Ecuación 17

De lo expuesto anteriormente se puede concluir que es posible obtener los valores de k_u y V_o a través de la pendiente de la recta de U en función del tiempo y de la concentración plasmática de flúor antes de inyectar una dosis de F.

Desarrollo luego de administrar una dosis endovenosa

Luego de la dosis endovenosa de F: la variación de la cantidad de fluoruro en plasma viene dada por la Ecuación 18, que en esta situación no se puede igualar a cero, ya que F_p cambia a lo largo del tiempo

$$\frac{dF_p}{dt} = k_o^- * [F]_{\text{hueso}} - k_o^+ * [F] - k_u * [F]$$

Ecuación 18

Supuesto del modelo: En la Ecuación 18, el término $k_o^- * [F]_{\text{hueso}}$, se puede considerar despreciable, porque luego de una dosis de F se asume que la concentración plasmática de flúor es muy superior al valor basal, y por lo tanto el proceso de incorporación de F al hueso sería mayor que el proceso de liberación de F del hueso, resultando

$$\frac{dF_p}{dt} = -k_o^+ * [F] - k_u * [F]$$

Ecuación 19

Si obtenemos factor común en el término de la derecha resulta,

$$\frac{dF_p}{dt} = -(k_o + k_u) * [F]$$

Ecuación 20

Llamamos ke a la suma de las constantes, que expresamos con la siguiente ecuación

$$k_e = k_o + k_u$$

Ecuación 21

Reemplazando la Ecuación 21 en la Ecuación 20 se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dF_p}{dt} = -k_e * [F]$$

Expresando la concentración en función de la cantidad y el volumen, donde Vd es el volumen de distribución de F:

$$\frac{dF_p}{dt} = -k_e * \frac{F_p}{V_d}$$

Ecuación 22

Reordenando:

$$\frac{dF_p}{F_p} = \frac{-k_e}{V_d} * dt$$

Ecuación 23

Integrando entre 0 y t:

$$\int_{D_o}^{F_p} \frac{dF_p}{F_p} = -\frac{k_e}{V_d} \int_0^t dt$$

Ecuación 24

Se obtiene: la siguiente ecuación. Aclaración a t = 0, Fp tomaría el valor Do, que es la dosis inyectada.

$$\log \frac{F_p}{D_o} = \frac{-k_e}{V_d} * t$$

Ecuación 25

que eliminando el log resulta

$$\frac{F_p}{D_o} = e^{\frac{-k_e}{V_d} * t}$$

Ecuación 26

Reordenando y dividiendo a ambos miembros por el Vd se obtiene:

$$[F] = \frac{D_o}{V_d} * e^{\frac{-k_e}{V_d} * t}$$

Ecuación 27

Que es la ecuación que representa la concentración de F en plasma a lo largo del tiempo luego de administrar una dosis oral de fluoruro.

A partir de la variación urinaria de F respecto al tiempo, expresada en la Ecuación 10 y replanteada a continuación:

$$\frac{dU}{dt} = ku * [F]$$

Ecuación 28

reemplazando la Ecuación 27 en la Ecuación 28 se obtiene:

$$\frac{dU}{dt} = \frac{ku * Do}{Vd} * e^{\frac{-ke}{Vd} * t}$$

Ecuación 29

Reordenando e integrando:

$$\int_0^U dU = \frac{ku * Do}{Vd} * \int_0^t e^{\frac{-ke}{Vd} * t} * dt$$

Ecuación 30

Resolviendo la integral y sumando la excreción basal en el tiempo (kb.t):

$$U = \frac{ku * Do}{ke} (1 - e^{-ke * \frac{t}{Vd}}) + kb * t$$

Ecuación 31

Se obtiene la variación de la cantidad de fluoruro eliminado por orina a lo largo del tiempo luego de administrar una dosis intravenosa de fluoruro: Do. Si se calcula la derivada primera de la excreción urinaria de F, representada por la Ecuación 31 se obtiene:

$$U' = \frac{kuDo}{ke} (0 - e^{-ke \frac{t}{Vd}} (-\frac{ke}{Vd})) + kb$$

Ecuación 32

Reordenando:

$$U' = \frac{kuDo}{Vd} e^{-ke \frac{t}{Vd}} + kb$$

Ecuación 33

La expresión de U' para t=0 resulta:

$$U'_{(0)} = \frac{kuDo}{Vd} + kb$$

Ecuación 34

Dado que ku, Do y kb son valores conocidos y calculados anteriormente, y U' es fácilmente aproximable a través de la excreción de F en orina a tiempos inmediatos después de la dosis, dividido por el tiempo en que se recolectó la muestra de orina, se puede obtener el valor de Vd. Finalmente con los valores de los datos Do y Fb y los parámetros ku, kb y Vd podemos calcular ke, haciendo una ajuste no lineal de los datos de U en función del tiempo luego de administrar la dosis utilizando la ecuación

$$U = \frac{ku * Do}{ke} (1 - e^{-ke * \frac{t}{Vd}}) + kb * t$$

Ecuación 35

Así con el desarrollo y las ecuaciones podemos conocer todas las constantes y parámetros del modelo, que aplicaremos al cálculo de R_o y F_o , que son las velocidades de salida e incorporación de fluoruro del hueso y que son proporcionales a los procesos de resorción y formación ósea, respectivamente.

Con el valor de k_e y k_u obtenemos k_o^+

$$k_o^+ = k_e - k_u$$

con k_o^+ y F_b , aplicando la Ecuación 2, obtenemos F_o

$$F_o = k_o^+ * F_b$$

con la Ecuación 16, el valor de k_b y F_o , calculamos R

$$R_o = k_b + F_o$$

Ecuación 36

Procedimiento de cálculo de R_o y F_o :

La Figura 2 muestra un esquema de la metodología para la obtención de los valores de F_o y R_o .

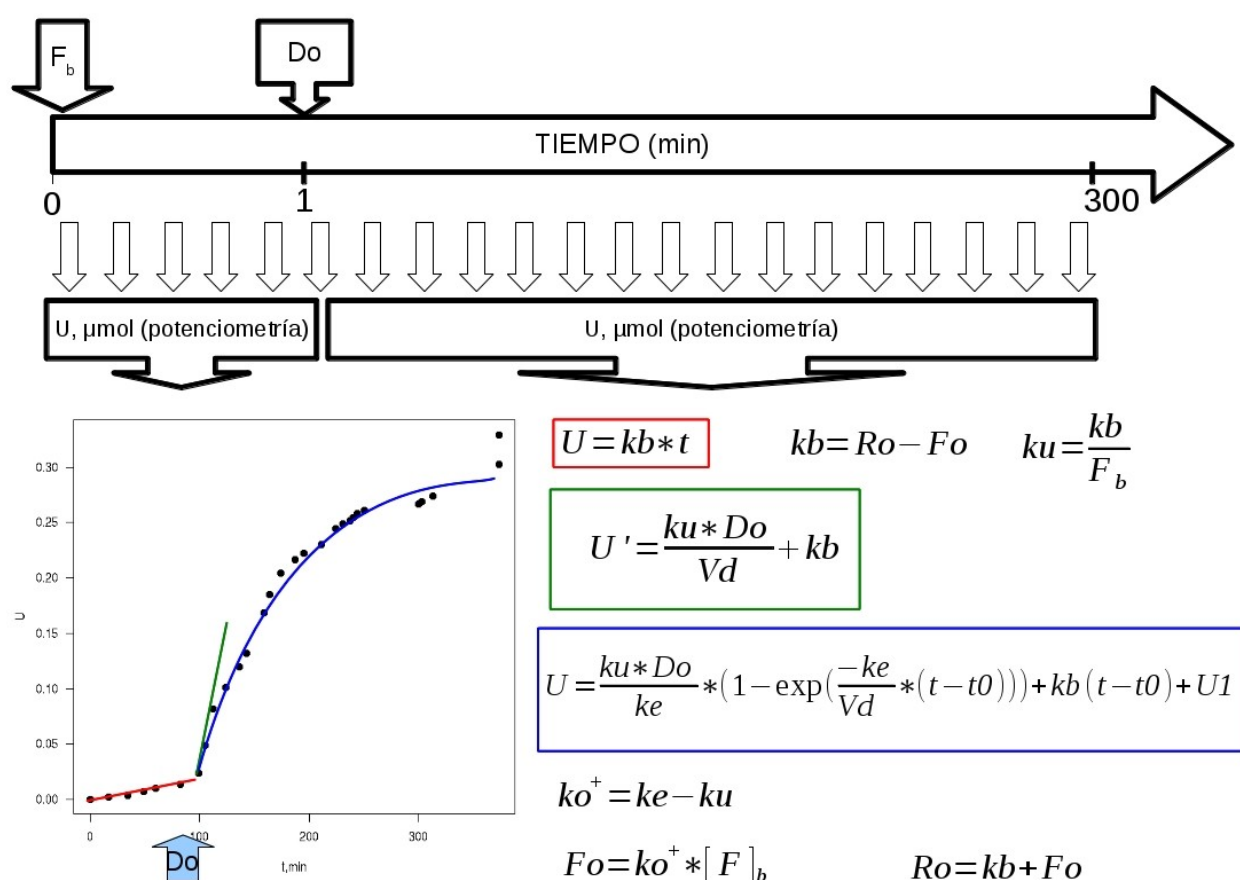


Figura 2. Descripción esquemática de la metodología para la medición de R_o y F_o . Las ecuaciones que se utilizan para ajustes están recuadradas en el mismo color que las líneas de la gráfica U vs t . Ver explicación en el texto.

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

1. Al inicio del experimento, antes de la administración de una dosis endovenosa de F (Do), se obtiene una muestra de sangre para la medición de la concentración de flúor basal ($[F]_b$).
2. Luego de anestesiarse al animal y realizar el cateterismo uretral se recolecta orina durante 1 h y en la misma se mide la excreción urinaria de F (U). La U se ajusta por una función lineal del tiempo, cuya pendiente es el parámetro k_b , representada por la línea roja de 0-100 minutos.

3. Con el valor del parámetro **kb** y $[F]_b$ se obtiene el valor de la constante de velocidad de excreción urinaria (**ku**) utilizando la Ecuación 17. A su vez, el parámetro kb es igual a la diferencia entre Ro y Fo, que llamamos Vo.
4. Inmediatamente luego de este período se administra una dosis endovenosa de F (Do) y se continua recolectando orina a intervalos de 10-15 min durante 4 h. En las muestras recolectadas se mide la concentración de F y se calcula la U.
5. Utilizando los primeros valores de U luego de la administración de Do se calcula la velocidad de cambio de U (U') y a partir de este valor, junto con ku, kb y Do se obtiene **Vd** utilizando la Ecuación 34.
6. El valor de **ke** se obtiene realizando un ajuste de los datos de U luego de administrar Do, utilizando la Ecuación 31 y los valores de Do, ku, kb y Vd obtenidos previamente.
7. Se calcula **ko⁺** utilizando la Ecuación 21 con los valores de ke y ku obtenidos.
8. Utilizando la Ecuación 2 y los valores de ko⁺ y $[F]_b$, se obtiene **Fo**.
9. Se calcula **Ro** con la Ecuación 16 y los valores de kb y Fo.

Cálculos del remodelado óseo con R

En primer lugar introducimos la tablaR771 de la planilla de cálculo `tablaR7-7.ods/xls`, conteniendo los valores de fluoruria. Los datos están expresados en umoles de F acumulados hasta un dado tiempo. Estos valores surgieron de la medición de la concentración de fluoruro en muestras de orinas obtenidas en una rata con cateterismo uretral. La medición de estas concentraciones se realizó por una técnica potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico.

```
>tablaR771<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

comprobamos el ingreso de los datos

```
> tablaR771
```

	t	U
1	0	0.000000000
2	17	0.002347548
3	34	0.003658308
4	49	0.007424558
5	60	0.010246128
6	82	0.013338403
7	99	0.023825705
8	105	0.048720900
9	112	0.081996725
10	124	0.101191619
11	136	0.119435800
12	143	0.131751329
13	159	0.168766423
14	164	0.184806482
15	174	0.204174451
16	187	0.216569240
17	195	0.222030576
18	211	0.230416198
19	224	0.244523116
20	231	0.248636486
21	237	0.251756145
22	240	0.254620523
23	244	0.257990618
24	250	0.260775484
25	300	0.266869340
26	303	0.269174358

```
27 313 0.273843120
```

```
28 373 0.302530024
```

```
29 373 0.329350898
```

```
> summary(tablaR771)
```

t	U
Min. : 0.0	Min. :0.00000
1st Qu.:105.0	1st Qu.:0.04872
Median :174.0	Median :0.20417
Mean :177.2	Mean :0.16313
3rd Qu.:240.0	3rd Qu.:0.25462
Max. :373.0	Max. :0.32935

Como figura en la tablaR772 de la planilla de cálculo, para este animal se midió la fluoremia basal que introduciremos en nuestro espacio de trabajo

```
> Fb<- 305
```

la dosis de fluoruro inyectada por vía intravenosa, expresada en micromoles

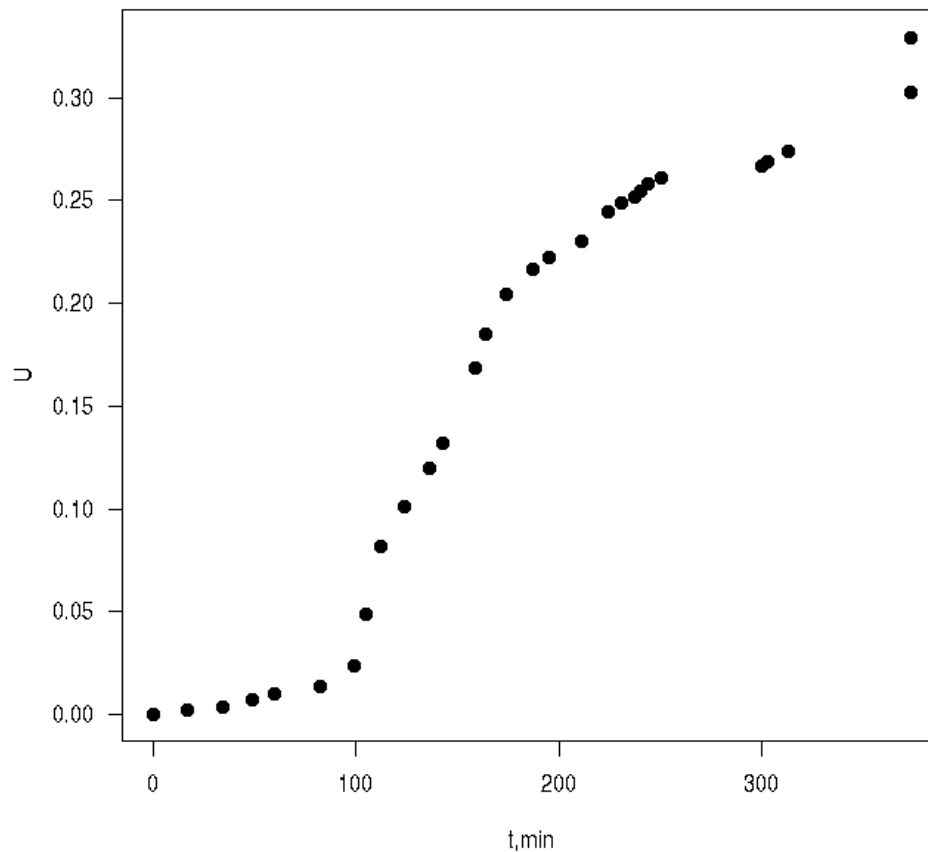
```
> Do<-2.58
```

y el tiempo al cual se realizó dicha inyección, expresado en minutos

```
> t0<-82
```

En primer lugar graficaremos los datos de U vs t, para observar si los mismos tienen comportamiento esperable, según podemos predecir a partir del conocimiento de la farmacocinética del fluoruro. Los datos de U deben crecer de manera monótona en función del tiempo y nunca deberían decrecer. Algún comportamiento de este tipo estaría indicando un error en la introducción de los datos.

```
> plot(tablaR771$t,tablaR771$U,pch=19,xlab="t, min",ylab="U",las=1)
```



Cálculo de kb, ku y Vo

Para ello ajustamos una función lineal a los valores de U vs t, para $t \leq 82$, utilizando la función `lm()` y forzando su paso por el origen, para lo cual agregamos el operador -1. Debemos recordar, teniendo en cuenta el desarrollo, que la pendiente de la recta de U vs t, antes de inyectar la dosis de F corresponde al parámetro kb

```
> lmbasal<-lm(U~t-1,data=tablaR771[c(1:6),])
> summary(lmbasal)
```

Call:

```
lm(formula = U ~ t - 1, data = tablaR771[c(1:6), ])
```

Residuals:

1	2	3	4	5	6
-5.171e-18	-3.358e-04	-1.708e-03	-3.097e-04	7.757e-04	3.954e-04

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
t	1.578e-04	7.405e-06	21.32	4.21e-06 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0008815 on 5 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9891, Adjusted R-squared: 0.9869

F-statistic: 454.4 on 1 and 5 DF, p-value: 4.213e-06

El valor de kb corresponde a la pendiente de la función lineal ajustada, que introducimos en nuestro espacio, utilizando el coeficiente del modelo lineal utilizado

```
> kb<-lmbasal$coefficient[1]
```

comprobamos que kb fue adecuadamente asignado

```
> kb
```

```
      t  
0.0001578413
```

Recordamos que

$$k_u = \frac{k_b}{[F]_b}$$

Ecuación 37

por lo tanto el valor de ku lo obtenemos con los valores hallados

```
> ku<-lmbasal$coefficient[1]/Fb
```

```
> ku
```

```
      t  
5.175124e-07
```

Podemos resumir hasta acá los datos y parámetros hallados

Fb: 305 umol/L

t0= 82 min

Do= 2.58 umol

kb= 0.0001578413

ku= 0.0000005175124

Podemos graficar la función U utilizando nuestro parámetros y los datos experimentales. Primeramente definimos la función

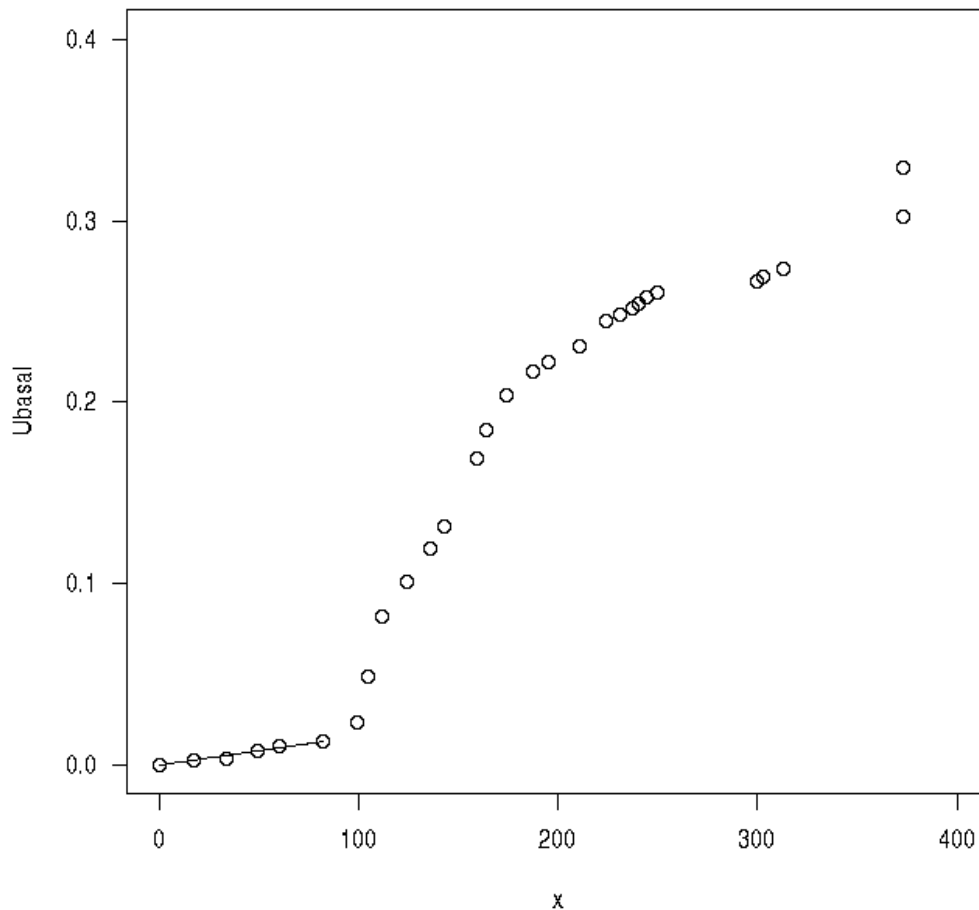
```
> Ubasal<-function(t){ku*Fb*t}
```

graficamos la misma

```
> plot(Ubasal,0,82,las=1,xlim=c(0,400),ylim=c(0,0.4))
```

y colocamos en la misma gráfica los puntos que representan U en función del tiempo.

```
> points(tablaR771$t,tablaR771$U)
```



La gráfica al igual que el valor de R-squared nos está mostrando un buen ajuste de los datos con el modelo planteado, antes de administrar la dosis D_0 .

Cálculo de k_e y V_d .

Como se desarrolló anteriormente, la derivada de U a tiempo cero viene expresada por la siguiente función

$$U'_{(0)} = \frac{k_u D_0}{V_d} + k_b$$

Ecuación 38

La derivada primera de U en función del tiempo la podemos estimar por la pendiente de la recta que ajusta U vs t , a tiempos cercanos al momento de la inyección. Tomaremos el intervalo de tiempo [82,105]min, que corresponde a las líneas 6:8 de la tablaR771

```
> lmdosis<-lm(U~t,data=tablaR771[c(6:8),])
```

```
> summary(lmdosis)
```

Call:

```
lm(formula = U ~ t, data = tablaR771[c(6:8), ])
```

Residuals:

```
      6      7      8
0.002531 -0.009703 0.007172
```

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.0987938	0.0700262	-1.411	0.393
t	0.0013366	0.0007307	1.829	0.319

Residual standard error: 0.01233 on 1 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.7699, Adjusted R-squared: 0.5398

F-statistic: 3.346 on 1 and 1 DF, p-value: 0.3185

La pendiente de esta recta es $U'_{(t=0)} = 0.0013366$
de la Ecuación 38 podemos obtener Vd

$$Vd = \frac{ku * Do}{U'_{(0)} - kb}$$

Ecuación 39

calculamos en R el valor de Vd utilizando la siguiente ecuación

```
> Vd<-ku*Do/(lmdosis$coefficient[2]-lmbasal$coefficient[1])
```

```
> Vd
```

t

0.001132706

agregamos este valor a la serie de datos y parámetros que venimos juntando

Fb: 305 umol/L

t0= 82 min

Do= 2.58 umol

kb= 0.0001578413

ku= 0.0000005175124

Vd= 0.001132709 L

Cálculo de ke

Para calcular ke utilizamos la ecuación

$$U = \frac{ku * Do}{ke} \left(1 - e^{-ke * \frac{t}{Vd}} \right) + kb * t$$

Ecuación 40

que modificaremos para que pueda ser utilizado directamente con los datos de la tablaR771

$$U = \frac{ku * Do}{ke} * \left(1 - e^{\frac{-ke}{Vd} * (t - t0)} \right) + kb * (t - t0) + U1$$

Ecuación 41

donde t0 es el tiempo en que se realiza la inyección y U1 la cantidad de fluoruro excretado hasta el momento de la inyección. Como t0=82 min, el valor de U1 que se obtiene de la tablaR771 es 0.0133384. Introducimos este valor en el espacio de trabajo

```
> U1= 0.0133384
```

El resto de los parámetros son conocidos y ya hemos introducidos esos valores. Asignaremos un valor inicial a ke, el que sabemos al menos que tiene que ser mayor que ku. Por lo que le asignaremos el valor 0.000001

Realizamos entonces un ajuste no lineal con la función nls()

```
> nlstablR771<-nls(U~ku*Do/ke*(1-exp(-ke/Vd*(t-t0)))+kb*(t-t0)+U1,tablaR771[c(6:29),],start=c(ke=0.000001),trace=TRUE)
```

0.04610722 : 1e-06

0.0460768 : 9.213029e-07

0.0460766 : 9.275402e-07

0.0460766 : 9.270824e-07

0.0460766 : 9.271162e-07

Como podemos ver el ajuste ha convergido a un número, reduciendo al mínimo el error.

Pedimos un summary() del ajuste

```
> summary(nlstablR771)
```

Formula: $U \sim ku * Do/ke * (1 - \exp(-ke/Vd * (t - t0))) + kb * (t - t0) + U1$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
ke	9.271e-07	6.078e-07	1.525	0.141

Residual standard error: 0.04476 on 23 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 4

Achieved convergence tolerance: 8.519e-07

Asignamos el valor al parámetro ke

```
> ke<-9.271e-07
```

Con el valor de ke y ku calculamos ko^+ utilizando la ecuación ya planteado

$$ke = ko^+ + ku$$

Ecuación 42

Llamaremos a la constante ko^+ como komas, para poder introducirla. Así obtenemos que

```
> komas=ke-ku
```

```
> komas
```

t

4.094876e-07

Podemos ahora calcular el valor de Fo utilizando la Ecuación 2

```
> Fo=komas*Fb
```

```
> Fo
```

t

0.0001249242

y aplicando la Ecuación 16, calculamos Ro

```
> Ro=kb+Fo
```

```
> Ro
```

t

0.0002827655

Así disponemos de los valores de F_o y R_o . Si este mismo animal fuera sometido a un tratamiento, podría medirse luego de un tiempo nuevamente F_o y R_o y decidir si este tratamiento afectó a la formación ósea (F_o), la resorción ósea (R_o), a ambas o a ninguno de los procesos

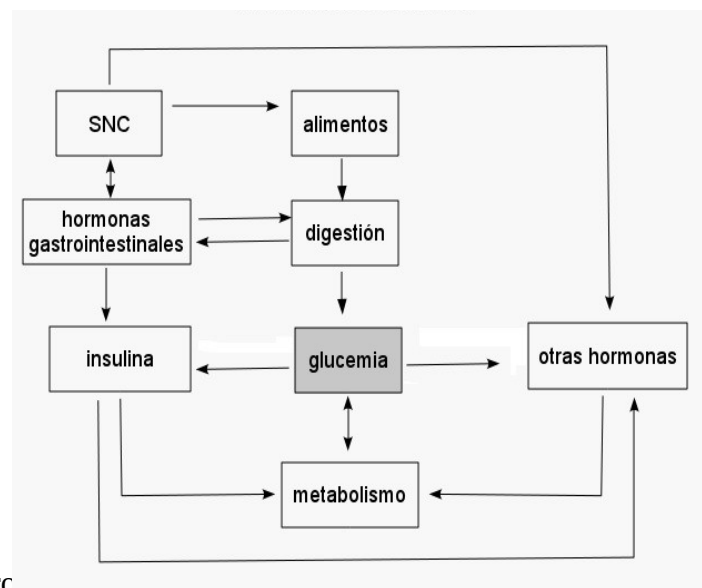
Una droga con efecto anabólico debería manifestarse con un aumento de F_o sin cambios en R_o . Contrariamente una droga antirresortiva, debería manifestarse con una disminución de R_o , sin cambios en F_o . En general las drogas utilizadas para mejorar la función ósea aumentan F_o o disminuyen R_o .

Clase 8

Resolución de sistemas de ecuaciones diferenciales

Los sistemas de ecuaciones diferenciales son útiles para enfrentar problemas de las ciencias biomédicas donde tenemos muchas variables cuyos valores se modifican a lo largo del tiempo y se encuentran relacionados entre sí. En esta clase, para abordar el tema desarrollaremos un sistema para el estudio de la homeostasis de la glucosa, por lo cual haremos una breve descripción del proceso biológico. Para tener una dimensión del problema que enfrentaremos, tenemos que tener en cuenta que el modelo desarrollado en este capítulo ocupó 6 años en el desarrollo de una beca doctoral y dio lugar a varios trabajos publicados.

La homeostasis de la glucosa es un complejo mecanismo que involucra factores endocrinos, autocrinos, paracrinos, nerviosos y metabólicos. La Figura 1 esquematiza algunos de los factores en juego en la homeostasis de la glucosa.



El resultado de este proceso es una variación dentro de límites muy estrechos, aun en estados de ingesta o privación de alimentos. En individuos sanos la glucemia se mantiene en un estrecho rango de variación que varía entre un máximo después de una comida y un mínimo después de realizar ejercicio físico o un período de ayuno. Numerosas hormonas participan en este control (insulina, glucagón, adrenalina, cortisol, hormona de crecimiento, incretinas, entre otras).

En respuesta a un aumento de la glucemia se produce secreción de insulina. Esta secreción presenta dos fases: una primer fase a los pocos minutos de la ingesta de glucosa y una segunda fase, que es mas duradera. Este proceso depende tanto de la insulina almacenada como de la síntesis de insulina y se prolonga tanto tiempo como dure la hiperglucemia. La glucosa en plasma proviene de los alimentos o es el resultado de la degradación del glucógeno en hígado o de la producción por células que realizan gluconeogénesis. En los seres humanos, la glucosa plasmática puede ser

removida debido a distintos procesos metabólicos: puede almacenarse inmediatamente en forma de glucógeno, degradarse en la glucólisis hasta piruvato o utilizarse en la vía de las pentosas.

Cuando la producción de insulina se ve disminuida o falla la respuesta de los tejidos a ésta, se generan entidades clínicas bien caracterizadas como son la diabetes mellitus tipo 1 (DMTI) y tipo 2 (DMTII). El tratamiento de la DMTI requiere habitualmente la administración de insulina, esta acción puede hacerse a través de inyecciones únicas o bien mediante la utilización de bombas de infusión. Estos dispositivos se programan de acuerdo a las actividades e ingesta de alimentos del paciente, obteniéndose buenos resultados. La implementación de un páncreas artificial constituye así una importante mejora en la terapéutica. Este dispositivo combina bombas de infusión de insulina, sensores subcutáneos continuos de glucosa y algoritmos de control que enlazan ambos mecanismos para que funcionen en forma simultánea y conjunta, con el objetivo de mantener la glucemia dentro del rango de valores normales. El desarrollo de esta tecnología requiere de la intervención de procesos de modelización matemática, que caractericen al sistema de una manera cuantitativa; y medidas de variables biológicas involucradas en el sistema homeostático. Un modelo matemático permite el diseño de controladores que sincronizan la información del sensor de glucosa y la bomba de infusión de insulina. Existen modelos matemáticos del sistema glucorregulatorio con finalidades diversas; por ejemplo: educacionales, para estimar la sensibilidad a la insulina, para el desarrollo de nuevos fármacos, entre otros. Si bien numerosas hormonas participan en el control de la glucemia, desde la práctica clínica frente a un cuadro de hiperglucemia se centra la atención en la insulina. Esto justifica el desarrollo de modelos del sistema glucosa-insulina pensados como un feedback con un controlador (el páncreas) y múltiples efectores (músculo, hígado, tejido adiposo) donde las variables de interés son la glucemia y la insulinemia. Bajo esta simplificación del sistema se han postulados numerosos modelos que podemos clasificar en 3 tipos: modelos de secreción de insulina, modelos del sistema glucosa insulina a corto plazo y modelos de diabetes a [22] largo plazo. Dentro de los modelos de secreción de insulina encontramos modelos complejos que intentan representar el proceso desde un punto de vista subcelular modelando el tráfico vesicular dentro de las células beta y la respuesta de estas células a la glucosa (Bertuzzi [23], Pedersen [24], Pedersen y Sherman [25]); y otros que persiguen reproducir la oscilación observada en los niveles de insulina plasmática (Sturis [26], Palumbo [27]). Este tipo de modelos aunque permiten una detallada descripción del proceso de secreción de insulina presentan alto número de parámetros de difícil estimación y se basan en variables de aun más difícil medición. Dentro de los modelos a largo plazo encontramos los modelos de Winter [28], Topp [29] y De Gaetano [30]. Estos modelos aunque de amplia utilidad, debido a que permitirían predecir progreso y evolución de la enfermedad, cuentan con pocos datos experimentales debido a dificultades económicas y éticas que impiden llevar a cabo experimentos a largo plazo; por lo cual, se basan principalmente en simulaciones y datos

22 Palumbo P, Ditlevsen S, Bertuzzi A, De Gaetano A, Mathematical modeling of the glucose–insulin system: A review, *Mathematical Biosciences* 244: 69–81. 2013.

23 Bertuzzi A, Salinari S, Mingrone G, Insulin granule trafficking in b-cells: mathematical model of glucose-induced insulin secretion, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E396. 2007.

24 Pedersen MG, Corradin S, Toffolo GM, Cobelli C, A subcellular model of glucose-stimulated pancreatic insulin secretion, *Phil Trans R Soc A* 366: 3525. 2008.

25 Pedersen MG, Sherman A, Newcomer insulin secretory granules as a highly calcium-sensitive pool, *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7432. 2009.

26 Sturis J, Pugh WL, Tang J, Ostrega DM, Polonsky JS, Polonsky KS, Alterations in pulsatile insulin secretion in the Zucker diabetic fatty rat, *Am J Physiol* 267: E250.1994.

27 Palumbo P, De Gaetano A, An islet population model for the endocrine pancreas, *J Math Biol* 61 (2): 171. 2010.

28 de Winter W, DeJongh J, Post T, Ploeger B, Urquhart R, Moules I, Eckland D, Danhof M, A mechanism-based disease progression model for comparison of long-term effects of pioglitazone, metformin and gliclazide on disease processes underlying Type 2 Diabetes Mellitus, *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 33: 313. 2006

29 Topp B, Promislow K, deVries G, Miura RM, Finegood DT, A model of betacell mass, insulin, and glucose kinetics: pathways to diabetes, *J Theor Biol* 206: 605. 2000.

30 De Gaetano A, Hardy T, Beck B, Abu-Raddad E, Palumbo P, Bue-Valleskey J, Prksen N, Mathematical models of diabetes progression, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295 (6): E1462. 2008.

poblacionales. Los modelos a corto plazo representan la dinámica glucosa-insulina frente a una perturbación externa como: una inyección de glucosa exógena, una ingesta oral de glucosa o aporte continuo por infusión de glucosa e insulina. Los modelos a corto plazo se basan principalmente en balances de masas donde se representa al sistema homeostático como compartimentos interconectados donde los materiales fluyen de uno a otro. Estos modelos permiten modelar la interacción glucosa-insulina por lo cual este tipo de modelos cobra relevancia en el desarrollo de mecanismos de control exógeno de la glucemia. Existen diferentes modelos matemáticos de este tipo. El modelo de Sorensen [31] pertenece a la clase de modelos compartimentales. Divide el organismo en compartimentos: el sistema nervioso central, el compartimiento de mezcla rápida representado por el espacio sanguíneo, la periferia (incluye el músculo esquelético y tejido adiposo), el intestino, el hígado y los riñones. El modelo fue desarrollado originalmente para representar a un sujeto sano, utilizando 22 ecuaciones diferenciales no lineales de las cuales 3 ecuaciones sirven para describir la secreción endógena de insulina. Los valores de los parámetros se derivan de la literatura y por lo tanto, solo representan un sujeto nominal promedio, con lo cual el modelo no puede representar la variabilidad intra e inter-paciente. El modelo de Fabietti [32] es un modelo de la dinámica de la glucosa-insulina específicamente concebido para facilitar el diseño y evaluación de algoritmos de control en lazo cerrado. El modelo se basa en una versión modificada del modelo mínimo de Bergman [33]. La secreción de insulina endógena ha sido sustituida por la infusión exógena de insulina por vía subcutánea y la cinética de la glucosa está representada por dos compartimentos. Las otras entradas externas del modelo, tales como las comidas y la administración de glucosa, se han representado conjuntamente con un submodelo de absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal. Cuatro de los 14 parámetros del modelo se estiman a partir de datos clínicos. Los parámetros restantes se obtienen a partir del ajuste del modelo con datos publicados en la literatura. El modelo de Hovorka [34] se compone de 9 ecuaciones diferenciales ordinarias y 15 parámetros libres. La variabilidad inter-paciente es representada por una población de 18 sujetos virtuales con DMTI. Los parámetros del modelo se obtuvieron a partir de estudios clínicos en pacientes con DMTI o de distribuciones de probabilidad poblacionales. La variabilidad intra-paciente se lleva a cabo mediante la superposición de oscilaciones sinusoidales en un subconjunto de parámetros del modelo. El Simulador Uva [35] fue obtenido a partir de una base de datos de 204 sujetos sanos que participaron en un protocolo con trazadores de glucosa marcada isotópicamente. La utilización de dichos trazadores permitió medir los distintos flujos de glucosa e insulina después de la ingesta de una comida mixta. Posteriormente, el modelo se adaptó a la población diabética a partir de datos de la literatura. En total el modelo tiene 13 ecuaciones diferenciales ordinarias y 26 parámetros libres.

La principal desventaja de estos modelos radica en el gran número de parámetros y los complejos estudios metabólicos que se deben realizar para conocerlos, que obliga a trabajar con valores promedios de muchos de ellos. Esto impide representar adecuadamente la variabilidad inter e intra-paciente y reduce la validez de los resultados obtenidos y con ello la aplicabilidad a los modelos. Además, la mayoría de ellos han sido desarrollados para humanos y los intentos de obtener todos los parámetros para ratas han sido infructuosos [36]. Por otro lado, no se hallaron metodologías que permitan estudiar in vivo de manera mini-invasiva los flujos de insulina y glucosa.

31 Sorensen JT. A physiologic model of glucose metabolism in man and its use to design and assess improved insulin therapies for diabetes. PhD thesis. Massachusetts Institute of Technology. 1985.

32 Fabietti PG, Canonico V, Federici MO, Benedetti MM, Sarti E, Control oriented model of insulin and glucose dynamics in type 1 diabetics, *Med Biol Eng Comput* 44: 69-78. 2006.

33 Bergman RN. The minimal model of glucose regulation: a biography, *Adv Exp Med Biol* 537:1-19. 2003.

34 Hovorka R, Canonico V, Chassin LJ, Haueter U, Massi-Benedetti M, Federici MO, Pieber TR, Schaller HC, Schaupp L, Vering T, Wilinska ME, Nonlinear model predictive control of glucose concentration in subjects with type 1 diabetes, *Physiol Meas* 25 (4): 905-20. 2004.

35 Kovatchev BP, Breton M, Dalla Man C, Cobelli C, In Silico Preclinical Trials: A Proof of Concept in Closed-Loop Control of Type 1 Diabetes, *J Diabetes Sci Technol* 3: 44-55. 2009.

36 Campetelli G, Lupo M, Fina BL, Zumoffen D, Basualdo M, Rigalli A, Computational model for studying the analogies between endocrine systems of humans and rats with diabetes mellitus, Experimental and simulated results. Symposium on Computer Applications in Biotechnology. Leuven, Belgica.

A continuación se desarrollará un modelo matemático para el estudio de la homeostasis glucosa-insulina, la estimación y optimización de sus parámetros y algunos experimentos de validación del modelo, desarrollados en el laboratorio de los autores de este material.

Descripción del modelo

El modelo que se describirá a continuación se fundamenta en que la glucemia es mantenida dentro de un rango normal gracias a la participación de la insulina y la acción de órganos, en forma dependiente de insulina (hígado, tejido adiposo y músculo) e independiente de la acción de esta hormona (sistema nervioso), Figura 2. En el planteo del sistema no se han considerado otras hormonas o procesos con el objetivo de alcanzar un equilibrio entre la representatividad y la aplicabilidad del modelo. En la Figura 2 se muestra un esquema representativo del modelo biológico y los procesos considerados en el planteo del modelo matemático.

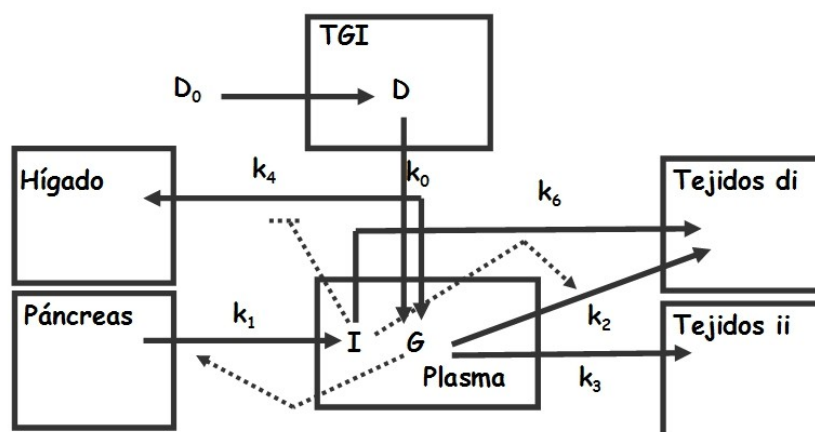


Figura 2. Sistema glucosa-insulina. Las líneas continuas representan flujo de glucosa o insulina y las líneas de puntos efecto estimulador (punta de flecha) o inhibitorio (punta roma). G : concentración de glucosa plasmática (mg/dl), I : concentración de insulina plasmática (pmol/l), D_0 : cantidad de glucosa ingerida a través de la dieta (mg), k_0 : constante de incorporación de glucosa en plasma desde el tracto gastrointestinal ($dl^{-1} min^{-1}$), k_1 : constante de velocidad de producción de insulina pancreática (pmol.dl/mg.min), k_2 : constante de velocidad de consumo de glucosa en los tejidos dependiente de insulina (mg.l/dl.min.pmol), k_3 : constante de velocidad de consumo de glucosa en los tejidos independiente de insulina (mg/min.dl), k_4 : constante de captación (para glucólisis y glucogenogénesis) o liberación de glucosa (por glucogenolisis y/o gluconeogénesis) por el hígado (mg.l/dl.min.pmol), k_6 : constante de depuración de insulina plasmática (min^{-1}). Las unidades de cada parámetro surgen del análisis de las dimensiones en función de las ecuaciones diferenciales planteadas a continuación.

El modelo propuesto (Ecuación 1) está constituido por 3 ecuaciones diferenciales. La primera de ellas representa la velocidad de cambio de la insulina plasmática. En este caso se consideró el aporte pancreático de insulina y su desaparición del plasma debido a su acción en los tejidos blanco. La segunda ecuación diferencial, plantea la variación de la concentración de glucosa plasmática considerando como factores perturbadores a la ingesta de glucosa a través de la dieta, el consumo de glucosa por parte de los tejidos en forma dependiente e independiente de insulina y el manejo hepático de la glucosa. La tercer ecuación diferencial representa la variación de la cantidad de glucosa en el aparato digestivo, siendo la única fuente de variación incluida el proceso de absorción de la glucosa [37].

37 Lombarte M, Lupo M, Campetelli G, Basualdo M, Rigalli A. Mathematical model of glucose-insulin homeostasis in healthy rats. Math Biosci 2013; 13: 181-188. 2013.

$$\frac{dI}{dt} = k_1 * G - k_6 * I$$

$$\frac{dG}{dt} = -k_4 * (I - I_{pi}) - k_3 - k_2 * I + k_0 * D$$

$$\frac{dD}{dt} = -k_a * D$$

Ecuación 1

En el sistema k_a , k_0 , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_6 representan constante de velocidad de procesos involucrados en cambios de la concentración plasmática de glucosa (G) o de insulina (I). G e I son funciones dependientes del tiempo cuyas derivadas (dI/dt y dG/dt) representan la variación de la glucemia e insulinemia en el tiempo y D la cantidad de glucosa en el tracto gastrointestinal, que es también una función del tiempo. I_{pi} es un parámetro del modelo relacionado con el funcionamiento hepático respecto del metabolismo glucídico. Los términos con signo negativo corresponden a procesos que producen una disminución en la concentración de glucosa en plasma o intestino y de insulina plasmática. Por su parte, los términos con signo positivo representan a aquellos procesos que aumentan la concentración plasmática de las sustancias en estudio.

En la ecuación que representa la variación de la concentración de insulina plasmática (dI/dt), el término $k_1 * G$ representa la secreción pancreática de insulina, la cual está regulada por la cantidad de glucosa en plasma, y el término $-k_6 * I$ refleja la desaparición del plasma de la insulina debido a su acción en los tejidos blanco.

En la ecuación que representa la variación de la concentración de glucosa plasmática (dG/dt), el término $-k_4 * (I - I_{pi})$ representa el consumo o producción hepático de la glucosa, siendo un término positivo cuando la insulina es baja ($I < I_{pi}$) indicando el aporte de glucosa al plasma debido a la glucogenolisis y gluconeogénesis. Contrariamente, este término es negativo cuando la concentración de insulina es mayor que I_{pi} , indicando el ingreso de glucosa al hígado para glucogenogénesis y/o glucólisis. El parámetro I_{pi} es un valor de insulina plasmática en el cual el hígado cambia su comportamiento de productor a consumidor de glucosa y viceversa. El término k_3 representa el consumo de glucosa independiente de insulina. Por su parte el término: $-k_2 * I$, representa el consumo de glucosa en tejidos en forma dependiente de insulina y el término: $k_0 * D$, representa la glucosa incorporada a partir del sistema digestivo.

Los parámetros (k_1 a k_6 , e I_{pi}) del sistema son valores que representan el comportamiento intrínseco de cada uno de los factores que influyen sobre la homeostasis del sistema glucosa-insulina. Dichos valores serán influenciados por factores que afecten a cada uno de los procesos del sistema homeostático, por lo tanto conocer dichos valores es de capital importancia. Para obtener el valor de estos parámetros se realizan dos pasos:

1- Estimación de los parámetros que permite hallar valores aproximados, que serán utilizados en el segundo paso de optimización.

2- Optimización: es un proceso en el que partiendo de los valores estimados se buscan los mejores valores de manera que las ecuaciones ajusten los datos experimentales. A continuación se muestran los procedimientos matemáticos para la estimación de los parámetros y luego la estimación de los parámetros en ratas normales.

Estimación de parámetros en ratas sanas

El proceso de estimación se realiza con los datos de glucemia e insulinemia de cada animal. A modo de ejemplo veremos el proceso sobre una de las ratas Sprague Dawley utilizadas en el trabajo. Se emplearon en total 11 ratas hembras sanas adultas de peso corporal 346.6 ± 20.4 g. Cada animal

recibe al inicio del experimento una dosis oral de glucosa, D₀. Llamamos prueba de tolerancia a la glucosa oral a esta administración y la simbolizamos con ls siglas: PTGO.

Utilizaremos los valores de insulinemia y glucemia medidos durante 6h. Para ello introduzca en su espacio de trabajo la tablaR781 de la planilla de cálculo tablaR7-8.xls/ods

```
> tablaR781<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec=',',sep='\t',encoding='latin1')
```

```
> tablaR781
```

	t	G	I
1	0	105.2	71.33
2	5	126.8	111.03
3	10	141.8	132.30
4	15	157.3	152.01
5	30	271.0	261.79
6	60	244.6	156.65
7	90	200.0	119.20
8	120	148.2	97.91
9	180	129.8	82.66
10	240	120.0	80.10
11	300	103.2	72.00
12	360	94.9	53.69

```
> summary(tablaR781)
```

t	G	I
Min. : 0.00	Min. : 94.9	Min. : 53.69
1st Qu.: 13.75	1st Qu.:116.3	1st Qu.: 78.08
Median : 75.00	Median :135.8	Median :104.47
Mean :117.50	Mean :153.6	Mean :115.89
3rd Qu.:195.00	3rd Qu.:168.0	3rd Qu.:137.23
Max. :360.00	Max. :271.0	Max. :261.79

Graficamos los valores para los valores de glucemia e insulinemia luego de la PTGO en el animal en estudio. Realizaremos ambos gráficos a través de un sistema de gráficos múltiples. R nos permite modificar algunos parámetros gráficos para poder hacerlo. Para ello cambiaremos el parámetro mfrow, el que tomará el valor c(1,2). Dentro del paréntesis anterior, el primer número indica las filas y el segundo la cantidad de columnas, es decir que haremos los dos gráficos en una línea con dos columnas.

```
> par(mfrow=c(1,2))
```

graficamos los valores de G

```
> plot(tablaR781$t,tablaR781$G,xlab='tiempo,min',ylab='glucemia, mg/dl',pch=19,las=1)
```

y los de I

```
> plot(tablaR781$t,tablaR781$I,xlab='tiempo,min',ylab='insulinemia, pmol/l',pch=19,las=1)
```

con lo que obtenemos

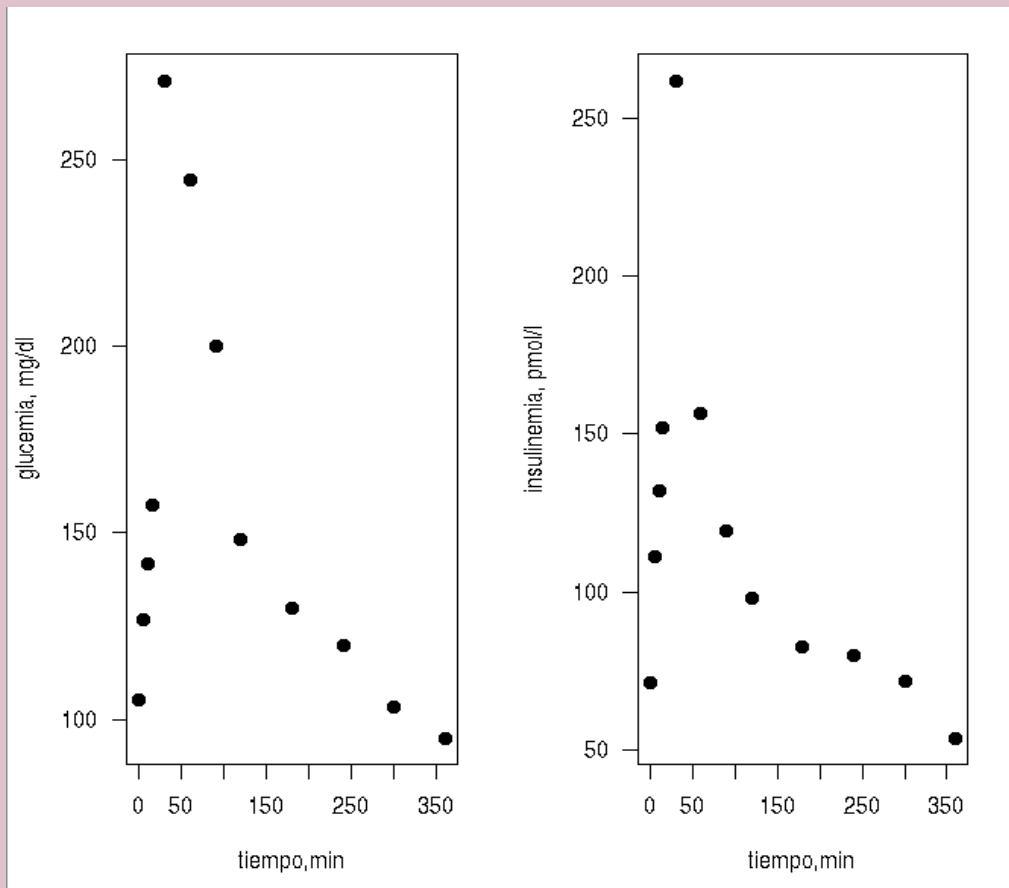


Figura 3. A la izquierda curva de glucemia y a la derecha de insulinemia obtenida luego de la PTGO.

Para la estimación de parámetros se utilizaron una serie de aproximaciones y supuestos que permiten ajustar distintas funciones en distintas regiones de la curva de glucemia e insulinemia en función del tiempo. Con este fin se emplearon herramientas convencionales del análisis matemático. Antes de comenzar la estimación de los parámetros y desarrollar el mecanismo para hacerlo introduciremos algunos datos de la tablaR781, en forma de constantes que serán utilizadas para el procesos de estimación.

Introducimos el valor del tiempo al cual se produce el máximo de la glucemia en la tablaR781, al que llamamos tMg

```
> tMg<-30
```

introducimos el valor máximo de glucosa de la tablaR781, correspondiente al tiempo tMg, al que llamamos GMg

```
> GMg<-271
```

Introducimos el tiempo para el menor valor de glucemia de la tablaR781, al que llamamos tmg

```
> tmg<-360
```

introducimos el valor de la dosis oral en mg, Do

```
> Do<-1500
```

introducimos el valor del tiempo al que se produce el máximo en la insulinemia al que llamamos tMi

```
> tMi<-30
```

Introducimos el valor del máximo valor de insulinemia, al que llamamos IMi

```
> IMi<-261.79
```

Introducimos la glucemia y la insulinemia en ayuno, que corresponde a la primer fila de la tablaR781

```
> Ga<-tablaR781[1,2]
```

```
> Ia<-tablaR781[1,3]
```

Estimación de k_a

En la Figura 4 se representa nuevamente el modelo, indicando la parte del mismo que se analizará y utilizará para estimar el valor de k_a .

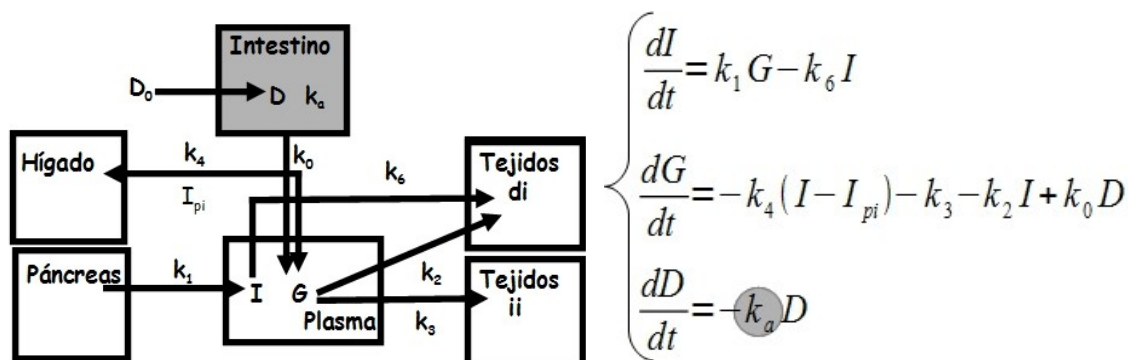


Figura 4. A la izquierda se muestra resaltado en gris el compartimento investigado. A la derecha se resalta en el sistema de ecuaciones, el parámetro cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

El parámetro k_a puede ser estimado aplicando el método de los residuales. Este método fue explicado en clases anteriores y en éste se realizará su aplicación. Dicho método consiste en considerar que luego del máximo de glucemia los procesos que incorporan glucosa al plasma a partir del intestino son despreciables respecto a los que la consumen. En esa situación la ecuación que representa la variación de la glucemia en función del tiempo se puede representar con

$$\frac{dG}{dt} = -k_e G$$

La constante k_e estaría representando la eliminación de glucosa por tejidos dependientes e independientes, cuyas constantes de velocidad son k_2 , k_3 y k_4 . En esta ecuación estamos suponiendo que el orden del proceso de eliminación de G es de primer orden respecto de dicha concentración. Esta ecuación diferencial se puede resolver, obteniéndose la siguiente función

$$G = G_0 * e^{-k_e t}$$

Donde G_0 es el valor de glucemia a tiempo cero si solo existiera eliminación. Este valor es teórico ya que a tiempo cero existirá tanto absorción como eliminación. Si ajustamos esta función a los datos de glucemia para tiempos mayor al máximo de glucosa, podemos obtener el valor k_e .

Calculo con R

Trabajando con la tablaR781, comprobamos que el máximo de la glucemia se produce a $t=30$ min y consideraremos los datos para $t>30$, que corresponde a la variable introducida tMg. Por simplicidad separamos estos datos en un subset, creando la tabla1, con valores de glucosa y tiempo

```
> tabla1<-data.frame(subset(tablaR781,t>=tMg,select=c(t,G)))
```

comprobamos los valores en tabla1

```
> tabla1
```

t	G
5	30 271.0
6	60 244.6
7	90 200.0
8	120 148.2
9	180 129.8
10	240 86.3
11	300 103.2
12	360 94.9

Ajustaremos los datos de t y G con la ecuación

$$G = G_0 * e^{-k_e t}$$

Para realizar el proceso de ajuste, debemos dar valores iniciales a nuestros parámetros: G_0 y k_e . G_0 tomaremos el valor 400, que surge de observar los datos. Si a 30 min tenemos 271 para el valor de G, podemos utilizar como valor inicial 400. Bien podría ser otro, siempre y cuando sea mayor que 271. Para k_e haremos un sencillo cálculo. Como el decrecimiento de la concentración de G es de orden 1, el tiempo de vida media para estos procesos es

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

De la observación de la tabla1 surge que aproximadamente en 90 min la concentración baja a la mitad (30 min – 271 / 120 min – 148.2). Podemos asumir que el $t_{1/2}$ será aproximadamente 90 min. Reemplazando 90 min en la ecuación anterior y despejando k_e obtenemos, $k_e = 0.0077 \text{ min}^{-1}$.

Realizamos el ajuste de los datos de la tabla1 con la ecuación planteada para la desaparición de glucosa, asignando en el argumento start, los valores iniciales elegidos.

```
> fit1<-nls(G~Go*exp(-ke*t),tabla1,start=c(Go=400,ke=0.0077),trace=TRUE)
```

```
15377.05 : 4.0e+02      7.7e-03
2739.849 : 2.746490e+02 3.589289e-03
2477.559 : 2.882623e+02 3.784507e-03
2476.974 : 288.93969602 0.00380135
2476.969 : 2.889915e+02 3.803113e-03
2476.969 : 2.889969e+02 3.803297e-03
2476.969 : 2.889974e+02 3.803316e-03
```

La primera columna de la tabla anterior, nos da el error del proceso de ajuste. La segunda columna nos da el valor de G_0 estimado por este proceso cuyo valor es redondeando y eliminando la expresión exponencial: $G_0=288$. Por otra parte, la tercera columna nos da los valores de k_e . El último valor es el valor estimado por el proceso de ajuste

$k_e = 0.0038$.

Introducimos en nuestro espacio de trabajo estos valores

```
> Go<-288
```

```
> ke<-0.0038
```

Siguiendo con el método de los residuales, construimos un objeto que llamamos tabla2 que contendrá los valores de la glucemia para $t < t_{Mg}$

```
> tabla2<-data.frame(subset(tablaR781,t<tMg,select=c(t,G)))
```

```
> tabla2
```

t	G
1	0 105.2
2	5 126.8

```
3 10 141.8
```

```
4 15 157.3
```

Con los parámetros $G_0 = 288$ y $k_e = 0.0038$, obtenemos los valores para G en el intervalo t [0-15] y lo agregamos como una columna a la tabla2, a la que llamamos G_r . Utilizando para este proceso la función `cbind()`

```
> tabla2<-cbind(tabla2,Gr=Go*exp(-ke*tabla2$t))
```

```
> tabla2
```

	t	G	Gr
1	0	105.2	288.0000
2	5	126.8	282.5797
3	10	141.8	277.2613
4	15	157.3	272.0431

obtenemos por diferencia entre G_r y G , la glucosa en aparato digestivo a la que llamamos G_a y agregamos como una nueva columna a tabla2

```
> tabla2<-cbind(tabla2,Ga=tabla2$Gr-tabla2$G)
```

```
> tabla2
```

	t	G	Gr	Ga
1	0	105.2	288.0000	182.8000
2	5	126.8	282.5797	155.7797
3	10	141.8	277.2613	135.4613
4	15	157.3	272.0431	114.7431

finalmente hallamos la regresión lineal del logaritmo de G_a en función de t , cuya pendiente sera el valor estimado de k_a

```
> fit2<-lm(log(Ga)~t,data=tabla2)
```

para ver los parámetros ejecutamos

```
> fit2$coef
```

```
(Intercept)      t  
5.20758137 -0.03073695
```

La pendiente es el valor correspondiente a la columna t , y lo asignamos así a k_a el valor hallado. Podemos hacerlo como

```
> ka<--0.03073695
```

o bien

```
> ka<-fit2$coef[2]
```

comprobamos el valor introducido

```
> ka
```

```
      t  
-0.03073695
```

Por conveniencia elegimos trabajar con las constantes con valor positivo, entonces invertimos el signo

```
>ka = -ka
```

Graficaremos el desarrollo anterior. Creamos una función de ajuste de la glucemia solo en presencia de mecanismos de excreción, cuyos parámetros fueron obtenidos con el ajuste fit1, llamamos a esta función Gexcrecion.

```
> Gexcrecion<-function(t){coef(fit1)[1]*exp(-coef(fit1)[2]*t)}
```

definimos una función para la glucosa residual, a la que llamamos Gresidual, cuyo parámetros son los correspondientes al ajuste fit2. Recuerde que fit2 se realizó con los logaritmos de los valores de G, por lo que para la función, que será exponencial, el coefficient[1] debe ser modificado

```
> Gresidual<-function(t){exp(fit2$coefficients[1])*exp(fit2$coefficients[2]*t)}
```

realizamos un gráfico vacío para colocar luego los elementos gráficos correspondientes

```
> plot(0,0,ty='n',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400),ylab='glucosa, mg/dl',xlab='tiempo, min')
```

colocamos los valores experimentales de G, de la tablaR781

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$G,pch=19)
```

creamos un vector de tiempo para graficar los datos de G solo en presencia de excreción, al que llamamos

```
> texcrecion<-seq(0,360,1)
```

generamos un vector al que llamamos gexcrecion, con los valores de G solo en presencia de excreción, con la función Gexcrecion,

```
> gexcrecion<-Gexcrecion(texcrecion)
```

graficamos en formato de línea los datos de ajuste de G con la función Gexcrecion

```
> lines(spline(texcrecion,gexcrecion))
```

Colocamos los puntos correspondientes a la glucemia del aparato digestivo (Ga) de la tabla2, que surgieron de restar para cada tiempo los valores de Gr menos los valor de G

```
> points(tabla2$t,tabla2$Ga,pch=0)
```

generamos un vector de tiempo (al que llamamos tresidual) con los tiempos para graficar la función de ajuste Gresicual, a los valores de Gr

```
> tresidual<-seq(0,30,1)
```

generamos un vector que llamamos gresidual, con valores calculados de la glucosa residual calculados con la función Gresidual

```
> gresidual<-Gresidual(tresidual)
```

graficamos la línea generada con la función Gresidual, en línea de puntos

```
> lines(spline(tresidual,gresidual),lty=2)
```

con lo que obtenemos

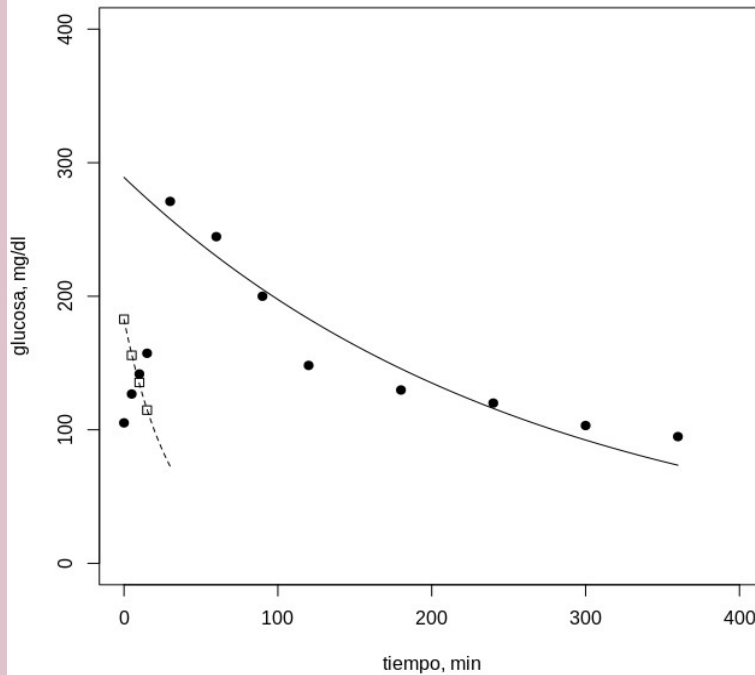


Figura 5. Los puntos negros representan los valores experimentales. La línea curva continua la función de ajuste de los valores de glucosa considerando solo el proceso de excreción. Los cuadrados representan los valores de glucosa en el aparato digestivo y la línea de puntos el ajuste de dichos valores con la función obtenida para la glucosa en el aparato digestivo, G_a .

Como resumen de todo este proceso podemos decir que hemos estimado el valor de k_a y le asignamos el valor: 0,03073695

Estimación de k_0

En un animal en ayuno que ingiere una dada cantidad de glucosa (D_0), durante un breve período de tiempo posterior a la ingesta de glucosa, los procesos que remueven glucosa del plasma pueden considerarse despreciables respecto al ingreso de glucosa al plasma. Por esta razón se pueden considerar despreciables los términos que incluyen a k_2 , k_3 y k_4 , en la ecuación de dG/dt .

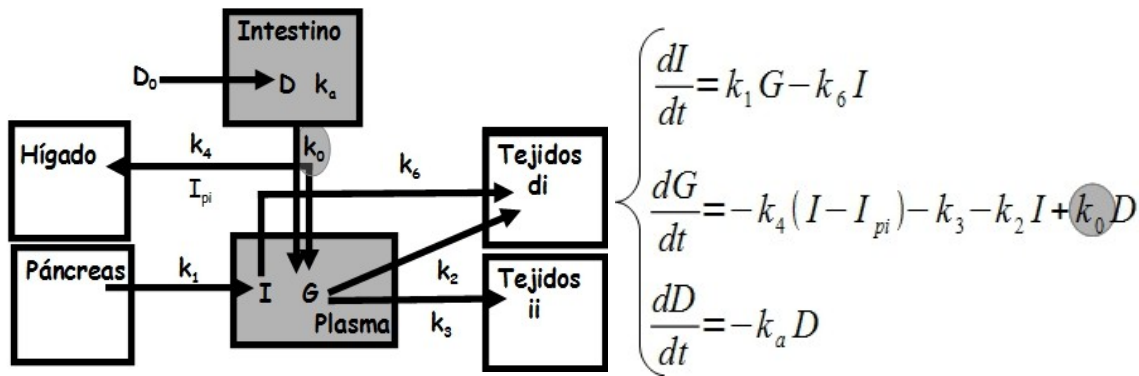


Figura 6. Se muestra resaltado en gris los compartimentos involucrados y el parámetro cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

Este supuesto es sustentado por el notable incremento en la concentración de glucosa plasmática que se produce luego de la ingestión de dicha sustancia. De acuerdo a esta simplificación, la ecuación que representa la variación de glucosa plasmática en el intervalo de tiempo mencionado

$$\frac{dG}{dt} = k_0 D - k_2 I - k_3 - k_4 (I - I_{pi})$$

se reduce a

$$\frac{dG}{dt} = k_0 D$$

Reemplazando D por la función que representa el contenido de glucosa en el sistema digestivo

$$D = D_0 * e^{-k_a t}$$

resulta

$$\frac{dG}{dt} = k_0 * D_0 * e^{-k_a t}$$

La resolución de esta ecuación diferencial permite obtener una ecuación que representa la concentración de glucosa plasmática en función del tiempo para tiempos cercanos a la administración de glucosa

$$G = G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t})$$

Empleando esta ecuación para ajustar los valores de glucemia medidos entre 0 y 15min luego de la administración de glucosa se obtiene k_0 , ya que: k_a es un valor obtenido anteriormente por el método de los residuales. G_a la glucemia de ayuno (medida al comienzo del experimento, $t=0$) y D_0 es la cantidad de glucosa administrada por vía oral, que también es un valor conocido.

Cálculo de k_0 con R

Ya tenemos introducidos los valores: D_0 , k_a y G_a , cosa que comprobamos

```
> D0
```

```
[1] 1500
```

```
> ka
```

```
X
```

```
0.03073695
```

```
> Ga
```

[1] 105.2

para simplicidad, creamos una tabla con los valores experimentales G para tiempos menores o iguales a 15 min, a partir de la tablaR781, a la que llamamos tabla3

```
> tabla3<-data.frame(subset(tablaR781,t<=15,select=c(t,G)))
```

comprobamos estos datos

```
> tabla3
```

```
  t  G
1 0 105.2
2 5 126.8
3 10 141.8
4 15 157.3
```

realizamos un ajuste no lineal de los datos de G en función t de la tabla3, utilizando la ecuación deducida,

$$G = G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t})$$

Para realizar el ajuste, utilizamos la función nls() y como parámetros de la función colocamos a k0. Los valores Ga, Do y ka son constantes de la función ya que sus valores son fijos y conocidos para el animal en estudio. Asignamos a k0 un valor inicial de 0.01 en el argumento start.

```
> ajustek0<-nls(G~Ga+((k0*Do)/ka)*(1-exp(-ka*t)),data=tabla3,start=list(k0=0.01),trace=T)
```

```
27285.42 : 0.01
```

```
2.792235 : 0.002892315
```

Al igual que en el ajuste anterior, la primer columna es el error y la segunda el valor del parámetro, en este caso k0. Asignamos el valor del parámetro hallado a k0

```
> k0<-coef(ajustek0)
```

podemos graficar la función de ajuste con este valor de k0

generamos un vector de tiempo hasta 15 minutos que llamaremos tabsorcion

```
> tabsorcion<-seq(0,15,0.1)
```

creamos la función de ajuste para el período de solo absorción, que utilizamos para el ajuste la función que venimos utilizando

$$G = G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t})$$

```
> Gabsorcion<-function(t){Ga+((k0*Do)/ka)*(1-exp(-ka*t))}
```

generamos un vector (al que llamamos gabsorcion) con los valores de G para el intervalo de tiempo [0,15] utilizando la función Gabsorcion, definida en el párrafo anterior

```
> gabsorcion<-Gabsorcion(tabsorcion)
```

creamos una gráfica para representar valores experimentales

```
> plot(0,0,ty='n',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400),ylab='glucosa, mg/dl',xlab='tiempo, min')
```

colocamos los valores experimentales de glucemia

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$G,pch=19)
```

colocamos la línea de ajuste para los valores experimentales en el tiempo de predominio de la absorción

```
> lines(spline(tabsorcion,gabsorcion),lty=1,lwd=2)
```

obtenemos la siguiente gráfica

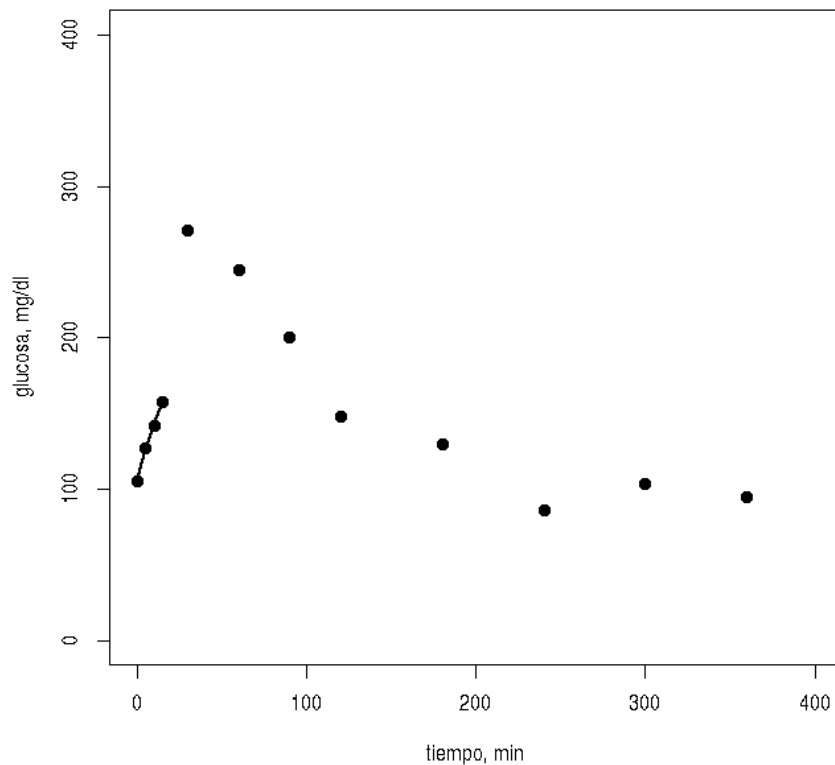


Figura 7. Los puntos representan los valores experimentales de glucosa y la línea la función de ajuste con la ecuación desarrollada suponiendo a tiempos cercanos a 0 un dominio del proceso de absorción por sobre los de eliminación de glucosa del plasma.

Como resumen de este último proceso podemos decir que hemos estimado el valor de k_0 y le asignamos el valor: 0.002892315.

Estimación de k_1

La constante k_1 es la constante de velocidad del proceso de secreción de insulina por el páncreas, estimulado por la concentración de glucosa plasmática, G . Para estimar el valor de k_1 utilizaremos el páncreas y el compartimiento plasmático Figura 8.

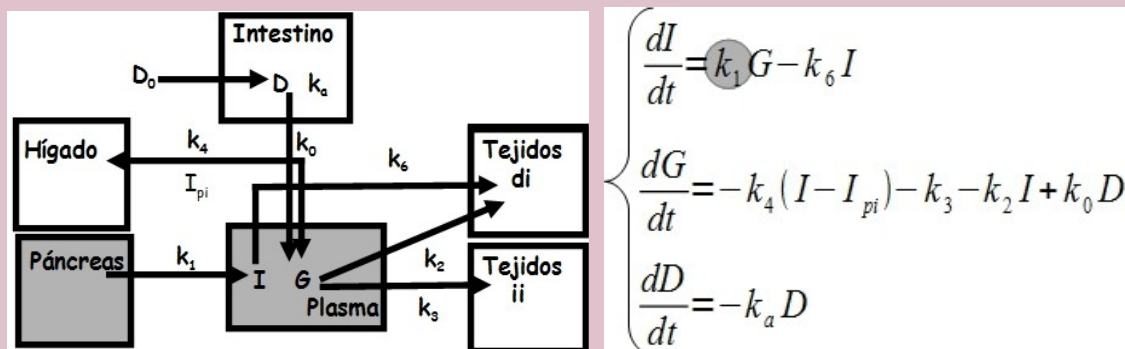


Figura 8. Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

Cuando se administra una cantidad de glucosa (D_0) se estimula la secreción de insulina, fenómeno que queda reflejado por un rápido aumento en la concentración plasmática de dicha hormona, Figura 3. El aumento en la concentración de insulina a tiempos próximos a la administración de glucosa puede ser interpretado como que la secreción de insulina es mucho mayor que la desaparición de la insulina del plasma. Entonces se formula el supuesto que el proceso de depuración de insulina es despreciable respecto a la secreción. Por lo tanto, la ecuación

$$\frac{dI}{dt} = k_1 G - k_6 I$$

se puede eliminar el segundo sumando del término de la derecha, obteniendo así

$$\frac{dI}{dt} = k_1 G$$

Como se expuso anteriormente, la ecuación

$$G = G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t})$$

representa la variación de la concentración de glucosa en un intervalo de tiempo coincidente con el análisis que estamos realizando. Por lo cual el valor de G puede ser reemplazada en la ecuación de dI/dt , obteniéndose:

$$\frac{dI}{dt} = k_1 * [G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t})]$$

y resolviendo esta ecuación se obtiene una ecuación que proporciona el valor de la insulinemia en función del tiempo, para tiempos cercanos a la administración de glucosa durante una PTGO.

$$I = I_a + k_1 G_a t + \frac{k_1 k_0 D_0}{k_a} t + \frac{k_1 k_0 D_0}{k_a^2} (e^{-k_a t} - 1)$$

que podemos escribir

$$I = I_a + (G_a + \frac{k_0 * D_0}{k_a}) * k_1 * t + \frac{k_1 * k_0 * D_0}{k_a^2} * (e^{-k_a t} - 1)$$

Ajustando esta función a los valores de insulinemia obtenidos a tiempos cercanos al momento de la administración de glucosa (0, 5, 10 y 15min) se puede obtener k_1 .

Resolución con R

En primer lugar creamos una tabla con los valores de I para los tiempos indicados. Se debe tener en cuenta que los tiempos elegidos pueden variar de un individuo a otro, dependiendo del tiempo en que se produzca el máximo de insulina.

```
> tabla4<-data.frame(subset(tablaR781,t<=15,select=c(t,I)))
```

```
> tabla4
```

```
  t  I
1 0 71.33
2 5 111.03
3 10 132.30
4 15 152.01
```

luego realizamos el ajuste no lineal de los valores I en función t con la ecuación descripta, dejando k1 como parámetro a estimar. En la ecuación, **Ia** es la insulinemia de ayuno, k0 y ka son los valores estimados anteriormente, Do la dosis de glucosa y Ga la glucemia de ayuno

```
> ajustek1<-nls(I~Ia+(((k0*Do)/ka)+Ga)*k1*t+((k0*Do*k1)/ka^2)*(exp(-ka*t)-1),data=tabla4,start=list(k1=0.01),trace=T)
```

```
7185.158 : 0.01
```

```
293.3256 : 0.04421316
```

El último valor de la columna de la derecha es el valor estimado de k1, que utilizamos para inicializar ese parámetro

```
> k1<-0.04421316
```

creamos un gráfico de insulinemia vacío

```
> plot(0,0,ty='n',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400),ylab='insulina,pmol/l',xlab='tiempo, min',las=1)
```

colocamos los puntos experimentales de la insulinemia

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$I,pch=1,cex=1)
```

creamos una función para la secreción de insulina con la ecuación ajustada a las condiciones, utilizando la ecuación en uso

$$I = I_a + \left(G_a + \frac{k_0 * D_0}{k_a} \right) * k_1 * t + \frac{k_1 * k_0 * D_0}{k_a^2} * (e^{-k_a t} - 1)$$

```
> Isecrecion<-function(t){Ia+(((k0*Do)/ka)+Ga)*k1*t+((k0*Do*k1)/ka^2)*(exp(-ka*t)-1)}
```

creamos un vector con tiempos para el ajuste, al que llamamos tsecrecionI

```
> tsecrecionI<-seq(0,15,0.1)
```

con la funcion Isecrecion y los valores de tiempo de tsecrecion hallamos los valores de insulina calculados en base a la ecuación ajustada para tiempos anteriores al máximo

```
> isecreccion<-Isecrecion(tsecrecionI)
```

graficamos la línea estimada por la función, de donde se obtuvo el valor de k1

```
> lines(spline(tsecrecionI,isecreccion),lty=1,lwd=2)
```

La figura siguiente representa gráficamente el ajuste realizado y el sector de la curva de insulinemia utilizada en la estimación de k1.

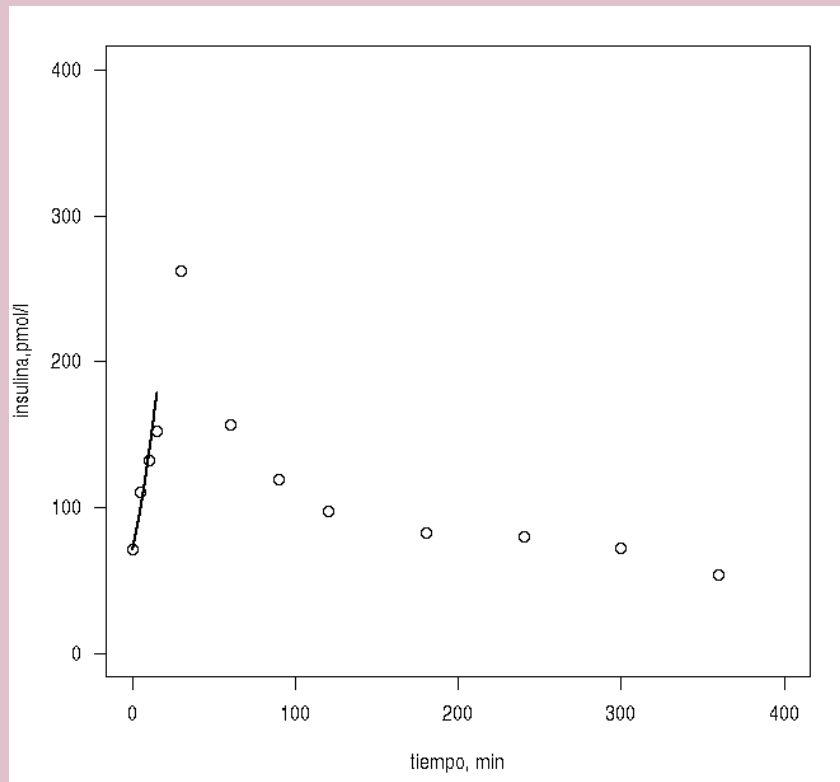


Figura 9. Los círculos representan los valores experimentales de insulina y la línea continua el ajuste realizado a los puntos de insulina de 0-15 min del cual se estimó el valor de k_1 .

Como resumen de este último proceso podemos decir que hemos estimado el valor de k_1 y le asignamos el valor: 0.04421316.

Estimación de k_6

La constante de velocidad k_6 pertenece al término que explica la desaparición de la insulina del compartimiento plasmático. Luego de alcanzado el valor máximo en la insulinemia (IMI) los datos de insulinemia pueden ser ajustados con una función de decaimiento mono-exponencial

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a) e^{-k_6(t - t_{MI})}$$

Ecuación 2

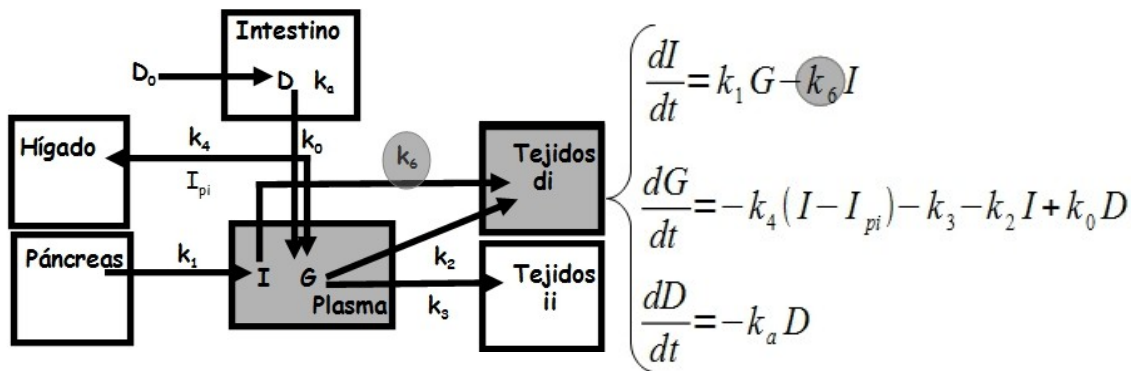


Figura 10. Modelo desarrollado para la rata sana.

Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

donde I_a es la insulinemia de ayuno (que es el valor medido a tiempo 0) t_{Mi} (tiempo en el que se alcanza IMI) e IMI es el valor máximo de la Insulina que se puede observar en la Figura 3, tablaR781.

De este modo, ajustando la ecuación mencionada a los valores de insulinemia desde el máximo de insulina en adelante se puede obtener el valor de k_6 .

Creamos un subset de datos que contenga los valores de insulina y tiempo, para valores de t mayores al máximo de insulina.

```
> tabla6<-data.frame(subset(tablaR781,t>=tMi,select=c(t,I)))
```

```
> tabla6
```

t	I
5	30 261.79
6	60 156.65
7	90 119.20
8	120 97.91
9	180 82.66
10	240 80.10
11	300 72.00
12	360 53.69

ahora realizamos el ajuste no lineal con la función `nls()` de manera de averiguar el único parámetro desconocido que es k_6 , de la Ecuación 2. Como siempre debemos asignar un valor inicial. Observando la tabla6 vemos que en 60 min la I pasa de 261.79 a 119.20, podríamos aproximar que en 60 min la insulina se redujo a la mitad. Como el ajuste que estamos haciendo es monoexponencial el tiempo de vida medio se puede calcular por la ecuación

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_6}$$

Reemplazamos 60 min en la expresión anterior y obtenemos el valor de k_6 . Para este caso tomaría un valor aproximado de 0.012, el que utilizaremos como valor inicial para estimar el valor de k_6

```
> ajustek6<-nls(I~Ia+(IMI-Ia)*exp(-k6*(t-tMi)),data=tabla6,start=list(k6=0.012),trace=T)
```

```
6671.437 : 0.012
1123.958 : 0.01886648
512.746 : 0.02282108
491.4022 : 0.02376087
491.1832 : 0.02386121
491.1818 : 0.02386923
```

491.1818 : 0.02386984

el último valor es el valor estimado de k_6 , que incorporamos a nuestro espacio de trabajo

```
> k6<-coef(ajustek6)
```

```
> k6
```

k6

0.02386984

Vamos a graficar este análisis. En primer lugar definimos una función exponencial que describirá el decaimiento de la concentración de insulina luego del máximo, que llamamos $I_{eliminacion}$ y corresponde a la Ecuación 2.

```
> Ieliminacion<-function(t){Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(t-tMi))}
```

en base a los datos de la tabla6

```
> tabla6
```

	t	I
5	30	261.79
6	60	156.65
7	90	119.20
8	120	97.91
9	180	82.66
10	240	80.10
11	300	72.00
12	360	53.69

definimos un vector al que llamamos: $teliminacionI$, que contiene valores de tiempo de la tabla

```
> teliminacionI<-seq(30,360,0.1)
```

utilizando la función $I_{eliminacion}$ y el vector $teliminacionI$, calculamos los valores de Insulina ajustados por la función $I_{eliminacion}$

```
> ieliminacion<-Ieliminacion(teliminacionI)
```

armamos un gráfico vacío

```
> plot(0,0,ty='n',las=1,ylab='insulina,pmol/l',xlab='tiempo,min',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400))
```

colocamos los valores de insulina de la tablaR781

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$I,cex=1.5,pch=1)
```

y la línea de ajuste de los valores con la función $I_{eliminacion}$

```
> lines(spline(teliminacionI,ieliminacion))
```

obtenemos así la siguiente grafica.

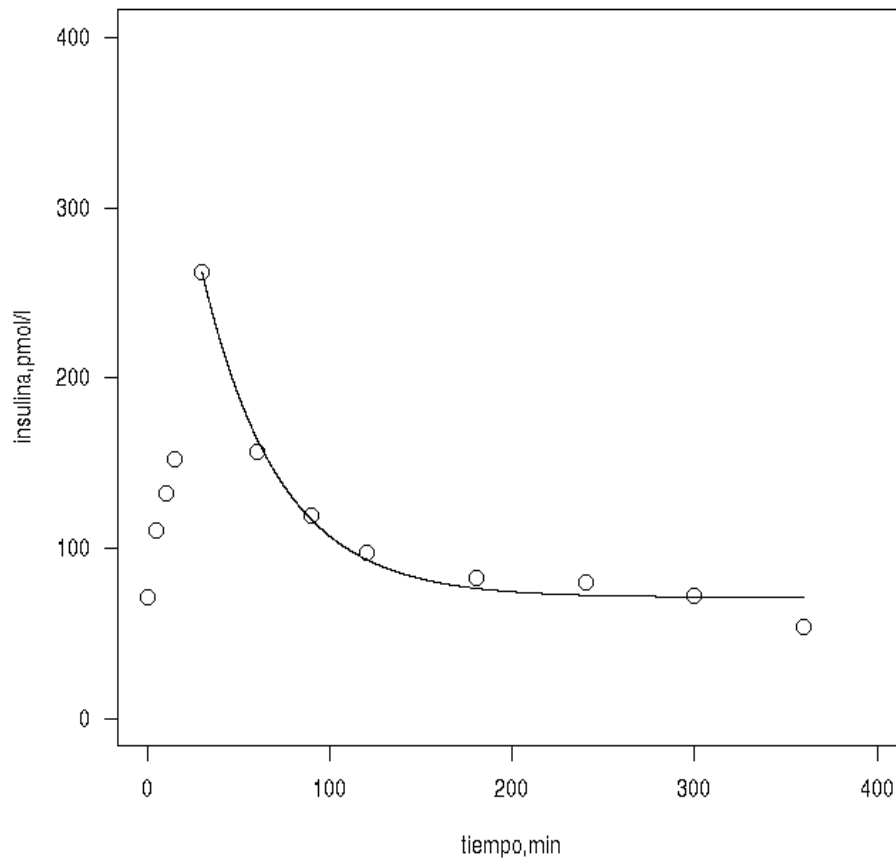


Figura 11. Estimación de k_6 . Los círculos representa los valores experimentales de insulina en el animal en estudio luego de una PTGO. La línea continua la gráfica de ajuste lograda con la función desarrollada a tal fin.

Como resumen de este último proceso podemos decir que hemos estimado el valor de k_6 y le asignamos el valor: 0.02386984.

Estimación de I_{pi}

Como dijimos I_{pi} es el valor de insulina plasmática en que el hígado cambia de su función consumidor a productor de glucosa. Analizaremos la parte del modelo resaltada en la Figura 12

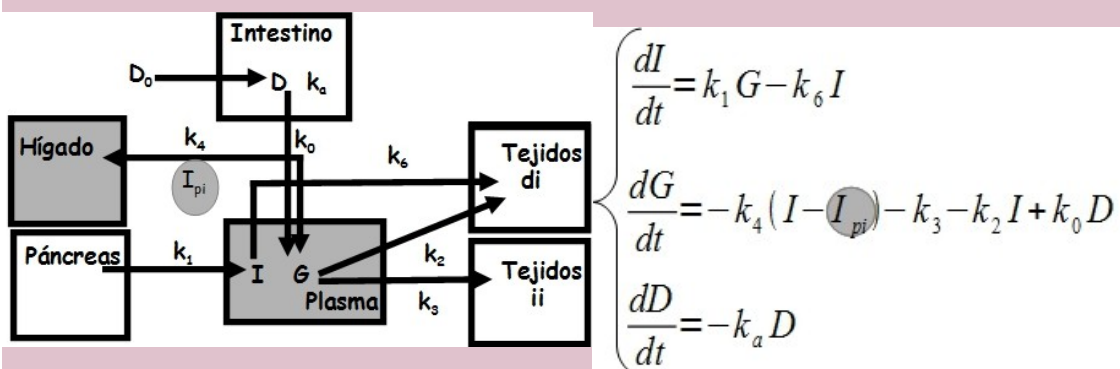


Figura 12. Modelo desarrollado para la rata sana.

Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

Luego de que la glucemia alcanza su valor máximo (GMg) la concentración plasmática de glucosa (G) decrece hasta alcanzar nuevamente valores de ayuno. La observación de numerosas curvas de glucemia en función del tiempo, permite postular que dicho comportamiento puede representarse empleando una función sigmoidea del tipo:

$$G = G_a + \frac{G_{Mg} - G_a}{1 + e^{\left(\frac{(t - t_{pi})}{B}\right)}}$$

Ecuación 3

Donde B es una constante propia de cada animal, tpi es el tiempo en que el hígado cambia su comportamiento de consumir a producir glucosa, tiempo al cual la gráfica de G muestra un punto de inflexión. Ga es el valor basal de glucosa medido al comienzo del experimento. GMg es la concentración de glucosa máxima luego de una sobrecarga de glucosa.

Empleando la Ecuación 3 para ajustar a los datos de glucemia desde su valor máximo se puede obtener tpi, que es el tiempo al cual se produce el punto de inflexión en la gráfica de glucemia en función del tiempo.

El valor de insulinemia en este tiempo es una estimación del parámetro denominado Ipi y se puede obtener valorizando la ecuación

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a) e^{-k_6(t - t_{MI})}$$

en el tiempo tpi

$$I_{pi} = I_a + (I_{MI} - I_a) e^{-k_6(t_{pi} - t_{MI})}$$

Ecuación 4

Resolución con R

Creamos primero una tabla, llamada tabla5 con los valores de glucosa a tiempos mayores al cual se alcanzó el máximo en dicha variable

```
> tabla5<-data.frame(subset(tablaR781,t>=tMg,select=c(t,G)))
```

```
> tabla5
```

	t	G
5	30	271.0
6	60	244.6
7	90	200.0
8	120	148.2
9	180	129.8
10	240	86.3
11	300	103.2
12	360	94.9

realizamos un ajuste no lineal de los datos utilizando la ecuación sigmoidea plantada anteriormente. Ciertas constantes como Ga y GMg, ya fueron asignadas. Los parámetros tpi y B serán estimados con la función nls() asignando valores iniciales para el cálculo, los cuales podrán ser datos promedio de los mismos hallados en experimentos anteriores o valores tentativos.

Chequeamos que los mismos estén con sus valores correspondientes a la tablaR781

```
> tablaR781
```

	t	G	I
1	0	105.2	71.33
2	5	126.8	111.03
3	10	141.8	132.30

```

4 15 157.3 152.01
5 30 271.0 261.79
6 60 244.6 156.65
7 90 200.0 119.20
8 120 148.2 97.91
9 180 129.8 82.66
10 240 120.0 80.10
11 300 103.2 72.00
12 360 94.9 53.69

```

```
> Ga
```

```
[1] 105.2
```

```
> GMg
```

```
[1] 271
```

y graficamos los datos de G en función del tiempo para obtener un valor de inicio para tpi, que obviamente estará entre 30 y 360 min

```
> plot(tablaR781$t,tablaR781$G)
```

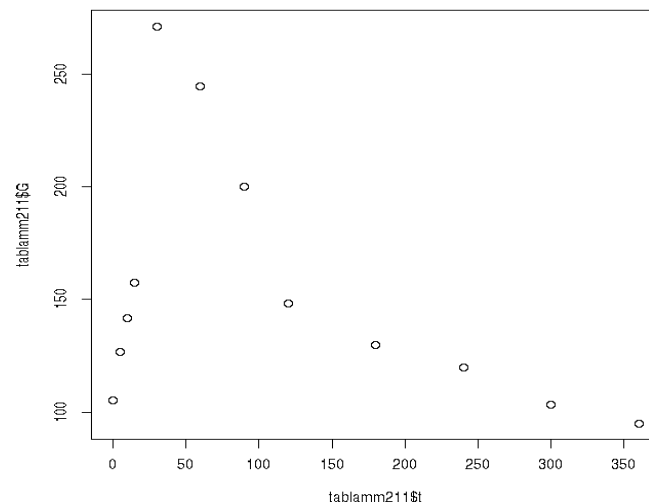


Figura 13

Observando el decaimiento del valor de G luego del máximo, podríamos inferir un punto de inflexión entre los 100 y 200 min. Así tomamos como valor inicial para tpi=120 min. Para B probamos con un valor inicial de B=10 y realizamos el ajuste no lineal con nls() a los datos de la tabla5

```
> ajustetpi<-nls(G~Ga+(GMg-Ga)/(1+exp((t-tpi)/B)),data=tabla5,start=list(tpi=120, B=10),trace=T)
```

```

7168.005 : 120 10
1527.514 : 110.54820 36.74877
898.4397 : 99.74158 28.90696
809.0953 : 98.97620 24.98114
800.9177 : 98.20600 24.13367
800.1501 : 98.05300 23.83534
800.0797 : 97.99776 23.75021
800.0732 : 97.98184 23.72411
800.0726 : 97.97695 23.71626
800.0726 : 97.97548 23.71389
800.0726 : 97.97504 23.71317

```

800.0726 : 97.97490 23.71296

la primer columna indica el error del proceso de ajuste para cada iteración, la segunda columna muestra el valor del parámetro tpi y la tercer columna el parámetro B. Asignamos los valores estimados de éstos a las variables tpi y B

```
> tpi<-coef(ajustetpi)[1]
```

```
> B<-coef(ajustetpi)[2]
```

comprobamos el ingreso de los mismos

```
> B
```

B

23.71296

```
> tpi
```

tpi

97.9749

Ahora calculamos Ipi, utilizando la Ecuación 4 que describe la desaparición de insulina luego de su máximo, utilizando varias constantes y parámetros ya estimados.

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a) e^{-k_6(t - t_{Mi})}$$

```
> Ipi<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi-tMi))
```

verificamos que su valor ha sido introducido correctamente

```
> Ipi
```

k6

108.9257

Graficamos a continuación el proceso, como haremos dos gráficas crearemos un espacio para ambas

```
> par(mfrow=c(1,2))
```

en la primer gráfica que creamos en blanco mostramos los valores de la glucemia para la rata en estudio

```
> plot(0,0,ty='n',ylab='glucemia, mg/dl',xlab='tiempo, min',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400),las=1)
```

y colocamos los puntos correspondientes

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$G)
```

creamos la función para ajuste de los datos de glucemia luego del máximo según la ecuación

$$G = G_a + \frac{G_{MG} - G_a}{1 + e^{\left(\frac{(t - t_{pi})}{B}\right)}}$$

a la que llamamos Gipi, ya que ajustará los valores de glucemia para valores de glucemia que utilizaremos para calcular luego el parámetro Ipi.

```
> Gipi<-function(t){Ga+(GMg-Ga)/(1+exp((t-tpi)/B))}
```

creamos un vector de tiempo para el rango de glucemia en que realizamos el ajuste, que va desde el valor de tiempo en el que se produce el máximo de la glucemia, hasta 400.

```
> tgi<-seq(tMg,400,0.1)
```

calculamos los valores de glucemia para dicho rango

```
> gipi<-Gipi(tgi)
```

graficamos la función de ajuste

```
> lines(spline(tgipi,gipi))
```

colocamos el punto de inflexión de la glucemia

```
> points(tpi,Gipi(tpi),pch=19,cex=1.5)
```

creamos para el espacio de la derecha un gráfico de insulina vacío

```
> plot(0,0,ty='n',ylab='insulina,pmol/l',xlab='tiempo, min',xlim=c(0,400),ylim=c(0,400),las=1)
```

colocamos los puntos de insulinemia

```
> points(tablaR781$t,tablaR781$I)
```

colocamos la función de ajuste correspondiente a la ecuación

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a) * e^{-k_6(t - t_{MI})}$$

para ello definimos la función que llamamos IIpi

```
> IIpi<-function(t){Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(t-tMi)) }
```

donde Ia, IMi, tMi y k6 ya fueron estimados y sus valores introducidos al espacio de trabajo, cosa que comprobamos

```
> Ia
```

```
[1] 71.33
```

```
> IMi
```

```
[1] 261.79
```

```
> k6
```

```
      k6
```

```
0.02386989
```

```
> tMi
```

```
[1] 30
```

creamos un vector de tiempos para graficar el ajuste con dicha función

```
> tIIpi<-seq(tMi,400,0.1)
```

creamos un vector con los valores de insulina para dicho intervalo utilizando la función IIpi, al que llamamos iIpi

```
> iIpi<-IIpi(tIIpi)
```

representamos la línea de ajuste

```
> lines(spline(tIIpi,iIpi))
```

colocamos el valor de Ipi en la gráfica

```
> points(tpi,IIpi(tpi),pch=19,cex=1.5)
```

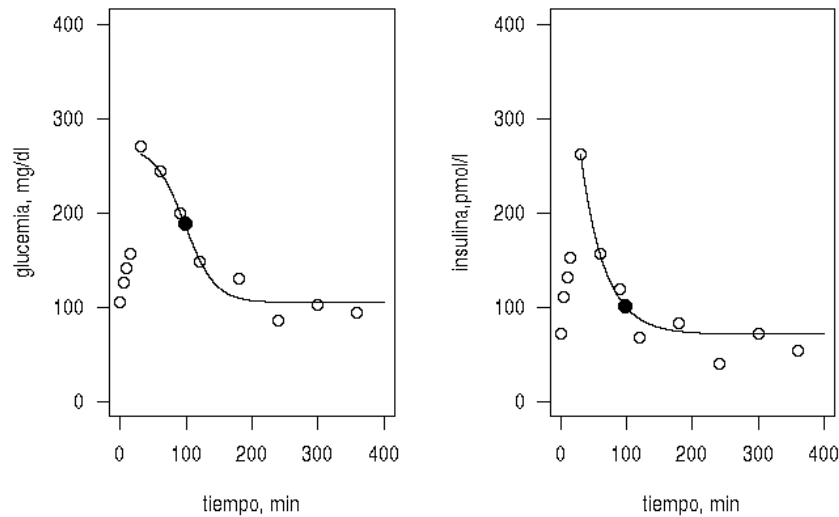


Figura 14. Izquierda: los círculos representan la glucemia, la línea continua el ajuste de los datos con la función accesoria y el círculo negro representa el punto de inflexión de la glucemia. A la derecha se representa la insulínemia en círculos. La línea continua representa el ajuste realizado con la función accesoria y el círculo negro, representa el valor de insulina en que se produce el cambio de consumo-producción de insulina (I_{pi}).

Como resumen de este último proceso podemos decir que hemos estimado el valor de I_{pi} y le asignamos el valor: 108.9258

Estimación de k_2 y k_3

Las constantes k_2 y k_3 representan a los procesos de consumo de glucosa dependiente e independiente de insulina. La estimación de k_2 y k_3 se hacen simultáneamente y se muestran los procesos involucrados en la Figura 15

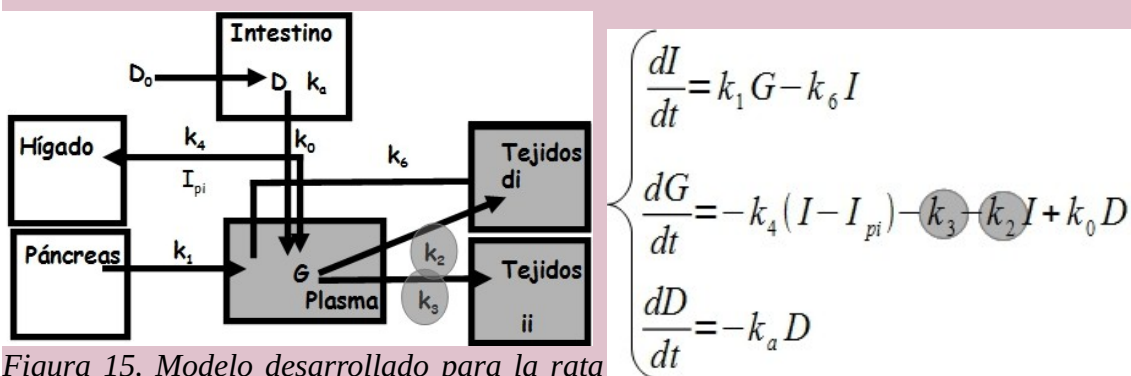


Figura 15. Modelo desarrollado para la rata sana.

Se muestra resaltado en gris los parámetros cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

En el tiempo t_{pi} , la glucemia tendrá el G_{pi} , la insulínemia el valor I_{pi} y la cantidad de glucosa en el tracto gastrointestinal se puede suponer despreciable, por lo tanto consideraremos a $D=0$. Entonces, reemplazando el valor de insulínemia por el valor de I_{pi} en la ecuación de dG/dt resulta la ecuación

$$\frac{dG}{dt}(t_{pi}) = -k_4(I_{pi} - I_{pi}) - k_3 - k_2I_{pi}$$

que luego de operar resulta

$$\frac{dG}{dt}(t_{pi}) = -k_3 - k_2 I_{pi}$$

Como la glucemia en función del tiempo luego de producido el máximo de glucosa plasmática se puede aproximar por la

$$G = G_a + \frac{G_{MG} - G_a}{1 + e^{\left(\frac{(t - t_{pi})}{B}\right)}}$$

derivando esta ecuación se obtiene

$$\frac{dG}{dt} = \frac{(G_a - G_{MG}) e^{\frac{(t - t_{pi})}{B}}}{B \left(1 + e^{\frac{(t - t_{pi})}{B}}\right)^2}$$

Valorizando dG/dt a dos tiempos (t1 y t2) cercanos al tpi, obteniendo dG/dt(t1) y dG/dt(t2). Con los valores de insulinemia calculados a t1 y t2, calculados con la ecuación

$$I = I_a + (I_{Mi} - I_a) e^{-k_6(t - t_{Mi})}$$

se obtiene un sistema de ecuaciones lineales de cuya solución se obtienen los valores para k2 y k3

$$\frac{dG}{dt}(t_1) = -k_3 - k_2 I_1$$

Ecuación 5

$$\frac{dG}{dt}(t_2) = -k_3 - k_2 I_2$$

Ecuación 6

Estimaciones de k3 y k2 con R

En primer lugar creamos una variable dG1 que tendrá el valor de la derivada de G a tiempo anterior a tpi. Arbitrariamente y apoyado por la experiencia tomamos un valor -10, para la diferencia entre t y tpi

$$> dG1 <- ((G_a - G_{MG}) * \exp((-10)/B)) / (B * (1 + \exp(-10/B))^2)$$

Para tiempo posterior a tpi tomamos 5 minutos

$$> dG2 <- ((G_a - G_{MG}) * \exp((5)/B)) / (B * (1 + \exp(5/B))^2)$$

hallamos I1 para los 10 minutos anteriores

$$> I1 <- I_a + (I_{Mi} - I_a) * \exp(-k_6 * (t_{pi} - 10 - t_{Mi}))$$

e I2 para los 5 minutos posteriores

$$> I2 <- I_a + (I_{Mi} - I_a) * \exp(-k_6 * (t_{pi} + 5 - t_{Mi}))$$

con estos valores calculamos k2 y k3

En primer lugar restamos miembro a miembro las Ecuación 5 y Ecuación 6

de lo cual obtenemos

$$dG1 - dG2 = k_2 * (I2 - I1)$$

despejamos k2 y calculamos

$$> k2 <- (dG1 - dG2) / (I2 - I1)$$

> k2

B

-0.003911028

reemplazamos luego este valor en Ecuación 5

> k3<--dG1-k2*I1

y así obtenemos el valor de k3

> k3

B

2.138173

Como resumen de este último proceso podemos decir que hemos estimado los valores de k2 y k3, hallando los valores, k2= 0.003911024 y k3= 2.138173

Estimación de k_4

Veremos ahora la estimación del parámetro k_4 . En base al esquema siguiente

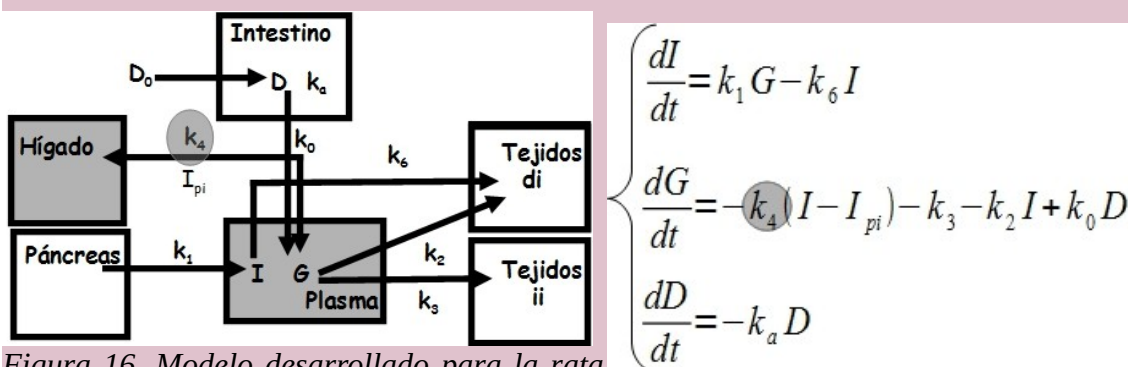


Figura 16. Modelo desarrollado para la rata sana.

Se muestra resaltado en gris los parámetros cuyo proceso de estimación se describe a continuación.

Podemos suponer que en ayuno la glucemia puede ser considerada constante, por lo cual la $dG/dt=0$ y $D=0$. El consumo de glucosa dependiente de insulina (k_2I) se puede suponer despreciable, y por lo tanto la ecuación siguiente

$$\frac{dG}{dt} = k_0 D - k_2 I - k_3 - k_4 (I - I_{pi})$$

se puede reescribir:

$$-k_4 (I - I_{pi}) - k_3 = 0$$

Como k_3 ya fue estimada I_a e I_{pi} son parámetros conocidos, se puede estimar el valor de k_4 a partir de la siguiente ecuación

$$k_4 = \frac{-k_3}{(I_a - I_{pi})}$$

Ecuación 7

Estimación con R

> k4<-k3/(Ipi-Ia)

> k4

B

0.05687286

Acá hemos finalizado la estimación de los parámetros del modelo, que resumimos a continuación para la rata en estudio.

> ka

[1] 0.03073695

> ke

[1] 0.0038

> k0

k0

0.002892315

> k1

[1] 0.04421316

> k2

B

-0.003911028

> k3

B

2.138173

> k4

B

0.05687286

> k6

k6

0.02386989

> Ipi

k6

108.9257

> Vd

X

10.19626

> Ga

[1] 105.2

> Ia

[1] 71.33

> Do

[1] 1500

Todo el proceso de estimación de los parámetros, que se fue desarrollando durante la clase puede combinarse en un solo documento y construir un script, que permita el cálculo en muy pocos minutos. A continuación se detalla un modelo de script para este procedimiento.

Si copia el código resaltado en amarillo y genera un archivo de texto para utilizar como script. Entre los archivos de la clase lo hallará con el nombre scripmodeloIG. Los datos puede generarlos a partir de la tablaR781, pero también se proveen en el archivo datosIG.txt Luego podrá ejecutar el scrip, que le irá solicitando los datos y hallará los parámetros de una manera muy sencilla

```

#This script allows to calculate the parameters of a mathematical model for homeostasis of glucose
and insulin applied to healthy rats
#It needs glucose and insulin values measured after an oral glucose, the values have to load
arranged in a txt file with 3 columns separated by space
#The data should have the following order and the following headings: t G I (where t is the time
sample was taken, G is glycemia in mg/dl, I is insulinol in pmol/l)
print("introduce the name of file with data including the extension, example dato.txt")
file<- scan(file = "", what = "",nmax=1)
data<-read.table(file,header=TRUE)
print(data)

print("introduce the value of time for the highest value of glycaemia (tMg)") #tMg=time for the
highest value of glycaemia
tMg<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

print("introduce the value of the highest value of glycaemia (GMg)") #GMg= the highest value of
glycaemia
GMg<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

print("introduce the value of time for the lowest value of glycaemia (tmg)") #tmg=time for the
lowest value of glycaemia
tmg<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

print("introduce the value of the oral dose of glucose (D0)")      #D0 is the oral dose of glucose
D0<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

print("introduce the value of time of the highest value of insulinemia (tMi)") #tMi=time of the
highest value of insulinemia
tMi<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

print("introduce the value of the highest value of insulinemia (IMi)") #IMi= the highest value of
insulinemia
IMi<-as.numeric(scan(file="",what="",nmax=1))

Ga<-data[1,2]

Ia<-data[1,3]

#ka and ke estimation
tabla1<-data.frame(subset(data,t>=tMg&t<=tmg,select=c(t,G)))
tabla1<-cbind(tabla1,ln=log(tabla1$G))
print(tabla1)
fit1<-lsfit(tabla1$t,tabla1$ln)
print(fit1$coefficients)
tabla2<-data.frame(subset(data,t<tMg,select=c(t,G)))
tabla2<-cbind(tabla2,lnGr=log(exp(fit1$coefficients[1]+fit1$coefficients[2]*tabla2$t)-tabla2$G))
print(tabla2)
fit2<-lsfit(tabla2$t,tabla2$lnGr)
ka<--(fit2$coefficients[2])
ke<--(fit1$coefficients[2])

#k0, Vd and k1 estimation

```

```

tabla3<-data.frame(subset(data,t<=15,select=c(t,G)))
print(tabla3)
ajustek0<-nls(G~Ga+((k0*D0)/ka)*(1-exp(-ka*t)),data=tabla3,start=list(k0=0.01),trace=T)
k0<-coef(ajustek0)
tabla4<-data.frame(subset(data,t<=15,select=c(t,I)))
print(tabla4)
ajustek1<-nls(I~Ia+(((k0*D0)/ka)+Ga)*k1*t+((k0*D0*k1)/ka^2)*(exp(-ka*t-1)),data=tabla4,start=list(k1=0.01),trace=T)
k1<-coef(ajustek1)
Vd<-ka/k0

#k6 and Ipi estimation
tabla5<-data.frame(subset(data,t>=tMg,select=c(t,G)))
print(tabla5)
ajustetpi<-nls(G~Ga+(GMg-Ga)/(1+exp((t-tpi)/B)),data=tabla5,start=list(tpi=120, B=10),trace=T)
tpi<-coef(ajustetpi)[1]
B<-coef(ajustetpi)[2]
print(tpi)
tabla6<-data.frame(subset(data,t>=tMi&t<=tmg,select=c(t,I)))
print(tabla6)
ajustek6<-nls(I~Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(t-tMi)),data=tabla6,start=list(k6=0.0002),trace=T)
k6<-coef(ajustek6)
print(k6)
Ipi<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi-tMi))

#k2, k3, k4 estimation
dG1<-((Ga-GMg)*exp((-10)/B))/(B*(1+exp(-10/B))^2)
dG2<-((Ga-GMg)*exp((5)/B))/(B*(1+exp(5/B))^2)
I1<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi-10-tMi))
I2<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi+5-tMi))
k2<-(dG1-dG2)/(I2-I1)
k3<--dG1-k2*I1
k4<-k3/(Ipi-Ia)
print("Values of parameters")
writeLines(paste("ka=",ka))
writeLines(paste("ke=",ke))
writeLines(paste("k0=",k0))
writeLines(paste("k1=",k1))
writeLines(paste("k2=",k2))
writeLines(paste("k3=",k3))
writeLines(paste("k4=",k4))
writeLines(paste("k6=",k6))
writeLines(paste("Ipi=",Ipi))
writeLines(paste("Vd=",Vd))
writeLines(paste("Ga=",Ga))
writeLines(paste("Ia=",Ia))
writeLines(paste("D0=",D0))

```

Clase 9

Resolución de sistemas de ecuaciones diferenciales

En la clase anterior se desarrolló un modelo biológico y su correspondiente modelo matemático para el estudio de la homeostasis de la glucosa en la rata. Se desarrollaron los mecanismos para estimación de los parámetros y se obtuvieron los valores de ellos para datos experimentales provenientes de una rata.

En primer lugar recordaremos el modelo biológico planteado en la clase anterior para la homeostasis de la glucosa en ratas normales

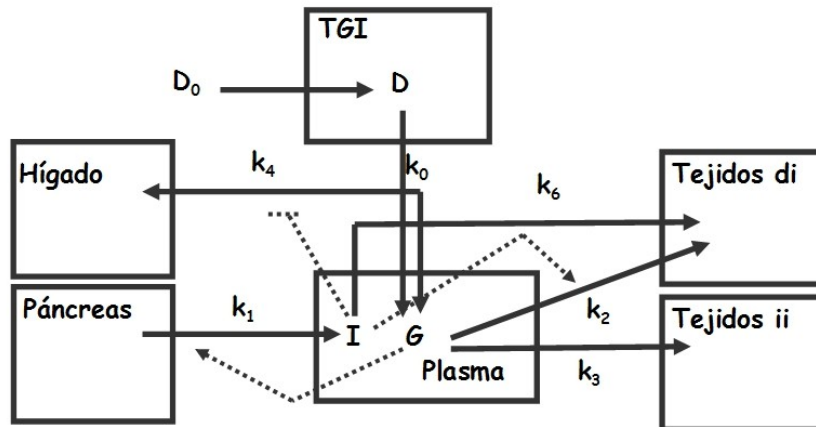


Figura 1. Sistema glucosa-insulina. Las líneas continuas representan flujo de glucosa o insulina y las líneas de puntos efecto estimulador (punta de flecha) o inhibitorio (punta roma). G : concentración de glucosa plasmática (mg/dl), I : concentración de insulina plasmática (pmol/l), D_0 : cantidad de glucosa ingerida a través de la dieta (mg), k_0 : constante de incorporación de glucosa en plasma desde el tracto gastrointestinal ($dl^{-1} min^{-1}$), k_1 : constante de velocidad de producción de insulina pancreática (pmol.dl/mg.min), k_2 : constante de velocidad de consumo de glucosa en los tejidos dependiente de insulina (mg.l/dl.min.pmol), k_3 : constante de velocidad de consumo de glucosa en los tejidos independiente de insulina (mg/min.dl), k_4 : constante de toma (para glucogenogénesis) o liberación de glucosa (por glucogenolisis y/o gluconeogénesis) por el hígado (mg.l/dl.min.pmol), k_6 : constante de depuración de insulina plasmática (min^{-1}). Las unidades de cada parámetro surgen del análisis de las dimensiones en función de las ecuaciones diferenciales planteadas a continuación.

Este modelo puede ser representados por el sistema de ecuaciones diferenciales representado en la Ecuación 1.1.1. Para este modelo se desarrollaron ecuaciones accesorias o se realizaron simplificaciones de manera de poder obtener una valor estimado de cada parámetro.

$$\begin{aligned}\frac{dI}{dt} &= k_1 * G - k_6 * I \\ \frac{dG}{dt} &= -(k_2 + k_4) * I + k_4 * I_{pi} - k_3 + k_0 * D \\ \frac{dD}{dt} &= -k_a * D\end{aligned}$$

Ecuación 1

En el proceso de estimación, realizado en la clase anterior se realizó sobre un set de datos que se utilizará nuevamente en esta clase y se hallan en la tablaR791, que introducimos en esta clase con el nombre tablaR791 y que hallaremos en la tablaR79.ods/xls

```
> tablaR791<-read.table('clipboard',header=TRUE, sep='t',dec=',', encoding='latin1')
```

```
> tablaR791
```

	time	G	I
1	0	105.2	71.33
2	5	126.8	111.03
3	10	141.8	132.30
4	15	157.3	152.01
5	30	271.0	261.79
6	60	244.6	156.65
7	90	200.0	119.20
8	120	148.2	97.91
9	180	129.8	82.66
10	240	120.0	80.10
11	300	103.2	72.00
12	360	94.9	53.69

En la clase anterior se fijaron algunas constantes y se estimaron los parámetros del sistema una rata en particular. Si no los tiene en su espacio de trabajo, introdúzcalos

```
> ka=0.03073695
```

```
> ke= 0.0038
```

```
> k0=0.002892315
```

```
> k1= 0.04421316
```

```
> k2= 0.003911028
```

```
> k3= 2.138173
```

```
> k4= 0.05687286
```

```
> k6= 0.02386989
```

```
> Ipi=108.9257
```

```
> Vd= 10.19626
```

```
> Ga= 105.2
```

```
> Ia= 71.33
```

```
> Do= 1500
```

Con estos valores enfrentaremos el proceso de optimización de los parámetros que consiste en hallar valores más representativos y ajustados de los parámetros a todos los tiempos del experimento. Debemos recordar que durante el proceso de estimación obtenemos un valor del parámetro que se cumple para un intervalo de tiempo en particular y el objetivo es hallar un valor para todo el experimento.

Optimización de los parámetros

En primer lugar definimos una función que llamaremos homeostasis y que corresponde a nuestro sistema de ecuaciones diferenciales

```

> homeostasis<-function(parametros,times=seq(0,400,by=0.5)){
  derivs<-function(s,valoresayuna,parametros){
    with(as.list(c(valoresayuna,parametros)),{
      dI=-k6*I+k1*G
      dG=-(k2+k4)*I+k0*D-k3+k4*Ipi
      dD=-ka*D
      return(list(c(dI,dG,dD)) )
    })
  }
  valoresayuna<-c(I=Ia,G=Ga,D=Do)
  return(ode(y=valoresayuna,times=times,func=derivs,parms=parametros))
}

```

Esta función tiene como variables a 'parametros' y 'times'.

Crearemos un vector con los valores de los parámetros estimados, utilizando los valores de constantes y parámetros introducidos recientemente

```

> parametrosestimados<-list(k0=k0,k1=k1,k2=k2,k3=k3,k4=k4,k6=k6,Ipi=Ipi,ka=ka)

```

asignamos estos datos al objeto 'parametros', que utiliza la función homeostasis() recién definida

```

> parametros<-parametrosestimados

```

cargamos la biblioteca FME, necesaria para trabajar con sistemas de ecuaciones diferenciales

```

> library(FME)

```

Si no la tiene en su computadora, descárguela como cualquier otro paquete de algún repositorio de R.

En primer lugar calcularemos utilizando los valores de los parámetros estimados los valores de I, G y D, utilizando la función 'homeostasis'. Almacenaremos los datos en el objeto salida

```

> salida<-homeostasis(parametros)

```

vemos el contenido de las primeras filas del objeto salida

```

> head(salida)

```

	time	I	G	D
[1,]	0.0	71.33000	105.2000	1500.000
[2,]	0.5	72.81754	107.1906	1477.123
[3,]	1.0	74.33035	109.1028	1454.596
[4,]	1.5	75.86641	110.9364	1432.412
[5,]	2.0	77.42364	112.6911	1410.566
[6,]	2.5	79.00009	114.3668	1389.054

graficamos utilizando la función `matplot()`, útil en esta situación, los valores de I, G y D calculados por el modelo que se hallan en el objeto `salida`

```
> matplot(salida[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,col=c("black","blue","red"),  
xlab="time,min",xlim=c(0,400))  
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
```

y además graficaremos los valores experimentales de G e I que hallamos en la `tablaR791`

```
> points(tablaR791$time,tablaR791$G,pch=20,col='blue')  
> points(tablaR791$time,tablaR791$I,pch=20,col='black')
```

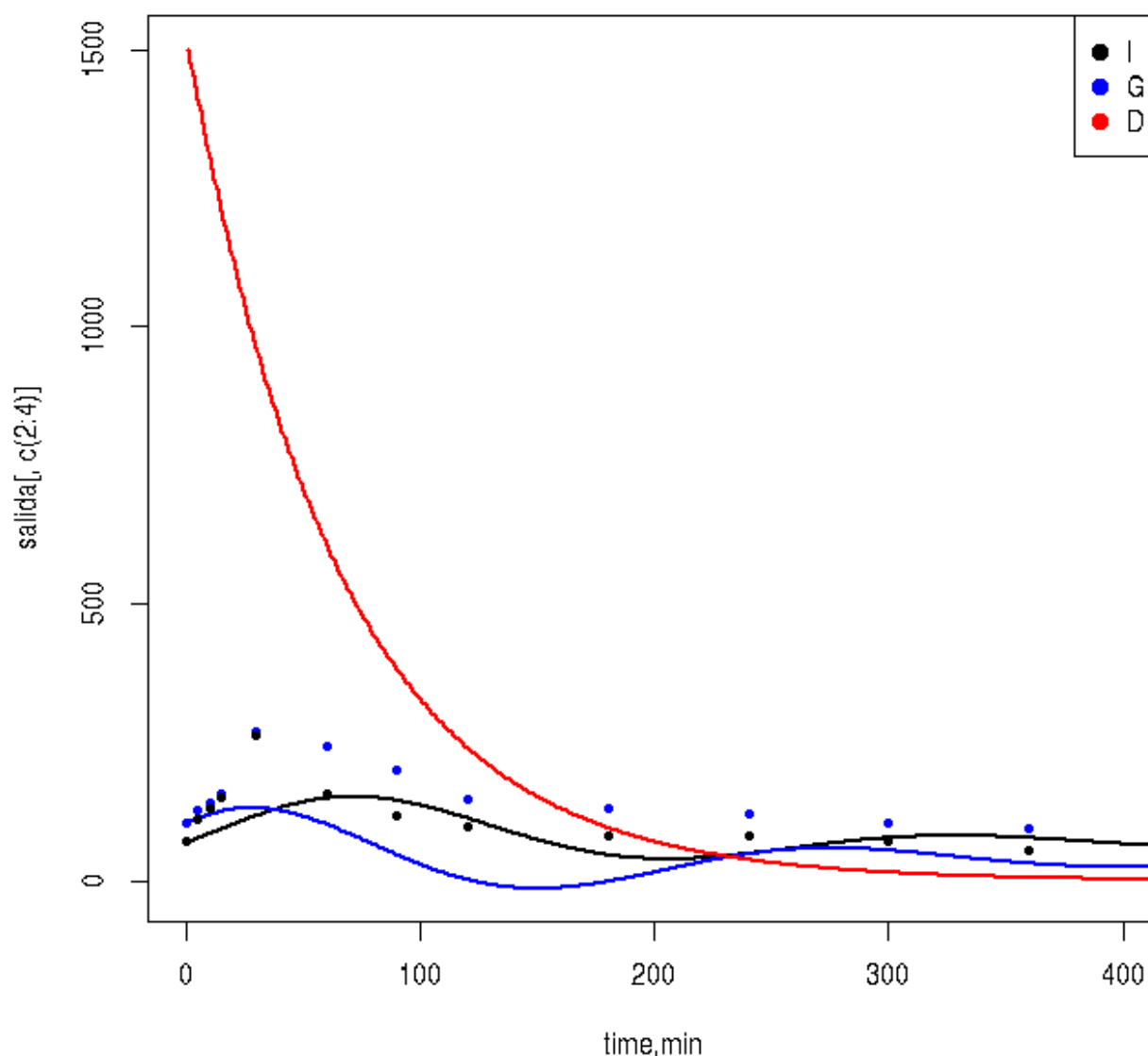


Figura 2

Como podemos ver Figura 2, las líneas roja, azul y negra representan los valores de D, G e I utilizando el modelo con los valores de los parámetros estimados. Los puntos azules y negros representan los valores experimentales medidos de G e I. Se puede observar un ajuste razonable de los valores de I, pero no tanto de G. Esto es razonable y esperable ya que las gráficas han utilizado parámetros estimados que solo son parcialmente válidos para ciertos intervalos de tiempos y suposiciones. Con el proceso de optimización de los parámetros esto podrá mejorar.

Comenzaremos a optimizar los parámetros, es decir buscar valores que permitan ajustar mejor los valores de G e I por la función homeostasis.

En primer lugar definimos una función 'objetivo' que se utilizará en el proceso de optimización y corresponde a una función que utiliza la función modCost() cuyo fin es minimizar las diferencias entre los valores reales y los valores estimados del modelo. El procedimiento que se hará tendrá el mismo resultado que obtenemos cuando hacemos una regresión lineal o un ajuste no lineal. Obtendremos parámetros que hacen que la función que utilizamos se ajuste mejor a los valores experimentales.

```
> objetivo<-function(x,parset=names(x)){
  parametros[parset]<-x
  tout<-seq(0,360,by=0.5)
  out<-homeostasis(parametros,tout)
  return(modCost(obs=tablaR791,model=out))
}
```

El proceso de optimización lo haremos en sucesivos ciclos que básicamente representamos en la Figura 3. Con los parámetros estimados a partir de datos experimentales y funciones auxiliares, utilizando la función que representa el modelo y una función llamada objetivo, por medio de la función ModFit() optimizaremos primero los parámetros k0 y k1. En un paso siguiente optimizaremos los parámetros k2 y k3, utilizando ahora para los parámetro k0 y k1 los valores optimizados y no los estimados. Luego haremos lo mismo para optimizar k6. Se podría seguir con un mismo planteo para optimizar los parámetros Ipi, ka y k4 que restarían.

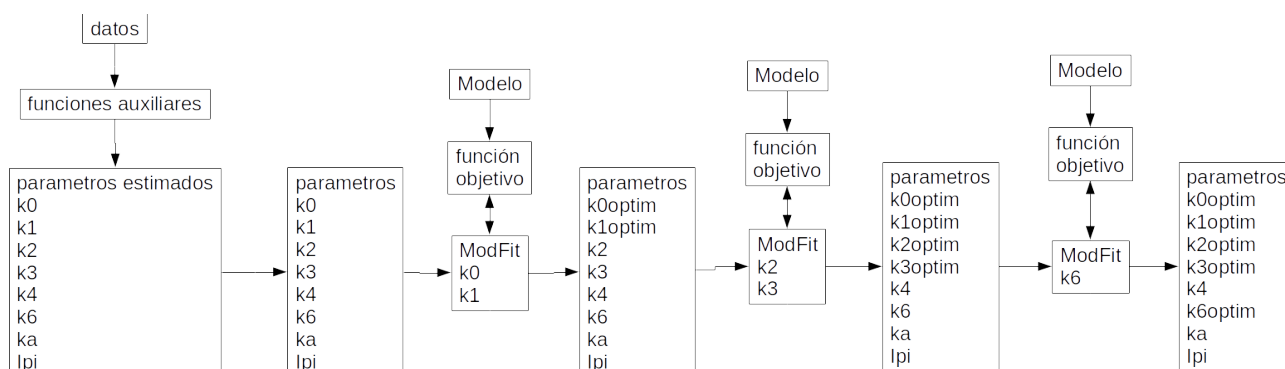


Figura 3

Optimización de dos parámetros: k0 y k1

Dado que el proceso de optimización de varios parámetros como ocurre en este caso y con relativamente pocos datos, como es esta situación, puede ser dificultosa. Se realizará en primer lugar el proceso de optimización de solo dos de ellos, dejando los otros con los valores estimados

A modo de ejemplo optimizaremos solo los parámetros k0 y k1 y utilizaremos para esto la función modFit() de la biblioteca FME, que asigna al objeto Fit el resultado del proceso. La función modFit() sabe cuales son los parámetros a optimizar, ya que en el argumento p de la función se indican los valores estimados de los mismos. Además colocamos una restricción en la optimización que es que los parámetros puedan tener como mínimo valor cero, es decir que no sean negativos. Esto queda indicado en el argumento lower. En este argumento tiene que existir tantos números como parámetros estamos optimizando. En caso que el argumento lower se omita, el proceso de optimización no tendrá límites mínimos y podrán así existir valores de parámetros que sean negativos. Aunque en este caso no lo utilizaremos, se puede incluir el argumento upper, que fija

valores máximos de los parámetros. Estos argumentos se fijan en función de conocimientos biológicos o propios del sistema. Por ejemplo la variable Ipi, que es el valor de la concentración de insulina en un dado tiempo del proceso estudiado, no puede tener valores mayores que el máximo alcanzado por la insulina ni menores que el mínimo. De la misma manera se pueden tomar límites para los parámetros, lo que deberá estar adecuadamente fundamentado.

```
> print(system.time(Fit<-  
modFit(p=c(k0=0.002892315,k1=0.04421316),f=objetivo,lower=c(0.0,0.0))))
```

```
user system elapsed  
1.356 0.005 1.423
```

vemos el contenido del objeto Fit, donde hallamos los valores optimizados de k0 y k1. Además se muestran en la salida de summary() otros datos que no tendremos en cuenta por el momento.

```
> summary(Fit)
```

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
k0	0.005929	0.001087	5.456	1.76e-05 ***
k1	0.013369	0.001386	9.646	2.32e-09 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 48.05 on 22 degrees of freedom

Parameter correlation:

	k0	k1
k0	1.0000	0.2643
k1	0.2643	1.0000

Podemos graficar nuevamente nuestros datos y el modelo, pero incluyendo ahora los valores optimizados de k0 y k1.

Para ello en primer lugar creamos dos objetos que tengan los valores optimizados de los parámetros

```
> k0optim<-Fit$par[1]
```

```
> k1optim<-Fit$par[2]
```

y creamos un vector con los parámetros optimizados, dejando los valores estimados para aquellos que no hemos optimizados

```
> parametrosoptimizados<-  
list(k0=k0optim,k1=k1optim,k2=0.0003911028,k3=2.138173,k4=0.05687286,k6=0.02386989,Ipi=  
108.9257,ka=0.03073695)
```

asignamos al objeto parametros, los valores de parametrosoptimizados

```
> parametros<-parametrosoptimizados
```

y ejecutamos nuevamente la función homeostasis para obtener los valores de nuestro modelo, datos que almacenamos en el objeto salidaoptimizada

```
> salidaoptimizada<-homeostasis(parametros)
```

graficamos entonces los valores del modelo que hallamos en salidaoptimizada y que vemos a continuación

```
> head(salidaoptimizada)
```

	time	I	G	D
[1,]	0.0	71.33000	105.2000	1500.000
[2,]	0.5	71.19748	109.6147	1477.123

```
[3,] 1.0 71.09565 113.9654 1454.595
[4,] 1.5 71.02378 118.2523 1432.412
[5,] 2.0 70.98103 122.4756 1410.566
[6,] 2.5 70.96663 126.6354 1389.053
```

Utilizamos las mismas funciones gráficas mostrada antes de la optimización

```
> matplot(salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,col=c("black","blue","red"),
xlab="time,min",xlim=c(0,400))
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
> points(tablaR791$time,tablaR791$G,pch=20,col='blue')
> points(tablaR791$time,tablaR791$I,pch=20,col='black')
```

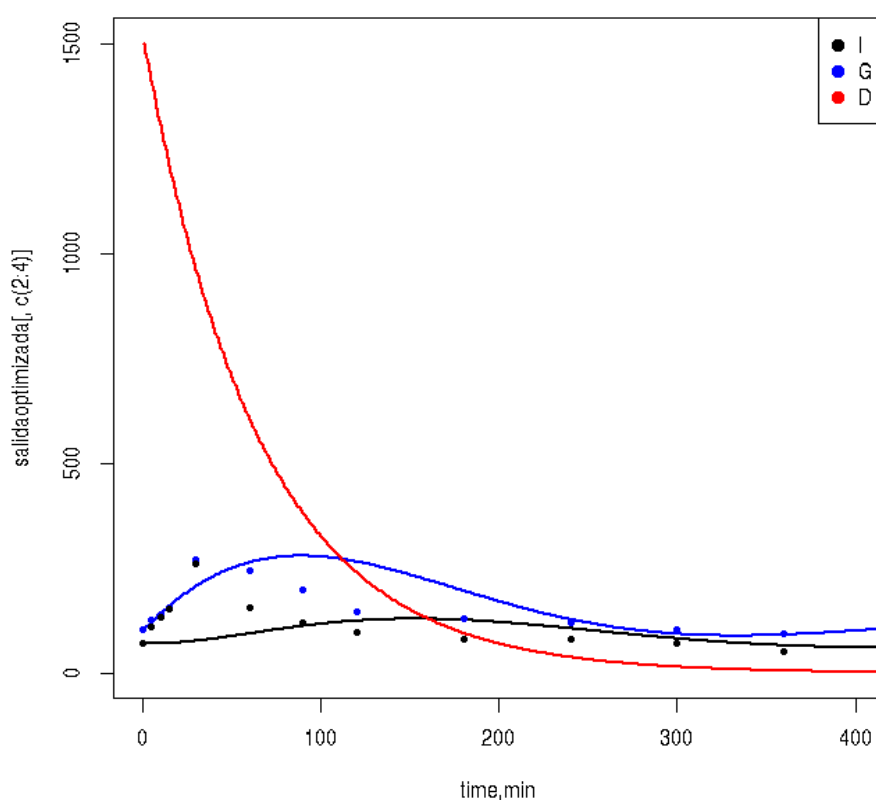


Figura 4

Podemos comprobar el mejor ajuste del modelo si comparamos la Figura 4 con la Figura 2.

Optimización de k_0 , k_1 , k_2 y k_3

Utilizamos nuevamente la función `modFit` y damos a los parámetros los valores estimados y los optimizados de k_0 y k_1

```
> print(system.time(Fit<-
modFit(p=c(k0=0.005928959,k1=0.01336924,k2=0.003911028,k3=2.138173),f=objetivo,lower=c(0
,0,0,0))))
```

```
user system elapsed
2.035 0.000 2.036
```

```
> summary(Fit)
```

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
k0	4.659e-03	1.423e-03	3.274	0.0038	**
k1	1.722e-02	3.197e-03	5.385	2.86e-05	***
k2	2.831e-13	1.950e-02	0.000	1.0000	
k3	9.661e-01	1.965e+00	0.492	0.6284	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 47.55 on 20 degrees of freedom

Parameter correlation:

	k0	k1	k2	k3
k0	1.0000	-0.4052	0.1168	0.2046
k1	-0.4052	1.0000	-0.5532	0.1640
k2	0.1168	-0.5532	1.0000	-0.8731
k3	0.2046	0.1640	-0.8731	1.0000

Podemos graficar nuevamente nuestros datos y el modelo, pero incluyendo ahora los valores optimizados de k0, k1, k2, k3 y k6.

Para ello en primer lugar creamos dos objetos que tengan los valores optimizados de los parámetros

```
> k0optim<-Fit$par[1]
> k1optim<-Fit$par[2]
> k2optim<-Fit$par[3]
> k3optim<-Fit$par[4]
```

y creamos un vector con los parámetros optimizados, dejando los valores estimados para aquellos que no hemos optimizados

```
> parametrosoptimizados<-
list(k0=k0optim,k1=k1optim,k2=k2optim,k3=k3optim,k4=0.05687286,k6=0.02386989,Ipi=108.92
57,ka=0.03073695)
```

asignamos al objeto parametros, los valores de parametrosoptimizados

```
> parametros<-parametrosoptimizados
```

y ejecutamos nuevamente la función homeostasis para obtener los valores de nuestro modelo, datos que almacenamos en el objeto salidaoptimizada

```
> salidaoptimizada<-homeostasis(parametros)
```

graficamos entonces los valores del modelo que hallamos en salidaoptimizada y que vemos a continuación

```
> head(salidaoptimizada)

   time      I      G      D
[1,] 0.0 71.33000 105.2000 1500.000
[2,] 0.5 71.40133 109.2525 1477.123
[3,] 1.0 71.50624 113.2495 1454.595
[4,] 1.5 71.64394 117.1911 1432.412
[5,] 2.0 71.81347 121.0770 1410.566
[6,] 2.5 72.01401 124.9072 1389.053
```

Utilizamos las mismas funciones gráficas mostrada antes de la optimización

```
> matplot(salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,col=c("black","blue","red"),
xlab="time,min",xlim=c(0,400))
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
> points(tablaR791$time,tablaR791$G,pch=20,col='blue')
> points(tablaR791$time,tablaR791$I,pch=20,col='black')
```

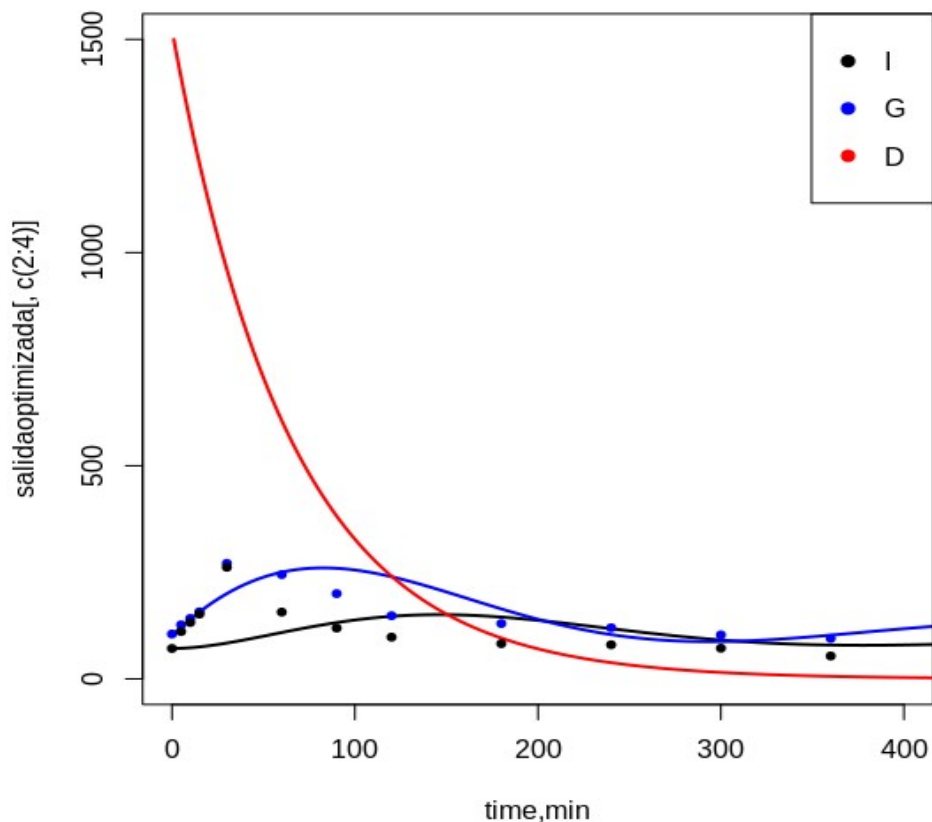


Figura 5

Optimización con k_0 , k_1 , k_2 , k_3 y k_6

Utilizamos nuevamente la función modFit y damos a los parámetros los valores estimados y los optimizados de k_0 , k_1 , k_2 , k_3

```
> print(system.time(Fit<-modFit(p=c(k0=0.004658765,k1=0.01721656,k2=2.830994e-
13,k3=0.9660883,k6=0.02386989),f=objetivo,lower=c(0,0,0,0,0))))

user system elapsed
2.609 0.004 2.612
> summary(Fit)
```

Parameters:

```

      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
k0 8.651e-03  1.826e-03  4.737 0.000143 ***
k1 1.472e+02  1.392e+04  0.011 0.991676
k2 2.831e-13  2.052e-02  0.000 1.000000
k3 1.445e+00  1.973e+00  0.732 0.473036
k6 2.090e+02  1.977e+04  0.011 0.991674
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Residual standard error: 33.65 on 19 degrees of freedom

```

Parameter correlation:
      k0    k1    k2    k3    k6
k0 1.0000 0.2803 0.7238 -0.6010 0.2806
k1 0.2803 1.0000 0.1376 -0.1797 1.0000
k2 0.7238 0.1376 1.0000 -0.9489 0.1379
k3 -0.6010 -0.1797 -0.9489 1.0000 -0.1799
k6 0.2806 1.0000 0.1379 -0.1799 1.0000

```

Podemos graficar nuevamente nuestros datos y el modelo, pero incluyendo ahora los valores optimizados de k0, k1, k2, k3 y k6.

Para ello en primer lugar creamos dos objetos que tengan los valores optimizados de los parámetros

```

> k0optim<-Fit$par[1]
> k1optim<-Fit$par[2]
> k2optim<-Fit$par[3]
> k3optim<-Fit$par[4]
> k6optim<-Fit$par[5]

```

y creamos un vector con los parámetros optimizados, dejando los valores estimados para aquellos que no hemos optimizados

```

>
                                                                    parametrosoptimizados<-
list(k0=k0optim,k1=k1optim,k2=k2optim,k3=k3optim,k4=0.05687286,k6=k6optim,Ipi=108.9257,k
a=0.03073695)

```

asignamos al objeto parametros, los valores de parametrosoptimizados

```

> parametros<-parametrosoptimizados

```

y ejecutamos nuevamente la función homeostasis para obtener los valores de nuestro modelo, datos que almacenamos en el objeto salidaoptimizada

```

> salidaoptimizada<-homeostasis(parametros)

```

graficamos entonces los valores del modelo que hallamos en salidaoptimizada y que vemos a continuación

```

> head(salidaoptimizada)

      time      I      G      D
[1,] 0.0 71.33000 105.2000 1500.000
[2,] 0.5 71.40133 109.2525 1477.123
[3,] 1.0 71.50624 113.2495 1454.595
[4,] 1.5 71.64394 117.1911 1432.412

```

```
[5,] 2.0 71.81347 121.0770 1410.566  
[6,] 2.5 72.01401 124.9072 1389.053
```

Utilizamos las mismas funciones gráficas mostrada antes de la optimización

```
> matplot(salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,col=c("black","blue","red"),  
xlab="time,min",xlim=c(0,400))  
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))  
> points(tablaR791$time,tablaR791$G,pch=20,col='blue')  
> points(tablaR791$time,tablaR791$I,pch=20,col='black')
```

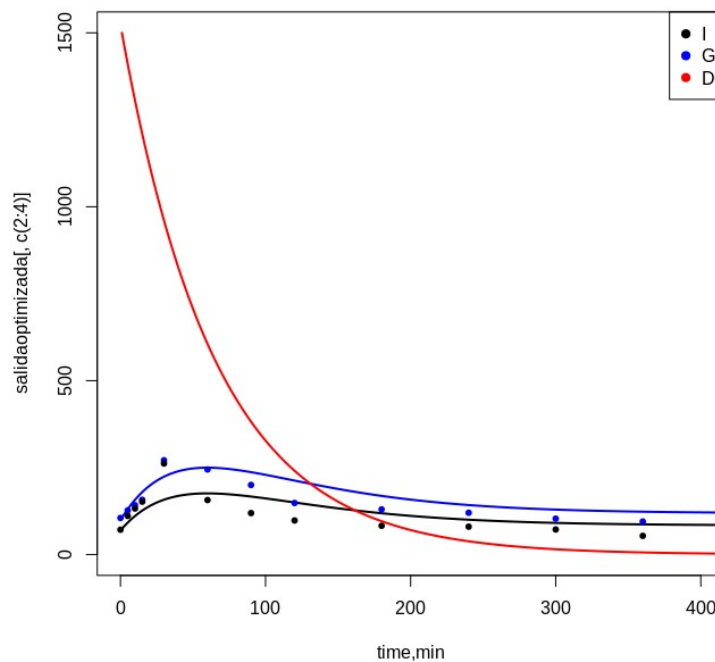
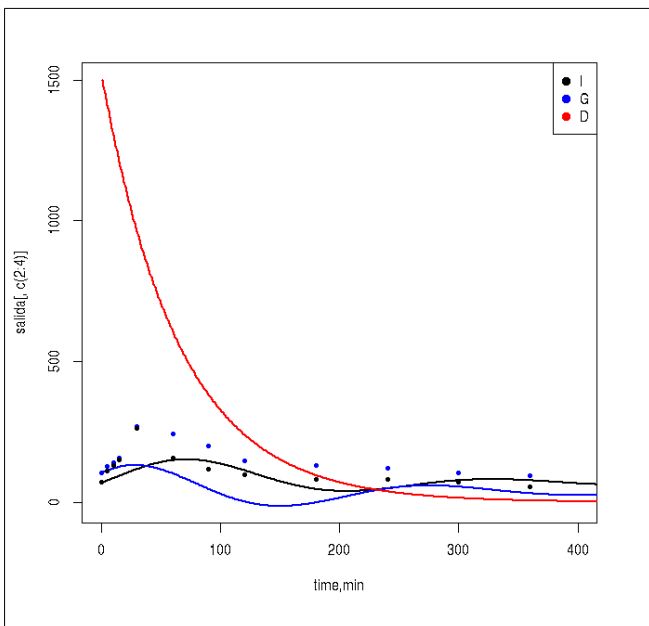


Figura 6

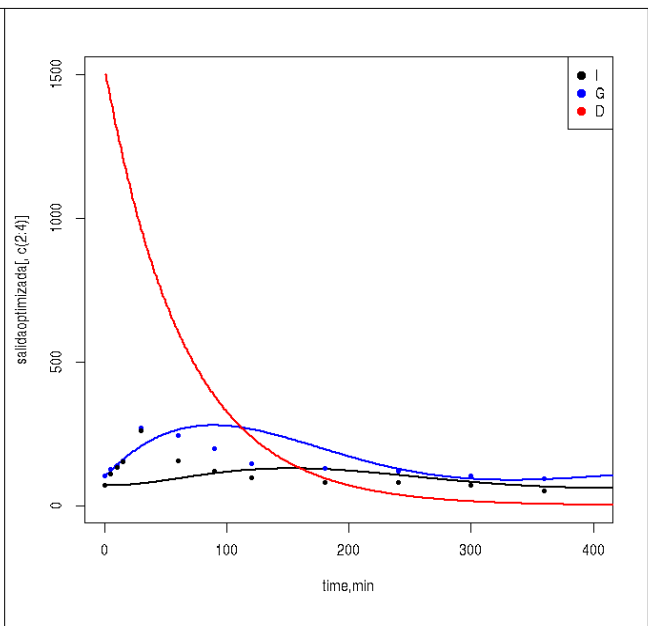
Podemos comprobar que con 5 parámetros optimizados hemos mejorado muchísimo el ajuste de los datos experimentales por nuestro modelo.

En este caso en particular, siendo un problema común en las ciencias biológicas, el número de datos es reducido para un número tan elevado de parámetros y por ende, intentar optimizar todos los parámetros da error con las herramientas incorporadas. El aumento del número de datos sería una gran solución, así como dejar algunos parámetros sin optimizar.

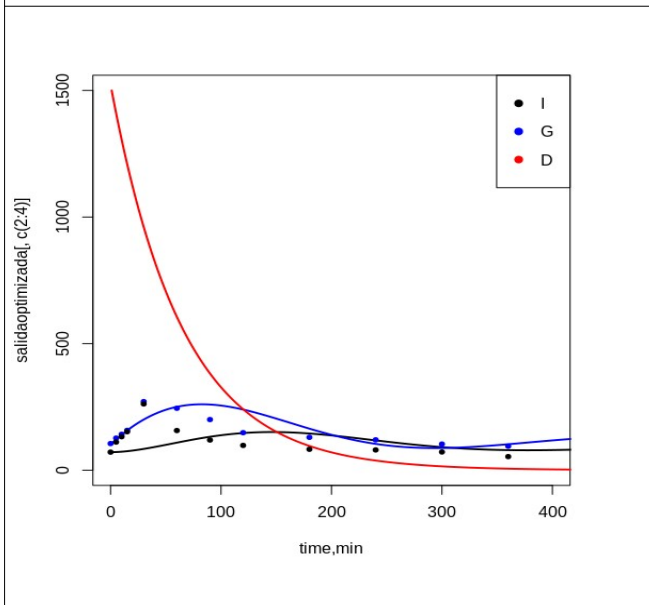
A continuación y a modo de resumen se muestran la progresión de los ajustes al aumentar el número de parámetros optimizados



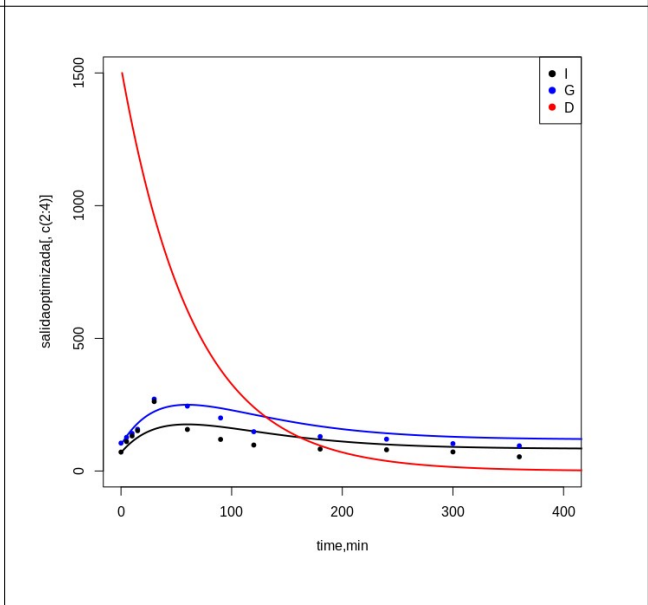
ningún parámetro optimizado
Todos los valores de los parámetros fueron los valores estimados



2 parámetros optimizados



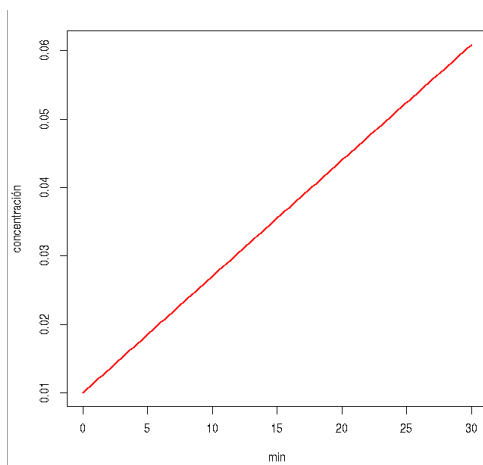
con 4 parámetros



Con 5 parámetros

- i Ericsson, Y. Monofluorophosphate physiology: general considerations. *Caries Res.* 17 (Suppl 1) 46-55. 1983
- ii Delmas, P.D., Dupuis, J., Duboeuf, F., Chapuy, M.C., Meunier, P.J. Treatment of Vertebral osteoporosis with disodium monofluorophosphate: Comparison with Sodium Fluoride. *J. Bone and mineral Res.* 5:S143-S147. 1990
- iii Rigalli, A., Cabrerizo, M., Beinlich, A., Puche, R.C. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittel Forschung. Drug Research* 44(I), 651-655. 1994.
- iv Rigalli, A., Esteban, L., Pera, L., Puche, R.C. Binding of monofluorophosphate to α_2 -macroglobulin and C3. *Calcified Tissue International* 60(I) 86-89. 1997.
- v Esteban, L., Rigalli, A., Puche, R.C. Metabolism of the complex monofluorophosphate- α_2 -macroglobulin in the rat. *Medicina (Buenos Aires)* 59:151-156. 1999
- vi Alfredo Rigalli, Rosa Alloatti, and Rodolfo C. Puche. Measurement of Total and Diffusible Serum Fluoride. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 13:151-157 (1999)
- vii Rigalli, A., Ballina, J.C., Beinlich, A., Alloatti, R., Puche, R.C. Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittel Forschung. Drug Research.* 44(I), 762-766. 1994.

viii



ix 13,68 eq/l

alcanzar la concentración dependerá de la solubilidad de la sustancia. En caso que nos se pueda alcanzar dicha concentración, podría disminuirse V1.

- x Birge, S.J., Avioli, R.C. Intestinal Phosphate transport and alkaline phosphate activity in the chick. *Am.J.Physiol.* 240: E384-E390. 1981