

TÍTULO DE TESIS

***Efecto del fluoruro sobre el consumo de glucosa por el
sistema nervioso y sus consecuencias sobre la capacidad
de aprendizaje y de memoria en ratas***

DOCTORANDO

Lic. en Biotecnología Patricia M. Lupión

Director: Dr. Alfredo Rigalli

Cátedra de Química Biológica

Laboratorio de Biología Ósea

Centro Universitario de Estudios Medioambientales (CUEM)

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario. Rosario - Argentina

Co-directora: Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Departamento de Ciencias Biológicas

Facultad de Odontología de Baurú

Universidad de San Pablo. Baurú - Brasil

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario



2021



Para Eva, Raúl y mi familia

ÍNDICE:

ÍNDICE:	3
AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Generalidades del fluoruro	10
1.2 Cociente intelectual: historia y aplicación	17
1.2.1 Medición del cociente intelectual y test de Raven	18
1.3 Sistema nervioso: generalidades y relación con los centros de aprendizaje y memoria	19
1.3.1 Sistema límbico	20
1.3.2 Conexiones intralímbicas	22
1.3.3 Estructuras cerebrales relacionadas con la memoria	22
1.4 Modelos de estudio en el aprendizaje y memoria en animales	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GENERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Breve descripción de los experimentos realizados	27
3.2 Cuidado de animales	28
3.3 Obtención y manipulación de muestras de sangre	29
3.4 Sonda orogástrica	29
3.5 Prueba de tolerancia oral de glucosa	29
3.6 Eutanasia	30
3.7 Medición de insulina	30
3.8 Medición de glucosa	31
3.9 Medición de fluoruro por potenciometría directa	31
3.10 Evaluación de aprendizaje y memoria	32
3.11 Perfusión de cerebro	35
3.12 Proceso de medición de 2-[C ¹⁴]-desoxi-D-glucosa	38

3.13	Evaluación del consumo de glucosa por sistemas independientes de insulina utilizando un modelo matemático	42
3.13.1	Descripción del modelo matemático	43
3.13.2	Estimación de parámetros del modelo matemático en ratas	46
3.14	Técnicas estadísticas y control de calidad	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Aprendizaje y memoria.....	48
4.1.1	Administración diaria de una dosis fluoruro por sonda gástrica: test de aprendizaje y memoria	48
4.1.2	Administración diaria de fluoruro por agua de bebida: test aprendizaje y memoria	51
4.2	Perfusión de cerebro	54
4.3	Consumo de glucosa utilizando 2-[C ¹⁴]-deoxi-D-glucosa	56
4.4	Evaluación del consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina utilizando un modelo matemático	57
5	DISCUSIÓN.....	60
6	APÉNDICE 1	65
6.1	Estimación de parámetros de la homeostasis glucosa insulina	65
6.1.1	Estimación de k_a	67
6.1.2	Estimación de k_0	72
6.1.3	Estimación de k_1	76
6.1.4	Estimación de k_6	79
6.1.5	Estimación de I_{pi}	82
6.1.6	Estimación de k_2 y k_3	87
6.1.7	Estimación de k_4	90
7	APÉNDICE 2	93
7.1	Optimización de parámetros de la homeostasis glucosa insulina	93
7.1.1	Optimización de los parámetros	93
7.1.2	Optimización de los parámetros k_0 y k_1	96
7.1.3	Optimización de k_0 , k_1 , k_2 y k_3	99
7.1.4	Optimización con k_0 , k_1 , k_2 , k_3 y k_6	101

8	APÉNDICE 3	105
	8.1 Inconvenientes en la técnica de perfusión de cerebro	105
	8.2 Criterios de inclusión	107
9	BIBLIOGRAFIA.....	109

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de mi tesis, como doctorando transité por diferentes caminos optimistas y no tanto, aprendí nuevas tareas aplicando herramientas no del todo conocidas como sucede en la mayoría de situaciones con las que uno no enfrentó. También obtuve mucha ayuda al recibir consejos, sugerencias y críticas de todo mi entorno tanto personal y como laboral.

Por eso hoy quiero agradecer sobre todo a mi director el Dr. Alfredo Rigalli por haber confiado en mí para apadrinarme en este trayecto tan sinuoso.

A la Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf quien muy amablemente aceptó ser mi co-directora.

A la Dra. Verónica Di Loreto y el Dr. Lucas Brun que son de las primeras personas que me dieron confianza y apoyo durante mi tesina y el desarrollo de esta tesis, como también mostrarme distintas resoluciones a mis problemas.

A las Dras Mercedes Lombarte, Maela Lupo y Brenda Fina invaluable en su consejo y experiencia del día a día.

Indudablemente gracias a la Lic. María Eugenia Chulibert por sostenerme día a día, ser mi amiga, psicóloga, nutricionista, compañera, coordinadora, extractora de sangre, respaldo y estar en TODO lo que necesité desde el inicio de nuestros doctorados.

Por supuesto a la ayuda indispensable del grupo de becarios alumnos que tomaron propio el desarrollo y la organización de los largos días de trabajo, principalmente a Leandro, Santiago L, Micaela y Marianela, sin dejar de nombrar también a Aldana, Santiago B, Mariano y al Med. Vet. Manaure Camargo Duarte por su ayuda durante las cirugías, entre tantos otros que me ayudaron.

A mi familia que desde lejos y sin terminar de entender demasiado siempre están para mí.

A Raúl mi compañero, apoyo y sustento, gracias por generar en mi la confianza para poder ser mamá de nuestra intrépida y hermosa hija Eva, como así también desarrollarme y crecer como mujer y profesional.

Por último quisiera agradecer a las profesoras Analía Boglioli y Graciela Calgaro por su direccionamiento, enseñanza y aporte en la escritura de la anatomía del cerebro.

ABREVIATURAS

En la siguiente tabla ordenada alfabéticamente se encuentran las abreviaturas y unidades utilizadas a lo largo del texto, para facilitar la lectura de la misma.

°C	Grados Celsius
2DG	2-[C ¹⁴]-desoxi-D-glucosa
AB	Administración de F ⁻ por agua de bebida
ACD	Arteria carótida derecha
ACI	Arteria carótida izquierda
Ag/AgCl	Plata/ Cloruro de plata
ATP	Adenosintrifosfato
Bq	Bequerel
CI	Cociente intelectual
D ₀	Cantidad de glucosa ingerida a través de la dieta
DUSO	Administración de F ⁻ a través de una dosis diaria única por sonda orogástrica
F	Flúor
F ⁻	Fluoruro
g	Gramos
G	Glucosa
GLUT-3	Transportador de glucosa tipo 3 específico de cerebro
h	Horas
I	Insulina
INSR	Receptor de insulina
I _{pi}	Insulinemia umbral para el cambio de función hepática
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1
k ₀	Parámetro de absorción intestinal de glucosa
k ₁	Parámetro de secreción de insulina
k ₂	Parámetro de consumo de glucosa dependiente de insulina
k ₃	Parámetro de consumo de glucosa independiente de insulina
k ₄	Parámetro de consumo/producción hepática de glucosa
k ₅	Parámetro de excreción urinaria de glucosa
k ₆	Parámetro de depuración plasmática de insulina
k _a	Parámetro de desaparición de glucosa del tracto gastrointestinal
k _e	Parámetro de eliminación de glucosa del plasma.
M	Molar
mg	Miligramos
mV	Milivoltios
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida

NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
OMS	Organización mundial de la salud
ppm	Partes por millón (mg/litro)
PTGO	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SD	Desvío estándar
SNC	Sistema nervioso central
SP	Solución de perfusión
VYD	Vena yugular derecha
VYI	Vena yugular izquierda
μl	Microlitro

RESUMEN

El fluoruro se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre e ingresa al organismo principalmente a través del agua de bebida. En concentraciones mayores a 1.5 ppm produce un cuadro clínico con diferentes signos y síntomas conocidos como fluorosis. Numerosos trabajos en niños muestran disminución del cociente intelectual por consumo de agua con elevada concentración de fluoruro. En el sistema nervioso puede afectar la capacidad de aprendizaje y memoria como también el coeficiente intelectual. La energía generada debido al consumo de glucosa en este sistema podría verse alterada luego de la administración de fluoruro conduciendo a una disfunción del proceso de aprendizaje y memoria. Para comprobarlo se evaluó el efecto de la exposición de ratas Sprague-Dawley de 50 días a una dosis oral de fluoruro o a través de agua de bebida por 30 días sobre el aprendizaje y memoria espacial por medio de un laberinto de agua sin encontrar diferencias en los parámetros que evidencian estas habilidades en ambos tipos de exposiciones al fluoruro. Por otro lado, se evaluó el consumo de glucosa por el cerebro utilizando tres modelos experimentales: 1- Aplicación de un modelo matemático, 2-perfusión de cerebro *in situ* y, 3- consumo de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa en cerebro. En ninguno de los tres modelos experimentales se encontró efecto del fluoruro en el consumo de la glucosa por el sistema nervioso. Tampoco tuvo efecto la forma de administración del ion. Se concluye que en la línea y edad de las ratas utilizadas el fluoruro no afecta el consumo de glucosa por el sistema nervioso ni el proceso de aprendizaje y memoria.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del fluoruro

El **flúor (F)** es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre, es considerado un elemento no esencial en los seres humanos y no posee un rol asignado en nuestro organismo. Sin embargo, debido a la imposibilidad de la preparación de alimentos completamente libre de **fluoruro (F⁻)** esta hipótesis aún no ha sido refutada.

Químicamente es un halógeno muy reactivo y tóxico, que forma compuestos inorgánicos y orgánicos llamados fluoruros (1). Principalmente se presenta en áreas con depósitos geológicos de origen marino y en aguas subterráneas de zonas montañosas en concentración muy variable según la zona que recorra el acuífero, la porosidad de los materiales, la velocidad de la corriente y la concentración de distintos cationes como hidrógeno, sodio y calcio, entre otros (2). También, se pueden encontrar elevadas concentraciones de F⁻ en zonas industriales donde se utilizan fertilizantes, en refinerías de petróleo, industria del vidrio, hornos de cocción de ladrillos, entre otros (3).

El F⁻ ingerido se absorbe principalmente a nivel del tracto gastrointestinal por difusión simple (estómago e intestino delgado). También una porción es capaz de ser introducido al organismo a través de los pulmones debido al F⁻ que se encuentra en la atmósfera. Una vez absorbido pasa a la circulación sanguínea donde es transportado y distribuido a todo el organismo, como tejidos blandos aunque especialmente es captado por tejidos calcificados como huesos y dientes. Se elimina principalmente en la orina a través de su filtración en los riñones y en menor medida a través de sudor, heces y saliva (4). De esta forma, una proporción significativa de F en el organismo proviene de la exposición a ambientes contaminados por ser residuo industrial y de productos de higiene bucal que presentan elevadas concentraciones de F (1000 a 1500 ppm). Pero el principal ingreso en el hombre es por la vía oral a través de la ingesta de alimentos y del agua de bebida proveniente de pozos domiciliarios. Resultados de 411 registros de muestras de agua provenientes de diferentes fuentes de agua, como por ejemplo pozos domiciliarios, red de

agua potable municipal, etcétera, recopilados en la base de datos “Atlantis” del Centro Universitario de Estudios Medioambientales (CUEM), avalan la afirmación recién expuesta, Figura 1.

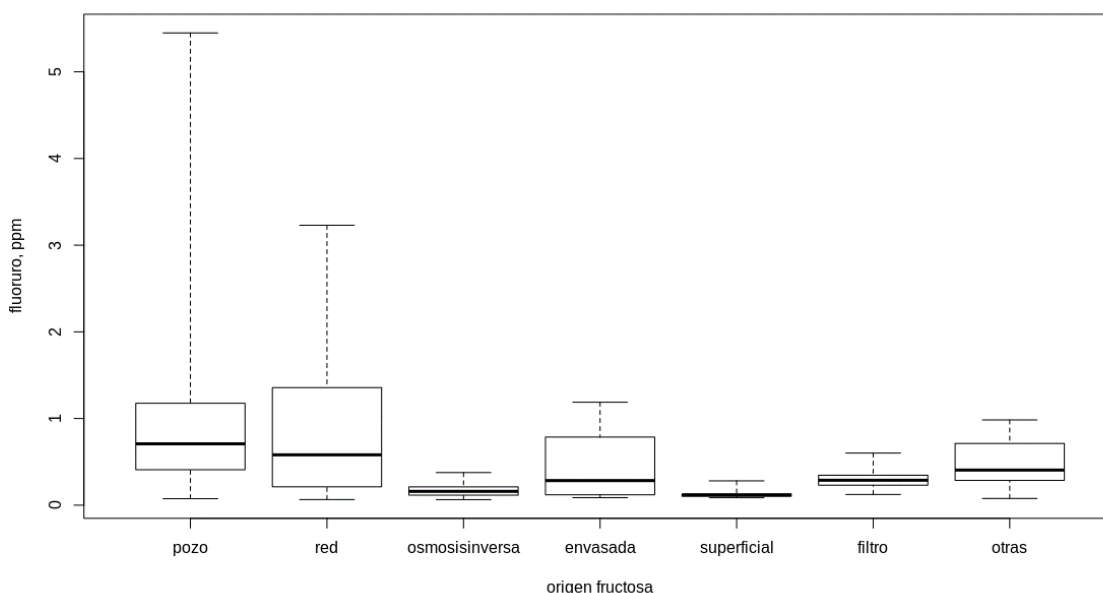


Figura 1: Concentración de fluoruro en aguas de diferentes fuentes. Se expresa mediana, percentiles 25 y 75 y rango de valores. Datos obtenidos de Atlantis 1.0 CUEM.

En pequeñas dosis, el F^- tiene un comportamiento beneficioso, por ejemplo, en tratamientos odontológicos. Un nivel de F^- en el agua potable más alto que el máximo de referencia establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1.5 ppm (5), es capaz de producir toxicidad en distintos tejidos. Es bien conocido su comportamiento en intoxicaciones crónicas por fluoruros que genera una patología denominada *fluorosis*, la cual puede tener signos y síntomas detectables o pasar desapercibida. Son alrededor de 25 países y 62 millones de personas las que se ven afectadas por esta patología (6), siendo el F^- el principal elemento presente en las aguas de consumo en esas regiones.

La principal vía de incorporación del F^- al organismo humano es la digestiva, ya que el 90% del F^- ingerido es absorbido en el estómago. En adultos, el 10% se deposita en los huesos, en tanto que en los niños se puede fijar hasta un 50%, siendo el resto excretado a través del riñón. En el recién nacido, cerca del 90% de F^- es retenido por el sistema óseo, aunque este porcentaje disminuye y se estabiliza con la edad. La concentración máxima del F^- en el plasma se observa de 30 a 60 min después de su ingesta (4).

La primera alteración visible en el hombre es el moteado dental (fluorosis dental), un leve problema estético que puede conllevar hasta la pérdida de piezas dentales. Una exposición prolongada produce alteraciones visibles e importantes como el curvado de las piernas por deformación ósea en huesos largos produciendo afecciones del aparato locomotor (fluorosis esquelético) (7). También es posible observar cambios en la capacidad reproductiva (8) y en el sistema endócrino (9) los cuales han sido descritos en numerosos trabajos.

En el laboratorio donde se realizó esta tesis se han descrito efectos adversos en especial sobre el sistema glucosa-insulina (10–14) y el locomotor (15). A pesar de sus efectos adversos, el importante avance en el conocimiento de la farmacología del F^- (4), permitió utilizarlo como trazador no radiactivo para la medida simultánea de los procesos de formación y resorción ósea (16,17).

Se ha observado que el F^- puede inducir cambios citológicos y bioquímicos en el cerebro que afectan el desarrollo de niños durante los procesos cognitivos, como podría suceder en el aprendizaje y la memoria a lo largo de los primeros 8 años de vida. El F^- puede atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en zonas del cerebro durante el desarrollo embrionario, como el hipocampo, causando disfunción en el sistema nervioso central (18,19) alterando también el metabolismo del oxígeno e incrementando la presencia de especies reactiva del oxígeno (ROS) (20). En individuos jóvenes (menores de 12 años) la permeabilidad de la barrera hematoencefálica es más reactiva que entre los adultos. También se conoce que los jóvenes son menos resistentes a la influencia tóxica del F^- , provocando procesos neurodegenerativos que desencadenan mecanismos de excitotoxicidad y estrés oxidativo (18). La excitotoxicidad produce daño en las células nerviosas por sobreestimulación a mano de neurotransmisores como el glutamato (21). El estrés oxidativo se produce por el incremento de factores que favorecen la oxidación, así como una deficiencia de antioxidantes. El F^- estimula las reacciones oxidativas en cascada, al mismo tiempo que reduce el potencial antioxidante que en el cerebro es relativamente pequeño.

Dichas disfunciones, se ven reflejadas en evaluaciones realizadas sobre el **cociente intelectual (CI)** de niños que viven en áreas con alto contenido de F^- en agua y alimentos, donde el CI es más bajo que el de los niños que viven en áreas con bajo contenido de F^- (22). Además en ratas, se demostró que, el F^- se acumula en el tejido nervioso endocraneal después de exposiciones crónicas al consumo de agua con altas concentraciones de F^- . Estas observaciones han conducido a investigadores a especular que dicha acumulación sucedería en el hipocampo y podría explicar los efectos sobre el aprendizaje y la memoria (6).

Es conocido que la principal fuente de energía de las células del sistema nervioso es la glucosa consumiendo entre 100 y 150 g por día representando el 20 % de la glucosa corporal. Las neuronas, principales células de este tejido, no son reguladas de forma tradicional por la hormona insulina como sucede con otros tejidos que utilizan glucosa para generar energía, como músculo, hígado y tejido adiposo. En seres humanos la expresión del gen receptor de insulina en sistema nervioso (*INSR*) es baja comparada con otros tejidos del organismo. En la Figura 2 se muestra la expresión del ARN mensajero y la proteína para *INSR*. A modo de aclaración, a la derecha de la imagen se muestran dos barras horizontales para cada tejido. La barra de la izquierda indica la magnitud de la expresión del ARN mensajero de la proteína en cuestión respecto de la máxima expresión. En cambio, la barra de la derecha muestra la magnitud de la expresión de la proteína en cada uno de los tejidos. Además, las imágenes de la izquierda (hombre y mujer) muestran con intensidades de color rojo la expresión de la proteína en cada uno de los órganos.

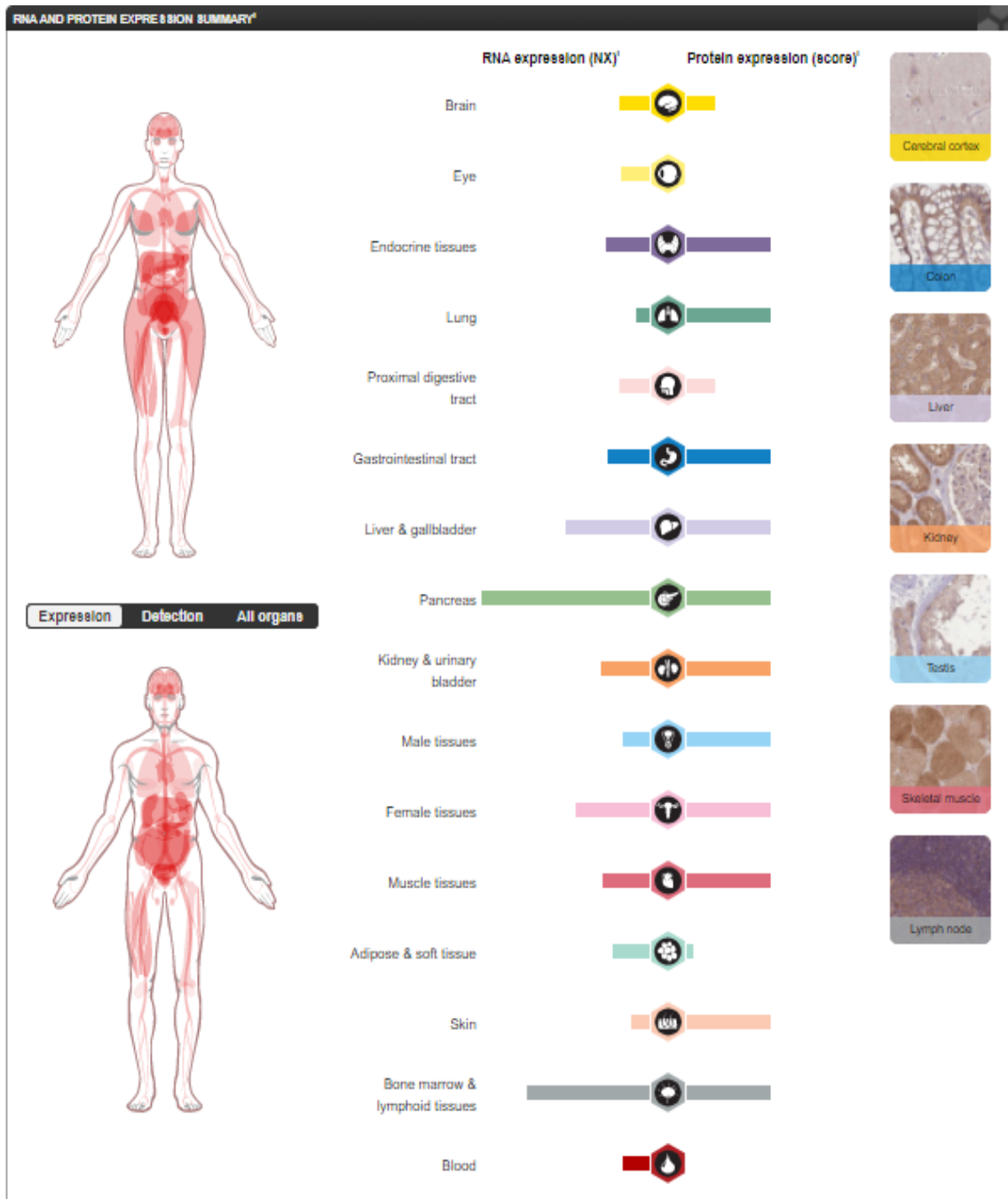


Figura 2: Expresión del receptor de insulina en diferentes órganos del cuerpo humano. The human protein atlas: <http://www.proteinatlas.org>

Sin embargo, la expresión de proteínas corriente abajo del receptor INSR, como el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1), tiene alta expresión por lo que la insulina podría tener efectos en este sistema, Figura 3.

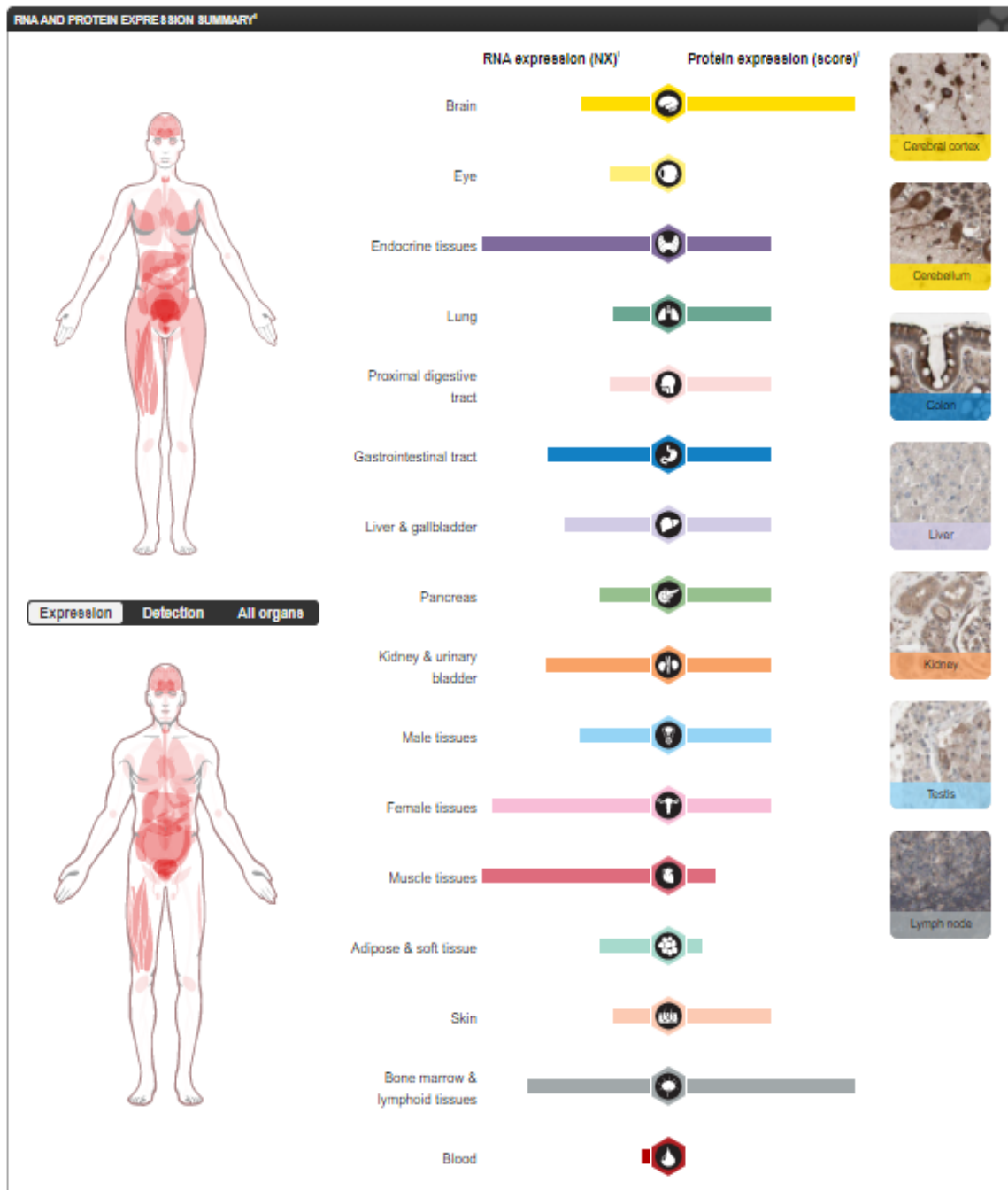


Figura 3: Expresión de IRS1 en humanos. The human protein atlas: <http://www.proteinatlas.org>

Debido a esta cualidad del sistema nervioso, nos referiremos al consumo de glucosa por este tejido como consumo independiente de insulina. En el Laboratorio de Biología Ósea se desarrolló un modelo matemático que permite evaluar *in vivo* el metabolismo de la glucosa en ratas con la posibilidad de medir el rol de diferentes tejidos en dicha homeostasis (12,23). Con este modelo matemático se pudo evaluar el efecto del F⁻ administrado en dosis única sobre la homeostasis de la glucosa, comprobándose *in vivo* resultados que habían sido

evaluados *in vitro* o de manera indirecta sobre la secreción de insulina (24,25) y sobre la resistencia a la insulina inducida por el F^- (14,26–28).

En condiciones normales el transporte de glucosa al cerebro implica numerosas interacciones de solutos, transportadores, enzimas y señalización celular. La glucosa ingresa en las neuronas por transportadores GLUT3, es fosforilada por la enzima hexoquinasa-1 y metabolizada a dióxido de carbono. En este proceso produce gran cantidad de NADH que es oxidado en la cadena respiratoria, generando energía en forma de ATP, Figura 4. La hipótesis que el fluoruro podría tener efecto sobre el sistema nervioso a través de alteraciones en el sistema generador de energía se fundamenta en que el F^- disminuye el consumo de oxígeno (29) debido a un desbalance en la cadena respiratoria (20). Este desbalance, conduciría a una disminución en la formación de ATP y a un aumento en la concentración de NADH, determinando una disminución citosólica en NAD oxidado que llevaría a la inhibición de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esta disminución en la disponibilidad de NAD oxidado causaría un aumento en la concentración de glucosa-6-fosfato que produciría una disminución en la primera reacción de la glucólisis, dado que la glucosa-6-fosfato inhibe la enzima hexoquinasa-1. Como la entrada de glucosa en el cerebro es realizada por el transportador específico de glucosa GLUT-3, la absorción de glucosa por este órgano estaría limitada por la concentración de glucosa elevada como consecuencia de la menor actividad de la enzima hexoquinasa-1, Figura 5. Esta alteración metabólica conduciría a una disminución del consumo de glucosa en el cerebro, lo que podría ser la causa de la disminución del CI (30).

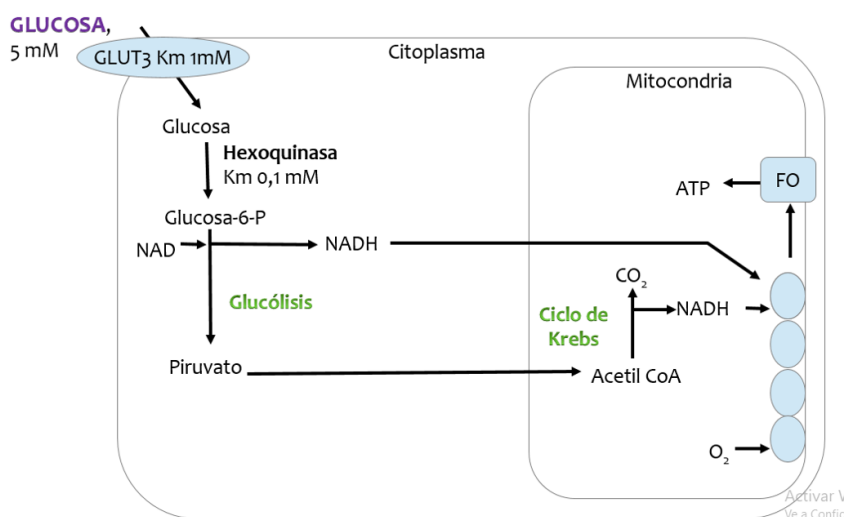


Figura 4: Esquema del consumo y metabolización de glucosa por la neurona

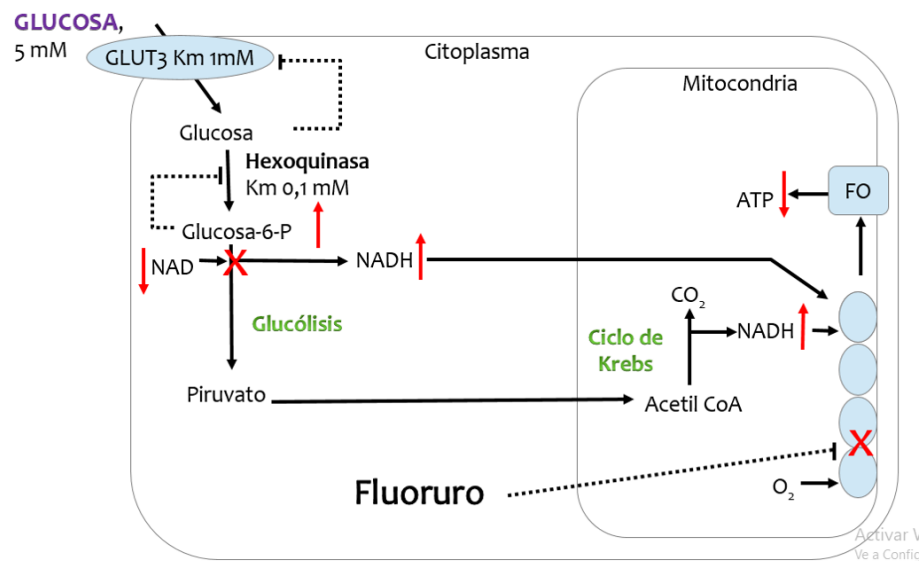


Figura 5: Esquema hipotético del efecto del fluoruro sobre el consumo y metabolización de glucosa de una neurona.

1.2 Cociente intelectual: historia y aplicación

A principio del siglo XX el psicólogo y pedagogo francés Alfred Binet fue uno de los primeros en evaluar la inteligencia de niños según su edad, parámetros de análisis prefijados y la utilización de métodos objetivos, de manera de lograr una escala numérica que permitiera determinar si los individuos estudiados tenían o no una inteligencia “normal”. Este método se caracterizaba por incluir pruebas complejas, destinadas a explorar procesos mentales de orden superior, tales como la memoria, las imágenes mentales, la comprensión o el juicio. Junto con Théodore Simon plantearon pruebas, con las que se estimaba sobre la base de la correcta ejecución de las tareas, las cuales exigían comprensión, capacidad aritmética y dominio del vocabulario. Esto lo correlacionaron con la edad del niño que las ejecutaba, resultando así en una test de predicción de rendimiento escolar o edad mental.

Con el tiempo, fueron utilizadas como pruebas de inteligencia de los niños estudiados, con la finalidad de identificar a los escolares que requerían una atención especial y tratar de mejorar así su educación (31).

Binet tenía claro que tanto la escala utilizada para la medición, como las pruebas realizadas, tenían límites. Las diversas clases de inteligencia no podían

ser estudiadas con precisión de forma cuantitativa, solo podían ser apreciadas cualitativamente. También pudo notar que el desarrollo intelectual progresivo veía influenciado en cierta medida por el ambiente, no era solo una cuestión genética, y los retrasos en el mismo podían ser reforzados y reparados mejorando las carencias y calidad de vida.

Al transcurrir los años, los tests fueron aplicados en distintos países y poblaciones, por lo que los científicos tuvieron que adaptarlos o ampliarlos generando así escalas acordes a las distintas poblaciones, transformando el concepto de la medición a lo que en la actualidad conocemos como **intelligence quotient o cociente intelectual (CI)**.

Uno de los problemas principales de los tests de CI es que se los tiende a considerar pruebas de inteligencia, cuando son, en realidad, medidores de lógica abstracta, por lo que no se pueden estimar otras formas de inteligencia como la práctica o emocional.

1.2.1 Medición del cociente intelectual y test de Raven

El test de Raven es utilizado para la medición del cociente intelectual a nivel mundial y es ampliamente estudiado a nivel global. Este test psicométrico es una prueba no verbal que evalúa la habilidad intelectual y el razonamiento basado en figuras. Publicado por primera vez en el año de 1938 por John C. Raven (32), está basado en el análisis bifactorial de Charles Spearman, el cual explica que la inteligencia está formada por 2 factores. El factor G que hace referencia a las características hereditarias de la persona y el factor S que incluye las características aprendidas por cada persona (cultura, estudios).

El test de matrices progresivas es de las pruebas más utilizadas a lo largo de los años debido a su adaptabilidad, pudiendo ser utilizada en amplias y distintas poblaciones a nivel mundial. Es fácilmente aplicable en niños de 5 años como en adultos, de un amplio nivel de instrucción, individualmente o colectiva y sin límite de tiempo de ejecución, en su versión original. Consiste en 60 problemas repartidos en 5 series (A, B, C, D y E) de doce elementos, aumentando progresivamente su dificultad. Las series A y B son grupos de problemas sencillos en los que no es indispensable el razonamiento complejo por lo que pueden ser resueltas por niños de corta edad, adultos disminuidos

intelectualmente o personas de edades avanzadas. Su realización consiste en mostrar al individuo una serie de dibujos con una pieza faltante, el sujeto debe elegir entre 6 a 8 opciones y solo una es la respuesta correcta. Cada elemento aparece como un rompecabezas relativamente simple de resolver. Los elementos poseen un ordenamiento acorde con su creciente complejidad y dificultad, y brindan un entrenamiento en el método de trabajo requerido. La facilidad de las primeras pruebas ayuda a entrenar al sujeto para resolver los problemas más difíciles que siguen en el orden. El número de problemas resueltos correctamente representa la puntuación del individuo que puede ser escalado en un nivel intelectual que corresponderá a su CI (33).

1.3 Sistema nervioso: generalidades y relación con los centros de aprendizaje y memoria.

El **sistema nervioso central (SNC)** o neuroeje es la parte del sistema nervioso que se encuentra en el conducto vertebral y en el cráneo. La porción que ocupa el conducto vertebral se llama **médula espinal** y el segmento que está protegido por el cráneo recibe el nombre de **encéfalo**. El **encéfalo** se divide en tres partes: **tronco encefálico**, **cerebelo** y **cerebro** (Figura 6).

El **cerebro** es un órgano complejo que representa la mayor parte del encéfalo. Se puede dividir en dos partes: el **diencéfalo** (tálamo, hipotálamo, subtálamo y epitálamo), que forma la porción central, y el **telencéfalo**, que forma los **hemisferios cerebrales**

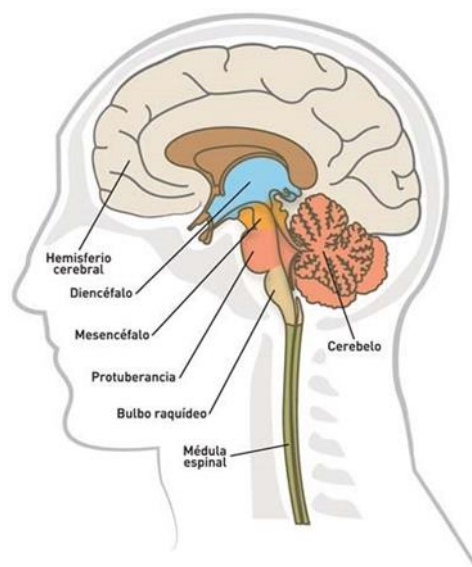


Figura 6: Sección sagital del SNC. Visión medial de la mitad derecha (García- Porrero 2005).

El cerebro es el encargado de integrar toda la información recibida por los órganos sensoriales y organizar una respuesta. Controla las funciones motoras, emocionales y todas las funciones cognitivas superiores: razonamiento, expresión emocional, memoria, aprendizaje (34).

El cerebro está formado por estructuras corticales y subcorticales. Las estructuras subcorticales hacen referencia a aquellas que quedan bajo la corteza cerebral, como el cuerpo calloso, el tálamo, los ganglios basales, amígdala, hipocampo y cuerpos mamilares, entre otras. Siendo estas últimas nombradas, regiones implicadas en los procesos de control de aprendizaje y memoria.

1.3.1 Sistema límbico

El **sistema límbico** engloba un conjunto de estructuras encefálicas interrelacionadas que intervienen de forma decisiva en múltiples funciones nerviosas como la regulación de la actividad vegetativa del organismo, las emociones y las motivaciones (conducta emocional y motivacional), la olfacción, el aprendizaje y algunos tipos de memoria. Es responsable de la vida afectiva, la integración de la información genética y ambiental a través del aprendizaje. Integra el medio interno acoplando la información proporcionada por lo formado y almacenado en la memoria, con el medio externo antes de expresar una conducta.

Por estas cualidades se realizará una descripción de las estructuras más representativas del sistema límbico y posteriormente, se compararán las del hombre con las de la rata.

En el denominado lóbulo límbico encontramos estructuras específicas situadas en regiones corticales y subcorticales, indispensables para el almacenamiento de la memoria.

Entre las estructuras corticales y subcorticales más importantes encontramos:

- *Corteza límbica*: el **giro cingular** y el **giro parahipocampal** se unen mediante el istmo por detrás del esplenio del cuerpo calloso. Aproximadamente los dos tercios anteriores de este giro se denominan *área entorrinal*.

- **Formación hipocampal:** es una estructura compleja oculta en la cara interna del cerebro que consta de tres zonas, **hipocampo**, **giro dentado** y **subículo**. Este se organiza en torno al surco del hipocampo y la lámina involuta con la que se continúa. El hipocampo está cubierto por el **álveo** que lo separa del ventrículo lateral, éste hace un relieve en el suelo de la prolongación temporal constituyendo el *asta o cuerno de Amón* (cornu Ammonis) y medialmente a ésta, encontramos la **fimbria**, la cual conecta el **fórnix** con el complejo hipocampal. Estas regiones hipocampales son de las partes de la corteza cerebral más antiguas, en estas neuronas se descubrieron los fundamentos de la plasticidad neuronal, los potenciales a largo plazo que son la base del proceso de aprendizaje. Esta formación es esencial para la denominada *memoria explícita o declarativa* (memoria de acontecimientos, sucesos, palabras), permiten aprender datos nuevos y retenerlos un tiempo (memoria a corto plazo: inmediata y reciente) y son importantes para la memoria de orientación espacial.
- **Amígdala** (complejo o cuerpo amigdalino): su papel está relacionado con la respuesta emocional aprendida que despiertan ciertas situaciones, y por lo tanto están involucradas con el aprendizaje emocional. Está implicada en el aprendizaje asociativo que permite establecer un vínculo entre un estímulo y el significado que tiene en términos de recompensa o de aversión para un sujeto.

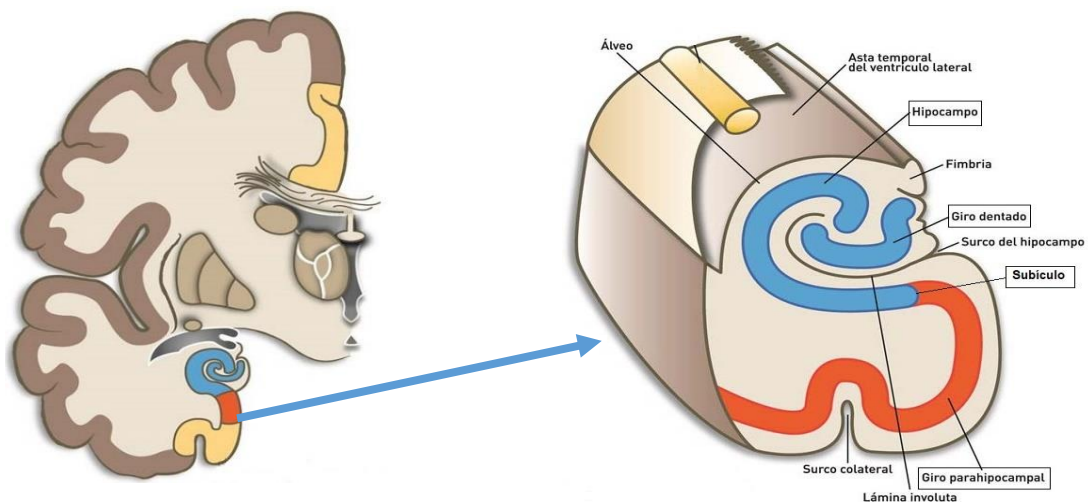


Figura 7: Corte frontal de un hemisferio cerebral. Se muestra la posición y organización del complejo hipocampal (García- Porrero 2005).

1.3.2 Conexiones intralímbicas

Los diferentes centros límbicos de sustancia gris, se unen entre sí en una unidad funcional. Estos son haces de axones que nacen en los cuerpos neuronales de alguno de los centros y terminan sobre las neuronas de otros centros. Algunas de las conexiones necesarias para establecer los centros de aprendizaje y memoria más importantes son el fórnix o trígono cerebral, el fascículo del cíngulo, el fascículo mamilotalámico y fibras talamocingulares. Los haces mencionados forman parte del **circuito de Papez**, el cual se trata de una conexión circular de gran importancia para las funciones de aprendizaje, formado principalmente por neuronas piramidales del hipocampo y del subículo (34).

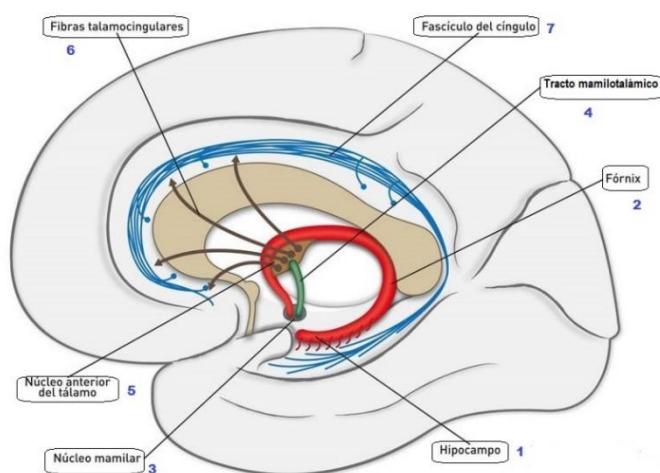


Figura 8: Representación esquemática del circuito de Papez en una cara medial del cerebro.

1.3.3 Estructuras cerebrales relacionadas con la memoria

La **memoria** es una función esencial para la supervivencia de los individuos. Gracias a la memoria, la información es retenida como conocimiento, el cual puede ser utilizado posteriormente cuando el individuo lo necesite para enfrentarse a las múltiples necesidades de la vida.

Memoria y aprendizaje son dos términos diferentes que están indisolublemente relacionados. El *aprendizaje* es el proceso por el que se adquiere un nuevo conocimiento. La memoria es el proceso gracias al cual se mantiene lo aprendido de forma que pueda ser evocado posteriormente

(recordado). Se distingue una memoria declarativa (explícita), que requiere de consciencia, y otra no declarativa (implícita). Según el tiempo de mantenimiento puede ser instantánea, intermedia (inmediata e intermedia) y a largo plazo.

Los centros de memoria están distribuidos por el cerebro, pero hay áreas de mayor relevancia que otras. En la fijación de la memoria declarativa para que se consolide, requiere de circuitos del sistema límbico, especialmente la formación hipocampal, el giro parahipocampal y estructuras del circuito de Papez (núcleo mamilar, núcleos talámicos anterior y dorsomediano).

El hipocampo es un lugar de almacenamiento de memoria espacial tanto en roedores como en el ser humano.

En las funciones vinculadas a la memoria espacial, toda la red vinculada al hipocampo es capaz de generar mapas cognitivos de lugares y objetos dentro del entorno, independientemente de la orientación del cuerpo del actor. Una perspectiva del entorno respalda un mapa cognitivo flexible, que permite ser utilizado desde diferentes ubicaciones de inicio o en ausencia de señales sensoriales (35).

1.4 Modelos de estudio en el aprendizaje y memoria en animales

Para que un animal pueda sortear los obstáculos que se le presentan en su ambiente es necesario que puedan orientarse de forma eficiente. Los procesos de aprendizaje y memoria espacial se consideran indispensables en esta situación, para adquirir y retener características del ambiente, y así permitirle al organismo desenvolverse en el espacio según sus necesidades cotidianas. La memoria espacial necesita de múltiples acciones que contemplan codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales dentro de los ámbitos en los que habita.

Esta memoria puede ser evaluada mediante modelos animales, en los que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible. Los modelos animales más utilizados, pertenecen a la familia de los roedores, ratas y ratones.

Éstos pueden adoptar cuatro formas principales de navegación para la resolución de tareas espaciales:

1. Aprendizaje de orientación: los animales basan su exploración en movimientos asimilados durante la ejecución de la tarea;
2. Aprendizaje de guía: aprenden asociaciones entre los estímulos señal y la meta.
3. Aprendizaje cartográfico: uso de señales distales con las que los animales se forman una representación de su entorno (mapa cognitivo) mediante el que localizan la meta.
4. Integración de la ruta: proceso de actualización de la información cuando las pistas ambientales no ofrecen datos suficientes, utilizan un sistema interno de referencia basado en el lugar de salida antes de iniciar la navegación (36).

El laberinto de agua es uno de los modelos más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores, en la que los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta. Se requieren pocos ensayos ya que los animales aprenden rápido, guiándose por claves extra-laberinto, sin el uso de su perfeccionada capacidad olfatoria característica en éstos animales.

En comparación con otros laberintos, el test de nado posee ventajas en la detección y cuantificación en las estrategias de búsqueda, y en una mayor sensibilidad en los resultados de animales con daños cognitivos por distintas lesiones cerebrales, como así también al administrar gran rango de fármacos. (37).

Otros beneficios del uso de este test es que los animales no necesitan ser privados de alimentos para motivar su aprendizaje, ni la exposición a un entrenamiento prolongado previo, como tampoco el empleo del uso de descargas eléctricas para motivar la respuesta al estímulo.

Las ratas son nadadores naturales y realizan tareas de escape de agua fácilmente, incluso si han sufrido lesiones cerebrales telencefálicas de diversos tipos (38).

Al aplicar este laberinto, los animales nadan en un tanque de experimentación desde diferentes puntos de inicio situados en el perímetro de la piscina hasta encontrar la plataforma sumergida en el agua que les permite

escapar de la situación de riesgo. Con este test es posible valorar la **memoria de referencia**, donde la plataforma permanece en un mismo lugar durante los ensayos (es independiente de los ensayos y permite aprender el procedimiento general para la ejecución de la tarea); y la **memoria de trabajo**, cuando se cambia la plataforma de posición en cada ensayo (memoria temporal que depende de cada ensayo).

El modelo del laberinto de agua refleja la complejidad de la navegación espacial, mostrando cómo los animales se orientan eficientemente en el espacio mediante su capacidad de establecer y retener asociaciones entre estímulos ambientales. A pesar de que la tarea causa cierto grado de estrés, lo que puede influir en su ejecución, este resulta muy útil para investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en el aprendizaje y la memoria espacial.

Existen evidencias además, que el hipocampo juega un papel crítico en la memoria declarativa en humanos y la espacial en roedores, por lo que puede ser tomada como la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite al animal navegar en el espacio.

2 OBJETIVOS

En base a lo expuesto en el capítulo de introducción se plantea los siguientes objetivos.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del fluoruro sobre los sistemas independientes de insulina y su relación con el proceso memoria/aprendizaje *in vivo* en la rata.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del fluoruro sobre el consumo de glucosa independiente de insulina en ratas *in vivo* administrando.
- Evaluar el efecto del fluoruro sobre el aprendizaje y la memoria en ratas.
- Evaluar los efectos del fluoruro sobre el consumo de glucosa independiente de insulina, el aprendizaje y la memoria con diferentes esquemas de administración del anión.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Breve descripción de los experimentos realizados

Se evaluó el efecto del F^- sobre los sistemas independientes de insulina y su relación con el proceso memoria/aprendizaje aplicando dos esquemas de administración del anión.

En el primer tratamiento se administró a 8 ratas de 50 días una dosis de 0.8 mg F^- /100 g de peso corporal utilizando una sonda orogástrica (llamamos a este tratamiento DUSO). Un grupo de 8 animales de la misma edad recibieron el mismo volumen de agua destilada por sonda orogástrica. Este tratamiento se realizó diariamente, 15 minutos antes de comenzar las pruebas experimentales (test de nado, prueba de tolerancia a la glucosa (PTGO) y perfusión de cerebro), posteriormente detalladas.

En el segundo se utilizaron 5 ratas de 21 días a las cuales se les administró el anión con el agua de bebida (llamamos AB a este tratamiento) en una concentración de 40 ppm, por un período de 30 días previos al inicio de las pruebas experimentales programadas ((test de nado, prueba de tolerancia oral a la glucosa, perfusión de cerebro o captación de 2-[C^{14}]-desoxi-D-glucosa). El grupo control estuvo compuesto por 5 ratas y recibió agua potable sin agregado de F^- por el mismo tiempo. Este tratamiento con agua de bebida, aporta la misma cantidad de F^- por día, en comparación a la que recibieron en forma diaria, por medio del tratamiento DUSO.

Es importante aclarar que en ambos tratamientos, las pruebas experimentales fueron comenzadas cuando las ratas tenían una edad de 50 días.

Las pruebas experimentales, antes mencionadas, empleadas para concretar los objetivos, se detallan a continuación:

1- *Test de nado*: se midieron los parámetros *tiempo de latencia* que está relacionado con la capacidad de aprendizaje y el *tiempo de permanencia*, que evidencia la relación con la memoria espacial de cada animal.

2- *Cálculo de velocidad de consumo de glucosa* por tejidos independientes de insulina *in vivo*, utilizando una prueba de tolerancia oral

a la glucosa y la aplicación de un modelo matemático de la homeostasis glucosa-insulina (12,39).

3- *Perfusión de cerebro in situ* que evalúa el consumo de glucosa por el sistema nervioso.

4- *Consumo de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa* por el cerebro *in vivo*.

En el resto de la sección se detallan las técnicas que se utilizaron para cumplir los objetivos:

3.2 Cuidado de animales

Todos los experimentos que involucraron animales se llevaron a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de 21 o 50 días. Durante los experimentos los animales se mantuvieron en el bioterio del Laboratorio con ciclo luz-oscuridad (12 h- 12 h) y con temperatura entre 23-26 °C. Se alojaron en contenedores colectivos, con un máximo de 3 animales por contenedor, con hidratación correspondiente y alimento balanceado (Gepsa, Argentina) *ad libitum*, en cama de viruta de madera. En los contenedores se genera la circulación y extracción de aire filtrado a intervalos de tiempo programados. Semanalmente se controló el peso corporal y estado general del animal. El peso corporal se determinó semanalmente con una balanza de 1 g de apreciación y el crecimiento se evaluó por comparación con curvas de crecimiento de ratas normales de la misma línea y sexo. El mantenimiento y tratamiento de los animales fue realizado por la autora de esta tesis, con la debida capacitación en las técnicas a utilizar. Estaba previsto que si durante el desarrollo del proyecto se presentase algún problema en la salud de los animales que no pudiera ser resuelto por la interesada o sus colaboradores, se realizaría una consulta al médico veterinario (Med. Vet. Fabián González) del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB) de la Universidad Nacional de Rosario. En la elección de los modelos y el número de los animales se siguió el principio de las 3Rs de Russell and Burch (40).

3.3 Obtención y manipulación de muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena lateral de la cola en capilares heparinizados, los cuales fueron centrifugados a 5000 g durante 3 min y cortados a nivel de la separación glóbulo-plasma (41). Las muestras de plasma fueron conservadas para la determinación de glucosa e insulina a una temperatura de - 20 °C, si las mediciones no se realizaron inmediatamente. Las mediciones de F^- se realizaron sobre la sangre entera.

3.4 Sonda orogástrica

La administración de sustancias por vía oral en dosis única se realizó con un catéter de polietileno K35 (catéter para alimentación de recién nacidos prematuros) para animales de menos de 200 g o K31 (catéter para alimentación de recién nacidos) para animales de más de 200 g. El catéter fue conectado a una jeringa correspondiente al volumen a administrar donde se realizó la carga de la solución, se secó la parte externa del catéter con papel absorbente y se sellaron los orificios con vaselina sólida, de manera que la solución a administrar no entre en contacto con las vías aéreas y digestivas superiores, por las características irritantes de la solución utilizada (42).

3.5 Prueba de tolerancia oral de glucosa

La técnica consiste en la administración por sonda orogástrica de 0.6 g de glucosa cada 100 g de peso corporal. La administración se realizó luego de 12 h de ayuno y se tomaron muestras de sangre en capilares heparinizados, como fue explicado anteriormente. El procedimiento tuvo una duración de 6 h tomándose las muestras a los siguientes tiempos, luego de la administración de glucosa por sonda orogástrica: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 min. Las muestras se procesaron según lo descrito en el apartado de obtención de muestras de sangre.

3.6 Eutanasia

En el desarrollo de esta tesis los animales fueron sacrificados en los procesos quirúrgicos como la perfusión de cerebro y en la medición de 2DG, en los cuales la eutanasia fue realizada por punción cardíaca, siendo también utilizada para recolección de muestra de sangre de cada animal. La misma se realizó bajo efecto de anestesia inyectable con acepromazina, seguida por la anestesia inhalatoria con isofluorano, hasta pérdida de reflejo podal. El animal se colocó sobre una camilla decúbito supino con las patas extendidas formando un ángulo de 45° a la línea media del cuerpo. La punción se realizó en la intersección de la extensión de las dos líneas imaginarias que pasan por el eje de las patas delanteras y la línea media del animal. Con el dedo índice se buscó el lugar donde se perciben con mayor intensidad los latidos del corazón. La aguja se introdujo en ese punto, en sentido vertical, lenta y firmemente, hasta que apareció una gota de sangre en el extremo de la aguja. Luego se extrajo la sangre por succión con la jeringa. La aguja y jeringa fueron heparinizadas previamente a realizar el procedimiento.

3.7 Medición de insulina

La medida de la concentración de insulina plasmática se realizó con un contador de centelleo sólido Alfamuclear modelo Cmos utilizando un kit de radioinmunoensayo específico para insulina de rata (Rat insulin Millipore, USA). El ensayo se fundamenta en la competencia entre la insulina de la muestra con insulina marcada con ^{125}I por anticuerpos específicos contra insulina de rata. El manejo del material radiactivo se realizó de acuerdo a las normas establecidas por la Autoridad Regulatoria Nuclear Argentina (norma ARN 10.1.1 de seguridad radiológica). La determinación fue sujeta a control de calidad, repitiéndose las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación superó el 15 %. Además se procesó un suero control de calidad y se calcularon con el mismo las unidades de desvío estándar. Si el valor de unidades de desvío estándar se encontraba fuera del rango $[-2.5, 2.5]$ se procedió a repetir el lote de determinaciones.

3.8 Medición de glucosa

La determinación de glucosa en las muestras de plasma se realizó con un kit comercial (Glicemia enzimática Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina). El método utiliza la enzima glucosa oxidasa la cual desarrolla color y es proporcional a la concentración de glucosa que se encuentra en la muestra. La absorbancia se midió a 505 nm con un lector de microplacas Rayto RT- 6000 y se procesan simultáneamente testigos de glucosa de 0.5, 1, 2 y 3 g/l. La determinación fue sujeta a control de calidad, repitiéndose las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación superaba el 15 %. Además se procesó un suero control de calidad y se calcularon con el mismo las unidades de desvío estándar. Si el valor de unidades de desvío estándar se encontraba fuera del rango [-2.5, 2.5] se procedió a repetir el lote de determinaciones.

3.9 Medición de fluoruro por potenciometría directa

La medición de la concentración de F^- en orina y soluciones se realizó por potenciometría directa utilizando un electrodo de ion específico ORION 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital y captura de datos con el software Biomedical data Acquisition Suite (BAS) (43). La determinación se basa en la relación lineal existente entre los mV desarrollados por los electrodos y el logaritmo de la concentración de fluoruro en las muestras o patrones utilizados. Simultáneamente con las muestras se procesan soluciones patrones de NaF en un rango de concentración de 10^{-3} M a 10^{-6} M (44). A las muestras y soluciones patrón se les adiciona un 10 % de solución reguladora de pH ácido acético/acetato de sodio 2 M para ajustar pH a 5 - 5.5 y homogeneizar la fuerza iónica de las soluciones. Para muestras de orina la técnica requiere volúmenes de 50 μ l o más. La determinación está sujeta a control de calidad, se procedió a repetir las determinaciones si el coeficiente de variación de la determinación superaba el 15 %. Además se procesó una solución control de calidad y se calcularon con el mismo las unidades de desvío estándar. Si el valor de unidades de desvío estándar se encontraba fuera del rango [-2.5, 2.5] se procedió a repetir el lote de determinaciones. La determinación fluoruro por potenciometría directa fue utilizada para corroborar

las concentraciones de las soluciones utilizadas para sonda orogástrica y agua de bebida.

3.10 Evaluación de aprendizaje y memoria

La capacidad de aprendizaje y memoria de referencia espacial se midió sobre la totalidad de los animales utilizando el test del laberinto de agua de Morris (38). Se trata de una evaluación que se hace sobre un desplazamiento espacial en la que los animales nadan desde un punto de partida situado en el perímetro de un tanque lleno de agua hasta encontrar una plataforma sumergida, donde el animal puede subirse y dejar de nadar. Este sistema consiste en un tanque de 152 cm de diámetro y 55 cm de profundidad, que contiene agua cuya temperatura está termorregulada a 26 ± 1 °C (Figura 9). El tanque se ubicó en una habitación con la misma disposición durante el tiempo que duró el experimento. Se dividió virtualmente el tanque en cuatro cuadrantes de igual superficie a través de líneas que se orientaron de norte (N) a sur (S) y de este (E) a oeste (O), definiendo así cuatro cuadrantes que llamamos NE, SE, SO y NO, según las líneas que lo delimitan. Externamente a cada sector y cercano al borde del tanque, se ubicaron marcadores visuales de diferente color y forma (representados en la ilustración en cada recuadro de los puntos cardinales). Estos marcadores visuales se mantuvieron en posición constante a lo largo del tiempo que duró el ensayo. Se estableció el cuadrante SO como inicio del nado (a) y en el cuadrante NE se ubicó una plataforma de escape de 10 cm de diámetro cuya superficie se encuentra 2 cm por debajo de la superficie del agua (b).

Para este experimento fueron utilizadas, 16 ratas pertenecientes a la administración de dosis diaria de F^- y 10 ratas pertenecientes a la administración de F^- por agua de bebida.

Al iniciar el test la rata es colocada con el hocico apuntando hacia las paredes del tanque dejándola nadar en búsqueda de la plataforma.

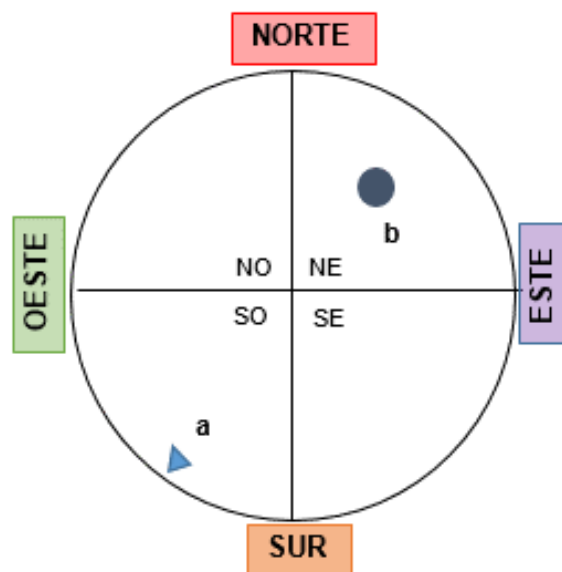


Figura 9: Esquema del tanque utilizado para realizar el test de nado. a: punto de inicio del nado, b: plataforma de escape.

Durante el nado de las ratas se midió, con un cronómetro, el tiempo de nado; además fueron monitoreadas por una cámara digital que grabó una serie de vídeos sobre los que se realizaron las mediciones de tiempos y recorridos que permitieron obtener datos para la interpretación del proceso de aprendizaje y memoria.

Los ensayos de aprendizaje fueron realizados cada 120 minutos 3 veces por día durante 5 días consecutivos. En estos ensayos las ratas se colocaron en el punto de entrada definido y se permitió 90 segundos de nado para que cada rata pueda encontrar la plataforma, dejándola 20 segundos sobre ella para su orientación en el espacio de nado, finalizando así la medición. De no localizar dicha plataforma, al cumplirse los 90 segundos se acompaña a la rata hasta la plataforma y de igual forma para que logre orientarse en el espacio, permanece 20 segundos sobre ella (Figura 10).

Por medio de los ensayos de aprendizaje se obtiene la variable de análisis denominada *tiempo de latencia*, la cual se registra en segundos y se define como el tiempo de nado que tarda la rata en alcanzar la plataforma. El tiempo de latencia provee información sobre la capacidad de aprendizaje a medida que las ratas son expuestas al test, reflejándose en menores tiempos de latencia a lo largo de los días.

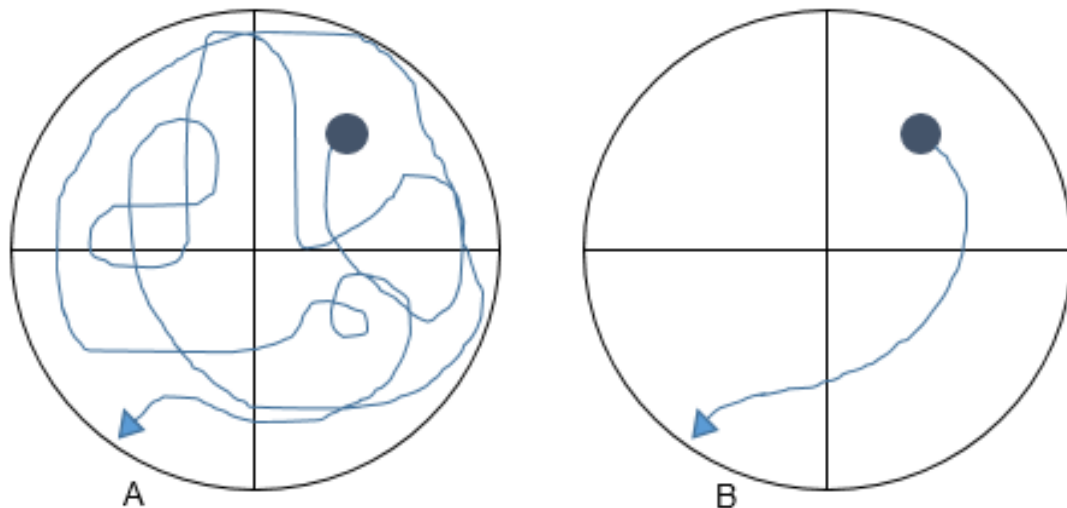


Figura 10: Trayectoria realizada por el animal para alcanzar la plataforma sumergida durante el test de aprendizaje por medo de la línea continua. (A) El primer día muestra un patrón de búsqueda desorientado. (B) El último día la trayectoria es directa hacia la plataforma. El triángulo celeste indica punto de inicio del ensayo. El círculo azul representa la plataforma de escape o punto final del ensayo.

Al sexto día comenzó en test de memoria espacial, test que se realizó en 2 días consecutivos, 3 veces por día. Para ello se retiró la plataforma del tanque de experimentación por lo cual la rata realizó nado obligado por un máximo de 90 segundos (Figura 11). En este test se registró el tiempo en el que la rata atraviesa o permanece en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante el ensayo de aprendizaje. Este tiempo se denomina *tiempo de permanencia* y se registró en segundos. Con este test es posible valorar la capacidad de memoria de referencia y orientación en el espacio. Cuanto mayor es el tiempo de permanencia, mayor es la memoria espacial de la rata.

Finalizado el tiempo de nado, las ratas se retiraron del tanque de experimentación, fueron secadas con toalla y se las dejó descansar en el contenedor correspondiente hasta el próximo ensayo del día.

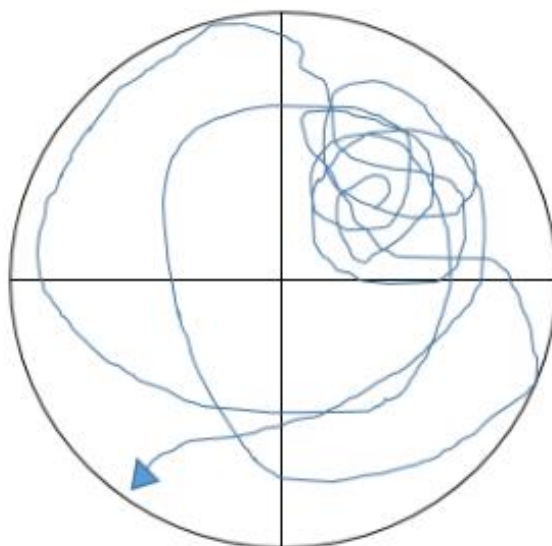


Figura 11: Trayectoria posible de un animal en test de memoria sin plataforma. El triángulo celeste indica punto de inicio del ensayo.

3.11 Perfusión de cerebro

El efecto del fluoruro sobre el consumo de glucosa por el sistema nervioso se evaluó *in situ* por el proceso denominado perfusión de cerebro. Para ello, el órgano se perfundió durante aproximadamente por 15 minutos con una solución sin fluoruro cambiándose luego a una solución conteniendo fluoruro (0.8 mg F⁻/100 g de peso corporal) por otros 15 minutos. Este procedimiento se aplicó a ratas que habían recibido tratamiento previo con flúor y a las ratas controles.

Se utilizaron 21 ratas Sprague Dawley hembras de 50 días de edad, pertenecientes a los dos grupos de administración de F⁻ y sus controles. Los animales quedaron distribuidos como sigue: 8 ratas que recibieron una dosis única diaria de fluoruro por sonda (DUSO-Fluoruro) y 7 controles (DUSO-Control); 5 ratas a las que se les administró el fluoruro en el agua de bebida (AB-Fluoruro) y 1 control (AB-Control). Todas ellas fueron sometidas a ayuno total por 10 horas antes del procedimiento quirúrgico. En el APÉNDICE 3 se encuentra desglosado el procedimiento de recolección de muestras con el criterio de inclusión y los inconvenientes producidos en el transcurso de la prueba experimental.

El consumo de glucosa se midió por diferencia entre la glucosa que ingresó al territorio perfundido por vía arterial y la glucosa que salió a través de un catéter venoso. Para ello se midió la concentración de glucosa de la solución de perfusión (SP) al ingreso de la carótida y del perfusato a la salida de la vena yugular.

El procedimiento implicó una intervención quirúrgica con el animal bajo efecto anestésico para la cual se contó con un quirófano debidamente equipado. Los materiales necesarios se prepararon de acuerdo a la comodidad y necesidades del cirujano: gasas, torundas de algodón, hisopos para contención de hemorragias y limpieza, hilos para ligaduras, agujas curvas con hilo para sutura, campo de trabajo (grande: para mesa de quirófano, chico: para cubrir al animal), camilla, rasuradora, retractor de tejidos blandos de alambre fino, pinzas de hemostasia rectas y curvas, porta agujas, pinzas de disección, tijeras rectas, curvas, agudas o punzantes y romas, clamps, hoja de bisturí N°15, portabisturí, exploradores, espátulas, catéter intravenoso abbocat 24- 26 G, sondas para perfusión, agujas: 25 G, 21 G, jeringas: 10 ml, 5 ml, 1 ml, descartador de elementos corto punzantes, cinta adhesiva. Las personas que intervinieron en la cirugía vistieron batas, cofias, barbijos, gafas y guantes. Todo material utilizado fue esterilizado en seco o autoclave según fuera necesario, siguiendo procedimientos protocolizados. Asimismo 30 minutos antes de cada cirugía se esterilizó el quirófano con luz UV.

La solución de perfusión tuvo la siguiente composición: NaCl 115 mmol/ l, KCl 4.7 mmol/ l, CaCl₂ 2.56 mmol/ l, MgSO₄ 1.2 mmol/ l, KH₂PO₄ 1.2 mmol/ l, NaHCO₃ 25 mmol/ l, albúmina sérica bovina 1 g/ 100 ml, glucosa 1 g/ l. Una parte de la solución se preparó y mantuvo libre de fluoruro, mientras que otra parte recibió el agregado de NaF, fijando la concentración de F⁻ en 50 µmol/ l, en las que ambas soluciones se ajustaron a un pH=7.4.

Durante la preparación de la SP y hasta el ajuste de pH, se realizó burbujeo de carbógeno en la solución, proceso que se mantuvo hasta la finalización del procedimiento quirúrgico. Para cada rata se prepararon 100 ml para prevenir que no se contaminara con microorganismos y luego se dividía ese volumen para el agregado correspondiente de fluoruro de sodio a una de las partes seleccionadas.

Los catéteres utilizados para la perfusión fueron heparinizados antes de su uso.

Los animales fueron anestesiados ateniéndonos al siguiente protocolo:

1. Sedación: se utilizó acepromazina al 1 %, 0.5 mg/ 100 g de peso corporal por vía subcutánea 10 a 20 minutos previos de la anestesia inhalatoria.
2. Anestesia inhalatoria: luego de alcanzado un grado de sedación adecuado, inducido por la acepromazina, se colocó al animal en un contenedor cerrado y se volatilizó en su interior 0.5 ml de isoflurano hasta que no presentara respuesta podal.
3. Anestesia de larga duración: luego de alcanzado un grado de adecuado de narcosis y analgesia inducido por isoflurano, se inyectó uretano por vía intraperitoneal 1.5 mg/ 100 g peso corporal.

Finalizado el proceso anestésico y conseguido un adecuado estado de narcosis y analgesia se rasuró la zona a intervenir localizada en la región del cuello y superior al esternón. Se colocó el animal en camilla en posición decúbito dorsal y se sujetaron las extremidades con cinta adhesiva. Se cubrió el campo de trabajo dejando libre la zona a intervenir, evitando así la pérdida de calor y facilitando la limpieza sobre el área de trabajo.

El procedimiento quirúrgico comenzó con una incisión medial de 3 cm de longitud en forma de H sobre el cuero a nivel del cuello.

Para el proceso de cateterismo arterio-venoso se procedió en el siguiente orden:

1. Canalización de la arteria carótida común izquierda (ACI),
2. Ligado y obstrucción de la vena yugular izquierda (VYI),
3. Ligado y obstrucción de la arteria carótida común derecha (ACD),
4. Canalización de la vena yugular derecha (VYD).

Si por complicaciones propias del procedimiento quirúrgico no se logró el cateterismo de la arteria carótida común izquierda, se procedió a la cateterización de la arteria carótida común derecha.

Para la canalización de la ACI se utilizó un catéter de polietileno P-50 que fue purgado de aire y se perfundió SP a través de una bomba peristáltica a un flujo de 130 μ l/min. El catéter fue introducido en el sentido del flujo sanguíneo de este vaso.

La VYI fue identificada y ligada con un hilo de manera de detener el flujo sanguíneo.

La ACD se localizó y se ligó con hilo de manera de detener el flujo sanguíneo.

La VYD se canalizó en sentido contrario al flujo y para controlar la correcta colocación del catéter se procedió a extraer con una jeringa un volumen de sangre, se debió constatar que no haya formación de burbujas de aire, que hubiese significado la presencia de daño en la vena.

Durante la perfusión el flujo de la SP se fijó de manera que la presión de perfusión se hallara entre 100 y 120 mm de Hg, medidos en un manómetro de mercurio introducido en paralelo con el catéter insertado en la ACI. El flujo se ajustó con la bomba de manera de mantener la presión en los valores mencionados y tuvo un promedio de 800 μ l/min. El perfusato fue recogido en tubos de polietileno de 1.5 ml por el catéter insertado en la VYD.

El proceso de perfusión constó de 2 partes:

1. Se perfundió la SP sin la presencia de F^- y se trató de recoger un mínimo 4 tubos de perfusato.
2. Se cambió a la SP con el agregado de F^- y, de la misma manera, se trató de recoger un mínimo de 4 tubos.

Si el procedimiento lo permitió se retomó la perfusión colocando nuevamente la SP sin presencia de F^- .

3.12 Proceso de medición de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa

La 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa (2DG) es una molécula que puede ingresar a las células ya que utiliza los transportadores GLUT al igual que la glucosa, su soluto natural (45). Una vez ingresada puede ser fosforilada en carbono 6 pero no puede isomerizarse a fructosa-6-fosfato. Por lo cual se acumulará en las células o tejidos expuestos a ella y permite así medir el ingreso de glucosa a la célula.

El procedimiento consiste en administrar 2DG por vía endovenosa y medir su concentración en homogenados de diferentes tejidos en presencia y ausencia de F^- . El valor de la concentración de 2DG es proporcional a la

velocidad de ingreso de 2DG al tejido estudiado. En esta prueba experimental se midió el consumo de 2DG por cerebro, músculo estriado y tejido adiposo; el efecto del F^- sobre el consumo de glucosa es conocido en estos últimos dos tejidos. En ellos, el F^- tiene efecto sobre las vías de señalización de insulina y el ingreso y metabolización de la glucosa (46).

Se utilizaron ocho ratas Sprague Dawley de 50 días de edad, las que se encontraban en ayunas de alimento al menos por 10 horas. Esto es beneficioso para la interpretación de los resultados del estudio ya que la reducción de la glucemia produce un descenso de la insulinemia y, por ende, un descenso del consumo de glucosa por sus tejidos blanco como hígado, tejido adiposo y músculo, lo cual deja disponible más glucosa para evaluar el consumo por el cerebro.

Se seleccionaron al azar los animales que recibieron NaF y vehículo. A los animales tratados con F^- se les administró por sonda orogástrica una dosis de NaF de 0.8 mg/ 100 g de peso corporal. El grupo control recibió el mismo volumen de agua destilada por la misma vía.

Inmediatamente después de la administración por sonda orogástrica, se realizó la sedación con xilacina¹ (20 mg/ ml) administrando 1.4 mg/ 100 g de peso corporal por vía subcutánea, se la dejó actuar 5 minutos para relajación muscular. Posteriormente se colocó al animal en un contenedor cerrado y se volatilizó en su interior 0.5 ml de isofluorano hasta que no presentó respuesta podal.

Quince minutos después del sondaje orogástrico y bajo el efecto de la anestesia inhalatoria, se inyectó por la vena lateral de la cola 100 μ l de 2DG (que correspondió a una actividad de 50 μ Ci– 1.85 MBq).

Transcurridos 30 minutos de la inyección de la 2DG los animales que se encontraban bajo anestesia con isofluorano fueron sacrificados por medio de punción cardíaca.

Comprobada la ausencia de signos vitales (frecuencia respiratoria y cardíaca nula) se procedió a la obtención de muestras de tejidos mencionados más arriba.

¹ Se administró **xilacina** como preanestesia con el fin de producir relajación muscular y aprovechar su rol agonista de los receptores adrenérgicos alfa-2 de páncreas (61) produciendo la inhibición de la liberación de insulina, favoreciendo así, la disponibilidad de glucosa para cerebro que dispone de transportadores de glucosa no dependientes de insulina.

Se rasuraron las zonas a intervenir localizadas en cabeza, zona abdominal y pata trasera izquierda con el fin de obtener muestras de cerebro, grasa abdominal y músculo gastrocnemio.

Se utilizaron 3 tipos de muestras:

- Tejido nervioso perteneciente al cerebro.
- Tejido muscular obtenido de la pata trasera izquierda seleccionando el músculo gastrocnemio.
- Tejido adiposo que fue obtenido de la región abdominal retroperitoneal derecho.

Para la ablación de cerebro se realizó una incisión sagital del cuero, comenzando desde el hueso occipital hasta frontal para exponer el cráneo del animal y delimitar la zona de la calota a extraer. Con un torno con cierra circular de hoja diamantada se procedió a realizar los siguientes cortes:

- Parasagitales sobre las suturas entre los huesos parietales y temporales,
- Coronal sobre la sutura entre el hueso frontal y parietales
- Coronal sobre la sutura entre el occipital y parietales.

Realizados los cortes las meninges se despegaron suavemente con espátula del endocráneo. Con espátula se rebatió el cerebro exponiendo la base del cráneo con el corte de los correspondientes nervios conectados al cerebro, del bulbo olfatorio y médula espinal, liberando todo el órgano. Posteriormente el cerebro fue colocado en una matriz de acrílico para cortes coronales de cerebro (Figura 12) y se obtuvo la porción correspondiente a las 11 y 22, zona en la cual encontramos la mayor porción del hipocampo (47,48). Cada muestra fue pesada y procesada en un homogeneizador de tejidos Potter con el agregado de PBS pH=7.4 en un volumen suficiente para lograr un estado fluido de la muestra. El excedente fue guardado a -20 °C para su conservación.

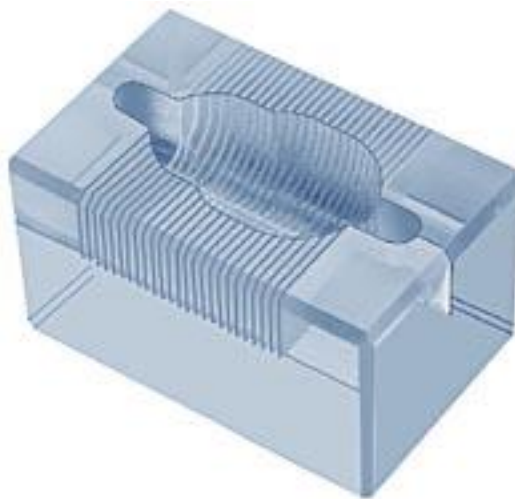


Figura 12: Matriz de acrílico utilizada para los cortes coronales de cerebro, con divisiones cada 1mm para ratas adultas entre 175 y 375g. (Brain matrix)

Para la obtención del tejido muscular la rata se colocó decúbito supino y se realizó una incisión en la piel del miembro posterior izquierdo desde el área inguinal hasta la pata. Se retiró el músculo gastrocnemio el cual se encuentra insertado en la parte posterior de la tibia. El tejido recolectado de cada rata fue pesado y procesada en un homogeneizador de tejidos Potter con el agregado de PBS pH=7.4 en un volumen suficiente para lograr un estado fluido de la muestra. El excedente fue guardado a -20 °C para su conservación.

Para la obtención del tejido adiposo, a la rata que ya se encontraba en posición decúbito supino se le realizó una laparotomía longitudinal medial de 3 cm. Se localizó el ovario, se lo desplazó de forma de exponer el panículo de tejido adiposo y se procedió a su extracción. Cada muestra fue pesada y procesada en un homogeneizador de tejidos Potter con el agregado de PBS pH=7.4 en un volumen suficiente para lograr un estado fluido de la muestra. El excedente fue guardado a -20 °C para su conservación.

Obtenidos los homogenados de los tejidos de cada rata, se tomaron 15 µl de cada uno y se los colocaron en un vial conteniendo 5 ml de líquido de centelleo de la siguiente composición: 10 g 2,5-difeniloxazol como sustancia centelladora 330 ml metanol, 60 g naftaleno, 20 ml etilenglicol y tolueno cantidad suficiente para completar 1 l.

Culminados estos preparados, se midió radiactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 100C, USA).

Se preparó una curva de calibración con 0, 37, 111, 185 y 370 Bq por vial.

La 2DG utilizada para la curva de calibración y para la inyección posee 50 μCi que equivale a 1.85 MBq y 9.768 GBq/ mmol.

La relación volumen de muestra-volumen de líquido de centelleo y el proceso de homogeneizado de las muestras disminuyó a valores indetectables el quenching físico, químico y de color.

Con las cuentas de cada punto de la curva de calibración y las cuentas de cada vial con las muestras, el peso total de tejido extraído, el volumen de PBS agregado y la actividad específica se calculó la concentración de 2DG por g de tejido.

3.13 Evaluación del consumo de glucosa por sistemas independientes de insulina utilizando un modelo matemático

Se evaluó el consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina entre los que ocupa un lugar importante el sistema nervioso. Esta medición se realizó utilizando un modelo matemático que permite realizar dicha medición de manera mini-invasiva, sin necesidad de anestesia y/o sedantes, que producen modificación del metabolismo glucídico (39). Por lo que no es recomendable la utilización de esos fármacos en este tipo de procedimientos. La metodología se aplicó luego de la administración de una dosis oral de F^- (8 mg/kg peso corporal) o luego de transcurridos los 30 días de consumo de F^- en el agua de bebida (40 ppm). Brevemente, el procedimiento consistió en administrar una dosis oral de glucosa, extraer sangre a tiempos sucesivos durante 6 h y medir la concentración de insulina y glucosa en dichas muestras. Con estas concentraciones, utilizando el modelo matemático se obtuvieron los parámetros del sistema glucosa-insulina poniendo especial interés en el valor de la velocidad de consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina.

A continuación se describe el procedimiento y la utilización del modelo matemático elegido. Para lograr la implementación del modelo, quince minutos después de la dosis de F^- se administró glucosa por vía oral (0.6 g/ 100 g peso corporal) y se recolectaron muestras de sangre a tiempos

0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360 min en las que se midió la concentración de glucosa e insulina en plasma. Con los valores de insulinemia y y glucemia se estimaron los parámetros del modelo matemático y luego se realizó el proceso de optimización de los mismos utilizando las bibliotecas **FME** y **deSolve** del software R. La biblioteca FME contiene funciones para la identificación de parámetros permitiendo ajustar un modelo a los datos. Estos modelos se escriben como un conjunto de ecuaciones diferenciales que se resuelven mediante una rutina de integración del paquete deSolve. En lo que respecta al paquete deSolve provee funciones que resuelven problemas de valor inicial de un sistema de ecuaciones diferenciales.

Las ecuaciones de estimación y los mecanismos de optimización propuestos por Lombarte et al (39), se readaptaron al cálculo con las bibliotecas y software descriptos, debido a que se encontraban escritos para su utilización con el software Matlab.

3.13.1 Descripción del modelo matemático

El modelo que se describirá a continuación se fundamenta en que la glucemia es mantenida dentro de un rango normal de concentración gracias a la participación de la insulina y a la acción de órganos que funcionan en forma dependiente de insulina (hígado, tejido adiposo y músculo) e independiente de la acción de esta hormona (sistema nervioso), (Figura 13). 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 13 se muestra un esquema representativo del modelo biológico y los procesos considerados en el planteo del modelo matemático.

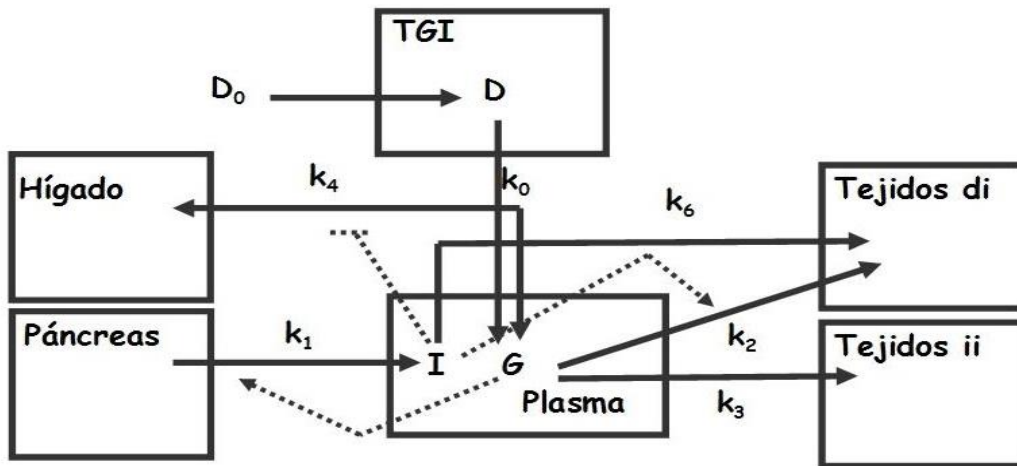


Figura 13: Sistema glucosa-insulina. Las líneas continuas representan flujo de glucosa o insulina y las líneas de puntos efecto estimulador (punta de flecha) o inhibitorio (punta roma). G : concentración de glucosa plasmática (mg/dl), I : concentración de insulina plasmática (pmol/l), D_0 : cantidad de glucosa ingerida a través de la dieta (mg), D : cantidad de glucosa en el tracto gastrointestinal (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 dependientes de insulina (mg.l/dl.min.pmol), k_3 : constante de velocidad de consumo de glucosa en los tejidos independientes de insulina (mg/min.dl), k_4 : constante de toma (para glucogenogénesis) o liberación de glucosa (por glucogenólisis y/o gluconeogénesis) por el hígado (mg.l/dl.min.pmol), k_6 : constante de depuración de insulina plasmática (min^{-1}), **TGI**: tracto gastrointestinal, **Tejidos di**: tejidos dependientes de insulina, **Tejidos ii**: tejidos independientes de insulina. Las unidades de cada parámetro surgen del análisis de las dimensiones en función de las ecuaciones diferenciales planteadas en la Ecuación 1.

El modelo propuesto (Ecuación 1) está constituido por 3 ecuaciones diferenciales. La primera de ellas representa la velocidad de cambio de la insulina plasmática (Ecuación 1, a). 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 (Ecuación 1, b), 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 formas dependiente e independiente de insulina y el manejo hepático de este monosacárido. La tercer ecuación diferencial (Ecuación 1, c) 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 (39).

$$a. \frac{dI}{dt} = k_1 * G - k_6 * I$$

$$b. \frac{dG}{dt} = -k_4 * (I - I_{pi}) - k_3 - k_2 * I + k_0 * D$$

$$c. \frac{dD}{dt} = -k_a * D$$

Ecuación 1: sistema de ecuaciones que describen el modelo matemático del sistema glucosa-insulina

En el sistema, k_a , k_0 , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 y k_6 representan constantes 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 (dG/dt y dI/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 es una función del tiempo. El parámetro I_{pi} del modelo está 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.

A continuación haremos la descripción de cada una de las ecuaciones que componen el sistema representado en Ecuación 1.

$$\frac{dI}{dt} = k_1 * G - k_6 * I$$

Esta ecuación representa la variación de la concentración de insulina plasmática respecto al tiempo, 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.

La segunda ecuación se muestra a continuación:

$$\frac{dG}{dt} = -k_4 * (I - I_{pi}) - k_3 - k_2 * I + k_0 * D$$

Esta representa la variación de la concentración de glucosa plasmática, el término $-k_4 * (I - I_{pi})$ representa el consumo o producción hepática 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 glucogenólisis 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, $-k_2 * I$ el consumo de glucosa en tejidos en forma dependiente de insulina y $k_0 * D$ la glucosa incorporada a partir del sistema digestivo.

La tercera ecuación:

$$\frac{dD}{dt} = -k_a * D$$

Esta ecuación representa la desaparición de glucosa del tubo digestivo, donde D es la cantidad de glucosa remanente, luego de la dosis oral administrada al inicio del proceso de medición y k_a es la constante de desaparición de glucosa del tracto gastrointestinal

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.

3.13.2 Estimación de parámetros del modelo matemático en ratas

El proceso de estimación involucra la aplicación de ecuaciones matemáticas pertenecientes al modelo descrito anteriormente o ecuaciones accesorias, que permiten el ajuste de datos de insulinemia o glucemia en ciertos períodos de tiempo, de manera que posibiliten la obtención de un valor para cada parámetro. Estos valores no son definitivos, porque se obtienen

bajo el planteo de determinados supuestos. Sin embargo son imprescindibles para la ejecución del proceso de optimización que arroja valores de los parámetros sin ninguna restricción temporal. El proceso de estimación y optimización de los parámetros se muestra en detalle en los APÉNDICE 1 y APÉNDICE 2, respectivamente.

3.14 Técnicas estadísticas y control de calidad

El análisis estadístico de los datos se realizó con diferentes paquetes estadísticos del software R 3.2.3 (49). En todos los ensayos se utilizó un nivel de significación del 5 %.

Las variables medidas fueron analizadas con el test Shapiro Wilk y de Bartlett para evaluar normalidad y homocedasticidad de los datos.

Los datos obtenidos en el test de nado no presentaron distribución normal por lo que los parámetros se compararon con la prueba de Mann Whitney y los resultados se expresaron como: mediana [rango] en s. Los resultados de tiempos de latencia en función de los tratamientos se compararon por la prueba Quade y de haber diferencias significativas se utilizó el post test denominado pairwise.t.test para identificar cuáles de los días difieren significativamente en la variable dentro de los tratamientos.

4 RESULTADOS

4.1 Aprendizaje y memoria

Durante el desarrollo del experimento se controló el estado general de salud de los animales, todos ellos mostraron un crecimiento normal y esperado, manteniéndose dentro de los percentiles 5 y 95 %.

Para poder obtener los datos a analizar en esta prueba experimental, las ratas debieron nadar en un tanque con agua, desde el punto de entrada hasta la plataforma de escape. Los nados se repitieron 3 veces a día por 5 días y el tiempo promedio de estos nados se denomina tiempo de latencia y es considerado un parámetro relacionado con la capacidad de aprendizaje en ratas. De forma similar, para obtener el parámetro de la capacidad de memoria, las ratas nadaron sin la presencia de la plataforma, de manera de cronometrar el tiempo de permanencia de la rata, en la zona en la que originalmente se encontraba la plataforma.

4.1.1 Administración diaria de una dosis fluoruro por sonda gástrica: test de aprendizaje y memoria

En primera instancia planteamos la comparación en conjunto de todos los animales del tiempo de latencia (medida de aprendizaje) bajo la administración de una dosis de F^- diaria por sonda orogástrica (DUSO). La misma no evidenció diferencia significativa en el tiempo de latencia entre los animales tratados con F^- y los controles, prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$; Figura 14.

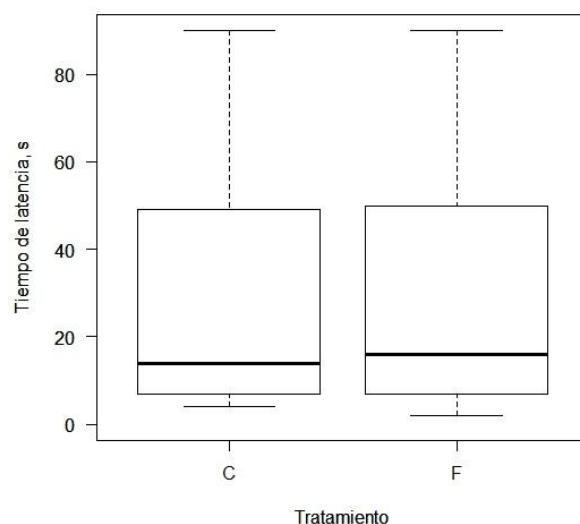


Figura 14: Tiempo de latencia (s) para animales tratados con agua (C) y fluoruro (F-). Se representa mediana, percentilo 25 y 75% y rango. Prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$

Por lo que al seguir el análisis de los datos implementamos desglosar el experimento por días y tratamiento. El tratamiento aplicado no mostró diferencias estadísticas significativas en el tiempo de latencia (Figura 15). Pero se observó que en el grupo tratado con F⁻ (Tratados) el tiempo de latencia de los días 1 (76, [7.7- 90] s) y 2 (33.7, [4-90] s) son significativamente diferentes a los días 3 (10.5, [2- 72] s), 4 (10, [5- 80] s) y 5 (8.7, [5- 46] s). De forma similar en el grupo control (Controles) obtuvimos diferencias estadísticas significativas entre el día 1 (62, [11- 90] s) y el resto de los días: día 2 (23, [4- 90] s), día 3 (10.5, [4- 90] s), día 4 (10, [5-90] s), día 5 (8, [4- 30] s) (Quade test, post-test pairwise.t.test, $p < 0.05$).

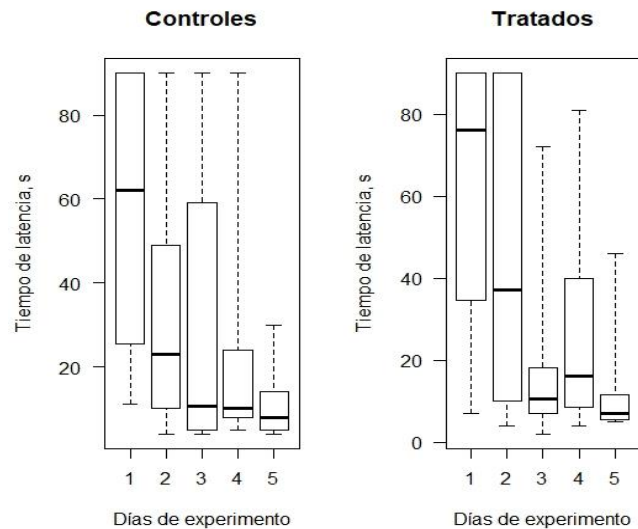


Figura 15: Tiempo de latencia (s) en función de los días de experimentación según el grupo de tratamiento (Quade test, post-test pairwise.t.test, $p < 0.05$).

De igual manera al analizar el tiempo de permanencia no mostró diferencias significativas entre los animales a los que se le administró F⁻ y controles, analizados en forma conjunta (Figura 16, prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$).

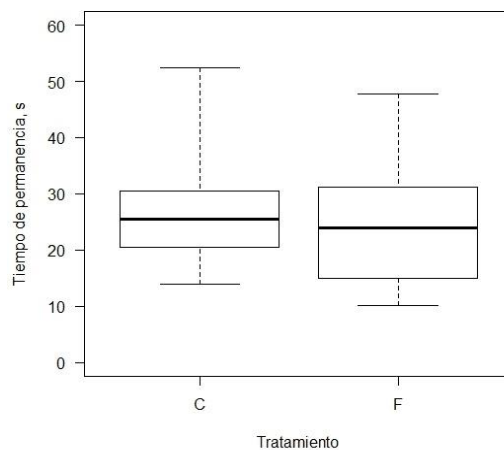


Figura 16: Tiempo permanencia para animales tratados con agua (C) y fluoruro (F). Se representa mediana, percentilo 25 y 75% y rango. Prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$.

Al analizar por separado los tratamientos en función de los días en el que se realizó el test de nado en el que se evalúa la capacidad de memoria (Figura 17), no se observaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en función al tratamiento ni en los días en los que se realizó la prueba (prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$).

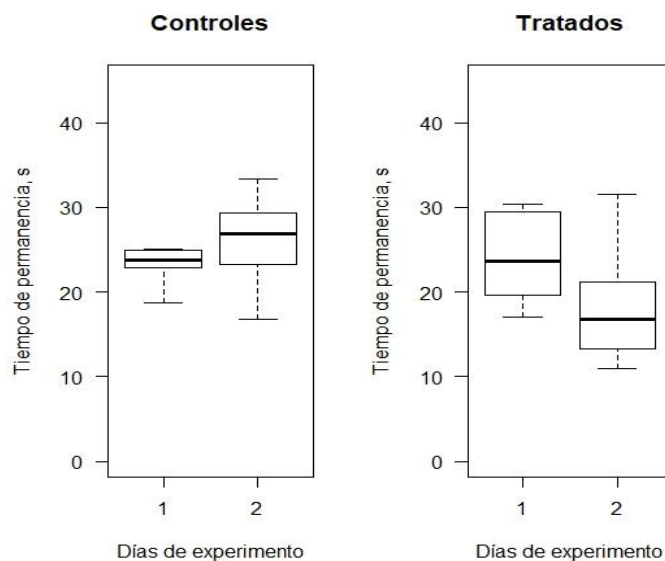


Figura 17: Tiempo de permanencia (s) en función de los días de experimentación según el grupo de tratamiento. Prueba de Mann Whitney, $p>0.05$.

4.1.2 Administración diaria de fluoruro por agua de bebida: test aprendizaje y memoria

Luego de exponer a las ratas a 30 días de ingesta de F^- en agua de bebida (AB) se procedió a realizar el test de nado. Al analizar el tiempo de latencia en función del tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los grupos. (Figura 18), prueba de Mann Whitney, $p>0.05$.

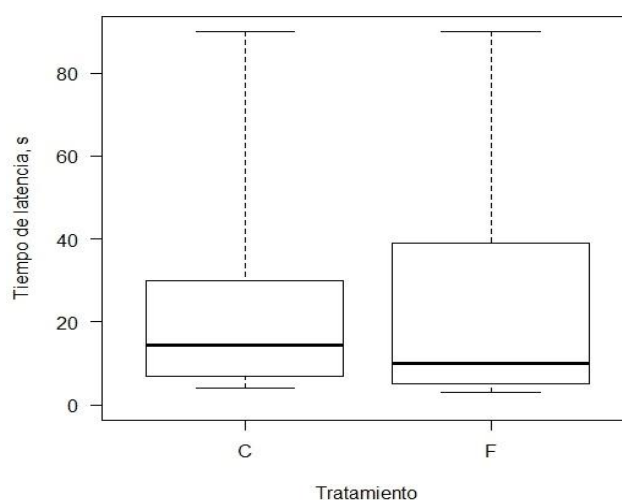


Figura 18: Tiempo de latencia (s) para animales tratados con agua (C) y fluoruro (F). Se representa mediana, percentilo 25 y 75% y rango. Prueba de Mann Whitney, $p>0.05$.

En la comparación del tiempo de latencia en función del tratamiento a lo largo de los días, al igual que en análisis anterior, el tratamiento no mostró efecto (Figura 19). Al desglosarlo en los días en los que se realizó el test intragrupo observamos, en el grupo tratado diferencia significativa del tiempo de latencia entre el día 1 (30, [3- 90] s) y los días 3 (7, [4- 59] s) y 5 (7, [4- 45] s). En el caso del grupo control se obtuvo diferencia entre el día 1 (90, [9- 90] s) y los días restantes: día 2 22.5, [6- 41] s, día 3 13.5, [5- 34] s, día 4 12.5, [6- 39] s, día 5 7, [4-14] s. Quade test, post-test pairwise.t.test, $p < 0.05$.

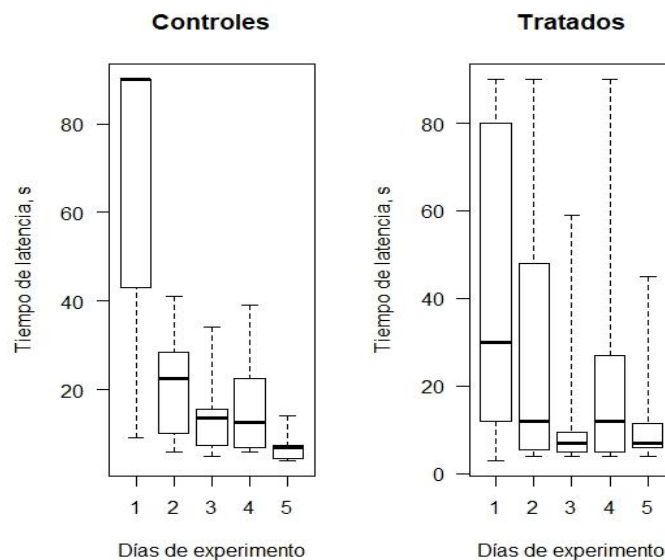


Figura 19: Tiempo de latencia (s) en función de los días de experimentación según el grupo de tratamiento (Quade test, post-test pairwise.t.test, $p < 0.05$).

El análisis de los datos del tiempo de permanencia en función del tratamiento no mostró diferencia significativa entre los grupos analizados. Figura 20, prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$.

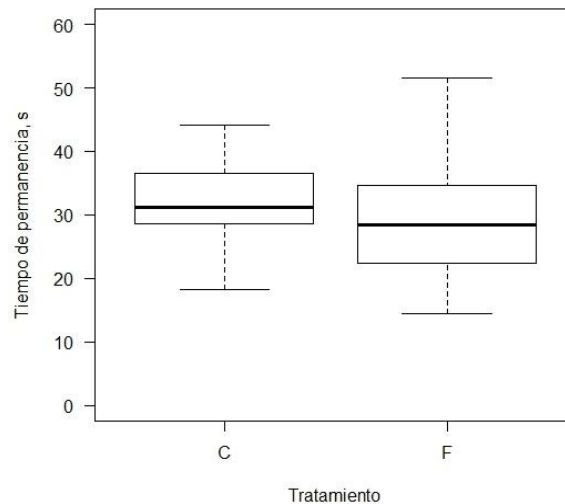


Figura 20: Tiempo de permanencia (s) para animales tratados con agua (C) y fluoruro (F). Se representa mediana, percentilo 25 y 75% y rango. Prueba de Mann Whitney, $p>0.05$.

El análisis de los datos de tiempo de permanencia por grupo y por día no mostró diferencia comparando entre los días o tratamiento. Figura 21 (Prueba de Mann Whitney, $p>0.05$).

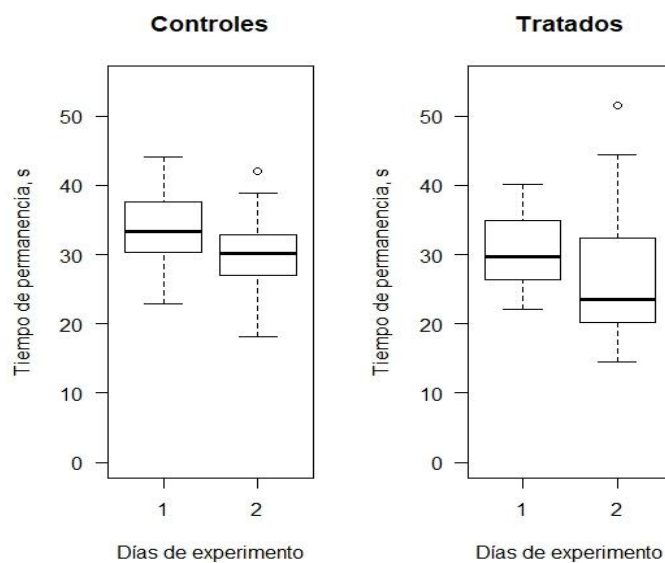


Figura 21: Tiempo de permanencia (s) en función de los días de experimentación según el grupo de tratamiento (Prueba de Mann Whitney, $p>0.05$)

Conclusión parcial: no se observaron diferencias significativas en el aprendizaje y la memoria entre animales que recibieron fluoruro por sonda orogástrica y en agua de bebida, respecto al grupo control.

4.2 Perfusión de cerebro

De los animales sometidos a cirugía para medida de consumo de glucosa *in situ*, no todos pudieron ser utilizados en la obtención de resultados.

En APÉNDICE 3 se describen los criterios de inclusión y causas de exclusión. Los animales que se excluyeron se debieron principalmente por problemas en el procedimiento quirúrgico, siendo la causa más frecuente (80 %) la falla en el cateterismo; las ratas restantes (20 %) debieron excluirse por dificultades con la anestesia. Por ello, solo pudieron utilizarse los datos de 9 de las 21 ratas incluidas e intervenidas en el estudio *in situ*, de perfusión de cerebro para comprobar el efecto del F^- sobre el consumo de glucosa por cerebro. En estos animales se procedió a determinar si la presencia de F^- en la solución de perfusión producía aumento o disminución del consumo de glucosa, teniendo en consideración el esquema de administración previa de F^- . Se observó un aumento en la velocidad de consumo de glucosa en un 33 % de los animales y una disminución en un 67 %. Se le aplicó la prueba estadística de proporción, en la cual no se logró obtener una proporción significativamente diferente (prop.test, $p>0.05$).

La Tabla 1 muestra los animales distribuidos en una tabla de doble entrada, en la que se clasificó por tratamiento previo con F^- y el cambio en el consumo de glucosa durante la perfusión. Si bien el número de animales en los que disminuyó el consumo de glucosa fue mayor en el grupo tratado con F^- , el análisis de los datos con la prueba exacta de Fisher no demostró asociación significativa entre el cambio de consumo de glucosa por el cerebro en la presencia de F^- en la solución de perfusión y contemplando el tratamiento previo que habían recibido esas ratas.

Tratamiento	Velocidad de consumo de Glucosa	
	Aumento	Disminución
Fluoruro	1	5
Control	2	1

Tabla 1: Velocidad de consumo de glucosa en función al tratamiento.
Prueba exacta de Fisher, $p>0.05$.

Conclusión parcial: la presencia de F^- en la solución de perfusión no produjo modificación significativa en el consumo de glucosa de la zona perfundida, ni tampoco fue influido por el tratamiento previo con F^- .

4.3 Consumo de glucosa utilizando 2-[C¹⁴]-deoxi-D-glucosa

El efecto del fluoruro sobre el consumo de 2DG, se midió en un grupo de animales luego de una dosis de F⁻ de 0.8 mg F⁻/100 g de peso corporal por sonda orogástrica. Para lograr el pico de flúor en sangre, el F⁻ debió administrarse 15 minutos antes de la inyección intravenosa de 2DG. Luego de transcurridos 30 minutos de la inyección intravenosa de 2DG se procedió a sacrificarlas y extraer tejido nervioso, muscular y adiposo, para su posterior análisis e interpretación de los datos. La Figura 22 muestra la concentración de 2DG por gramo de tejido en los distintos tejidos investigados. Todos los animales tratados con F⁻ presentaron un consumo menor de 2DG que en los animales controles sin diferenciar los tejidos. Sin embargo, esta diferencia entre tratados y controles sólo fue estadísticamente significativa en tejido muscular y adiposo (prueba de Mann Whitney, $p < 0.05$). No presentando diferencia significativa en consumo de glucosa por el tejido nervioso, prueba de Mann Whitney, $p > 0.05$.

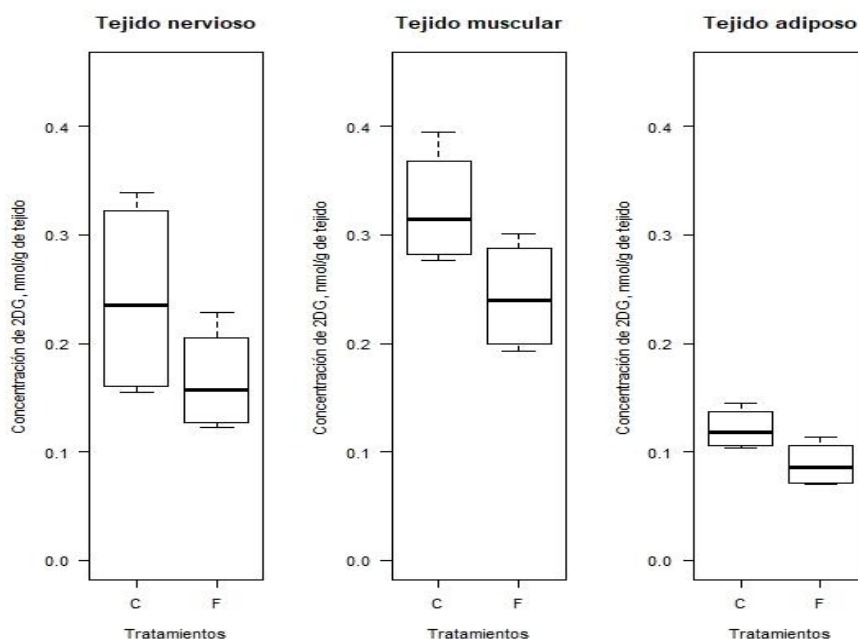


Figura 22: Concentración de 2DG de cada tejido analizado en función al tratamiento aplicado.

Conclusión parcial: la presencia de fluoruro no modifica significativamente el consumo de 2DG por el cerebro, aunque si lo hace a nivel de músculo estriado y tejido adiposo.

4.4 Evaluación del consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina utilizando un modelo matemático

En el apartado 3.10 de MATERIALES Y MÉTODOS y en el APÉNDICE 1 se muestran las ecuaciones del modelo y los procedimientos para la estimación de los parámetros del sistema de ecuaciones diferenciales que representa la homeostasis del sistema glucosa insulina en la rata. Se presenta, a manera de ejemplo, el desarrollo de la obtención de los parámetros de una rata en particular.

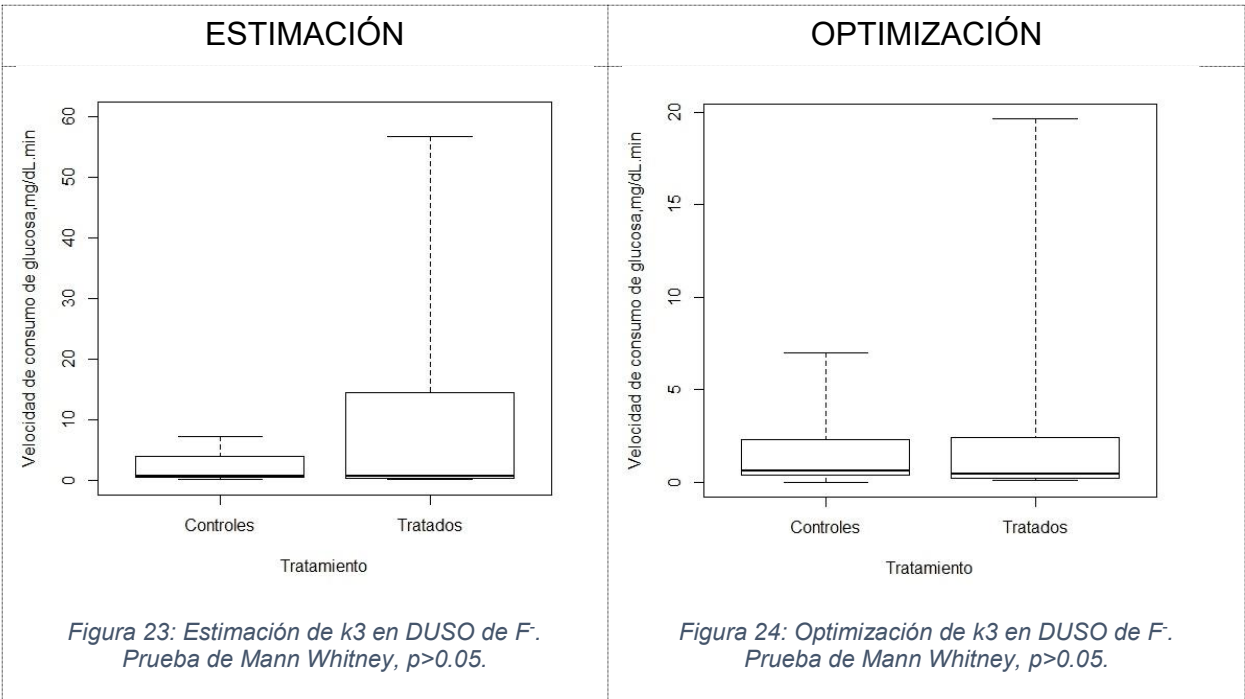
Rata	Administración	Tratamiento	Estimación k3	Optimización k3
800	DUSO	Control	0.9047	0.9047
400	DUSO	Control	0.4593	0.4629
200	DUSO	Control	0.7381	0.6804
40	DUSO	Control	0.6144	0.5538
4	DUSO	Control	0.3420	0.2374
6	DUSO	Control	0.1036	0.0000
2	DUSO	Control	7.1462	3.7259
11	DUSO	Control	6.9409	6.9599
100	DUSO	Fluoruro	24.8635	19.6354
30	DUSO	Fluoruro	0.9357	0.9207
3	DUSO	Fluoruro	0.4428	0.4461
1	DUSO	Fluoruro	3.9002	3.8999
60	DUSO	Fluoruro	0.1729	0.0676
20	DUSO	Fluoruro	0.2211	0.1919
33	DUSO	Fluoruro	0.1944	0.2054
10	DUSO	Fluoruro	56.6804	NA
7	AB	Control	1.1591	1.0824
31	AB	Control	0.4451	0.3588
430	AB	Control	0.2735	0.1531
21	AB	Control	0.9000	0.8040
41	AB	Control	0.5785	0.4704
110	AB	Fluoruro	0.6349	0.6130
210	AB	Fluoruro	0.2384	0.2056
13	AB	Fluoruro	0.3350	0.3370
300	AB	Fluoruro	0.4129	0.4136
12	AB	Fluoruro	0.7905	0.7868

Tabla 2: Valores de estimación y optimización de k3. DUSO: administración de F mediante una dosis única por sonda orogástrica. AB: Administración de F por agua de bebida. NA indica que el proceso de optimización no logró hallar un valor real del parámetro.

En todos los animales el procedimiento se llevó a cabo de la forma indicada en el ejemplo. De todos los parámetros que intervienen en el modelo, en esta tesis

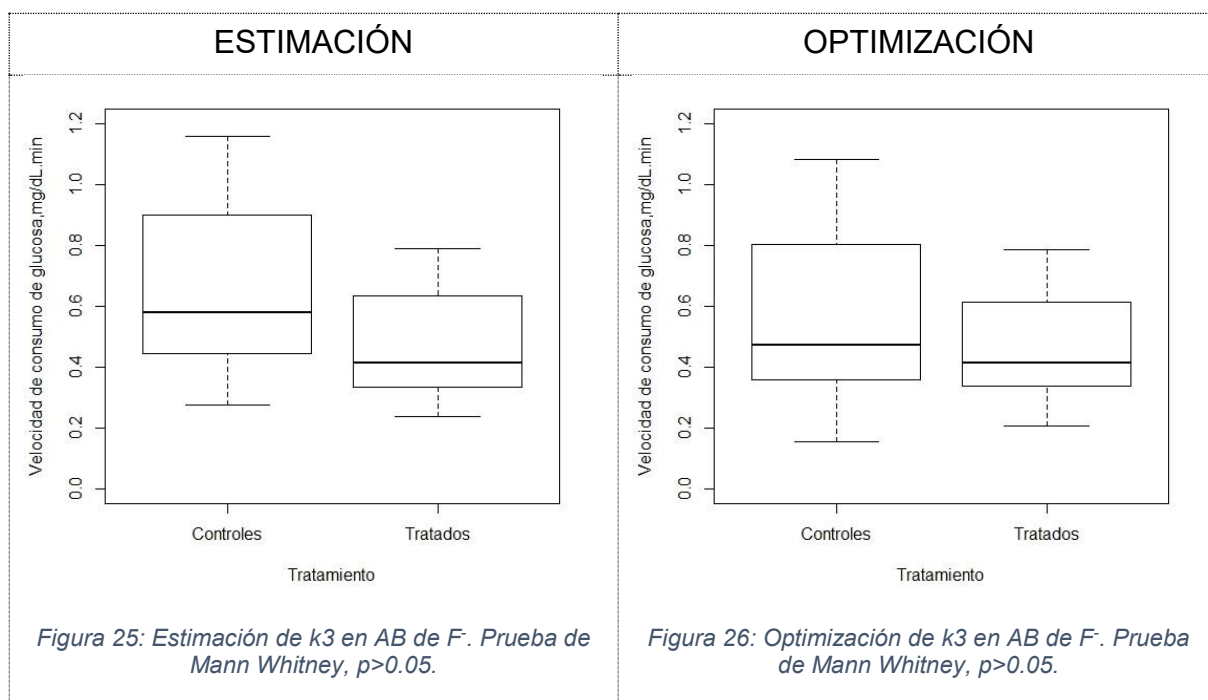
nos centramos en aquel que estima el consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina, que se denomina k_3 en el modelo planteado. Con los valores estimados de los parámetros, se realizó el proceso de optimización, como se muestra para el animal seleccionado en el APÉNDICE 2. Al optimizar los parámetros se intentó mejorar su ajuste a los valores

En la Tabla 2 se muestran los valores hallados en los procesos de estimación y optimización del parámetro k_3 . En la misma se puede observar que la rata 10 no muestra un valor para la optimización. Este hecho se debió a la imposibilidad de las ecuaciones del modelo de poder hacer la optimización con el valor de los parámetros obtenidos de la estimación. En las Figura 23 y Figura 24, observamos la comparación entre los valores hallados en los procesos de estimación y optimización de la velocidad del consumo de glucosa en función de los tratamientos. Cuando se analizaron por la prueba de Mann Whitney no se hallaron diferencias significativas de los grupos tratados con sus controles de los animales que habían sido tratados con una dosis de fluoruro por sonda orogástrica ($p>0.05$).



En las Figura 25 y Figura 26Figura 26, observamos la comparación entre los valores hallados en los procesos de estimación y optimización de la velocidad del consumo de glucosa en función de los tratamientos de los

animales que habían recibido fluoruro por agua de bebida por 30 días. Cuando se analizaron por la prueba de Mann Whitney no se hallaron diferencias significativas de los grupos tratados con sus controles ($p>0.05$).



Conclusión parcial:

No se hallaron diferencias significativas entre los valores de k_3 de ratas tratadas con F^- y controles, tanto en el caso del tratamiento de una dosis diaria por sonda orogástrica como en el caso del tratamiento por agua de bebida, prueba de Mann Whitney, $p>0.05$.

5 DISCUSIÓN

El F es un elemento distribuido ubicuamente en la corteza terrestre, siendo el decimotercer elemento más abundante. En muchos países donde el suministro de agua potable es de origen subterráneo, la concentración del F⁻ sobrepasa los límites recomendados por la OMS o los valores aceptados por las legislaciones locales. Otros distritos promueven la fluoración de sus aguas en el marco de prevención de caries dental en la población, siendo una medida de salud pública muy controvertida. La fluoración del agua potable obliga a los ciudadanos al consumo involuntario, de un químico que no necesariamente requieren.

Dependiendo del estudio publicado que se analice, se hallan planteos y conclusiones controversiales acerca del papel que desempeña el F⁻ en la salud humana. Avalan esta afirmación los miles de trabajos publicados en la revista trimestral de la Sociedad Internacional para la Investigación del Fluoruro (*“International Society for Fluoride Research”* www.fluorideresearch.org).

Se ha observado que dependiendo de la edad, el tiempo de exposición, la dosis administrada y las regiones geográficas de las poblaciones analizadas, los resultados pueden ser muy diferentes, por lo cual su interpretación debe hacerse con sumo cuidado (50–52).

En China, India, Irán, Irak, entre otros países, donde la presencia de F en agua es endémica, se han hallado concentraciones de F⁻ en agua entre 1.5 ppm y 9.6 ppm. En todos los trabajos revisados, se concluyó que la medición de la inteligencia es significativamente inferior en los niños que provenían de zonas con altos niveles de F (50,51). Las razones por la que existen déficits cognitivos o disminución de CI en niños de regiones con alta presencia e ingesta de F⁻ por el agua de bebida, todavía no están completamente dilucidadas. Esto podría deberse a diferencias en factores, los sesgos en la interpretación de resultados o la presencia de otras sustancias tóxicas el agua de bebida.

Muchas de estas asociaciones fueron observadas al analizar el impacto de la exposición al F⁻ en la prevalencia de caries dental en campañas de promoción de salud bucal de niños escolarizados.

En algunas partes de América, en investigaciones del mismo tipo, se ha llegado a conclusiones diferentes. En México, Soto-Barreras et al., observaron diferentes resultados a los de Asia. En este trabajo observaron una disminución de la prevalencia de caries dental en los niños analizados, pero sin encontrar asociación de la presencia del F con déficits cognitivos (52). De forma similar en Colombia no lograron establecer la existencia de una asociación entre la presencia de fluorosis dental en una población de niños en edad escolar y el CI que presentaban (33), obtenido por la aplicación del test de matrices combinadas de Raven.

Aunque el CI es una de las variables que permite evaluar la capacidad intelectual de personas en un ámbito académico, hoy se sabe que no es la única que se puede aplicar para etiquetar de “inteligente” a un individuo. Actualmente se puede hablar de inteligencia emocional, musical, lingüística, lógica- matemática, naturalista, espacial, inter e intrapersonal, corporal-cinética, entre las principales que se pueden enumerar con características propias de cada área (53). Los individuos tienen la capacidad de desarrollarse de formas diferentes frente a las capacidades adquiridas o naturales dentro de un ambiente con oportunidades que les permita nutrirlas y utilizarlas para beneficio propio o de su comunidad, si la situación lo amerita.

Pasando a estudios realizados en animales, un trabajo realizado con ratas Sprague Dawley de 70 días (12), a las que se le administró una dosis oral de F^- , y se aplicó un modelo matemático de la homeostasis de glucosa para medir el consumo de glucosa independiente de insulina, demostró una disminución del mismo en animales tratados respecto de los controles. Esta disminución podría estar asociada a una restricción de energía en los procesos metabólicos normales del SNC. La repetición de este experimento en esta tesis con la misma línea de ratas, no logró demostrar la disminución hallada en experimentos anteriormente detallados. Solo puede marcarse como diferencia importante que en los experimentos de esta tesis se utilizaron ratas de 50 días en lugar de 70 días. Además se utilizaron herramientas más sofisticadas de modelización matemática que permitieron un proceso de optimización más controlado. En los experimentos en que se demostró disminución se habían utilizados herramientas de Simulink y MatLab y en las de esta tesis se utilizaron las bibliotecas de Solve y FME del entorno R.

Al aplicar el test de aprendizaje y memoria encontramos una gran variabilidad en la respuesta de los animales utilizados. Además, no se hallaron diferencias en las mediciones de aprendizaje y memoria entre el grupo control y los animales tratados con fluoruro para ambas formas de administración: sonda orogástrica y agua de bebida.

Al analizar el consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina, no se observó disminución del mismo en los animales tratados con flúor con los tres modelos experimentales aplicados: el modelo matemático, la perfusión de cerebro, y la captación de 2DG. Sin embargo, se observó una disminución en la captación de 2DG por músculo y tejido adiposo en las ratas que habían recibido F por sonda orogástrica 15 minutos previos a la administración de 2DG. Este resultado estaría confirmando el conocido efecto del fluoruro sobre la resistencia a la insulina en músculo y tejido adiposo. Si bien no se halló una disminución significativa del consumo de glucosa en los 3 modelos, se observó que en los tres modelos el consumo de glucosa fue menor que en el grupo control. Podría interpretarse que la falta de significado estadístico fuera consecuencia del reducido número de animales utilizados, interrogante que puede resolverse aplicando un test de potencia. La aplicación del test de potencia utilizando la biblioteca pwr, permite concluir que se necesitaría un tamaño muestral de 31 animales para demostrar asociación entre la presencia de F⁻ en la solución de perfusión y el consumo de glucosa por cerebro, con un nivel de significación de 0.05 y potencia de 0.8. De forma similar el análisis de la captación 2DG con la misma biblioteca, indicó que se necesitarían 16 unidades experimentales para demostrar la asociación significativa entre captación de 2DG y la administración de fluoruro. A pesar que el número de animales que se necesitaría parece fácilmente alcanzable, las dificultades económicas para la provisión de insumos y el mantenimiento del cuarto para el uso de radioisótopos, hace imposible la concreción de un mayor número de experimentos. Con respecto a la perfusión de cerebro, se consideró inadecuada la persecución de un resultado por aumento del número de animales, teniendo en cuenta la gran cantidad de ellos que quedan excluidos del análisis por dificultades en el procedimiento de perfusión.

La disminución del cociente intelectual en niños observado en zonas de fluorosis (50), aun cuando en algunos sitios del planeta no se haya

reproducido, es un llamado de alerta a la ingesta crónica de F^- . Los resultados hallados relacionados al cociente intelectual ante la ingesta de F^- podría deberse a la presencia de otras sustancias tanto, en el agua de bebida como en la alimentación, así como en causas de origen genética y relacionadas también con la etnia poblacional. Es conocido desde hace años que la ingesta o administración simultánea de algunos elementos disminuye los efectos del fluoruro (54,55). De la misma manera, muchos compuestos de origen vegetal presente en los alimentos, disminuyen los efectos del F^- (56,57).

Por otra parte se ha demostrado en ratones, que la farmacocinética del F^- es afectada por factores genéticos (58). Los efectos del fluoruro sobre el tejido óseo (59) y la fluorosis dental (60) son dependiente de la línea de ratones utilizados.

Este trabajo de tesis no demostró efectos significativos del F^- sobre el aprendizaje y la memoria con el test utilizado. Tampoco demostró diferencias significativas en el consumo de glucosa en experimentos de perfusión de cerebro, en la captación de 2DG, ni en los procesos de estimación y optimización del parámetro k_3 . Sin embargo, en los tres experimentos mencionados los valores hallados en los animales tratados con F^- mostraron valores más bajos en comparación a los animales controles.

A pesar de que la mayoría de la población mundial se encuentra expuesta al F^- en rango de concentraciones bajas o moderadas que no presentan signos visibles de fluorosis, las regiones que si están gravemente expuestas, deben implementar tecnologías que permitan reducir de manera segura el F^- y otros iones acompañantes igualmente tóxicos, tanto del agua como el aire circundante.

Centenares de trabajos en animales y humanos han demostrado efectos adversos importantes del F^- en diversas áreas de investigación. Aunque muchos de estos trabajos utilizan rangos de concentración de flúor alejados de los valores que pueden hallarse en aguas de consumo humano. En el desarrollo de esta tesis se utilizaron concentraciones de fluoruro comparables a las concentraciones halladas en el agua en zonas de fluorosis.

Los resultados de esta tesis no pueden ser tomados como definitivos para sustentar la hipótesis de la inocuidad del fluoruro para los sistemas biológicos, aunque sus resultados se sumen a una corta lista de trabajos donde no se demostraron efectos adversos.

Esta tesis suma sus resultados a una larga recopilación de trabajos científicos avalados por importantes instituciones y revistas científicas que seguirán engrosando la discusión sobre el riesgo/beneficio del uso de fluoruro como prevención y tratamiento de las caries dentales en seres humanos.

6 APÉNDICE 1

6.1 Estimación de parámetros de la homeostasis glucosa insulina

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, D_0 . Llamamos prueba de tolerancia a la glucosa oral a esta administración y simbolizamos con PTGO.

Utilizamos los valores de insulinemia y glucemia medidos durante 6 h.

El proceso de estimación y optimización es realizado en el software R e involucra la utilización de scripts diseñados específicamente para este proceso.

En primera instancia, introducimos en el espacio de trabajo del software R la Tabla 3, con los datos de tiempo (t), glucemia (G) e insulinemia (I) denominada allí “Rata33” desde la planilla de cálculo Rata33.xls/ods.

```
Rata33<-read.table('clipboard',header=TRUE,dec='.',sep='t', encoding='latin1')
>Rata33
```

t	G	I
0	105.2	71.33
5	126.8	111.03
10	141.8	132.30
15	157.3	152.01
30	271.0	261.79
60	244.6	156.65
90	200.0	119.20
120	148.2	97.91
180	129.8	82.66
240	120.0	80.10
300	103.2	72.00
360	94.9	53.69

Tabla 3: Valores de insulinemia y glucemia en función al tiempo pertenecientes a la rata 33

Su representación gráfica se muestra en la Figura 27.

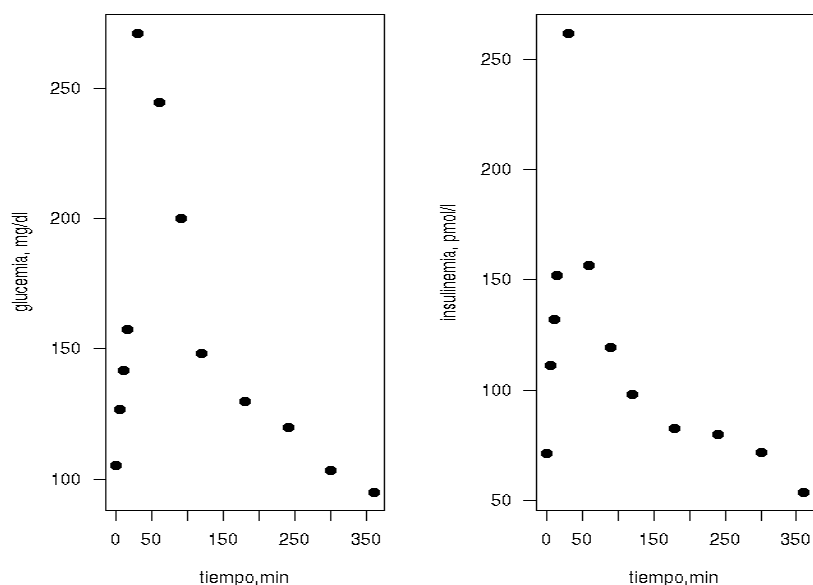


Figura 27: A la izquierda curva de glucemia y a la derecha de insulinemia obtenida luego de la PTGO.

Para la estimación de parámetros se utilizaron una serie de aproximaciones y supuestos que permiten ajustar diferentes funciones en regiones distintas 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, introducimos en nuestro espacio de trabajo algunas constantes, que surgen de la tabla de datos denominada Rata33 (Tabla 3). Estos valores son conocidos como valores iniciales del proceso y permiten obtener una solución al sistema de ecuaciones diferenciales.

Durante todo el proceso observaremos el **símbolo (<-)** indispensable en la introducción de los diferentes códigos en el entorno de R.

Introducimos, entonces, el valor del tiempo al cual se produce el máximo de la glucemia en la tabla Rata33, al que llamamos t_{Mg} :

```
tMg<-30
```

Introducimos el valor máximo de la concentración de glucosa de la tabla Rata33, correspondiente al tiempo t_{Mg} , al que llamamos G_{Mg}

```
GMg<-271
```

Introducimos el tiempo para el menor valor de glucemia de la tabla Rata33, al que llamamos t_{mg} :

$tmg < -360$

Introducimos el valor de la dosis oral de glucosa en mg, a la que llamamos D_0 .

$D_0 < -1500$

Introducimos el valor del tiempo al que se produce el máximo en la insulinemia al que llamamos t_{Mi}

$tMi < -30$

Introducimos el valor del máximo valor de insulinemia, al que llamamos I_{Mi} .

$IMi < -261.79$

Introducimos la glucemia (G_a) y la insulinemia (I_a) en ayuno, que corresponde a la primera fila de la tabla Rata33.

$G_a < -105.2$

$I_a < -71.33$

A continuación se indican los supuestos y el proceso de estimación de cada parámetro del modelo.

6.1.1 Estimación de ka

En la Figura 28 se representa nuevamente el modelo descrito en materiales y métodos, indicando la parte del mismo que se analizará y utilizará para estimar el valor de ka .

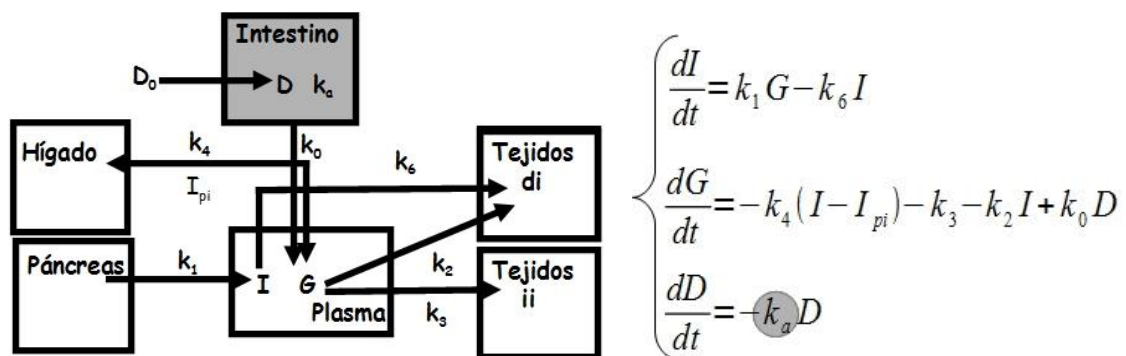


Figura 28: Modelo desarrollado para la rata sana. A la izquierda se muestra resaltado en gris el compartimiento investigado. A la derecha se resalta en el sistema de ecuaciones, el parámetro cuyo proceso de estimación se describe en la sección 6.1.1-Estimación de ka .

El parámetro ka (constante de velocidad de desaparición de glucosa de la luz del aparato digestivo) es estimado aplicando el método de los residuales. Como muestra la Figura 28, este parámetro pertenece a la tercera ecuación, la cual representa la variación de la cantidad de glucosa en el aparato digestivo. Este modelo experimental nos impide acceder a dicho compartimiento por lo que el

proceso se realiza con los valores de glucemia. Dicho método, consiste en considerar que luego del máximo de glucemia, los procesos que incorporan glucosa al plasma a partir del tracto gastrointestinal son despreciables respecto a los que la consumen. En esa situación, la variación de la glucemia en función del tiempo se puede representar con la Ecuación 2.

$$\frac{dG}{dt} = -k_e * G$$

Ecuación 2

La constante k_e representa la eliminación de glucosa por tejidos dependientes e independientes de insulina, 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 Ecuación 3.

$$G = G_0 * e^{-k_e t}$$

Ecuación 3

G_0 es el valor de glucemia a tiempo cero si sólo existiera eliminación. Este valor es teórico ya que a tiempo cero existirán 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 .

Trabajando con la tabla "Rata33", comprobamos que el máximo de la glucemia se produce a $t=30$ min y consideraremos los datos para tiempos mayores a 30, que corresponde a la variable introducida t_{Mg} . Por simplicidad separamos estos datos en un subset, creando la tabla1:

```
tabla1<-data.frame (subset(Rata33,t>=tMg,select=c(t,G)))
```

Comprobamos los valores en tabla1:

```
> tabla1
```

t	G
30	271.0
60	244.6
90	200.0
120	148.2
180	129.8
240	86.3
300	103.2
360	94.9

Tabla 4: Selección de valores de glucemias a tiempos mayores a 30 min

Debemos darle al proceso de ajuste valores iniciales a nuestros parámetros: G_0 y k_e . Para G_0 tomamos el valor 400, que surge de observar los datos. Si a 30 minutos 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 se supuso de orden 1, el tiempo de vida media para un proceso de orden 1 se representa en general por la Ecuación 4.

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

Ecuación 4

De la observación de la “*tabla1*” ingresada en R surge que aproximadamente en 90 min la concentración baja aproximadamente a la mitad (30 min– 271/ 120 min– 148.2). Reemplazando 90 min en la ecuación nos arroja un valor de k_e de 0.0077 min⁻¹.

Realizamos el ajuste de los datos de la *tabla1* con la ecuación planteada para la desaparición de glucosa.

```
> fit1<-nls(G~Go*exp(-ke*t),tabla1,star=c(Go=400,ke=0.0077),trace=TRUE)
15377.05:      4.0 e+02      7.7e-03
2739.849:      2.746490 e+02    3.589289 e-03
2477.559:      2.882623 e+02    3.784507 e-03
2476.974:      288.93969602    0.00380135
2476.969:      2.889915 e+02    3.803113 e-03
2476.969:      2.889969 e+02    3.803297 e-03
2476.969:      2.889974 e+02    3.803316 e-03
```

La primera columna representa el error. La segunda arroja el valor de G_0 estimado por este proceso cuyo valor es redondeado y eliminado de la expresión exponencial: $G_0=288$. Por otra parte, la tercera columna nos da los valores de k_e .

El último valor corresponde al valor estimado por el proceso de ajuste.

Entonces el valor estimado para k_e es 0.0038 min⁻¹.

Ahora construimos una nueva tabla que llamamos “*tabla2*”, en el entorno de R, que contendrá los valores de la glucemia para tiempos menores a t_{Mg} .

```
> tabla2<-data.frame(subset(Rata33,t<tMg,select=c(t,G)))
```

```
> tabla2
```

t	G
0	105.2
5	126.8
10	141.8
15	157.3

Tabla 5: valores de glucemia para tiempos menores al tMg

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 la “tabla2”, obtenemos así la Tabla 6. Denominamos G_r a la glucosa residual, que es una variable creada por la aplicación de este modelo para luego calcular la glucosa en el aparato digestivo (G_a).

```
> tabla2<-cbind(tabla2,Ga=tabla2$Gr-tabla2$G)
```

```
> tabla2
```

t	G	Gr	Ga
0	105.2	288.00	182.80
5	126.8	282.58	155.78
10	141.8	277.26	135.46
15	57.3	272.04	114.74

Tabla 6: valores de glucemia en el aparato digestivo para tiempos menores al tMg

Finalmente hallamos la regresión lineal del logaritmo de G_a en función de t , cuya pendiente será el valor estimado de ka .

```
> fit2<-lm(log(Ga)~t, data=tabla2)
```

Cuyos coeficientes son

```
> fit2$coef
```

```
(Intercept)      t
5.20758137 -0.03073695
```

Introducimos así a ka asignándole el valor hallado:

```
> ka<-fit2$coefficients[2]
```

```
> ka
```

```
-0.03073695
```

Dado que al definir nuestro modelo, asignamos a las constantes un signo positivo o negativo según aporten o extraigan glucosa o insulina de los compartimientos, las constantes tienen siempre valores positivos. Por esta razón 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*, cuyos parámetros son los correspondientes al ajuste *fit2*. Teniendo en cuenta 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)}
```

Graficamos los datos experimentales y las funciones definidas recientemente como:

```
> 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 Rata33:

```
> points(Rata33$t,Rata33$G,pch=19)
```

Creamos un vector de tiempo para graficar los datos de *G* solo en presencia de excreción, al que llamamos *texcrecion*:

```
> 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 valores 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 *Gresidual*, 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)
```

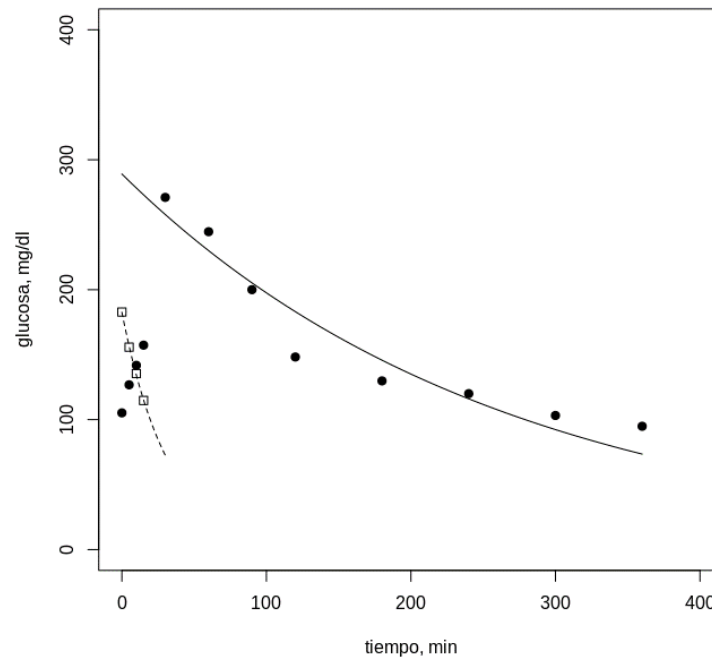


Figura 29: Los puntos negros representan los valores experimentales. La línea curva continua la función de ajuste de los valores de glucosa considerando solo el proceso de excreción. Los cuadrados representan los valores de glucosa en el aparato digestivo y la línea de puntos el ajuste de dichos valores con la función obtenida para la glucosa en el aparato digestivo, G_a .

La Figura 29 muestra el buen ajuste de los datos experimentales de decaimiento de la glucemia y los valores residuales de glucosa en el aparato digestivo, que surgen del procedimiento descripto.

6.1.2 Estimación de k_0

La constante de velocidad k_0 representa el ingreso de glucosa al plasma a partir del aparato digestivo. Si bien mantiene una relación con k_a no necesariamente es igual, debido a los procesos de transporte a través de epitelios y la metabolización intracelular a nivel del aparato digestivo. En un animal en ayuno que ingiere una dada cantidad de glucosa (D_0), durante un

breve periodo 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 .

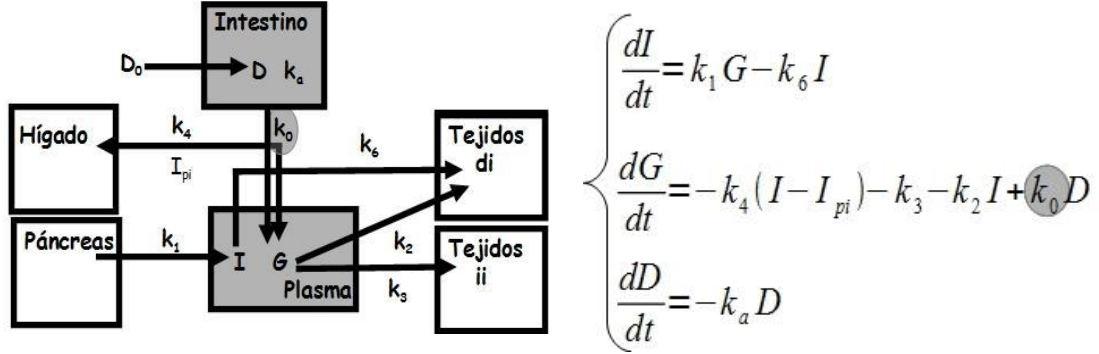


Figura 30: Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris los compartimientos involucrados y el parámetro cuyo proceso de estimación en la sección 6.1.2. Estimación de k_0

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 la siguiente:

$$\frac{dG}{dt} = k_0 D$$

Reemplazando D por la función que representa el contenido de glucosa en el sistema digestivo:

$$D = D_0 * e^{-k_0 t}$$

Resulta:

$$\frac{dG}{dt} = k_0 * D_0 * e^{-k_0 t}$$

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, bajo supuestos ya explicados:

$$G = G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_0 t})$$

Empleando esta ecuación para ajustar los valores de glucemia medidos entre 0 y 15 min y luego de la administración de glucosa se obtiene k_0 . Para esta ecuación se necesita de k_a que es un valor obtenido por el método de los residuales, G_a que es 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.

Para llevar adelante el proceso de estimación, debemos inicializar algunas variables. Otras ya han sido inicializadas en los pasos previos como: D_0 , k_a y G_a . Es conveniente realizar la comprobación de los valores los cuales son:

```
> D0
1500
```

```
> ka
0.03073695
```

```
> Ga
[1] 105.2
```

Creamos para simplicidad una tabla con los valores experimentales de tiempo y G a partir de la Rata33, a la que llamamos “tabla3”:

```
> tabla3<-data.frame(subset(Rata33,t<=15,select=c(t,G)))
```

Realizamos un ajuste no lineal de los datos de G en función de t de la “tabla3”. Para ello utilizamos la función *nls()* y como parámetros de la función colocamos a k_0 . Los valores G_a , D_0 y k_a son constantes de la función ya que sus valores son fijos y conocidos para el animal en estudio. Asignamos a k_0 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
```

Los datos de las dos columnas anteriores muestran en la primera columna el error y en la segunda el valor estimado de la constante k_0 .

Asignamos así, el valor del parámetro hallado a k_0 :

```
> k0<-coef(ajustek0)
```

y podemos graficar la función de ajuste con este valor de k_0 .

Generamos un vector de tiempo hasta 15 minutos que llamaremos *taborcion*:

```
> taborcion<-seq(0,15,0.1)
```

Creamos la función de ajuste para el período de solo absorción, que utilizamos para el ajuste

```
> 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(taborcion)
```

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:

```
> points(Rata33$t,Rata33$G,pch=19)
```

Colocamos la línea de ajuste para los valores experimentales en el tiempo de predominio de la absorción:

```
> lines(spline(taborcion,gabsorcion),lty=1,lwd=2)
```

Obtenemos la siguiente gráfica:

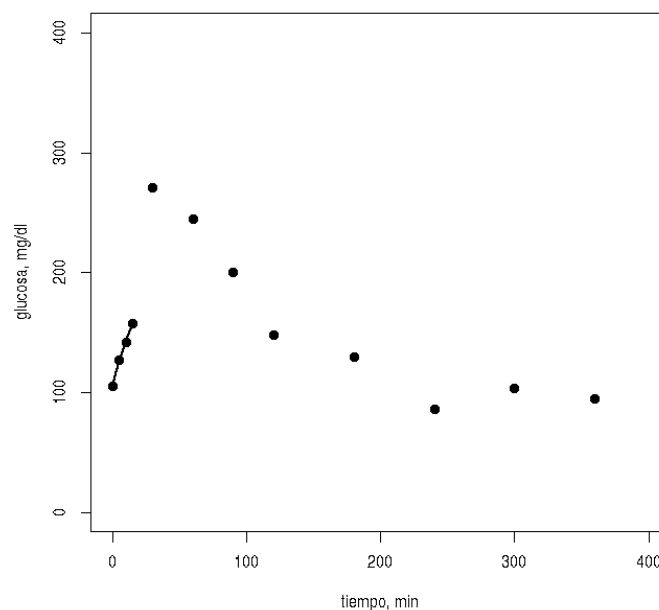


Figura 31: Los puntos representan los valores experimentales de glucosa y la línea la función de ajuste con la ecuación desarrollada suponiendo, en los tiempos cercanos a 0, un dominio del proceso de absorción por sobre los de eliminación de glucosa del plasma.

6.1.3 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 32).

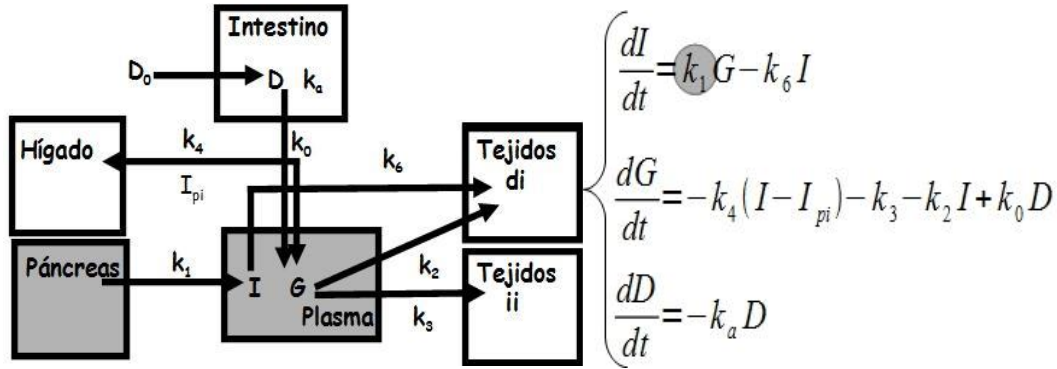


Figura 32: Modelo desarrollado para la ratas sana. Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe en la sección 6.1.3-Estimación de k_1 .

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 27. El aumento en la concentración de insulina a tiempos próximos a la administración de glucosa puede ser interpretado como que el proceso de 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 simplificar de manera que se obtiene:

$$\frac{dI}{dt} = k_1 * G$$

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 igual al considerado en la simplificación de la ecuación de la variación de la concentración de insulina. Por lo cual, el valor de G puede ser reemplazado en la ecuación dI/dt :

$$\frac{dI}{dt} = k_1 * \left[G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} (1 - e^{-k_a t}) \right]$$

y resolviendo esta ecuación diferencial se obtiene la 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:

$$I = I_a + \left(G_a + \frac{k_0 D_0}{k_a} \right) * k_1 * t + \frac{k_1 * k_0 * D_0}{k_a^2} * (e^{-k_a t} - 1)$$

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 una estimación del parámetro k_1 .

A continuación se muestra el procedimiento realizado 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 animal a otro, dependiendo del tiempo en que se produzca el máximo de insulina.

```
> tabla4<-data.frame(subset(Rata33,t<=15,select=c(t,I)))
> tabla4
```

t	I
0	71.33
5	111.03
10	132.30
15	152.01

Tabla 7: Valores de insulinemia a tiempos cercanos a la administración de glucosa.

Luego realizamos el ajuste no lineal de los valores I en función de t con la ecuación descripta. Donde I_a es la insulinemia de ayuno, k_0 y k_a son los valores estimados anteriormente, D_0 la dosis de glucosa y G_a la glucemia de ayuno.

Para el ajuste utilizamos la función `nls()`:

```
>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
```

Los datos anteriores muestran en la primera columna el error durante el proceso de ajuste y la segunda columna corresponde al valor estimado de k_1 , que utilizamos para inicializar ese parámetro:

```
> k1<-0.04421316
```

Creamos un gráfico para representar los valores 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(Rata33$t,Rata33$I,pch=1,cex=1)
```

Creamos una función para la secreción de insulina con la ecuación ajustada a las condiciones:

```
>Isecrecion<-function(t){Ia+(((k0*D0)/ka)+Ga)*k1*t+((k0*D0*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 función *Isecrecion* y los valores de tiempo de *tsecrecionI* 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 k_1

```
> lines(spline(tsecrecionI,isecreccion),lty=1,lwd=2)
```

La Figura 33 representa gráficamente el ajuste realizado y el sector de la curva de insulinemia utilizada en la estimación de k_1 . El buen ajuste de los datos experimentales, garantiza en gran parte los supuestos realizados y las funciones utilizadas.

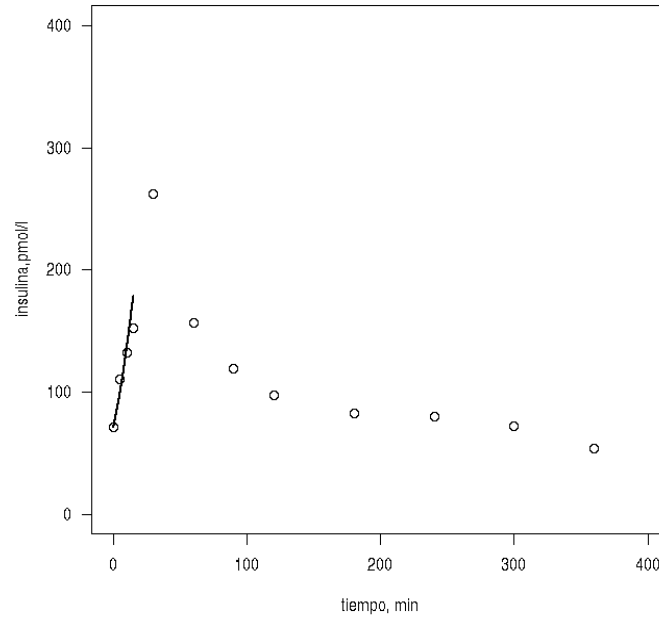


Figura 33: Ajuste de la secreción de insulina para la estimación de k_1 . Los círculos representan los valores experimentales de insulina y la línea continua el ajuste realizado a los puntos de insulina de 0-15 min del cual se estimó el valor de k_1 .

6.1.4 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 (I_M), el decaimiento de los valores de insulina plasmática indican un predominio del proceso de desaparición de la hormona por sobre los otros procesos. Estos datos de insulinemia pueden ser ajustados con una función de decaimiento monoexponencial.

$$I = I_a + (I_{Mi} - I_a)e^{-k_6(t-t_{Mi})}$$

Ecuación 5

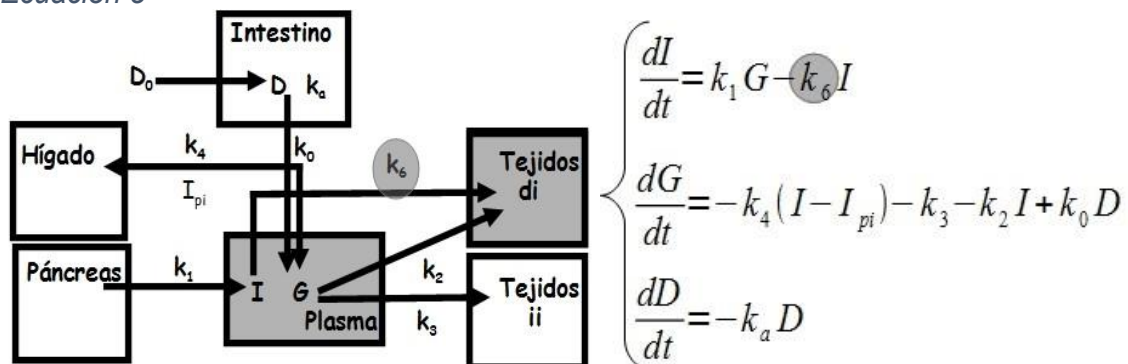


Figura 34: Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe en la sección 6.1.4. Estimación de k_6

De la Ecuación 5, I_a es la insulinemia de ayuno (que es el valor medido a tiempo 0), t_{Mi} es el tiempo en el que se alcanza I_{Mi} , e I_{Mi} es el valor máximo de insulina que se puede observar en la Figura 27 y en Tabla 3. Pero no tenemos certeza si ese valor corresponde al máximo, un ajuste a los puntos en el entorno del máximo utilizando, por ejemplo, un polinomio de segundo orden, parecería ser una mejor opción. Pero en este caso lo resolvemos con los valores de la tabla “Rata33”.

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 (selección acotada) de datos que contenga los valores de insulinemia para tiempos mayores al máximo de insulina y menor o igual al mínimo de glucosa sanguínea.

```
> tabla6<-data.frame(subset(Rata33,t>=tMi & t<=tmg,select=c(t,I)))
> tabla6
```

t	I
30	261.79
60	156.65
90	119.20
120	97.91
180	82.66
240	80.10
300	72.00
360	53.69

Tabla 8: Valores de insulinemia para tiempos mayores a la insulinemia máxima ingresada como tabla6 en R.

Ahora realizamos el ajuste o lineal con la función $nls()$ de manera de averiguar el único parámetro desconocido que es k_6 . 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:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_6}$$

que 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
 491.402: 0.02376087
 491.183: 0.02386121
 491.181: 0.02386923
 491.181: 0.02386984
```

El último valor es el valor estimado de k_6 , que incorporamos a nuestro espacio de trabajo:

```
> k6<-0.02386984
```

Para graficar los datos involucrados en este proceso de estimación, en primer lugar definimos una función exponencial que describirá el decaimiento de la concentración de insulina luego del máximo, que llamamos *Ieliminacion*.

```
> Ieliminacion<-function(t){Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(t-tMi))}
```

En base a los datos de la “tabla6” (Tabla 8), definimos un vector *teliminacionI* que contiene valores de tiempo de la misma.

```
> teliminacionI<-seq(30,360,0.1)
```

Utilizando la función *Ieliminacion* y el vector *teliminacionI*, calculamos los valores de Insulina ajustados por la función *Ieliminacion*

```
> 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 Rata 33,

```
> points(Rata33$t,Rata33$I,cex=1.5,pch=1)
```

y la línea de ajuste de los valores con la función *Ieliminacion*

```
> lines(spline(teliminacionI,Ieliminacion))
```

Obtenemos así la Figura 35, que muestra un buen ajuste a los datos experimentales, dando garantía a los supuestos y procedimiento utilizados al estimar el parámetro.

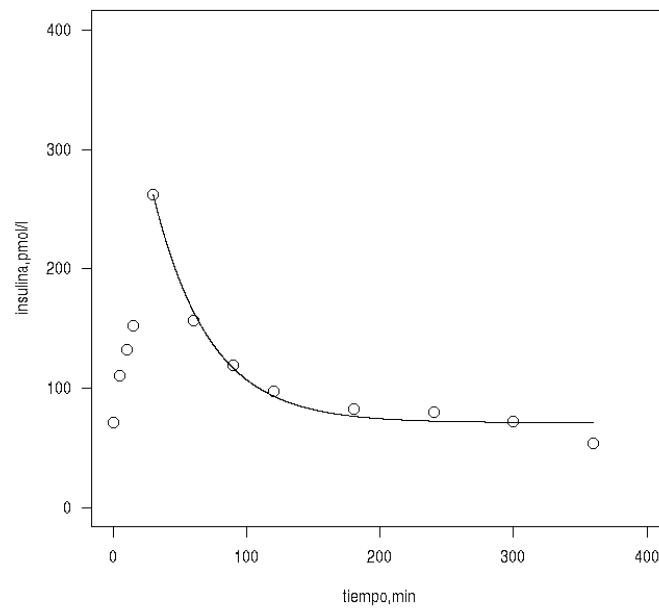


Figura 35: Estimación de k_6 . Los círculos representan los valores experimentales de insulina en el animal en estudio luego de una PTGO. La línea continua la gráfica de ajuste lograda con la función desarrollada a tal fin.

6.1.5 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 resaltado en la Figura 36.

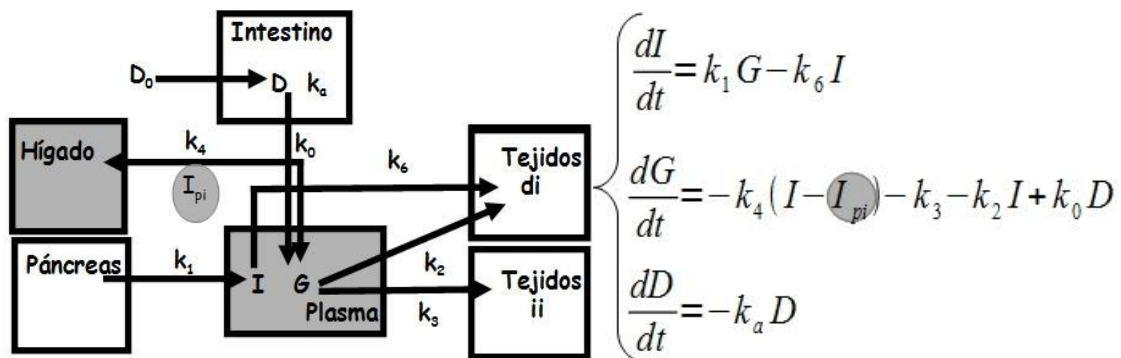


Figura 36: Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris el parámetro cuyo proceso de estimación se describe en la sección 6.1.5 Estimación de I_{pi} .

Luego de que la glucemia alcanza su valor máximo (G_{Mg}) 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 6

Donde B es una constante propia de cada animal, t_{pi} 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. G_a es el valor basal de glucosa medido al comienzo del experimento. G_{Mg} es la concentración de glucosa máxima luego de una sobrecarga de glucosa.

Empleando la Ecuación 6 para ajustar los datos de la glucemia desde su valor máximo, se puede obtener t_{pi} 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 I_{pi} y se puede obtener valorizando la ecuación:

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a)e^{-k_6(t-t_{MI})}$$

en el tiempo t_{pi}

$$I_{pi} = I_a + (I_{MI} - I_a)e^{-k_6(t_{pi}-t_{MI})}$$

Ecuación 7

Para realizar el proceso de estimación de la constante I_{pi} , 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(Rata33,t>=tMg,select=c(t,G)))
> tabla5
```

t	G
30	271.0
60	244.6
90	200.0
120	148.2
180	129.8
240	86.3
300	103.2
360	94.9

Tabla 9: valores de glucosa a tiempos mayores al cual se alcanzó el máximo nombrada tabla5 en el entorno de R

Realizamos un ajuste no lineal de los datos utilizando la ecuación sigmoidea planteada anteriormente. Ciertas constantes como G_a y G_{Mg} , ya fueron inicializadas. Los parámetros tpi y B serán estimados con la función $nls()$ asignando valores iniciales para el cálculo, los cuales podrán ser datos promedios de los mismos hallados en experimentos anteriores o valores tentativos.

Para evitar errores chequeamos en tabla “Rata33” que las variables estén con sus valores correspondientes y posteriormente graficamos los datos de G en función del tiempo para obtener un valor de inicio para tpi , que estará entre 30 y 360 min, Figura 37.

```
> plot(Rata33$t,Rata33$G)
```

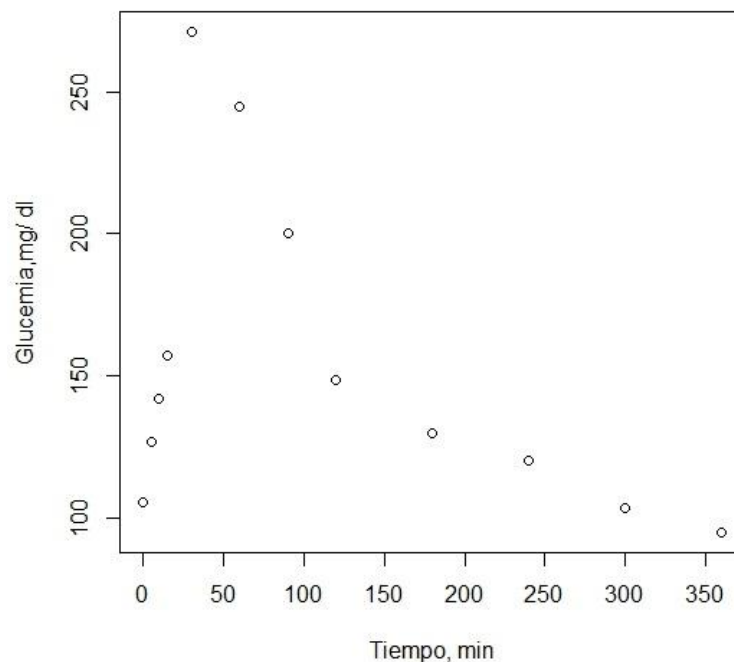


Figura 37: Glucemia en función del tiempo.

Observamos que en 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, la segunda el parámetro t_{pi} y la tercer columna el parámetro B . Asignamos los valores estimados de éstos a las variables t_{pi} y B .

```
> tpi<- 97.97490
> B<-23.71296
```

Ahora calculamos I_{pi} , utilizando la Ecuación 7 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))
```

Graficamos a continuación el proceso, como haremos dos gráficas crearemos un espacio para ambas (Figura 38).

```
> par(mfrow=c(1,2))
```

En la primera 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(Rata33$t,Rata33$G)
```

Creamos la función para el ajuste de los datos de glucemia luego del máximo según la ecuación:

$$G = G_a + \frac{G_{Mg} - G_a}{1 + e^{\left(\frac{(t-t_{pi})}{B}\right)}}$$

La misma la 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(tgi,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(Rata33$t,Rata33$I)
```

y por último, colocamos la función de ajuste correspondiente a la ecuación.

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,

```
> tIpi<-seq(tMi,400,0.1)
```

creamos un vector con los valores de insulina para dicho intervalo utilizando la función *Ilpi*, al que llamamos *ilpi*,

```
> ilpi<-Ilpi(tIpi)
```

representamos la línea de ajuste,

```
> lines(spline(tIpi,ilpi))
```

y colocamos el valor de *Ipi* en la gráfica.

```
> points(tpi,Ilpi(tpi),pch=19,cex=1.5)
```

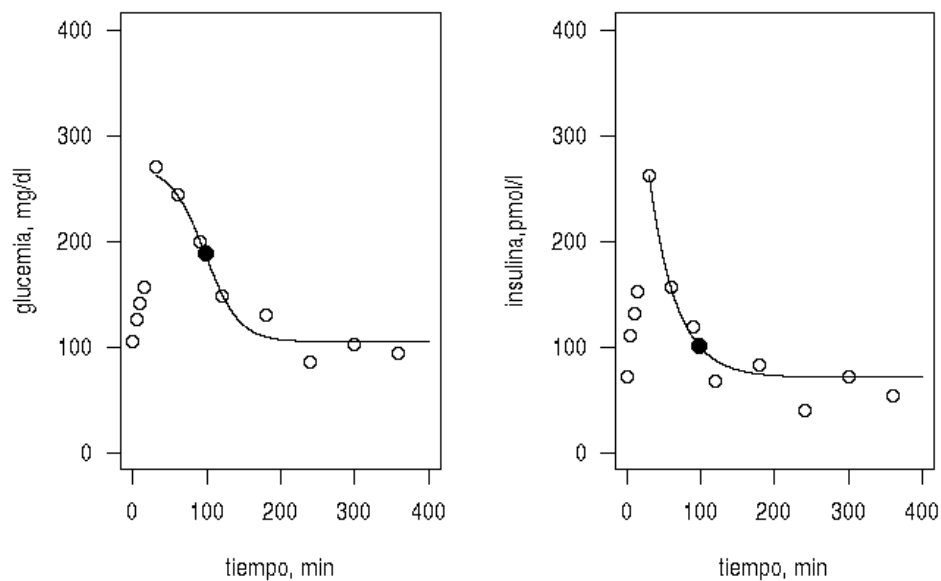


Figura 38: Izquierda: los círculos representan la glucemia, la línea continua el ajuste de los datos con la función accesoria y el círculo negro representa el punto de inflexión de la glucemia. A la derecha se representa la insulinemia en círculos. La línea continua representa el ajuste realizado con la función accesoria y el círculo negro, representa el valor de insulina en que se produce el cambio de consumo-producción de insulina (*Ipi*).

6.1.6 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 39.

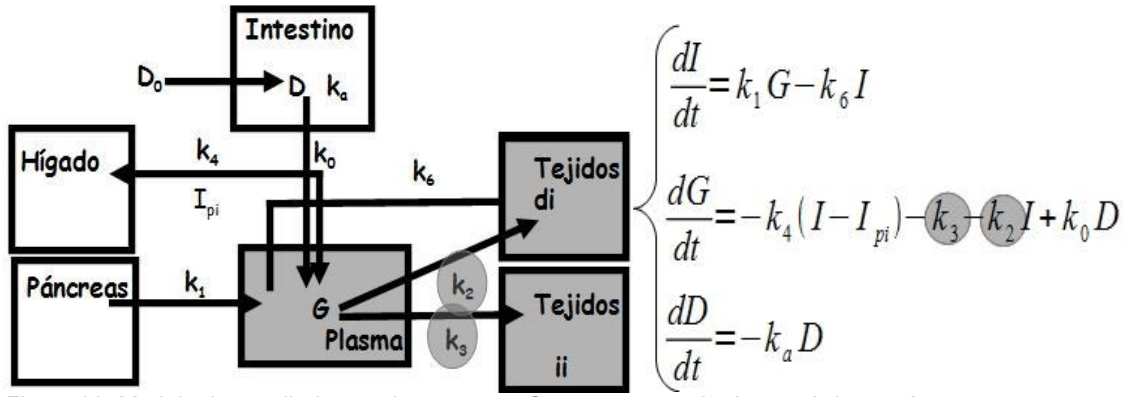


Figura 39: Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris los parámetros cuyo proceso de estimación se describen en la sección 6.1.6. Estimación de k_2 y k_3

En el tiempo t_{pi} , la glucemia tendrá el valor G_{pi} , la insulinemia 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 insulinemia 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:

$$\frac{dG}{dt}(t_{pi}) = -k_3 - k_2I_{pi}$$

Como la glucemia en función del tiempo luego de producido el máximo de glucosa plasmática se puede aproximar por la siguiente ecuación,

$$G = G_a + \frac{G_{Mg} - G_a}{1 + e^{\left(\frac{(t-t_{pi})}{B}\right)}}$$

y 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 (t_1 y t_2) cercanos a t_{pi} , obtenemos valores para $dG/dt(t_1)$ y $dG/dt(t_2)$, dado que G_a , G_{MF} , t_{pi} y B son conocidos.

Por otra parte con la Ecuación 8 y los tiempos t_1 y t_2 obtenemos valores de insulinemia (I) a dos tiempos que llamamos I_1 e I_2 .

$$I = I_a + (I_{MI} - I_a)e^{-k_6(t-t_{MI})}$$

Ecuación 8

Así con los valores: $dG/dt(t_1)$, $dG/dt(t_2)$, I_1 e I_2 se obtiene un sistema de ecuaciones lineales (Ecuación 9 y Ecuación 10):

$$\frac{dG}{dt}(t_1) = -k_3 - k_2 I_1$$

Ecuación 9

$$\frac{dG}{dt}(t_2) = -k_3 - k_2 I_2$$

Ecuación 10

de cuya solución se obtienen los valores para k_2 y k_3 .

Para realizar el cálculo, creamos una variable dG_1 que tendrá el valor de la derivada de G a tiempo anterior a t_{pi} . Arbitrariamente y apoyado por la experiencia tomamos un valor -10, para la diferencia entre t y t_{pi} .

```
> dG1<-((Ga-GMg)*exp((-10)/B))/(B*(1+exp(-10/B))^2)
```

Para tiempo posterior a t_{pi} tomamos 5 minutos

```
> dG2<-((Ga-GMg)*exp((5)/B))/(B*(1+exp(5/B))^2)
```

Hallamos I_1 para los 10 minutos anteriores

```
> I1<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi-10-tMi))
```

e I_2 para los 5 minutos posteriores

```
> I2<-Ia+(IMi-Ia)*exp(-k6*(tpi+5-tMi))
```

Con estos valores calculamos k_2 y k_3 .

En primer lugar restamos miembro a miembro de las ecuaciones lineales Ecuación 9 y Ecuación 10 de lo cual obtenemos:

$$dG_1 - dG_2 = k_2 * (I_2 - I_1)$$

donde despejamos k_2 y calculamos:

```
> k2<-(dG1-dG2)/(I2-I1)
```

> k2

-0.003911028

Reemplazamos luego este valor en

> k3<--dG1-k2*I1

y así obtenemos el valor de k3

> k3

2.138173

6.1.7 Estimación de k_4

Veremos ahora la estimación del parámetro k_4 que se trata de la constante de velocidad de toma (para glucogenogénesis) o liberación de glucosa (por glucogenolisis y/o gluconeogénesis) por el hígado. En base al esquema siguiente:

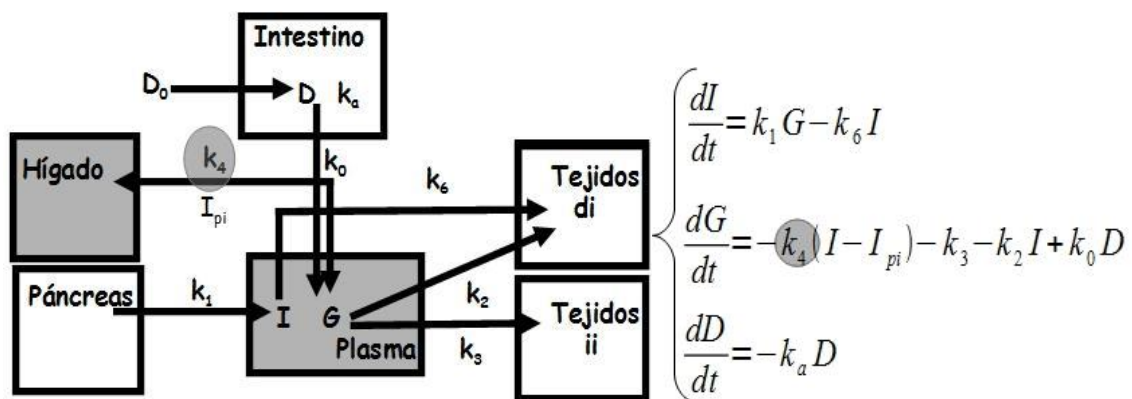


Figura 40: Modelo desarrollado para la rata sana. Se muestra resaltado en gris los parámetros cuyo proceso de estimación se describe a continuación

Podemos suponer que en ayuno la glucemia puede ser considerada constante, por lo cual la $dG/dt=0$. Por otra parte en ayunas $D=0$, por lo que el término $k_0 D$, tomará el valor cero. El consumo de glucosa dependiente de insulina ($k_2 I$) 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:

$$-k_4 (I_a - I_{pi}) - k_3 = 0$$

Como k_3 ya fue estimada I_a e I_{pi} son variables o parámetros ya conocidos se puede estimar el valor de k_4 a partir de la Ecuación 11:

$$k_4 = \frac{-k_3}{(I_a - I_{pi})}$$

Ecuación 11

El cálculo es llevado a cabo en R

```
> k4<-k3/ (Ia-Ipi)
> k4
```

```
0.05687286
```

Así finalizamos el proceso de estimación de los parámetros del modelo, que resumimos a continuación para la rata en estudio.

```
> ka
[1] 0.03073695
> ke
[1] 0.0038
> k0
0.002892315
> k1
[1] 0.04421316
> k2
-0.003911028
> k3
2.138173
> k4
0.05687286
> k6
0.02386989
> Ipi
108.9257
> Vd
10.19626
> Ga
```

```
[1] 105.2
```

```
> la
```

```
[1] 71.33
```

```
> Do
```

```
[1] 1500
```

7 APÉNDICE 2

7.1 Optimización de parámetros de la homeostasis glucosa insulina

Los valores estimados obtenidos en el apéndice 2 son los siguientes:

```
ka= 0.03073695
ke= 0.0038
k0= 0.002892315
k1= 0.04421316
k2= 0.003911028
k3= 2.138173
k4= 0.05687286
k6= 0.02386989
lpi= 108.9257
Vd= 10.19626
Ga= 105.2
la= 71.33
Do= 1500
```

Con estos valores enfrentamos el proceso de optimización de los mismos que consiste en hallar valores más representativos y ajustados de los parámetros a todos los valores 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.

7.1.1 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*lpi
dD=-ka*D
return(list(c(dI,dG,dD)) )
})
}
valoresayuna<-c(I=la,G=Ga,D=Do)
```

```
return(ode(y=valoresayuna,times=times,func=derivs,parms=parametros))
}
```

Esta función tiene como variables a “*parámetros*” y “*times*”.

Creamos 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,lpi=lpi,
ka=ka)
```

Asignamos estos datos al objeto “*parámetros*”, que utiliza la función *homeostasis()* recién definida:

```
>parametros<-parametrosestimados
```

Cargamos la biblioteca *FME*, necesaria para trabajar con sistemas de ecuaciones diferenciales:

```
> library(FME)
```

En primer lugar calculamos, utilizando los valores de los parámetros estimados los valores de *I*, *G* y *D*, utilizando la función “*homeostasis*”. Almacenamos 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="Tiempo,min",ylab="Concentración",xlim=c(0,400))
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
```

y además graficamos los valores experimentales de *G* e *I* que hallamos en la denominada Rata33 expresada en APÉNDICE 1:

```
> points(Rata33$time,Rata33$G,pch=20,col='blue')
```

```
> points(Rata33$time,Rata33$I,pch=20,col='black')
```

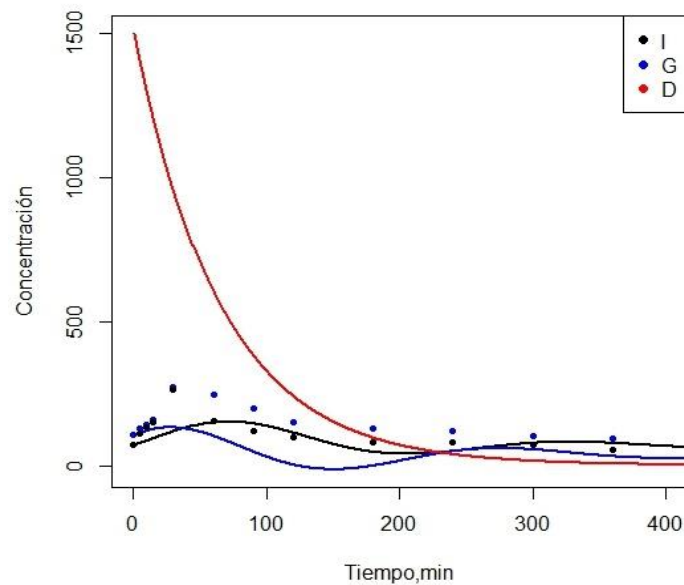


Figura 41: Optimización de valores experimentales de G e I .

Como podemos ver Figura 41, 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.

Para lograr esto, 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 se obtiene cuando se aplica 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=Rata33,model=out))
}

```

El proceso de optimización lo planteamos para realizarlo en sucesivos ciclos que básicamente representamos en la Figura 42. Con los parámetros estimados a partir de datos experimentales y funciones auxiliares, junto con la utilización de la función que representa el modelo y una función llamada *objetivo*, podemos por medio de la función *ModFit()* optimizar primero, los parámetros k_0 y k_1 . En el paso siguiente logramos la optimización de los parámetros k_2 y k_3 , utilizando ahora para los parámetros k_0 y k_1 , los valores optimizados del ciclo anterior. Luego se realiza lo mismo para optimizar k_6 . Se puede seguir con el mismo planteo para optimizar los parámetros lpi , ka y k_4 que restan.

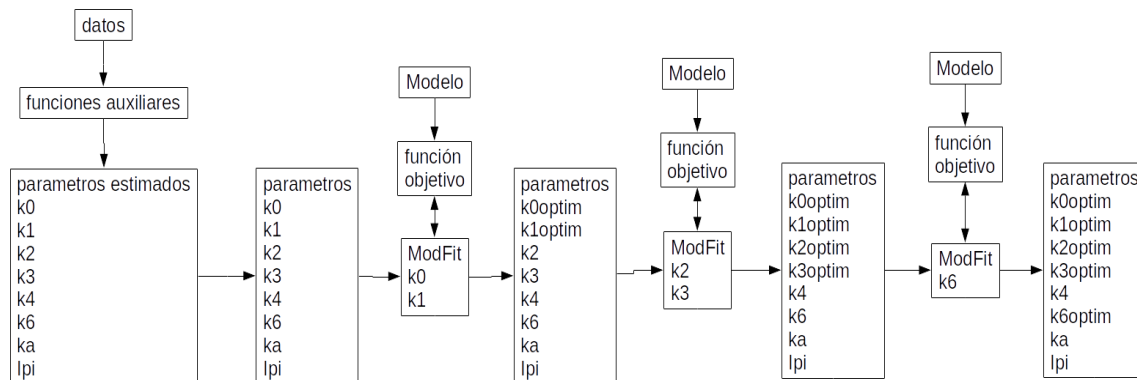


Figura 42: Ciclo de optimización de parámetros

7.1.2 Optimización de los parámetros k_0 y k_1

El proceso de optimización de varios parámetros, como ocurre en este caso, y con relativamente pocos datos, como también ocurre en esta situación, puede resultar muy difícil. Se realiza, en primer lugar, el proceso de optimización de solo dos de ellos, dejando los otros con los valores estimados.

A modo de ejemplo optimizamos solo los parámetros k_0 y k_1 . Utilizamos para esto la función *modFit()* del paquete *FME* del software R, que asigna al objeto *Fit* el resultado del proceso. La función *modFit()* interpreta cuáles son los parámetros a optimizar, ya que en el argumento **p** de la función, indican los valores estimados de los mismos.

Además es necesario colocar una restricción en la optimización, que es, que los parámetros puedan tener como valor mínimo cero, es decir que no sean negativos. Esto queda indicado en el argumento “*lower*”. En este argumento tiene que existir tantos números como parámetros que estamos optimizando. En caso que el argumento “*lower*” sea omitido, el proceso de optimización no registra límites mínimos y podrían así existir valores de parámetros que sean negativos. Aunque en este caso no lo utilizamos, se puede incluir el argumento “*upper*”, que fija valores máximos de los parámetros. Estos argumentos son fijados en función de conocimientos biológicos o propios del sistema. Por ejemplo, la variable *I_{pi}*, que es el valor de la concentración de insulina en un dado tiempo del proceso estudiado, la misma, 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 debe 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
```

Observamos que el contenido del objeto *Fit*, hallamos los valores estimados de *k₀* y *k₁*. Además en la salida de *summary()*, mostrada a continuación, 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 k_0 y k_1 .

Para ello, debemos crear dos objetos que tengan los valores optimizados de los parámetros:

```
> k0optim<-Fit$par[1]
> k1optim<-Fit$par[2]
```

Posteriormente creamos un vector con los parámetros optimizados, dejando los valores estimados para aquellos que no fueron optimizados todavía.

```
>parametrosoptimizados<-list(k0=k0optim,k1=k1optim,k2=0.0003911028,
k3=2.138173, k4=0.05687286,k6=0.02386989,lpi=108.9257,ka=0.03073695)
```

Asignamos al objeto parámetros, los valores de *parametrosoptimizados*:

```
> parametros<-parametrosoptimizados
```

Y así, es ejecutada nuevamente la función homeostasis para obtener los valores de nuestro modelo, datos que son almacenados 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 mostradas antes de la optimización.

```
matplot(salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,
col=c("black","blue","red"),xlab="Tiempo,min",ylab="Concentración",
xlim=c(0,400))
legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
points(Rata33$time,Rata33$G,pch=20,col='blue')
points(Rata33$time,Rata33$I,pch=20,col='black')
```

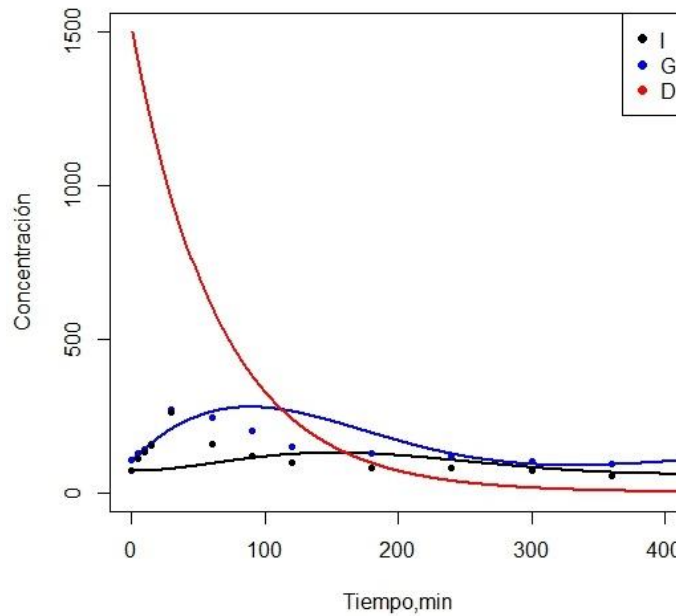


Figura 43: Optimización de parámetros k_0 y k_1 .

Podemos comprobar el mejor ajuste del modelo si comparamos Figura 43 la con la Figura 41.

7.1.3 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
```

Nuevamente graficamos nuestros datos y el modelo, pero incluyendo ahora los valores optimizados de k_0 , k_1 , k_2 y k_3 .

Para ello, en primer lugar, creamos cuatro 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]
```

También debemos crear un vector con los parámetros optimizados, dejando los valores estimados, en aquellos que no hemos optimizado aún.

```
>parametrosoptimizados<-list(k0=k0optim,k1=k1optim,k2=k2optim,k3=k3optim,
k4=0.05687286, k6=0.02386989, lpi=108.9257, ka=0.03073695)
```

Asignamos al objeto *parametros*, los valores de *parametrosoptimizados*:

```
> parametros<-parametrosoptimizados
```

Nuevamente ejecutamos 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 mostradas antes de la optimización

```
>matplot(salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,
col=c("black","blue","red"), xlab="Tiempo,min",ylab= "Concentración",
xlim=c(0,400))
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
> points(Rata33$time,Rata33$G,pch=20,col='blue')
> points(Rata33$time,Rata33$I,pch=20,col='black')
```

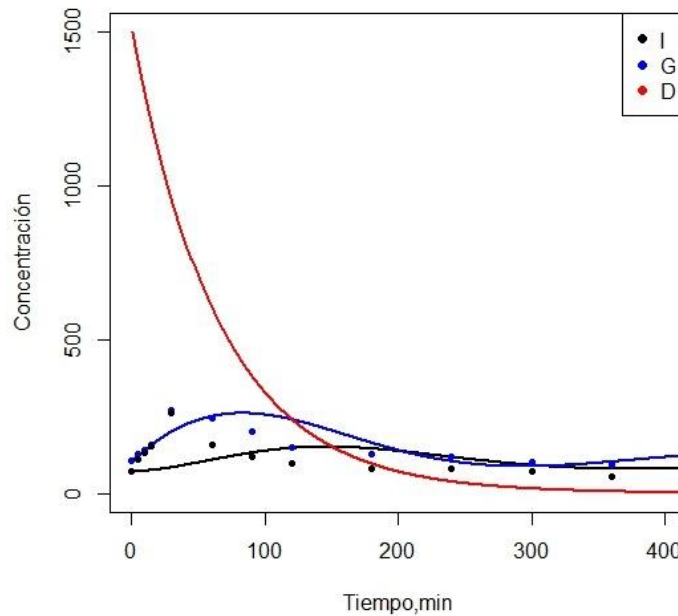


Figura 44: Optimización de parámetros k_0 , k_1 , k_2 y k_3 .

7.1.4 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 y 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
2.92 0.15 3.14
```

```
> 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 k_0 , k_1 , k_2 , k_3 y k_6 .

Para ello en primer lugar creamos cinco 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]
```

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,lpi=108.9257,ka=0.03073695)
```

Asignamos al objeto *parametros*, los valores de *parametrosoptimizados*:

```
> parametros<-parametrosoptimizados
```

Ejecutamos nuevamente la función *homeostasis* para obtener los valores de nuestro modelo, datos que son almacenados 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 mostradas en las anteriores optimizaciones:

```
>matplot (salidaoptimizada[,c(2:4)],type="l",lty=1,lwd=2,
col=c("black","blue","red"), xlab="Tiempo,min",ylab= "Concentración",
xlim=c(0,400))
> legend('topright',c('I','G','D'),pch=19,col=c('black','blue','red'))
> points(Rata33$time,Rata33$G,pch=20,col='blue')
> points(Rata33$time,Rata33$I,pch=20,col='black')
```

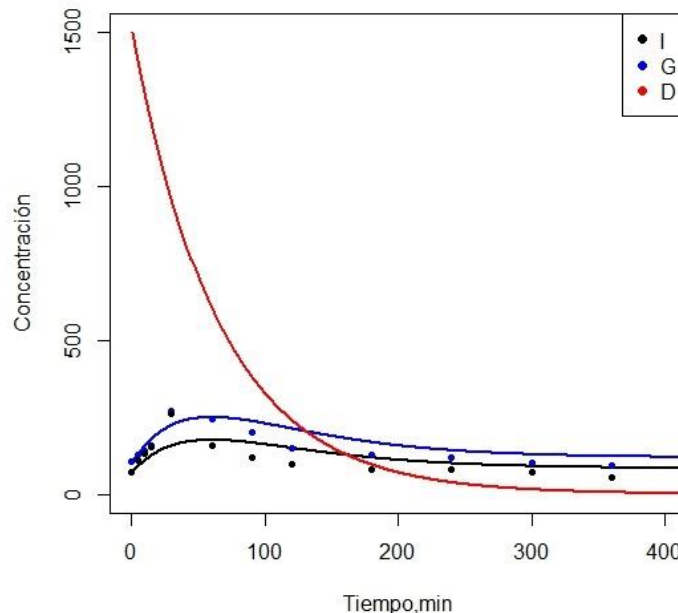
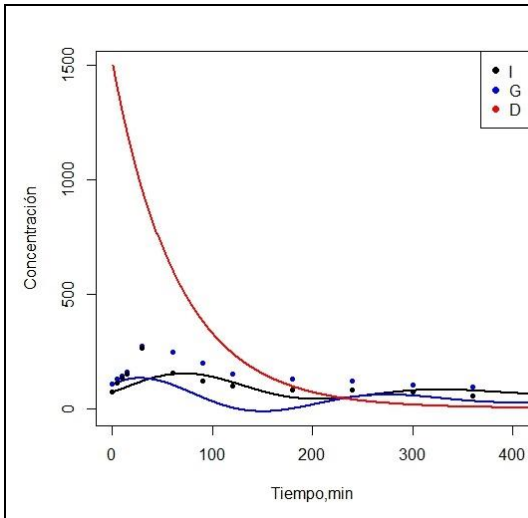


Figura 45: Optimización de parámetros k_0 , k_1 , k_2 , k_3 y k_6 .

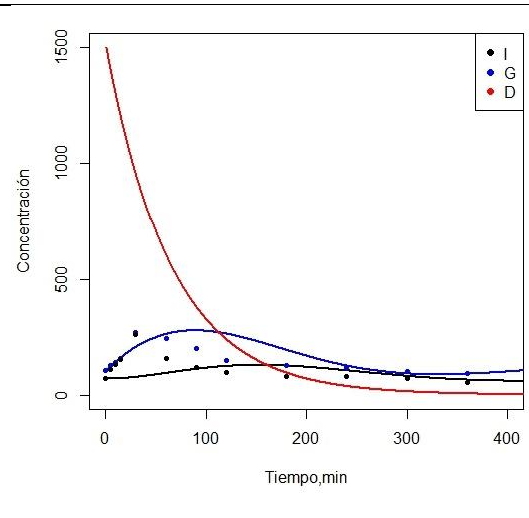
Podemos comprobar que con 5 parámetros optimizados hemos mejorado de manera considerable el ajuste de los datos experimentales con nuestro modelo.

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.

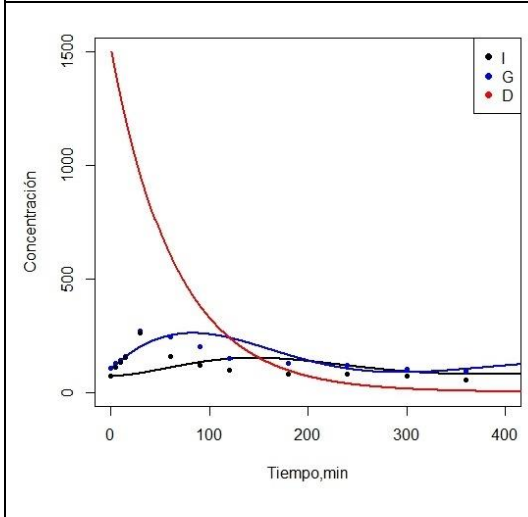
A continuación y a modo de resumen se muestran la progresión de los ajustes al aumentar el número de parámetros optimizados:



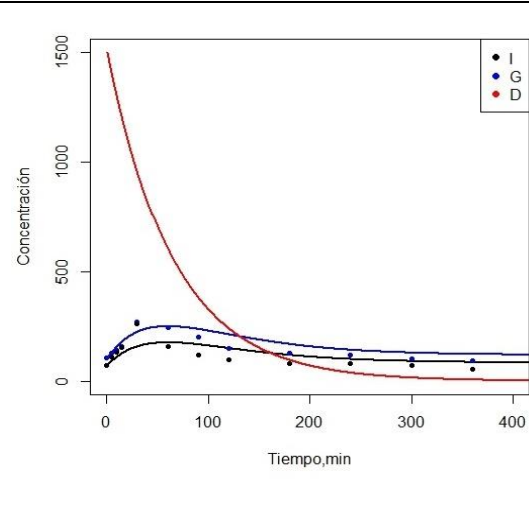
Ningún parámetro optimizado.
Todos los valores de los parámetros utilizados fueron los valores estimados.



Con 2 parámetros optimizados.



Con 4 parámetros optimizados



Con 5 parámetros optimizados

8 APÉNDICE 3

8.1 Inconvenientes en la técnica de perfusión de cerebro

Esta clase de cirugías se pueden considerar de mediana a alta complejidad y requieren de un gran entrenamiento por parte del cirujano y equipo. Con el fin de evitar muertes innecesarias de animales, todo el equipamiento estuvo preparado desde la primera cirugía, de forma que si se podía completar el experimento los datos pudieran ser recolectados. Si la cirugía resultaba exitosa, se procedía a guardar las muestras y si no lo era, se utilizaba como entrenamiento en la técnica.

El procedimiento quirúrgico tuvo distintas complicaciones que comprometieron la obtención de datos confiables y adecuados para el análisis. En algunos de los procedimientos la anestesia presentó complicaciones que culminaron con la muerte del animal. En otras situaciones las arterias carótidas no pudieron ser canalizadas. También existieron cirugías en las que el animal a intervenir murió por complicaciones durante el proceso anestésico, sin embargo se continuó con la perfusión y de ser posible se realizó la recolección de muestras.

En la tabla siguiente se muestra cada animal intervenido, el tratamiento, si se logró o no la perfusión y la condición resultante del experimento.

La Tabla 10 incluye el total de cirugías realizadas con las siguientes descripciones. En la columna RATA figura el número que se le asignó para identificar a cada animal, TRATAMIENTO: indica el tratamiento recibido por el animal previo a la cirugía (DUSO: una dosis única por vía oral, AB: tratamiento con agua de bebida por 30 días, Fluoruro: tratamiento con fluoruro, Control: animal que recibe tratamiento pero sin fluoruro). La columna PERFUSIÓN indica con "Si" cuando la cirugía y perfusión se desarrolló con éxito generando datos para su análisis, mientras que "NO" indica que alguna complicación impidió la obtención de datos confiables para el análisis.

Los experimentos incluidos en el análisis de datos posterior son aquellos con CONDICIÓN: Recolección de muestras.

RATA	TRATAMIENTO	PERFUSIÓN	CONDICIÓN
100	DUSO-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
10	DUSO-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
3	DUSO-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
1	DUSO-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
800	DUSO-Control	No	Murió por anestesia, exploración, sin recolección de perfusato.
200	DUSO-Control	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
40	DUSO-Control	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
6	DUSO-Control	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
4	DUSO-Control	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
2	DUSO-Control	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
13	AB-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
12	AB-Fluoruro	No	Murió en el procedimiento, exploración, sin recolección de perfusato.
60	DUSO-Fluoruro	Si	Recolección de muestras.
33	DUSO-Fluoruro	Si	Recolección de muestras.
20	DUSO-Fluoruro	Si	Recolección de muestras
210	DUSO-Control	Si	Recolección de muestras.
11	DUSO-Control	Si	Recolección de muestras.
300	AB-Fluoruro	Si	Recolección de muestras.
41	AB-Fluoruro	Si	Recolección de muestras.
30	AB-Fluoruro	Si	Recolección de muestras.
430	AB-Control	Si	Recolección de muestras.

Tabla 10: Resumen de cirugías realizadas en el procedimiento de perfusión

8.2 Criterios de inclusión

Se establecieron los siguientes criterios para incluir los animales a utilizar en el análisis de los datos:

- ✓ Correcto cateterismo de una arteria carótida y una vena yugular. Entendiendo como correcto cateterismo, aquel que permitió la introducción y ligado de los catéteres.
- ✓ Un flujo estable de la SP y mantenimiento de la presión de perfusión en los valores indicados más arriba.
- ✓ Un mínimo en la recolección de 4 tubos de SP sin el agregado de fluoruro.
- ✓ Que se lograra cambiar al SP con fluoruro y sobrepasara el volumen muerto de los catéteres.
- ✓ Un mínimo en la recolección de 4 tubos de perfusato impulsado por el SP con el agregado de F⁻.

Los perfusatos recolectados se centrifugaron, se guardó el sobrenadante y con una alícuota de 5 µl de cada tubo se midió la concentración de glucosa. Simultáneamente se midió la concentración de glucosa de la SP sin y con F⁻ utilizadas en la perfusión. La medición de glucosa se realizó como se indicó con el equipamiento correspondiente.

Con la concentración de glucosa de la SP utilizada, el volumen infundido por la bomba y el tiempo se calculó la velocidad de ingreso de glucosa por el catéter colocado en la ACI. Con la concentración de glucosa, el volumen de cada tubo y el tiempo de recolección, se calculó la velocidad de salida de glucosa por el catéter colocado en la VYD. Por diferencia entre el ingreso y la salida de glucosa se obtuvo velocidad de consumo de glucosa de cada animal durante la perfusión.

La siguiente tabla es un ejemplo de la recolección y conversión de datos de un animal perfundido. Nótese que la fila tonalizada con verde corresponde al punto de cambio de solución de perfusión.

Tubo	F	Cc gl perf	Veloc ing	Vel (ml/min)	Tpo recolec (min)	Tiempo acumulado	Vol perf (ml)	Vol acumulado	Veloc infus (mgglc/min)	Veloc efusión (mgglc/min)	Vconsumo (mgglc/min)
1	no	1.144	1*4	0.416	1	1	1.2141	1.2141	0.36	0.48	-0.11
2	no	0.837	1*4	0.416	3	4	1.1454	2.360	0.36	0.35	0.01
3	no	0.704	1*4	0.416	2	6	1.3051	3.665	0.36	0.29	0.07
4	no	0.691	1*4	0.416	4	10	1.3478	5.012	0.36	0.29	0.07
5	no	0.372	1*6	0.509	3	13	1.334	6.346	0.44	0.19	0.25
6	si	0.642	1*6	0.509	3	16	1.3152	7.662	0.44	0.33	0.12
7	si	0.825	1*6	0.509	4	20	1.5281	9.190	0.44	0.42	0.02
8	si	0.742	1*8	0.775	3	23	1.1786	10.368	0.67	0.58	0.10
9	si	0.416	1*8	0.775	4	27	1.3362	11.705	0.67	0.32	0.35

Tabla 11: recolección y conversión de datos de un animal perfundido.

Se tomaron para el análisis, los valores de las 9 ratas en las que se completaron los criterios de inclusión. Para poder utilizar la velocidad de consumo de glucosa se seleccionaron los últimos 4 valores de velocidad y el punto correspondiente al cambio de la solución de perfusión sin F (SP-F) a la SP con F (SP+F). Con estos valores se realizó un promedio dándole entidad a la velocidad de consumo de glucosa en ausencia de F⁻ en la SP (VCG-F). De forma similar se promediaron los 4 valores de velocidad de consumo de glucosa posterior al cambio al SP+F (VCG+F) teniendo en cuenta de no incluir el volumen muerto correspondiente del catéter. Luego se hizo la correspondiente comparación entre ambos valores de la misma rata. Se consideró que la velocidad de consumo de glucosa es “mayor o aumenta” si el valor VCG+F es mayor al valor VCG-F. De forma contraria se consideró que el valor de la velocidad de consumo de glucosa es “menor o disminuye” si el valor VCG+F es menor numéricamente al valor VCG-F.

Se realizaron test estadísticos tanto cualitativos como cuantitativos de estos de manera de realizar un análisis completo de los datos.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Jiménez-Zabala A, Santa-Marina L, Otazua M, Ayerdi M, Galarza A, Gallastegi M, et al. Ingesta de flúor a través del consumo de agua de abastecimiento público en la cohorte INMA-Gipuzkoa. *Gac Sanit*. 2018;32(5):418–24.
2. Chirkes JD, Heredia OS, Fernández Cirelli A. Silicio y flúor en la llanura pampeana argentina. *IRFH 2014 - 2do Encuentro de Investigadores en Formación en Recursos Hídricos: resúmenes de trabajos*. 2014;
3. Dhar V, Bhatnagar M. Physiology and toxicity of fluoride. *Indian J Dent Res*. 2009;20(3):350.
4. Rigalli A, Ballina JC, Beinlich AD, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetic differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds in the rat. *Arzneimittelforschung*. 1994;44(6):762–6.
5. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol. 1, recommendations. 3rd ed. Geneva PP - Geneva: World Health Organization; 2008.
6. Sharma D, Singh A, Verma K, Paliwal S, Sharma S, Dwivedi J. Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;56:297–313.
7. Satyajeet K. Water fluoridation, dental fluorosis, bone fluorosis, and skeletal fluorosis among persons in the hojai sub-division, nagaon district, assam, india: a quantitative overview. *India. Fluoride*. 2012;45(3):180.
8. Zhou Y, Qiu Y, He J, Chen X, Ding Y, Wang Y, et al. The toxicity mechanism of sodium fluoride on fertility in female rats. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:566–72.
9. Basha PM, Sujitha NS. Combined Impact of Exercise and Temperature in Learning and Memory Performance of Fluoride Toxicated Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012;150(1–3):306–13.
10. Lima Leite A, Lobo JGVM, Pereira HABS, Silva Fernandes M, Martini T, Zucki F, et al. Proteomic Analysis of Gastrocnemius Muscle in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes and Chronically Exposed to Fluoride. *PLoS One*. 2014;9(9):e106646.
11. Lobo JGVM, Leite AL, Pereira HABS, Fernandes MS, Peres-Buzalaf C, Sumida DH, et al. Low-level fluoride exposure increases insulin sensitivity in experimental diabetes. *J Dent Res*. 2015;94(7):990–7.
12. Lombarte M, Fina BL, Lupión PM, Lupo M, Rigalli A. In vivo measurement of fluoride effects on glucose homeostasis: an explanation for the decrease in intelligence quotient and insulin resistance induced by fluoride. *Fluoride*. 2016;49(September):204–10.
13. Lombarte M, Fina BL, Lupo M, Buzalaf M, Rigalli A. Physical exercise ameliorates the toxic effect of fluoride on the insulin-glucose system. *J Endocrinol*. 2013;218(1):99–103.
14. Lupo M, Buzalaf MAR, Rigalli A. Effect of Fluoridated Water on Plasma Insulin Levels and Glucose Homeostasis in Rats with Renal Deficiency. *Biol Trace Elem Res*. 2011;140(2):198–207.
15. Fina BL, Lupo M, Da Ros ER, Lombarte M, Rigalli A. Bone Strength in Growing Rats Treated with Fluoride: a Multi-dose Histomorphometric,

- Biomechanical and Densitometric Study. *Biol Trace Elem Res*. 2018;185(2):375–83.
16. Lupo M, Brance ML, Fina BL, Brun LR, Rigalli A. Methodology developed for the simultaneous measurement of bone formation and bone resorption in rats based on the pharmacokinetics of fluoride. *J Bone Miner Metab*. 2014;33(1):16–22.
 17. Lupo M, Neira M V, Chulibert ME, Vaquero S, Lombarte M. Use of fluoride for the measurement of bone remodelling in rats and human beings. *Fluoride*. 2020;53:477–82.
 18. Goschorska M, Giewoń K, Hasior N, Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Rać ME, et al. The protective properties of selected naturally occurring antioxidants of plant origin against fluoride-induced neurotoxicity. *Fluoride*. 2017;50(2):203–12.
 19. Dec K, Łukomska A, Maciejewska D, Jakubczyk K, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, et al. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. *Biol Trace Elem Res*. 2017;177(2):224–34.
 20. Fina BL, Lombarte M, Rigalli JP, Rigalli A. Fluoride increases superoxide production and impairs the respiratory chain in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e100768.
 21. Blaylock RL. Excitotoxicity: A possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. Vol. 37, *Fluoride*. 2004. p. 301–14.
 22. Karimzade S, Aghaei M, Mahvi A, Tehran I. Investigation Of Intelligence Quotient In 9–12-Year-Old Children Exposed To High-And Low-Drinking Water Fluoride In West Azerbaijan Province, Iran. *Fluoride*. 2014;47(1):9–14.
 23. Lombarte M, Lupo M, Fina BL, Campetelli G, Buzalaf M, Basualdo M, et al. In vivo measurement of the rate constant of liver handling of glucose and glucose uptake by insulin-dependent tissues, using a mathematical model for glucose homeostasis in diabetic rats. *J Theor Biol*. 2018;439:205–15.
 24. Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung*. 1995;45(3):289–92.
 25. Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res*. 2005;55(08):455–60.
 26. Menoyo I, Puche RC, Rigalli A. Fluoride-induced resistance to insulin in the rat. *Fluoride*. 2008;41(4):260–9.
 27. Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone Miner*. 1992;16(2):101–8.
 28. Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcif Tissue Int*. 1990;46(5):333–8.
 29. Fina BL, Brance ML, Brun LR, Rigalli A. Fluoride inhibition of oxygen consumption and increased oxidative stress in rats. Vol. 45, *Fluoride*. 2012.
 30. Spittle B. Development of fluoride toxicity including cognitive impairment with reduced iq: pathophysiology, interactions with other elements, and predisposing and protective factors. *Fluoride*. 2016;49(September):189–93.
 31. Mérida JA, Jorge M. La Escala de la Ingeligencia de Binet y Simon (1905) su recepción por la Psicología posterior. *Rev Hist Psicol*.

- 2007;28(2/3):307–13.
32. Raven JC. The R.E.C.I. series of perceptual tests: an experimental survey. *Br J Med Psychol.* 1939;18(1):16–34.
 33. Pardo Ruiz JE, Torres Tabares F. Asociación entre la presencia de fluorosis dental y los niveles de coeficiente intelectual de niños escolares de cartagena. Universidad de Cartagena; 2015.
 34. García-Porrero JA, Hurlé JM. Anatomía humana. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2005. 500 p. (El libro Catedra).
 35. Chersi F, Burgess N. The Cognitive Architecture of Spatial Navigation: Hippocampal and Striatal Contributions. *Neuron.* 2015;88(1):64–77.
 36. Vicens P, Redolat R, Del Carmen Carrasco M. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema.* 2003;15(4):539–44.
 37. Hodges H. Maze procedures: The radial-arm and water maze compared. *Cogn Brain Res.* 1996;3(3–4):167–81.
 38. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11:47–60.
 39. Lombarte M, Lupo M, Campetelli G, Basualdo M, Rigalli A. Mathematical model of glucose-insulin homeostasis in healthy rats. *Math Biosci.* 2013;245(2):269–77.
 40. Russell WMS, Burch RL. The Principles of humane experimental technique. Wheathampstead: Universities Federation for Animal Welfare; 1992. 238 p.
 41. Lupo M, Di Loreto VE, Pera L, Rigalli A. Samples. In: Rigalli A, Di Loreto V, editors. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat.* 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press; 2009. p. 63–72.
 42. Lupo M, Di Loreto VE, Rigalli A. Substances administration. In: Rigalli A, Di Loreto V, editors. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat.* 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group - CRC Press; 2009. p. 55–62.
 43. Rigalli NF, Rigalli A. Biomedical data Acquisition Suite (BAS). Software de digitalización y adquisición de datos de laboratorio a partir de instrumentos de medición. Dirección Nacional de derecho de autor. Expte 973409. 2011.
 44. Rigalli A, Brun LR, Di Loreto VE, Pera L. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Editorial de la UNR; 2007.
 45. Hoerter J. Insulin increases the rate of degradation of 2-deoxy-glucose-6-phosphate in the perfused rat heart: A ³¹P NMR study. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23(10):1101–15.
 46. Chiba FY, Tsosura TV, Pereir RF, Mattera MS de LC, Dos Santos RM, Marani F, et al. Mild chronic NaF intake promotes insulin resistance and increase in inflammatory signaling in the white adipose tissue of rats. *Fluoride.* 2019;52(1):18–28.
 47. Snyder JM, Hagan CE, Bolon B, Keene CD. Nervous System. In: *Comparative Anatomy and Histology.* Elsevier Inc.; 2018. p. 403–44.
 48. Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem behavior.* 1980;13:453–6.
 49. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Austria; 2017.
 50. Duan Q, Jiao J, Chen X, Wang X. Association between water fluoride and the level of children's intelligence: a dose–response meta-analysis. *Public Health.* 2018;154:87–97.

51. Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Developmental Fluoride Neurotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.* 2012;120(10):1362–8.
52. Soto-Barreras U, Escalante-Villalobos KY, Holguín-Loya B, Perez-Aguirre B, Nevárez-Rascón A, Martínez-Martínez RE, et al. Effect of fluoride in drinking water on dental caries and IQ in children. *Fluoride.* 2019;52(3):474–82.
53. Gross M, Pereyra C. Breve recorrido histórico por las teorías y medición de la inteligencia. *PsicoPediaHoy.* 2014;16(7).
54. Chinoy NJ, Memon MR. Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice. *Fluoride.* 2001;34(1):21–33.
55. Khandare A, Kumar U, Rao S. Magnesium hydroxide for protection against fluoride toxicity in rabbits. *Fluoride.* 2011;44(1):21–6.
56. Fazel Nabavi S, Nabavi SM, Habtemariam S, Moghaddam AH, Daglia M, Abolhasani F. Protective effect of methyl 3-o-methyl gallate against sodium fluoride-induced oxidative stress in rat cardiac tissues. *Fluoride.* 2012;45(3):290–6.
57. Baba N, Raina R, Verma P, Sultana M, Prawez S, Nisar N. Toxic effects of fluoride and chlorpyrifos on antioxidant parameters in rats: Protective effects of vitamin E and C. *Fluoride.* 2013;46:73–9.
58. Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MAR. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res.* 2009;88(11):1054–8.
59. Kobayashi CAN, Leite AL, Peres-Buzalaf C, Carvalho JG, Whitford GM, Everett ET, et al. Bone Response to Fluoride Exposure Is Influenced by Genetics. *PLoS One.* 2014;9(12):e114343.
60. Everett ET, McHenry MAK, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, et al. Dental fluorosis: Variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res.* 2002;81(11):794–8.
61. Abdel el Motal SM, Sharp GW. Inhibition of Glucose-Induced Insulin Release by Xylazine. *Endocrinology.* 1985;116(6):2337–40.