

**FORMULACIÓN DE MODELOS
MATEMÁTICOS DE FENÓMENOS
BIOLÓGICOS**

**Alfredo Rigalli
Cristina Aguirre
Mirta Armendáriz
Guillermo Cassiraga**

PRÓLOGO

Leer este libro y escribir su prólogo han resultado tareas muy gratas. Esta “Formulación de modelos matemáticos de fenómenos biológicos” es la primera criatura, fruto del trabajo multidisciplinario, que produce el Doctorado en Ciencias Biomédicas. Y concreta de manera ordenada el contenido del curso del mismo título, que los autores dictan anualmente a los graduados interesados.

Es evidente que un modelo matemático no sustituye al fenómeno biológico en el cual se inspira. No es tan evidente, sin embargo, el curioso objetivo oculto en la formulación de un modelo matemático. Después de formulado, el modelo permite efectuar predicciones que deberán comprobarse experimentalmente mientras sea posible, y los resultados conducirán a la ampliación de la aplicabilidad del modelo o su eliminación por inexacto.

Los ejemplos se suceden en orden de complejidad creciente y exponen la relación entre los fenómenos y su abstracción: el modelo. El lector apreciará, además, la frecuencia con que se exponen resultados propios. El conjunto destila autoridad, es decir, es el producto del trabajo de laboratorio y la consecuente reflexión intelectual.

Prof. Dr. Rodolfo C. Puche
Director
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias Médicas.
Rosario, marzo de 2003

TABLAS DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
¿Cuál es la utilidad de plantear un modelo para un fenómeno?.....	13
CAPÍTULO 2.....	16
PARADIGMAS DE LA MODELIZACIÓN MATEMÁTICA.....	16
FIJACIÓN DE UN LIGANDO A UNA MACROMOLÉCULA.....	16
CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	25
Rectificación de Lineweaver-Burk.....	29
Rectificación de Eadie-Hofstee.....	29
Cálculo de los parámetros enzimáticos.....	30
CAPÍTULO 3.....	34
MEDIDA DE CONSTANTES TOTALES Y PARCIALES.....	34
Determinación de la constante de depuración total (kd).....	35
Medida de la constante de depuración hepática.....	36
Medida de la constante de depuración sérica.....	39
CAPÍTULO 4.....	42
GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN.....	42
CAPÍTULO 5.....	54
INFUSIÓN CONTINUA.....	54
CAPÍTULO 6.....	69
ESTUDIOS DE ABSORCIÓN EN ÓRGANOS AISLADOS.....	69
MODELO DE ESTÓMAGO AISLADO.....	69
MODELO DE INTESTINO AISLADO.....	78
ABSORCIÓN INTESTINAL DE MFP EN PRESENCIA DE CALCIO.....	91
CAPÍTULO 7.....	99
FARMACOCINÉTICA DEL FLUORURO DE SODIO (NaF).....	99
Absorción gástrica de Fluoruro.....	101
Absorción intestinal de Fluoruro.....	103
Concentración plasmática de fluoruro.....	104
Comprobación de los supuestos.....	108
Excreción urinaria de Fluoruro después de una dosis oral.....	113
CAPÍTULO 8.....	115
FARMACOCINÉTICA DEL MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO.....	115

CAPÍTULO 9.....	126
FARMACOCINÉTICA SIMPLIFICADA DEL NaF	126
CAPÍTULO 10.....	132
METABOLISMO DEL COMPLEJO α 2MMFP.....	132
MODELO EXPLORATORIO.....	133
Estudio de la cinética de secreción e inactivación.....	134
Análisis del proceso de captación del complejo α 2M –MFP.....	140
MODELO MATEMÁTICO COMPLETO.....	143
Fundamentación del sistema.....	144
Resolución matemática del sistema.....	148
Determinación de las constantes de velocidades.....	152
Validación del modelo en ratas y seres humanos.....	152
ANEXO 10.....	155
inyección endovenosa de MFP.....	155
dosis oral de MFP.....	157
CAPÍTULO 11.....	161
VALORIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DIASTÓLICA.....	161
.....	164
.....	165
ANEXO 11.....	179
Principios físicos de la ecografía Doppler.....	179
Fig.2.....	183
APÉNDICE 1.....	185
LEY DE VELOCIDAD.....	185
Órdenes y constantes de velocidad.....	186
Resumen del procedimiento para hallar el orden.....	190
APÉNDICE 2.....	193
Abreviaturas.....	193
APÉNDICE 3.....	195
Transformadas de Laplace.....	195
BIBLIOGRAFÍA.....	197

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En las Ciencias Biológicas el hombre se enfrenta a fenómenos naturales, ya sean espontáneos o bien provocados por él mismo, pudiendo ser estos procesos de origen físico o químico. A menudo los fenómenos son mezcla de procesos naturales y artificiales, como ocurre al realizar un experimento de laboratorio. Lo mismo sucede con su naturaleza, rara vez son puramente químicos o físicos. Habitualmente, el objetivo del hombre de ciencia es dar una explicación racional del fenómeno que estudia, lo que incluye explicar su mecanismo, dar las causas y predecir sus consecuencias. A partir de la observación de un fenómeno se intenta obtener leyes que permitan predecir nuevos fenómenos similares, interpretar otros parecidos o más aún elaborar una conclusión que explique muchos fenómenos aparentemente diferentes. El logro de los objetivos mencionados, requiere la participación de herramientas provenientes de diferentes áreas del conocimiento. Se pueden mencionar entre estas herramientas: la observación, la recopilación de datos, la tabulación de los mismos, el análisis estadístico, los cálculos matemáticos, las técnicas quirúrgicas y la repetición de fenómenos en condiciones controladas de laboratorio.

En este libro se hará referencia a los recursos que la matemática nos da para lograr una mejor interpretación de los fenómenos biológicos.

Desarrollar un modelo matemático de un fenómeno significa obtener leyes que relacionen las variables involucradas en el fenómeno en cuestión, donde cada una de ellas es representativa de las diferentes etapas o procesos que forman parte del fenómeno estudiado. Estas leyes en principio deben ser simultáneamente coherentes con el fenómeno biológico y con la lógica matemática, aunque no necesariamente deben incluir todas las variables involucradas en el proceso.

Para ilustrar este punto se utilizará un ejemplo de la física y la ingeniería, donde la formulación de un modelo matemático es utilizada con un gran valor predictivo. Los fenómenos físicos en su mayoría han sido enmarcados en leyes. Por ejemplo la ley

$$x = x_0 + v_0 \cdot t + \frac{1}{2} \cdot a \cdot t^2$$

relaciona la posición de una partícula (x) con su posición al inicio de un movimiento (x_0), su velocidad inicial (v_0), la aceleración de la partícula (a) y el tiempo transcurrido desde el inicio del movimiento (t), al que se lo consideró cero. Si se conoce de dónde y cómo partió un automóvil (su x_0 , v_0 y a), utilizando la fórmula anterior, se puede predecir con mucha exactitud a qué distancia se encontrará el automóvil en un dado tiempo. Esto es una predicción ya que el automóvil puede o no haber partido. Por supuesto que el automóvil estará muy cerca del lugar anticipado por la ley, si las condiciones de aceleración no han cambiado. Esto indica que tienen valor predictivo si se controlan las condiciones en las que ocurre el proceso. Pero no puede predecir qué ocurrirá en el viaje. Si el conductor paró a desayunar no está contemplado en la ley, como tampoco está incluido cualquier imprevisto como ser un desperfecto mecánico, un control de tránsito, las condiciones climáticas, etc.

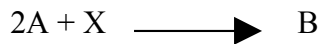
Otro ejemplo es el principio de Arquímedes que relaciona el empuje que recibe un cuerpo al estar sumergido en un fluido, con su peso, volumen y la densidad del líquido en el que se encuentra. La aplicación de este principio permitió el vuelo de los dirigibles, pero no pudo predecir el desastre que consumió en llamas al dirigible Hindenburg en no más de 35 segundos. Lo mismo ocurrió el 11 de septiembre de 2001. Las leyes de resistencia de materiales permitieron al constructor de las Torres Gemelas asegurar que no se caerían ante el impacto de un avión de esas dimensiones. Sin embargo esta predicción falló, ya que las leyes no contemplaban que los aviones estarían cargados de combustible y su combustión causaría temperaturas muy elevadas.

Con estos ejemplos no se quiere resaltar las fallas de un modelo sino dejar claro que un modelo matemático no contemplará lo que no se incluya en el mismo. Esto es, un modelo matemático siempre tendrá términos que han quedado excluidos y que de su aplicación a los fenómenos irán apareciendo y completándose. También debe quedar claro que un modelo no puede "hacer" que un fenómeno ocurra de una manera determinada.

¿Cuál es la utilidad de plantear un modelo para un fenómeno?

Luego de realizar una experiencia el investigador se enfrenta a datos y resultados. Algunos de esos resultados pueden ser controlados y pueden ser modificados, otros son inamovibles. Por ejemplo si se realiza una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas y se extrae sangre a partir del momento en que la glucosa fue administrada, no se puede evitar que el tiempo transcurra pero sí es posible mantener los valores de glucosa dentro de ciertos límites. Esto último se puede lograr inyectando una dosis adecuada de insulina. Hay variables que el investigador puede modificar haciendo subir, bajar o mantener un valor constante, otras en las que es imposible elegir el sentido de su modificación. El tiempo es un ejemplo de estas variables, no es posible hacer un experimento y pretender que el tiempo transcurra hacia atrás. Sin embargo sí es posible disminuir el peso de un animal o aumentar su presión sanguínea.

Por lo expuesto anteriormente, parece ser que el tiempo es una variable incontrolable. Es obvio que no podemos retroceder ni adelantarnos. Aunque sí podemos independizarnos. Pero dada la dificultad que encontramos con esta variable es habitual estudiar la variación de las otras en función del tiempo. Esto no significa que el tiempo pueda tomar cualquier valor, sino que se analizarán los fenómenos a lo largo del tiempo. Es común que se diga que una variable es función del tiempo. Por ejemplo si analizamos la concentración de la sustancia B que se forma por la reacción entre A y X



veremos que a medida que transcurre el tiempo tendremos más concentración de B, la cual puede ajustarse, por ejemplo, con una función del tipo

$$B(t) = a + c \cdot t$$

donde a y c son constantes.

Esta ley indica que al transcurrir el tiempo la concentración de B aumenta en forma lineal. Es decir que si el tiempo transcurre la concentración de B aumenta, sin embargo no significa que B se forma a partir del tiempo.

Lo mismo ocurre con el peso de un ser humano. Es posible establecer una ley que indicará que el peso aumentará con el curso del tiempo, esto se debe a que ingiere alimentos no tiempo.

Con esto se quiere decir que en la ley de un modelo determinado, pueden aparecer variables que no sean las que ocasionan la variación de las otras, pero sí deben aparecer forzosamente las que producen dicha variación. En el caso que las variables fundamentales sean excluidas o falte alguna, cuando la ley sea aplicada al estudio de un fenómeno, esta ley no siempre ajustará a los valores obtenidos. Esto quedará claro si aplicamos el ejemplo anterior. Si realizamos una experiencia colocando en un tubo de ensayo A y X y medimos la concentración de B observaremos que ésta sigue una función lineal durante un tiempo, sin embargo pasado cierto valor, la ley dejará de cumplirse. ¿Qué ocurrió? Evidentemente alguna o algunas variables no han sido contempladas en el modelo, como por ejemplo que se agoten las sustancias A y X, que la reacción inversa comience a ser importante, que se libere calor que haga pasar la sustancia X a vapor y escapar así de la solución, etc.

Por ello desarrollar un modelo, es útil aún si es incompleto y defectuoso, ya que al aplicarlo si no ajustara los datos experimentales dará información de que existen factores no

contemplados. En el caso que no existieran otras variables, si el modelo aún no ajusta a los datos experimentales indicará que la interpretación del fenómeno es errónea.

De lo expuesto surge, que un modelo si no se aplica, de nada sirve para la interpretación del fenómeno. Si el modelo es puesto a prueba en diferentes condiciones experimentales y ajusta adecuadamente los valores, aun cuando las condiciones cambian indicará que este modelo tiene gran valor predictivo y se podrá utilizar para simular experiencias antes de realizarlas.

El trabajo de obtener un modelo matemático tiene dos ramas de trabajo. Por una parte el desarrollo matemático, que involucra la resolución de las ecuaciones y obtención de leyes y por otro lado los experimentos. ¿Cómo se conjugan ambos? De la resolución del modelo matemático, se obtiene una o más leyes que relacionan las variables involucradas. Por otro lado en los laboratorios, se trabajará con los procesos reales, obteniendo medidas de las variables incluidas en las leyes, bajo diferentes pero controladas condiciones experimentales. Luego se realiza el ajuste de los datos experimentales con las funciones halladas. Este proceso habitualmente se realiza utilizando softwares específicos que permiten obtener rápidamente los resultados. A partir de estos últimos se decidirá si el modelo planteado es apropiado. Esta decisión será tomada en base a múltiples factores: grado de ajuste de las funciones a los valores experimentales, forma de la gráfica de la función hallada, reproducibilidad de los resultados, adaptación del modelo a valores hallados en otras condiciones experimentales, etc.

Nota de los Autores: Los conceptos matemáticos utilizados en los distintos capítulos pueden ser consultados en la siguiente bibliografía

Stewart, James. Cálculo. Conceptos y contextos. International Thomson Editores. México. 1999.

Edwards C.H. Jr, Penney D.E. Ecuaciones diferenciales elementales. Prentice - Hall Hispanoamericana, S.A. México Tercera Edición 1993

CAPÍTULO 2

PARADIGMAS DE LA MODELIZACIÓN MATEMÁTICA

En este capítulo se desarrollarán algunos modelos matemáticos clásicos, de amplia vigencia en la investigación biológica. Como se observará, estos modelos gozan de una gran simplicidad en lo que se refiere a los recursos matemáticos utilizados. Sin embargo su utilización es muy amplia debido a que permiten realizar una rápida interpretación de un fenómeno biológico o la obtención de información a partir de un experimento. A partir de estos modelos básicos se han desarrollado otros de mayor complejidad, pero cuyas aplicaciones son más específicas, permitiendo utilizarlos en situaciones no previstas en el modelo inicial. Esto último no quita importancia a los dos modelos que se desarrollarán en este capítulo. Por el contrario, demuestran su papel de fundadores de una estrategia de estudio que irá tomando con el tiempo mayor protagonismo en las mesas de miles de laboratorios. Existen muchos modelos que gozan de las mismas cualidades. La elección de estos para su discusión, se debe a que han sido utilizados en nuestro laboratorio, y se transmitirá la experiencia personal.

FIJACIÓN DE UN LIGANDO A UNA MACROMOLÉCULA

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

Uno de los problemas comunes en la química biológica es investigar la interacción entre macromoléculas, como las proteínas, y pequeños ligandos (cationes, aniones, ácidos grasos, etc.) Existen diferentes maneras a través de las cuales se puede reconocer o sospechar la fijación de una sustancia a otra.

Por ejemplo, la falta de una sustancia en orina, luego de administrarla a un animal de experimentación, puede ser un indicio aunque no una prueba contundente. Una sustancia puede no

aparecer en orina por diferentes razones además de la fijación. Puede no filtrar a nivel glomerular o puede filtrar libremente pero ser reabsorbida en un 100 % a nivel tubular. Otra razón es que sea metabolizada totalmente a un compuesto diferente al original.

Otro indicador de ligamiento es el valor del volumen de distribución (Vd)¹ de la sustancia. Este valor es hallado al realizar un estudio farmacocinético de la droga. Si bien este valor puede sugerir ligamiento, no necesariamente la sustancia tiene que estar uniéndose a una macromolécula.

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

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

¹ ver definición y cálculo en capítulo 7

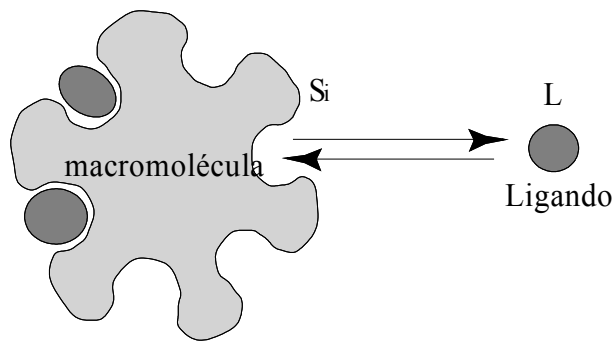


figura 2.1

Supongamos una macromolécula (figura 2.1) con n sitios de fijación para un ligando dado: **L**. De acá en adelante se utilizará el término ligando cuando se hace referencia a la pequeña molécula que se fija a la macromolécula. Como se esquematiza en la figura 2.1, el ligando puede estar fijado a un sitio de la macromolécula o libre en la solución. Por otra parte la macromolécula puede tener más de un sitio de fijación. Además estos sitios pueden ser iguales entre sí o diferentes. Para el desarrollo se utilizarán las siguientes abreviaturas:

m: concentración de la macromolécula

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

c: concentración del ligando libre

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

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

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



En una reacción química se pueden escribir leyes para la velocidad de reacción directa e inversa², ver apéndice 1.

En base a estas leyes se puede escribir una expresión para la constante de equilibrio³ del proceso de fijación que tendrá la expresión

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

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

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

$$S_i = m - b_i$$

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

² Para una reacción $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$

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

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

³. Al llegar una reacción al equilibrio, $v_d = v_i$, por lo tanto

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

reordenando se obtiene la expresión para la constante de equilibrio

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

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

$$k_i = \frac{b_i}{(m-b_i).c} = \frac{1}{\left(\frac{m}{b_i}-1\right).c} = \frac{1}{\left(\frac{1}{r_i}-1\right).c} = \frac{1}{\frac{(1-r_i)}{r_i}.c}$$

reordenando la expresión

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

reordenando esta expresión, se obtiene

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

reagrupando

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

La expresión anterior se puede escribir como

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

ó

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

si se despeja r_i , se obtiene

$$r_i = \frac{k_i c}{k_i c + 1}$$

r_i representa el número de moles de ligando fijado por mol de macromolécula en el sitio i . Por lo tanto el número total de moles de ligando ligado en los n sitios, expresado por mol de

macromolécula será la sumatoria de los moles fijos en cada uno de los n sitios, esto se puede obtener sumando los valores r_i , para todos los sitios. Esto queda expresado

$$r = \sum_{i=1}^n \frac{k_i c}{k_i c + 1}$$

Si se considera que los n sitios son equivalentes en afinidad, la expresión anterior se puede escribir:

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

o

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

al dividir miembro a miembro por c

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

se obtiene una de las expresiones finales de este modelo

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

Esta expresión corresponde a una recta, donde r/c es la variable dependiente, r la variable independiente, kn la ordenada al origen y k la pendiente. Si tomamos $r/c = 0$, la expresión anterior resulta

$$0 = k \cdot n - k \cdot r$$

despejando y simplificando, se obtiene

$$r = n$$

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

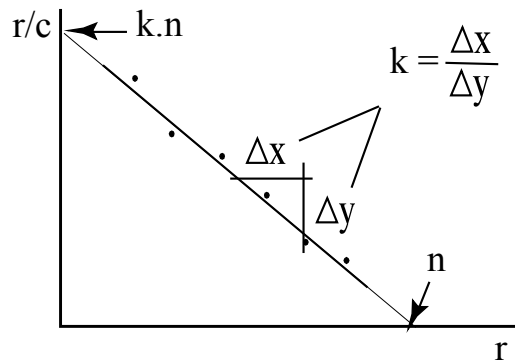


figura 2.2

En la figura 2.2 se grafica la recta que se obtiene, el valor de k se obtiene a partir de la pendiente de la recta y n a partir de la abscisa al origen. También puede obtenerse n a partir del valor de la ordenada al origen conociendo previamente k .

A partir de la fórmula obtenida anteriormente

$$r = \frac{nk c}{k c + 1}$$

se obtiene la siguiente expresión

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

reordenando

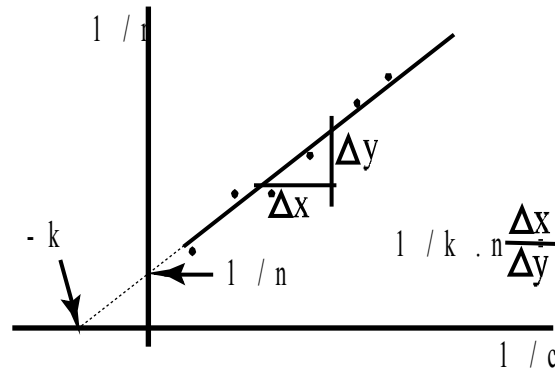
$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{n k} \cdot \frac{1}{c}$$

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

Graficando los valores experimentales en base a estas variables (figura 2.3), se pueden obtener los valores de n y k a

partir de la ordenada al origen y la pendiente.

La intersección de la extrapolación de la recta con los ejes coordenados permite obtener n o k .



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

figura 2.3

Se aplicará este modelo al estudio de la fijación entre el calcio y la fosfatasa alcalina intestinal. En este análisis se calcularán el número de sitios de fijación y la constante de afinidad entre el ligando y la proteína. Para cumplir con este objetivo se prepararon soluciones con igual contenido molar de fosfatasa alcalina intestinal purificada de rata. A las soluciones se les agregó CaCl_2 de manera de fijar la concentración total del ligando en valores preestablecidos. La solución de CaCl_2 fue suplementada con trazas de Ca^{45} (isótopo radioactivo emisor beta, que se utiliza para determinar la concentración de calcio). Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente para permitir que el proceso de fijación alcance el equilibrio. Luego se ultrafiltraron a través de membranas que permiten el paso de partículas de peso molecular menor a 30 KDa. De esta manera en el ultrafiltrado que se obtiene sólo existe calcio sin ligar con la misma concentración que tiene el calcio libre junto con la fosfatasa alcalina. Midiendo el calcio en el ultrafiltrado se conoce el valor de concentración de calcio libre (c). Como la cantidad total del ligando (l) agregado es conocida, se puede sacar por diferencia la cantidad fijada (b). La cantidad de moles por litro de proteína (m) también es conocida, por lo tanto se puede calcular la variable r (b/m) y r/c , necesarias para realizar el gráfico r/c vs r .

En la tabla 2.I se muestran los valores obtenidos y la figura 2.4 muestra la representación de los mismos y los valores obtenidos.

Como se puede observar en la figura 2.4, los valores experimentales fueron ajustados por una recta con significado estadístico ($r = 0.512$ $p < 0,05$). El ajuste de los datos

por una recta, indica que la fijación del calcio a la fosfatasa alcalina es compatible con un modelo de 8 sitios independientes y equivalentes en afinidad ($K = 18 \text{ mM}^{-1}$). Es importante destacar que si los datos no fueran ajustados por una recta, no indican un fracaso del experimento, sino que estaría indicando que el proceso de fijación no es compatible con el mencionado modelo. Se deberían en tal caso analizar los datos con otros modelos, por ejemplo modelos que presentan cooperatividad positiva o negativa entre sitios, modelos de dos sitios de diferente afinidad, etc.

Tabla 2.I: fijación de calcio a fosfatasa alcalina de rata

r	r/c M ⁻¹	n
4.0	96840±15967	3
3.3	74200±14004	3
1.2	88285±18006	3
0.6	92040±12000	3
0.3	224701±25005	3
0.01	120821±0	2

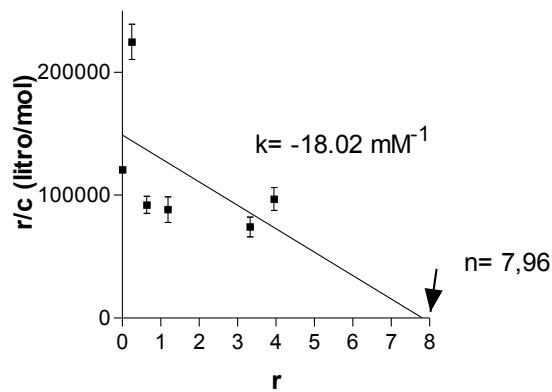


Figura 2.4

CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las enzimas son catalizadores⁴ biológicos. No existe prácticamente proceso químico en los organismos vivos que ocurra en ausencia de una o más enzimas. Estas moléculas, de naturaleza proteica, hacen posible las reacciones químicas en el ambiente compatible con la vida.

Conocer la velocidad de la reacción y los factores que sobre ella influyen es valioso al trabajar experimentalmente con enzimas. L. Michaelis y M.L. Menten desarrollaron en 1913 un modelo matemático para una reacción catalizada por una enzima. Este modelo, el más sencillo planteado, es aplicable a una reacción con un sustrato⁵ y supone reversibilidad de los procesos químicos involucrados. Este modelo luego fue ampliado y aplicado a otras situaciones. Por su validez aún hoy, un siglo después de su planteo merece una mención especial como paradigma de la modelización matemática.

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



donde

[E] = concentración de enzima libre

[ES] = concentración de complejo enzima-sustrato

[S] = concentración de sustrato

k_{+1} es la constante de velocidad de la reacción de formación del complejo enzima sustrato a partir de la E y el S libre

⁴ un catalizador es una sustancia que interviene en la reacciones químicas aumentando la velocidad de las reacciones, recuperándose inalterada al finalizar el proceso.

⁵ se entiende por sustrato un reactivo de la reacción. Es la sustancia que se ubica en el sitio activo de la enzima y es transformada a producto.

k_{-1} es la constante de velocidad de la reacción de descomposición del complejo ES en la E y el sustrato

k_{+2} es la constante de velocidad de formación de producto a partir del complejo ES

k_2 es la constante de velocidad de formación del complejo ES a partir de los productos.

El modelo se desarrolla suponiendo que

$$[ES] \ll [S] \quad (1)$$

para toda t , es decir que durante todo el tiempo se supone que existe presente una gran concentración de sustrato. Por lo tanto el modelo es aplicable a situaciones en las que se mide la velocidad inicial de la reacción. Además se supone que la concentración del sustrato es muy superior a la concentración de la enzima para todo tiempo

$$[S] \gg [E] \quad (2)$$

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

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

$$v_0 = k_{+2} \cdot [ES]^{\delta_{ES}}$$

Si se supone que el orden del proceso es 1, la ecuación resultará

$$v_0 = k_{+2} \cdot [ES] \quad (3)$$

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

$$\frac{dES}{dt} = k_{+1} \cdot [E] \cdot [S] - k_{+2} \cdot [ES] - k_{-1}[ES]$$

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

$[E_T] = [E] + [ES]$, utilizando esta igualdad se puede escribir la expresión anterior como

$$\frac{dES}{dt} = k_{+1} \cdot ([E_T] - [ES]) \cdot [S] - k_{+2} \cdot [ES] - k_{-1}[ES]$$

en el estado estacionario⁶ se cumple que $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

por lo tanto

$$0 = k_{+1} \cdot ([E_T] - [ES]) \cdot [S] - k_{+2} \cdot [ES] - k_{-1}[ES]$$

reordenando

$$k_{+1} \cdot ([E_T] - [ES]) \cdot [S] = k_{+2} \cdot [ES] + k_{-1}[ES]$$

ó

$$k_{+1} \cdot ([E_T] - [ES]) \cdot [S] = [ES] \cdot (k_{+2} + k_{-1})$$

reordenando

$$\frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{(k_{+2} + k_{-1})}{k_{+1}} = K_m$$

⁶ en el estado estacionario, la concentración de ES permanecerá constante ya que se degradará a P a la misma velocidad que se forma a partir de la E y el S.

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

Reordenando

$$([E_T] - [ES]) \cdot [S] = K_m \cdot [ES]$$

$$[S] \cdot [E_T] - [ES] \cdot [S] = K_m \cdot [ES]$$

$$[S] \cdot [E_T] = K_m \cdot [ES] + [S] \cdot [ES]$$

se obtiene una expresión para la concentración del complejo ES,

$$\frac{[S] \cdot [E_T]}{K_m + [S]} = [ES]$$

reemplazando este valor en la ecuación (3), se obtiene la ley de velocidad

$$v_o = \frac{k_{+2} \cdot [S] \cdot [E_T]}{K_m + [S]}$$

Si toda la enzima estuviera formando el complejo ES, se tendría la velocidad máxima, por lo tanto el producto $k_{+2} \cdot [E_T] = V_{\max}$. Reemplazando esta igualdad en la última expresión resulta

$$v_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación de Michaelis-Menten}$$

Esta ecuación responde a una hipérbola con un valor asintótico a V_{max} cuando la concentración de S tiende a infinito.

Rectificación de Lineweaver-Burk

Experimentalmente, es dificultoso llegar a concentraciones como para que la reacción alcance la V_{max} . Por lo tanto se trabaja con rectificaciones de esta función que permiten conocer los parámetros V_{max} y K_m aun cuando la enzima no se ha saturado por el sustrato. Partiendo de la ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

se obtiene

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

Por lo tanto $1/v$ es una función lineal de la $1/[S]$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Rectificación de Eadie-Hofstee

Es otra rectificación utilizada para hallar los valores de K_m y V_{max} . Partiendo de la ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

reordenando la ecuación

$$v \cdot K_m + v \cdot [S] = V_{\max} \cdot [S]$$

$$\frac{v}{[S]} \cdot K_m + v = V_{\max}$$

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

$$v = V_{\max} - K_m \cdot \frac{v}{[S]}$$

Cálculo de los parámetros enzimáticos

La determinación de los parámetros enzimáticos, K_m y V_{\max} , entre otras bondades ofrecen la posibilidad de distinguir qué tipo de inhibición ejerce una sustancia sobre una enzima. Las formas más comunes de inhibición se dan en la tabla 2.II. Esta tabla informa sobre la modificación del valor de cada uno de los parámetros, respecto de la reacción realizada en ausencia del inhibidor.

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

Aplicación: La fosfatasa alcalina es una enzima de la mucosa intestinal que hidroliza los enlaces éster fosfórico de diferentes sustratos. Esta enzima hidroliza el Monofluorofosfato de sodio [1] y se ha demostrado que en presencia de calcio la actividad de la fosfatasa alcalina disminuye.

Tabla 2.III: medidas de actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Mmol/min.L. media±SD (n)

	[pNFF]	[Ca ⁺⁺]= 0 mM	[Ca ⁺⁺]=50mM
Tabla 2.III: Tipos de inhibición enzimática			
tipo de inhibición	K_m	V_{\max}	
competitiva	0.29±0.03 (3)	0.13±0.08 (3)	no cambia
no competitiva	0.49±0.08 (2)	0.22±0.10 (2)	disminuye
anticompetitiva	0.55±0.15 (3)	0.30±0.08 (3)	disminuye
	0.63±0.10 (2)	0.38±0.12 (2)	disminuye
	4.000	1.10±0.11 (2)	1.03±0.16 (2)
	5.000	0.81±0.07 (3)	0.84±0.39 (3)
	10.000	1.23±0.22 (3)	0.85±0.61 (3)
	15.000	1.40±0.03 (3)	0.57±0.32 (3)
	20.000	1.81±0.10 (2)	0.81±0.45 (2)
	25.000	1.97±.45 (3)	1.28±0.41 (3)

En la tabla 2.III se muestran los valores de velocidad enzimática de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina intestinal, para diferentes concentraciones del sustrato p-nitrofenilfosfato (pNFF) en presencia y ausencia de calcio (supuesto inhibidor).

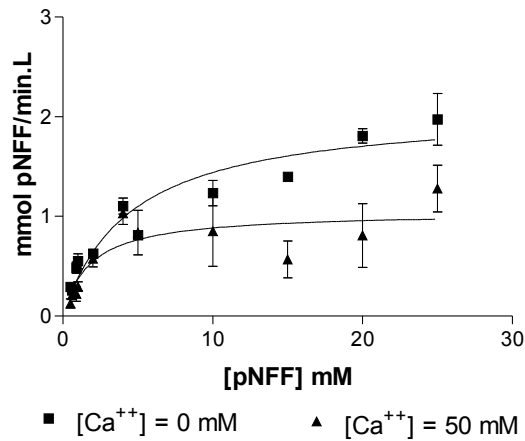


figura 2.5

La figura 2.5 muestra la gráfica de los valores de la tabla 2.III. En la tabla 2.IV se muestran los valores de K_m y V_{max} ,

Tabla 2.IV: efecto del calcio sobre los parámetros de la fosfatasa alcalina		
parámetro	[Ca ²⁺] = 0 mM	[Ca ²⁺] = 50 mM
V_{max}	0.009805	0.004915
K_m	5.038	2.010

obtenidos para esta enzima en presencia y ausencia de calcio, utilizando el modelo de Michaelis y Menten.

Los resultados hallados indican que el calcio produciría una inhibición de tipo anticompetitiva

CAPÍTULO 3

MEDIDA DE CONSTANTES TOTALES Y PARCIALES

Cuando una sustancia A es depurada del organismo, la velocidad de desaparición de ésta se puede expresar por la siguiente ecuación diferencial

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k_d[A]^\delta$$

donde k_d es la constante de depuración y δ es el orden del proceso. En este caso la constante de depuración es una constante global, que representa todos los fenómenos involucrados: excreción renal, metabolización, etc. Si los procesos involucrados dependen de la [A] afectados por el mismo orden, la expresión se puede escribir

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]^\delta - k_2[A]^\delta - k_3[A]^\delta - \dots - k_n[A]^\delta = \sum_{i=1}^n -k_i[A]^\delta$$

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

En algunas circunstancias puede ser importante y/o necesario determinar en qué porcentaje participa un órgano en particular en este proceso. Esta determinación puede llevarse a cabo de varias maneras. Una de ellas es la que se presenta a continuación. En este caso se analizará la metabolización del complejo α_2 macroglobulina- monofluorofosfato (α_2 MMFP).

El monofluorofosfato de sodio (MFP), es una droga utilizada en el tratamiento de la osteoporosis [2, 3]. El MFP se absorbe a nivel gástrico [4] y se liga a la α_2 -macroglobulina (α_2 M) plasmática formando el complejo α_2 MMFP [5]. Este complejo es captado *in vitro* por cortes de hígado y hueso principalmente por el receptor sensible al ácido [5']-poliinosínico [6].

En el trabajo que se detalla a continuación se muestra un método para determinar la participación del hígado sobre la

depuración total del complejo mencionado, como así también los problemas experimentales y sus soluciones.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en la rata. En estos animales se inyectó el complejo purificado. El complejo se obtiene mezclando α_2 M con MFP *in vitro*. Luego de la incubación se purifica utilizando una columna de tamiz molecular (Sephadex® G100). Esta técnica produce una solución diluida lo suficientemente pura del complejo para ser inyectada al animal de experimentación.

Determinación de la constante de depuración total (k_d)

El complejo α_2 MMFP fue purificado por la técnica anteriormente detallada y se inyectó a ratas anestesiadas por medio de un catéter colocado en la arteria femoral. Por el mismo catéter se obtuvieron muestras de sangre a los tiempos detallados en la tabla 3.I. En las distintas muestras plasmáticas se determinó la concentración del complejo, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 3.I.

Al realizar las regresiones lineales: $[\alpha_2\text{MMFP}]$ vs. tiempo, logaritmo de $[\alpha_2\text{MMFP}]$ vs. tiempo y $1/[\alpha_2\text{MMFP}]$ vs tiempo se deduce que el mejor ajuste se logra con la rectificación logarítmica, lo que indica que el decaimiento de la concentración del complejo es proporcional a la concentración del mismo (ver apéndice 1).

Tabla 3.I: concentraciones de complejo α_2 MMFP en plasma de ratas luego de una inyección i.v del mismo

tiempo minutos	α_2 M-MFP μM	n
0	93 ± 8	4
15	14 ± 10	4
30	4 ± 3	4
45	0.5 ± 0.2	4
60	0.2 ± 0.1	4
75	0.1 ± 0.1	4

$$\frac{d[\alpha_2\text{MMFP}]}{dt} = -k_d[\alpha_2\text{MMFP}]$$

Por lo tanto los datos se ajustan con una función exponencial decreciente. Resolviendo la ecuación diferencial se

obtiene la ley que describe el comportamiento de $[\alpha_2\text{MMFP}]$ en función del tiempo

$$[\alpha_2\text{MMFP}] = [\alpha_2\text{MMFP}]_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

Del análisis de la misma se puede obtener el valor de la constante de depuración $k_d = 0,093 \text{ min}^{-1}$ y un $t_{1/2} = 7,4$ minutos. En este proceso participan diferentes tejidos, entre ellos el óseo y el hepático [6].

Medida de la constante de depuración hepática

Para determinar en qué porcentaje influye el hígado sobre el proceso de depuración se practicó una hepatectomía funcional. Este es un modelo en que se trabaja con el animal intacto, bajo anestesia general. El objetivo que se persigue con los experimentos de hígado aislado *in situ* es determinar el porcentaje del metabolismo que le corresponde al hígado con respecto al animal intacto. El porcentaje en que el hígado participa saldrá por diferencia entre la constante de depuración total (k_d) y la que se obtenga cuando el animal está con la circulación hepática anulada. Se inyecta por vía endovenosa una cantidad fija de complejo $\alpha_2\text{MMFP}$. Se obtienen por el mismo catéter muestras de sangre en las que se determina la concentración del complejo [7]. Pasado un tiempo se ligan la arteria hepática y la vena porta anulando la circulación del hígado. Durante el resto del experimento el animal permanece vivo pero sin participar la circulación hepática y por lo tanto tampoco participa el hígado en el proceso de depuración. Durante este período la variación de la concentración plasmática se debe a la participación de todos los tejidos, menos el hígado.

Para el experimento se procedió de la siguiente manera: se purificó el complejo $\alpha_2\text{MMFP}$ por la técnica descrita más arriba.

El complejo se inyectó por un catéter insertado en la arteria femoral. Por el mismo catéter se extrajo sangre para determinar la concentración del complejo α_2 MMFP a los tiempos indicados en la tabla 3.II. Durante los primeros 15 minutos de experimento se mantuvo al animal anestesiado y

Tabla 3.II. concentraciones de complejo α_2 MMFP en plasma de ratas luego de una inyección i.v del mismo

tiempo (minutos)	α_2 MMFP, μM
0	1.3
5	6
10	4.5
15	1
20	1.2
25	0.9
30	1.5

se realizó un lazo en arteria hepática (tronco celiaco) y vena porta por medio de una laparotomía abdominal. A los 15 minutos se ajustaron los lazos y se mantuvo al animal en este estado por los 15 minutos restantes. El experimento duró 30 minutos.

Del análisis de los resultados surge que a partir de los 15 minutos no existe decaimiento de la concentración del complejo. Sin embargo observando el valor basal (a $t = 0$, $[\alpha_2\text{MMFP}] = 1,3 \mu\text{M}$), se puede deducir que a los 15 minutos (cuando se liga la circulación) ya todo el complejo ha sido metabolizado y la concentración del complejo α_2 MMFP, ha alcanzado su valor basal, y no existe decaimiento posterior de su concentración por haber sido totalmente metabolizado.

Sin considerar el valor basal, los datos indicarían que el hígado es el principal órgano de depuración, ya que luego de anular su circulación cesa el decaimiento plasmático de la concentración del complejo. Sin embargo esta conclusión es errónea. De este error surge la importancia de conocer un valor basal del metabolito cuya variación plasmática se estudia en el experimento.

Solución al problema: conociendo que el máximo en la concentración plasmática del complejo α_2 MMFP se produce a los 60 minutos se administraron 80 μmol de MFP por sonda gástrica de manera que el complejo se forme *in vivo*, obteniéndose en este caso concentraciones 50 órdenes de magnitud mayor. Con este diseño se obtiene un rango de variación de la concentración del complejo mayor que en experimento anterior, disminuyendo el error en la determinación y permitiendo tener más tiempo para la realización del experimento. A partir de los 70 minutos se obtienen muestras de sangre a los tiempos indicados en la tabla 3.III.

Tabla 3.III: concentraciones del complejo α_2 MMFP en plasma de ratas luego de una dosis oral de MFP

tiempo (minutos)	α_2 MMFP, μM
70	437 \pm 243
75	373 \pm 218
80	221 \pm 129
85	221 \pm 98
90	164 \pm 29

En estas muestras se determina la concentración del complejo α_2 MMFP. A los 80 minutos se liga la circulación hepática obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 3.III y la figura 3.1. Con los valores de concentración se determinan los órdenes de los procesos por análisis

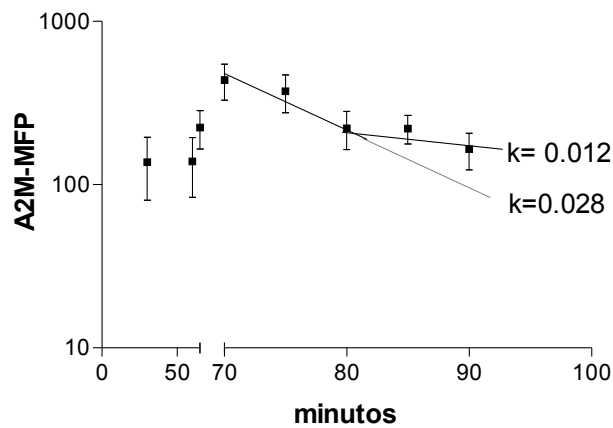


figura 3.1

de las regresiones mencionadas más arriba (ver apéndice 1). En este caso el ajuste fue bueno para una cinética de orden 1. Se debe distinguir que en este caso las pendientes de las rectas no coinciden con las constantes de velocidad, ya que la gráfica se halla en escala logarítmica de base 10 (ver apéndice 1).

Con los datos de 70 a 80 minutos se determina la constante de depuración total $k_d = 0,065 \text{ min}^{-1}$ y con los datos de 80 minutos a 90 minutos se determina la constante de depuración sin la presencia del hígado $k = 0,028 \text{ min}^{-1}$. Lo que indica que el hígado participa en aproximadamente un 56 %.

Medida de la constante de depuración sérica

Para determinar la constante de hidrólisis en plasma se procedió a extraer sangre de ratas, centrifugarla para separar los glóbulos obteniéndose plasma el que fue incubado a 37° C . Las ratas habían recibido, 60 minutos antes de la extracción, una dosis de $80 \mu\text{mol}$ de MFP por sonda gástrica, de esta manera, al extraer la sangre la concentración sanguínea del complejo es elevada [8]. Al separar el plasma del organismo el único proceso que actúa sobre la concentración del complejo es la acción de factores plasmáticos. En estas condiciones se determinó la concentración del complejo $\alpha_2\text{MMFP}$ [7], Tabla 3.IV.

tiempo (minutos)	$\alpha_2\text{MMFP}, \mu\text{M}$
60	14.1
120	12.8
180	10.4

Al realizar las regresiones $[\alpha_2\text{MMFP}]$ vs tiempo, $\ln [\alpha_2\text{MMFP}]$ vs tiempo y $1/[\alpha_2\text{MMFP}]$ vs tiempo, nos encontramos con una escasa diferencia entre los ajustes de las funciones a los datos (ver valor del coeficiente de correlación: r). Como se puede observar en la tabla 3.V, si bien las constantes numéricamente son muy diferentes, los tiempos de vida media del complejo en plasma

son similares, independientemente del ajuste. En este caso será importante tener en cuenta el contexto biológico para decidir sobre el ajuste a utilizar.

Tabla 3.V: valores de k, r y t _{1/2}			
ajuste	r	k	t _{1/2} (min)
[] vs t	0.98	0.031 M.min ⁻¹	227
ln [] vs t	0.98	0.0025 min ⁻¹	277
1/[] vs t	0.97	0.00021 M ⁻¹ .min ⁻¹	337

CAPÍTULO 4

GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN

En ciertos trabajos de laboratorio es común la utilización de gradientes de concentración. Se entiende que en un proceso existe un gradiente de concentración cuando se produce una variación gradual de una propiedad, en este caso la concentración. Se pueden crear por ejemplo un gradiente de sacarosa en un tubo de centrífuga, un gradiente de poliacrilamida en un gel para electroforesis, etc. El desarrollo que se muestra a continuación corresponde a una solución que fluye a través de una columna cromatográfica y en la cual se crea un gradiente de concentración de una de las sustancias. En esta solución hay una o más sustancias cuyas concentraciones van cambiando en el transcurso del tiempo. Existe la necesidad de crear un gradiente de concentración en los procesos de purificación de proteínas, por ejemplo cuando se

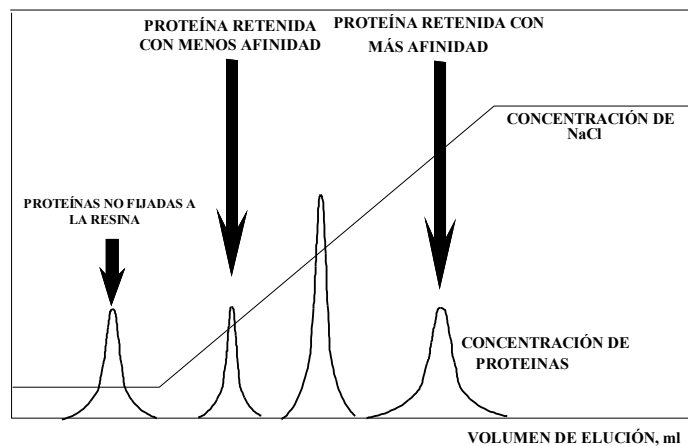


figura 4.1

utilizan columnas de intercambio iónico [9]. En estos casos se

trabaja con una columna (tubo de vidrio) que contiene una sustancia de relleno (por ej. dietilaminoetil celulosa: DEAE celulosa) que tiene cargas fijas, en el caso de la DEAE celulosa las cargas son positivas. Al pasar proteínas a través de ella, las que tengan cargas negativas serán retenidas en la columna por interacciones electrostáticas con las cargas fijas en la resina de relleno. Existirán proteínas que no serán retenidas y serán eluidas de la columna antes de iniciar el gradiente (figura 4.1). Esto ocurre a una dada concentración de anión cloruro (Cl^-). Una vez que las proteínas están retenidas sobre las cargas del relleno de la columna, se inicia un gradiente de concentración para el anión cloruro (el fluido que pasa por la columna irá aumentando la concentración de Cl^-) que irá despegando a las proteínas de acuerdo a la fuerza de su unión electrostática. De esta manera se pueden separar proteínas aun cuando el peso molecular sea similar.

Existen diferentes alternativas para generar un gradiente. Estas alternativas pueden ser simples en instrumental pero costosas en tiempo o complejas en instrumental y valiosas por el escaso tiempo insumido.

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

En el primer caso detallado en la figura 4.2 se prepararon tres soluciones de 0, 0,15 y 0,3 M. En el intervalo de 0 a 15 minutos se utiliza la solución 0 M, a los 15 minutos se cambia por la solución 0,15 M y a los 30 minutos se coloca la 0,3 M. En el segundo y tercer caso de la figura 4.2 el número de soluciones utilizadas es mayor permitiendo una variación de la concentración con menos diferencias entre ellas.

En cualquiera de estos casos de la figura 4.2, se observa que la concentración real de la sustancia (—) se aproximará más al gradiente esperado (-----) cuanto mayor sea el número de soluciones preparadas. Si bien en los tres gradientes mostrados en la

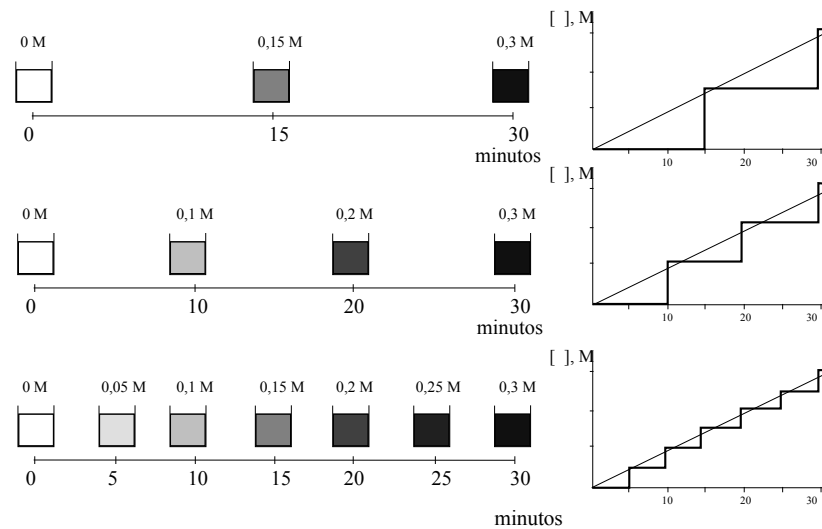


figura 4.2

figura 4.2 la concentración de la sustancia sufrió las variaciones deseadas, se puede observar que en el último caso el ajuste a la concentración esperada es mejor. Técnicamente, puede no ser necesario un ajuste tan marcado. Por ejemplo si tenemos sólo dos sustancias fijas en una columna, una de ellas se eluye con una concentración 0,02 M de cloruro y la otra con 0,3 M, sería suficiente un gradiente con tres escalones: una solución con $[Cl^-]$ menor a 0,02 M (en este caso ambas permanecerían en la columna); la segunda solución de concentración entre 0,02 y 0,3 M (en este paso se eluiría una de las sustancias). Cuando terminara de salir la primera sustancia, se debería cambiar a otra solución de $[Cl^-]$ mayor a 0,3 M, con lo que se lograría despegar la segunda. En el caso que la molaridad del Cl^- al que se despegan las proteínas es muy

próxima, la cantidad de soluciones puede ser muy grande o inclusive puede llegar a ser imposible la aplicación de este método.

Si bien este método no presenta posibilidad de fallas si las soluciones están bien preparadas, requiere mucho trabajo de cálculo y de preparación de soluciones.

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

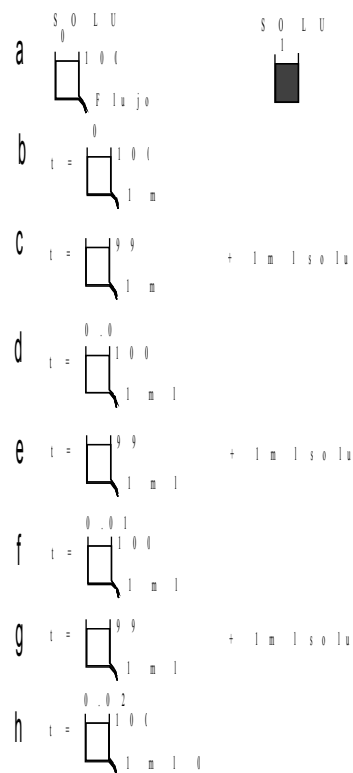


figura 4.3

Para simplificar la comprensión se realizará el desarrollo con valores numéricos. Se dispone de un recipiente de 100 ml con una solución 0 M de un dado soluto y el flujo de salida del recipiente es de 1 ml/min (figura 4.3.a). A tiempo 0 saldrá en el primer minuto 1 ml de solución 0 M (figura 4.3.b). A $t = 1$ min el recipiente tendrá 99 ml (figura 4.3.c) ; si en este momento se agrega 1 ml de solución B de concentración 1 M, la solución A pasará a tener una concentración 0,01 M y durante 1 minuto fluirá 1 ml de solución 0,01 M (figura 4.3.d). A $t = 2$ min el recipiente volverá a tener 99 ml, en este momento se agrega nuevamente 1 ml de solución B (1 M) figura 4.3.e, la solución A volverá a tener 100 ml pero su concentración será 0,0199 M. Durante 1 minuto fluirá solución A con concentración 0,0199 M. A $t = 3$ min el volumen volverá a ser 99 ml y habrá fluido solución de la concentración antes mencionada. En este momento se agrega nuevamente 1 ml de solución B determinando que la solución A tenga ahora una concentración de 0,0297 M. Analizando un tiempo en particular (t) se puede deducir que la cantidad de moles que hay en la solución A es

$$[]_t = \left(\frac{99 \cdot []_{t-1}}{1000} + 0.001 \right) \times \frac{1000}{100}$$

El primer término en el interior del paréntesis es la cantidad de moles existentes en el recipiente A al finalizar el período anterior ($t - 1$) , el segundo término es la cantidad de moles agregadas con la alícuota de la solución B (1 ml de solución 1 M = 0,001 M). Simplificando la expresión se obtiene

$$[]_t = 0,99 \cdot []_{t-1} + 0.01$$

Se obtiene un gradiente de concentración que es la aproximación lineal. La pendiente del gradiente dependerá de la concentración utilizada.

La aproximación a la recta dependerá del intervalo de tiempo adoptado. Con el ejemplo anterior llevaría aproximadamente 30 minutos llegar de 0 M a 0,3 M (figura 4.4).

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

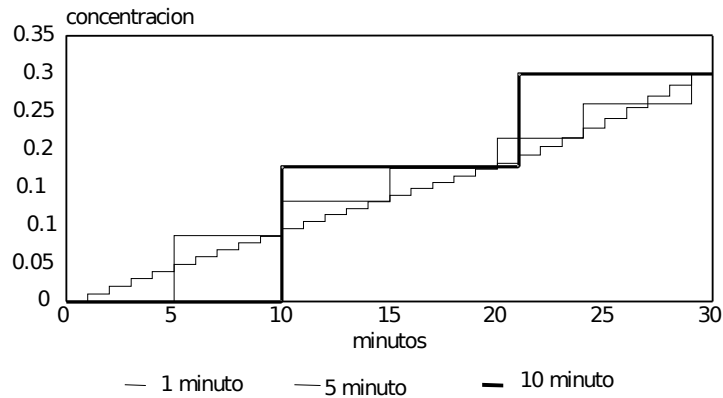


figura 4.4

$$[]_t = 0,95.[]_{t-1} + 0.05$$

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

$$[]_t = 0,9.[]_{t-1} + 0.1$$

Observando las últimas tres soluciones, se puede deducir que el escalón entre dos concentraciones consecutivas es menor cuanto menor es el intervalo de tiempo entre los agregados (figura 4.4).

Para un caso genérico

$$[]_t = (1-x).[]_{t-1} + x$$

donde

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

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

$$\begin{aligned} 1000ml &\rightarrow C \\ V' &\rightarrow m = \frac{C \cdot V'}{1000} \end{aligned}$$

Al cabo del período Δt , la masa de soluto en el recipiente A será m_1' , la que resulta del siguiente cálculo

$$\begin{aligned} 1000ml &\rightarrow C_o \\ V - V' &\rightarrow m_1' = \frac{C_o(V - V')}{1000} \end{aligned}$$

por lo tanto la nueva masa será $m_1 = m + m_1'$

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

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

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

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

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

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

o bien

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

reordenando

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

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

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

Tercera alternativa: Utilizando válvulas solenoides. Este sistema consta de un ordenador que controla válvulas de tres vías. Dos soluciones de diferentes concentraciones se conectan a esta válvula y el ordenador controla el tiempo que cada entrada permanece abierta de acuerdo a la concentración que se desea obtener. Un sistema de mezcla ("mixer") se intercala entre las válvulas y la salida del catéter que lleva la solución con el gradiente (figura 4.5). Por ejemplo si se desea un gradiente desde 0 M a 0,3 M, se puede conectar al sistema una solución 0 M y una 0,3 M. Programando el sistema, al principio, el ordenador mantendrá abierta continuamente la entrada a la solución 0 M, en este período la solución que se obtiene es 0 M. Luego se comenzará a abrir por un período de tiempo la vía que conecta a la solución 0,3 M y se cerrará la correspondiente a la solución 0 M. Este período de tiempo se irá incrementando de manera que la solución que sale será de una concentración creciente, hasta que al final del proceso se llegará a una solución 0,3 M.

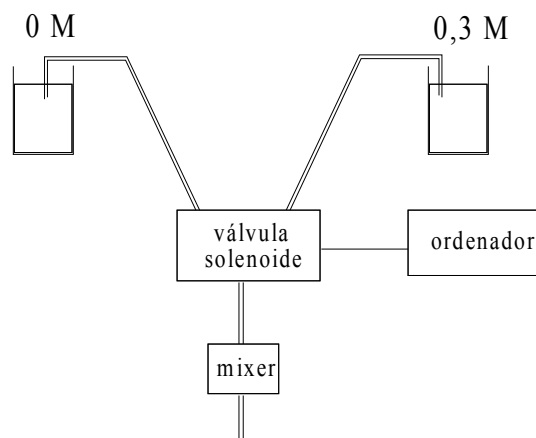


figura 4.5

Cuarta alternativa: utilizando un sistema creador de gradiente.

Este sistema consta de dos compartimientos conectados por una llave (figura 4.6). El compartimiento de la izquierda se mantiene cerrado herméticamente, razón por la cual mantendrá su volumen constante y su concentración inicial es C_1 , que corresponde a la concentración inicial del gradiente. El flujo que se obtiene por la salida del compartimiento de la izquierda (k_s) será idéntico al que entre desde el compartimiento de la derecha (k_i). El compartimiento de la derecha se mantiene en equilibrio con la atmósfera y contiene una solución cuya concentración inicial es C_2 . La concentración C_2 puede ser mayor o menor que C_1 , de manera que al producirse la mezcla la concentración C_1 comenzará a variar, saliendo del recipiente una solución con una concentración $C = C(t)$. El modelo que se describe a continuación provee de una ecuación que relaciona esta $C(t)$ con los valores iniciales y de desarrollo del gradiente.

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

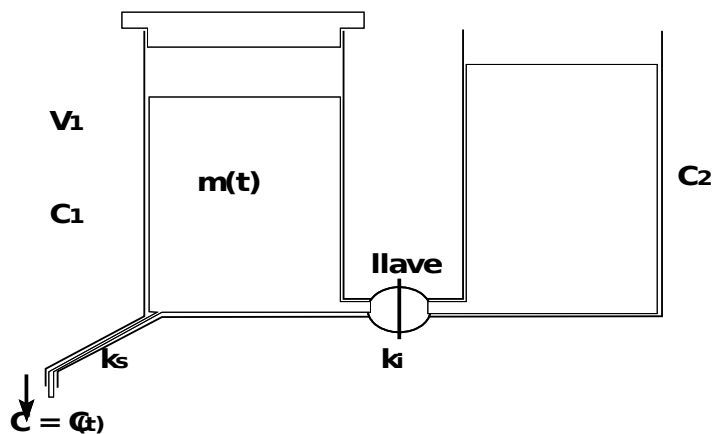


figura 4.6

La variación de m viene dada por la ecuación

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

dividiendo ambos miembros por el volumen V_1 , resulta

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

como $dm/V_1 = dC$, resulta

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

como $k_i = k_s$

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

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

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

sustituyendo $C_2 - C = z$

resulta $-dC = dz$

o bien $dC = -dz$

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

se obtiene

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

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

$$\ln(C_2 - C_1) - \frac{k_i}{V_1} \cdot t = \ln(C_2 - C)$$

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

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

distribuyendo el exponente

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

finalmente se obtiene la ecuación definitiva con la cual se puede trabajar sobre una planilla de cálculo, para calcular tiempos, flujos y concentraciones a utilizar.

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

CAPÍTULO 5

INFUSIÓN CONTINUA

La infusión continua es una práctica habitual cuando se desea inyectar una cantidad conocida de una droga durante un período de tiempo. Esta metodología también es útil cuando se desea mantener constante la concentración de una sustancia en un compartimiento. *In vivo*, esta técnica se realiza cateterizando una

arteria o una vena de un animal e inyectando una solución de concentración conocida a un flujo dado. El objetivo es alcanzar una concentración determinada que permita mantener este valor con fines de tratamiento o bien medir la constante de velocidad de depuración (k_e) de la sustancia.

Si bien la infusión continua de una sustancia puede realizarse en cualquier compartimiento, es común su utilización cuando se desea mantener constante la concentración de una droga en sangre. En esta práctica se infunde la sustancia, proceso que tiene una constante de velocidad (k_i). Esta infusión mantiene en la sangre una cantidad de la sustancia A, figura 5.1. Por otro lado, de la sangre la sustancia A es eliminada, por uno o más procesos. Aunque sean más de uno los procesos, si son del mismo orden se pueden considerar como un único proceso cuya constante de velocidad de eliminación es k_e .

Para realizar la infusión se puede proceder de dos maneras diferentes

- canalizando vena o arteria y utilizando una bomba peristáltica o de infusión⁷.
- colocando una minibomba osmótica en la cavidad peritoneal del animal⁸

En ambos casos el modelo matemático es el mismo. La variación de la cantidad de la sustancia A en sangre estará dada por la siguiente ecuación diferencial

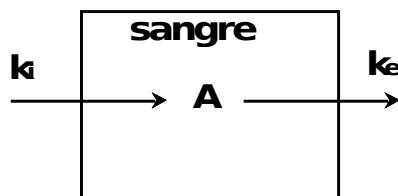


figura 5.1

⁷ Las bombas de infusión, son dispositivos que presentan una jeringa y un mecanismo automático al que se le puede regular la velocidad de empuje del

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

En esta ecuación se está teniendo en cuenta que la velocidad de infusión es independiente de la cantidad presente en sangre, por lo tanto el proceso de infusión tiene orden cero, en cambio la eliminación de la sustancia es mayor cuanto mayor es la cantidad de la misma en sangre, por lo que el proceso de eliminación es de orden 1.

Aplicando las transformadas de Laplace (ver apéndice 3)

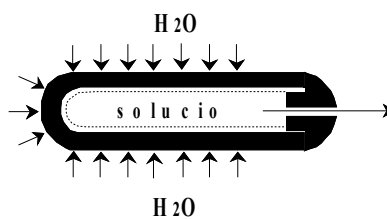
$$s\bar{A} - A_0 = \frac{k_i}{s} - k_e \bar{A}$$

Si la sustancia A no existe en la sangre, la concentración inicial de A será cero, por lo tanto se puede suponer que $A_0 \cong 0$. Reordenando la expresión anterior se obtiene

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

émbolo de la jeringa, de esta manera se puede obtener un flujo constante y conocido. Las bombas peristálticas, sin jeringa, realizan el empuje por compresión de un catéter produciendo los mismos resultados que la bomba de infusión.

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



despejando la transformada de A

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

aplicando antitransformada

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

dividiendo por el volumen de distribución de la sustancia, se obtiene el valor de su concentración

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

Esta es la ley que sigue la concentración de la sustancia A, en este modelo.

A partir de esta ley se pueden obtener otras expresiones de amplia utilidad. Si en la expresión anterior se calcula el límite para el tiempo $t \rightarrow \infty$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [A] = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_i}{k_e \cdot V_d} (1 - e^{-k_e t})$$

se obtiene el valor de la concentración de A a tiempo infinito, es decir el valor al cual tiende la concentración si la infusión se prolonga un tiempo muy largo. Esta expresión resulta

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [A] = [A]_{\infty} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k_i}{k_e \cdot V_d} (1 - e^{-k_e t})$$

de donde finalmente se obtiene que la concentración de A para tiempo infinito es

$$[A]_{\infty} = \frac{k_i}{k_e \cdot V_d}$$

Si los valores de k_i , k_e y V_d son conocidos, se podrá saber a qué concentración máxima, $[A]_{\infty}$, se llegará. Esta expresión también es útil para elegir un valor de k_i para alcanzar una $[A]_{\infty}$ determinada.

Si el objetivo es hallar las variables farmacocinéticas, se infundirá la sustancia hasta obtener la concentración constante, $[A]_{\infty}$. A partir de este momento se suspende la infusión y de la curva de decaimiento de la concentración de la sustancia se halla el valor de k_e . Conociendo k_e , k_i y $[A]_{\infty}$, se puede hallar el volumen de distribución de la sustancia.

El modelo permite obtener el tiempo necesario para alcanzar un porcentaje de $[A]_{\infty}$. Por ejemplo si se desea saber cuánto tiempo se demorará en alcanzar la mitad del valor máximo, esto es $[A]_{\infty}/2$, como se conoce que

$$[A_{\infty}] = \frac{k_i}{k_e V_d}$$

reemplazando ambos valores en la expresión obtenida anteriormente

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

resulta

$$\frac{[A_{\infty}]}{2} = [A_{\infty}] \cdot (1 - e^{-k_e t})$$

distribuyendo $[A_\infty]$

$$\frac{[A_\infty]}{2} = [A_\infty] - [A_\infty]e^{-k_e t}$$

reagrupando los términos con $[A_\infty]$, se obtiene

$$-\frac{[A_\infty]}{2} = -[A_\infty] \cdot e^{-k_e t}$$

simplificando y reemplazando t por $t_{1/2}$, debido que a ese tiempo la concentración de A es igual a $[A_\infty]/2$, resulta

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

despejando $t_{1/2}$

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

Como se puede observar el tiempo para alcanzar una fracción (en este caso 50%) del valor máximo es independiente de la k_i e inversamente proporcional a k_e .

De la misma manera se pueden obtener valores del tiempo para alcanzar un $x\%$ del valor máximo. Siguiendo una deducción similar se obtiene

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

Existe otra metodología para obtener los parámetros farmacocinéticos, especialmente cuando el tiempo necesario para la

estabilización es muy largo. En este caso se utiliza la derivada de la función. Si se deriva la expresión

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

se obtiene

$$[A]' = \frac{k_i}{k_e \cdot V_d} (0 - e^{-k_e \cdot t} \cdot (-k_e))$$

reordenando resulta

$$[A]' = \frac{k_i}{k_e \cdot V_d} (k_e e^{-k_e \cdot t})$$

simplificando y pasando el término exponencial al denominador

$$[A]' = \frac{k_i}{V_d \cdot e^{k_e \cdot t}}$$

A tiempo cero, el valor de la derivada resulta

$$[A]_0' = \frac{k_i}{V_d} \cong \frac{\Delta[A]}{\Delta t}$$

Como indica la ecuación anterior, la derivada a tiempo cero⁹ se puede aproximar por el cociente incremental entre la concentración de la sustancia y el tiempo. El valor obtenido del cociente incremental¹⁰ será tanto más próximo al valor de la derivada, cuanto más pequeño sea el valor de Δt . En este punto es importante resaltar que la amplitud del Δt puede estar restringida por diferentes motivos. Por ejemplo se debe tener un Δt de dimensión suficiente como para que la técnica utilizada para medir $[A]$ detecte diferencias significativas entre los valores, de manera que el $\Delta[A]$ sea un valor confiable y no una mera representación del error experimental de la determinación. Como se observa en la figura 5.2 cuanto mayor sea el Δt , peor será la estimación que se obtendrá de la derivada.

Uno de los inconvenientes que se puede presentar es alcanzar el valor A_∞ cuando k_e tiene un valor pequeño. Observando la siguiente expresión

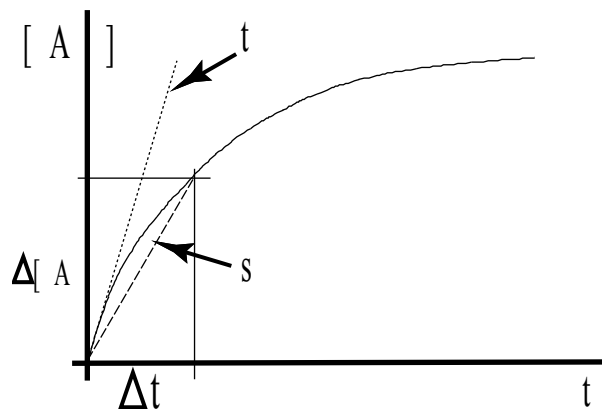


figura 5.2

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

¹⁰ es la pendiente de la recta s en la figura 5.2

$$[A]_0 = \frac{k_i}{V_d}$$

se deduce que la derivada a tiempo cero es directamente proporcional a k_i . En base a esto se puede modificar la infusión para alcanzar el plateau en un tiempo más corto. Para ello al inicio se infunde a una velocidad mayor, de manera que k_i sea mayor que la que se utilizará en el resto de la infusión. Como se puede ver en la figura 5.3, la línea continua muestra la evolución que seguiría la concentración de A con la constante k_i , mientras que la línea de puntos muestra la evolución con una k_i mayor. Como lo muestran las flechas las tasas de infusión tienen una relación inversa con el tiempo necesario para alcanzar A_∞ .

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

$$\frac{D_0}{V_d} \cong [A_\infty]$$

y simultáneamente infundir a velocidad k_i . De esta manera se alcanzaría el valor del plateau al inicio del experimento y luego lo mantendríamos. Se debe observar que con ambas metodologías se necesita tener una noción del proceso. En el primer caso se debería conocer cuándo se ha alcanzado la concentración constante y

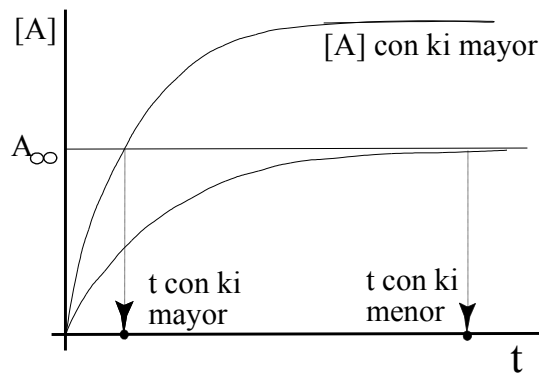


figura 5.3

cambiar la velocidad de infusión al valor previsto. En el segundo caso se debería tener una estimación del volumen de distribución.

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

Además como se observa en la figura 5.4 se puede estimar el tiempo que la minibomba osmótica presenta un flujo regular. Para este ejemplo es de aproximadamente 25 horas. La línea de puntos muestra la variación real de la concentración de la sustancia A en el recipiente, mientras que la línea continua corresponde a la recta que ajusta los valores con un comportamiento lineal cuya pendiente es $1,1 \mu\text{M}/\text{hora}$. Si el recipiente en que se colocó la minibomba tiene un volumen de 1 litro, esto indica que cada hora se vuelcan al recipiente $1,1 \mu\text{mol}$ de la sustancia. Este es el flujo de la bomba, el que proporciona un valor de $k_i = 1,1 \mu\text{mol}/\text{hora}$.

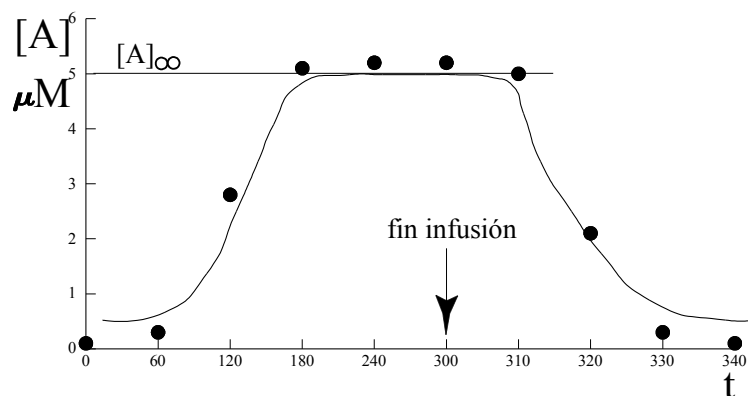


figura 5.5

Aplicación a un caso particular

En la tabla 5.II se muestran los valores obtenidos en una infusión continua con un $k_i = 0,017 \mu\text{mol}/\text{min}$ ($1 \mu\text{mol}/\text{hora}$). Estos mismos valores se visualizan en la figura 5.5. De 0 a 300 minutos se infunde a velocidad constante. En este período está presente la infusión y la excreción. A los 300 minutos se suspende la infusión.

De la tabla 5.II se puede obtener el valor $[A]_\infty$, en este caso dicho valor es igual a $5,2 \mu\text{M}$. De la regresión entre el $\ln[A]$ y el tiempo para $t > 300$ minutos se obtiene k_e . Para los datos de la tabla 5.II, $k_e = 0,14 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0,99$ $p < 0,01$). Estos valores confirman además que el proceso de eliminación es de primer orden. En el caso que la regresión entre el $\ln[A]$ y el tiempo no fuera significativa, el

t	[A] μM
0	0.1
60	0.3
120	2.8
180	5.1
240	5.2
300	5.2
310	5
320	2.1
330	0.3
340	0.1

modelo planteado no sería correcto, ya que el orden del proceso de eliminación no sería uno.

Conociendo estos valores y aplicando la expresión

$$[A]_{\infty} = \frac{k_i}{k_e V_d}, \text{ obtenemos el valor de } V_d$$

$$V_d = \frac{k_i}{k_e \cdot [A]_{\infty}} = \frac{0.017 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}}{0.14 \text{min}^{-1} \cdot 5.2 \mu\text{mol} \cdot \text{litro}^{-1}} = 0.023 \text{ litros}$$

Si se utiliza la derivada de la función a tiempo cero para obtener el valor del volumen de distribución se obtendría

$$[A]_0' = \frac{k_i}{V_d} = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = \frac{0.3 - 0.1}{60 - 0} = 0.00333 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

despejando V_d

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

como se puede observar el valor obtenido del volumen de distribución es notablemente diferente al obtenido anteriormente. La razón principal radica en que al utilizar la ecuación de la derivada a tiempo cero, el intervalo de tiempo empleado es 60 minutos. Este valor de intervalo determina que el cociente incremental no sea una buena aproximación de la derivada.

Los cálculos anteriores indican que la disposición de una ecuación no implica que la misma pueda ser utilizada indiscriminadamente y sin criterio.

CAPÍTULO 6

ESTUDIOS DE ABSORCIÓN EN ÓRGANOS AISLADOS

En este capítulo se describirán experimentos y se desarrollarán modelos aplicados a estudios de absorción y metabolismo de sustancias en órganos aislados *in situ*. La expresión "órgano aislado *in situ*" se refiere a un órgano que se encuentra en el animal, preservando o no todas sus funciones, manteniendo la innervación e irrigación sanguínea. A través de ciertas manipulaciones, químicas y quirúrgicas, se logran controlar algunos de los procesos que en él ocurren. Durante la realización del experimento el animal de experimentación permanece vivo, bajo los efectos de algún anestésico. Los modelos que se presentarán a continuación han sido desarrollados para el estudio de los procesos de absorción del monofluorofosfato (MFP) y el fluoruro de sodio (NaF) [4] en estómago e intestino. Se discutirán a continuación los experimentos y la interpretación de los datos que permitieron desarrollar los modelos definitivos.

MODELO DE ESTÓMAGO AISLADO

A continuación se estudiará el proceso de absorción gástrica de una o más drogas. En particular serán analizados los procesos de absorción e hidrólisis del MFP. Hipotéticamente, el MFP (figura 6.1) ingresa al tubo digestivo, por vía oral, el proceso tendría una constante de velocidad k_1 . Al llegar al estómago éste se podría absorber a través de la mucosa gástrica con una constante k_2 o metabolizar a fluoruro (F), proceso cuya constante de velocidad sería k_3 . A su vez el MFP podría absorberse (k_4) a través de la mucosa y pasar al torrente circulatorio. Por último el MFP y el F podrían pasar al duodeno (k_5 y k_6). Algunos de estos procesos son ya conocidos, otros son el motivo de la investigación.

Si se desea conocer el metabolismo en la luz del estómago es conveniente : siguientes

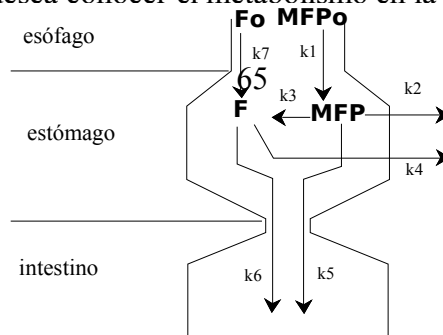


figura 6.1

recursos son aplicables con el objetivo de lograr dicha simplificación.

- Bloqueo del pasaje de las sustancias al duodeno mediante ligadura en el píloro. Con esta ligadura se logra que k_5 y k_6 sean cero. El estómago se aísla del resto del tubo digestivo, pero mantiene su irrigación e innervación. Este modelo se denomina estómago aislado *in situ*. La ligadura del píloro implica una laparotomía abdominal, por lo que es imprescindible una anestesia total del animal utilizado.

- Administración de una dosis única a un dado tiempo, utilizando una sonda gástrica. Con esta maniobra, se logra que no exista un proceso continuo de aporte de la sustancia vía esófago por lo tanto k_1 y k_7 son cero.

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

- el MFP se hidroliza y da como productos fluoruro (F^-) y fosfato (P) [10]. Si bien este proceso está descrito en intestino no existía información sobre su existencia en estómago, en el momento de desarrollar el modelo.
- el fluoruro se absorbe a nivel gástrico, proceso que es favorecido por la formación de ácido fluorhídrico (HF). Este fenómeno es dependiente del pH, dado que este ácido es débil, su formación está favorecida por el bajo pH que presenta la luz del estómago.

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

Tabla 6.I: concentraciones de MFP y F^- en la luz del estómago luego de colocar 2 ml de MFP 60 mM

tiempo (min)	[MFP] μ M	[F^-] μ M
0	52 ± 5	12.6 ± 2
15	48 ± 4	13 ± 5
30	37 ± 7	10 ± 2
45	37 ± 4	9 ± 1
60	35 ± 6	8 ± 2
75	30 ± 1	8 ± 1
90	23 ± 2	7 ± 1

Se realizó un experimento de estómago aislado *in situ* y se midió la concentración de MFP y F^- en función del tiempo. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 6.I. Como se puede observar tanto el MFP como el F^- disminuyen a lo largo del tiempo. La disminución de la concentración de MFP determina que no se puedan descartar los procesos cuyas constantes son k_2 y k_3 . En base a estas observaciones se estableció un modelo preliminar para someter al estudio. El mismo está representado en la figura 6.2

Con el objetivo de determinar la existencia del proceso cuya constante es k_3 se administraron 2 ml de MFP 80 mM a ratas cuyo estómago se había

aislado *in situ*. Los animales se ayunaron previamente durante 24 horas para evitar la presencia de alimentos en la luz gástrica. A los 2 minutos de la administración se retiró el contenido del interior del estómago y se incubó a 37° C durante 385 minutos.

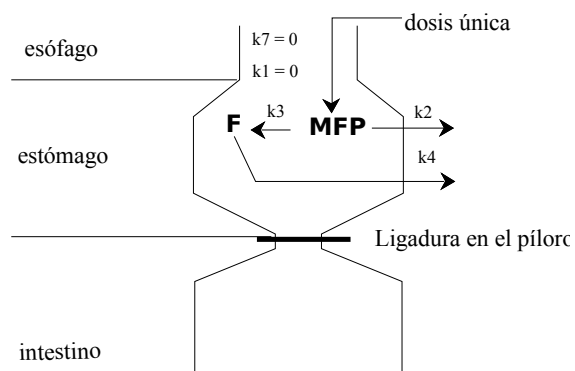


figura 6.2

Con esta maniobra se logra mezclar la solución de MFP con algún posible factor de la luz gástrica (si existe) que pudiera metabolizar el MFP a F⁻, para luego estudiarlo *in vitro*. Se debe notar que al incubarlo *in vitro*, las constantes k_2 y k_4 se desprecian, ya que *in vitro*, el MFP y el F⁻, como tales, no podrían salir del sistema (figura 6.3).

En estas condiciones se determinó la concentración de F⁻ en función del tiempo en el buffer de incubación. La hipótesis que se maneja es la siguiente: si en el estómago el proceso de transformación de MFP a F⁻ tiene lugar, la concentración de F⁻ *in vitro* debe aumentar.

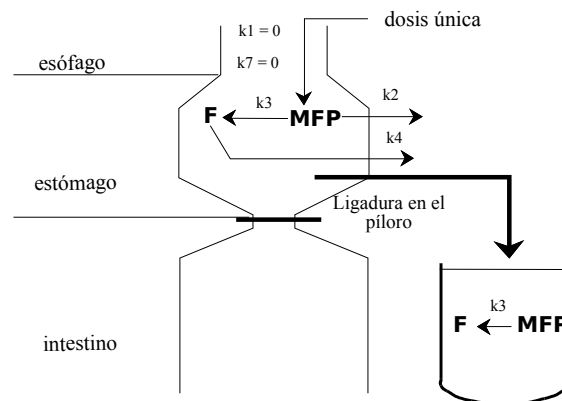


figura 6.3

Los datos que se obtuvieron del proceso son los que se muestran en la tabla 6.II. Analizando los datos de esta tabla mediante regresión lineal se puede ver que la pendiente de la recta que ajusta a los valores de [F⁻] en función del tiempo no discrepa de cero ($-0.001151 \pm 0.0007062 \mu\text{mol/litro} \cdot \text{min}$), por lo que se puede establecer que el proceso de transformación de MFP a F⁻ es despreciable, es decir $k_3 = 0$.

Con los resultados del experimento anterior se puede suponer que la presencia de algún factor soluble en la luz gástrica es despreciable, pero no se puede descartar la presencia de una

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

enzima de membrana que produjera dicha metabolización o algún factor que fuera secretado a la luz no inmediatamente (dentro de los 2 minutos de preincubación *in situ*). Este último problema sería solucionable si se preincubaran a diferentes tiempos y luego se incubaran las soluciones *in vitro* repitiendo el experimento anterior.

En base a los experimentos detallados anteriormente y con las limitaciones impuestas, el modelo para estómago aislado *in situ* luego de una dosis única de MFP queda representado por la figura 6.4

En este punto se puede concluir que el MFP y F^- desaparecen de la luz gástrica por absorción a través de la mucosa gástrica o bien por unión a la membrana.

Para dilucidar si se trata de unión a la membrana o absorción se midió flúor en sangre por microdestilación isotérmica [11] después de 15 minutos de haber llenado el estómago aislado *in situ* con las soluciones que se detallan en tabla 6.III.

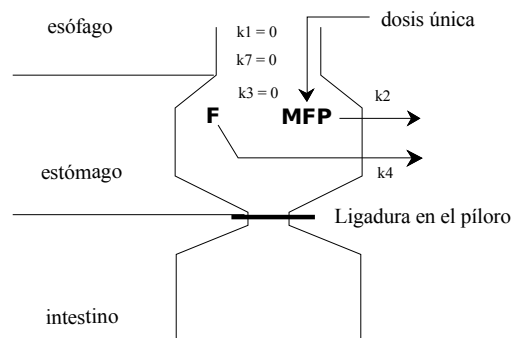


figura 6.4

Tabla 6.III: [F ⁻] determinada por μ DI en plasma luego de 15 minutos de llenar el estómago con 2 ml de las soluciones de la primer columna (n=4)	
solución de llenado	[F ⁻] determinado por μ DI, uM
MFP 0 mM, NaF 0 mM	1.6 \pm 0.5
NaF 80 mM	79.0 \pm 14
NaF 80 mM + Al ⁺⁺⁺ 80 mM	1.8 \pm 1.0
MFP 80 mM, NaF 5 mM	5.8 \pm 1.1
MFP 80 mM, NaF 5 mM + Al ⁺⁺⁺ 5 mM	3.9 \pm 0.8

Cuando en la luz del estómago se colocó una solución de MFP 0 mM y NaF 0 mM, en el plasma se determinó una concentración de flúor de $1,6 \pm 0.5 \mu\text{M}$. Esta sería la concentración basal en un animal no expuesto a una dosis de compuestos con flúor. Cuando el estómago se llenó con una solución de NaF 80 mM a los 15 minutos en el plasma la concentración de F alcanzó el valor de $79 \mu\text{M}$, lo que está confirmando la absorción de fluoruro a nivel gástrico. Esto indica que el decrecimiento de la concentración de fluoruro a nivel gástrico, se debe en parte a un proceso de absorción (la fijación no puede ser descartada). Cuando se utilizó la misma concentración de fluoruro de sodio, pero simultáneamente con concentraciones equimolares de aluminio, que forma un complejo no absorbible entre ambos elementos, concentraciones plasmáticas compatibles con esta inhibición fueron detectadas en plasma 15 minutos después de colocar la solución en la luz gástrica ($1,8 \pm 1.0 \mu\text{M}$). Cuando se colocó una solución de MFP 80 mM que está acompañada por NaF 5 mM la concentración plasmática asciende a $5.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$. En este caso no podemos afirmar que el aumento de la concentración plasmática sea por absorción del MFP. Sin embargo si la solución además tiene aluminio: MFP 80 mM, NaF 5 mM + Al^{+++} 5 mM, la fluoremia es $3.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$. Este último dato indica que aun cuando el F no se absorbe por la unión a Aluminio, el MFP se absorbe y no forma complejo con el Al^{+++} .

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

La ecuación diferencial que representaría el proceso a nivel gástrico quedaría representada de la siguiente manera

$$\frac{dMFP}{dt} = -k_2 \cdot MFP^\delta$$

Como el ajuste de los datos de [MFP] en función del tiempo mediante una función exponencial, es bueno, se puede asumir que el orden del proceso es 1.

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

Esta última ecuación es a variables separables por lo tanto de sencilla resolución. Aplicando transformadas de Laplace (Ver apéndice 3), se obtiene

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

reagrupando

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

despejando la transformada de MFP

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

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

$$MFP = MFP_o \cdot e^{-k_2 \cdot t}$$

dividiendo ambos miembros por el volumen

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

ó

$$[MFP] = [MFP_0] \cdot e^{-k_2 \cdot t}$$

Realizando las regresiones de [MFP] vs tiempo o ln [MFP] vs tiempo, se obtiene en ambos casos un buen ajuste de la función a los datos experimentales. La constante k_2 se obtuvo de la regresión entre ln[MFP] vs tiempo, $k_2 = 0.008197 \pm 0.0009846 \text{ min}^{-1}$

MODELO DE INTESTINO AISLADO

Para estudios de absorción o metabolización intestinal de una sustancia se puede utilizar el modelo de intestino aislado *in situ*. Este modelo es similar al realizado con el estómago aislado de la rata. Como se dijo al inicio de este capítulo se analizará este modelo aplicado al estudio de la absorción de MFP.

Luego de una dosis oral de MFP, al intestino llega una fracción del MFP y del F, provenientes del estómago, figura 6.5.

En el intestino existen las posibilidades de metabolización, excreción y absorción de las sustancias, procesos cuyas constantes de velocidad son k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 , k_7 . Con el propósito de simplificar el estudio y circunscribir el mismo al intestino, se aísla el intestino *in situ*. Para cumplir con este objetivo, se practican dos ligaduras, una en el píloro y otra aproximadamente 4 cm más adelante. En uno de las dos ligaduras se coloca un catéter, por el cual se introducirán las soluciones y se extraerán las muestras.

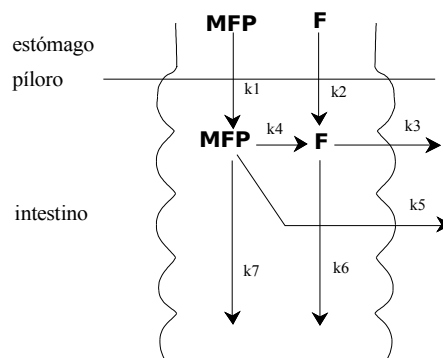


figura 6.5

Utilizando este recurso se logra independizar el estudio del pasaje del estómago al intestino y de la eliminación de ambas

sustancias por materia fecal. De esta manera k_1 , k_2 , k_6 y k_7 se consideran iguales a cero.

Con la operatoria mencionada el sistema en estudio queda reducido a lo representado por la figura 6.6.

En este modelo se representará con k (constante total de desaparición) a la suma de las constantes de hidrólisis del MFP (k_4) y constante de absorción del MFP (k_5).

La constante k es la constante de velocidad del proceso de desaparición del MFP de la luz intestinal, sin discriminar los procesos de hidrólisis y absorción

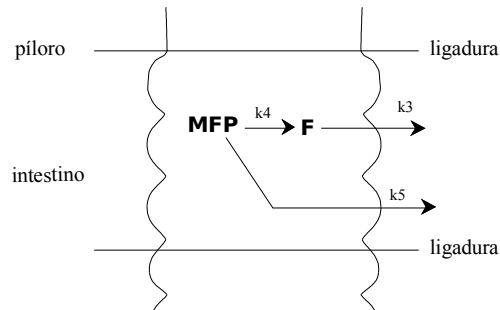


figura 6.6

$$k = k_4 + k_5$$

Se realizó un experimento con fines exploratorios. Los resultados de éste serán posteriormente utilizados para obtener las constantes de velocidad. En este experimento se colocaron por el catéter 2 ml de una solución de MFP 80 mM. Se debe recordar que aún en los casos de contar con drogas de gran pureza, siempre estará presente el fluoruro. Durante 90 minutos se extrajeron muestras de 100 μ l. En estas soluciones, utilizando las técnicas descriptas anteriormente, se determinaron las concentraciones de fluoruro y MFP. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6.IV.

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

Utilizando los valores de $[MFP]$ de la tabla 6.IV, se puede hacer un primer análisis. Los logaritmos naturales de estos valores ajustan con una gran significación estadística a una función lineal del tiempo ($r = 0.9898$, $p < 0,01$), cuya pendiente es $-0,0502 \pm 0.0042 \text{ min}^{-1}$. Se debe recordar

que en caso de existir este tipo de ajuste, indica que la concentración de MFP en la luz intestinal es una función exponencial decreciente del tiempo, del tipo

$$[MFP] = [MFP_0] \cdot e^{-k \cdot t}$$

De la misma manera se pueden analizar

los valores de la concentración de fluoruro para tiempos superiores a 45 minutos¹¹. Si se correlacionan los valores de $\ln[F^-]$ en función

Tabla 6.IV. Concentraciones de MFP y F^- en la luz intestinal luego de llenarlo con MFP 80 mM

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

¹¹ De la observación de los valores de la tabla 6.IV, se puede deducir que más allá de los 45 minutos, el proceso de hidrólisis es despreciable. La ausencia casi total de MFP en la luz intestinal y el franco decaimiento de la concentración de fluoruro son las pruebas de esa afirmación. Por lo tanto a $t > 45$ minutos se puede afirmar que sólo estaría presente el proceso cuya constante de velocidad es k_3

del tiempo, se obtiene un ajuste estadísticamente significativo ($r = 0.9889$ $p < 0,01$) con una pendiente $-0.0186 \pm 0.0023 \text{ min}^{-1}$. Estos resultados indican que el fluoruro desaparece de la luz intestinal en forma proporcional al logaritmo de su concentración. En base a estas observaciones

se puede afirmar que la concentración de fluoruro en la luz del intestino es un proceso de primer orden ajustado por una función exponencial del tipo

$$[F] = [F_0] \cdot e^{-k_3 \cdot t}$$

Se realizó un experimento con el intestino aislado, pero en este caso el lumen se llenó con una solución que sólo contenía NaF, figura 6.7. En este experimento sólo está presente el proceso de absorción del Fluoruro. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 6.V. Correlacionando el \ln de la $[F]$ con el tiempo, se obtuvo un significativo ajuste por una recta, lo que confirma que la desaparición del F es un proceso de primer orden.

La pendiente de la recta (k_3) fue $0,0132 \pm 0.0007 \text{ min}^{-1}$.

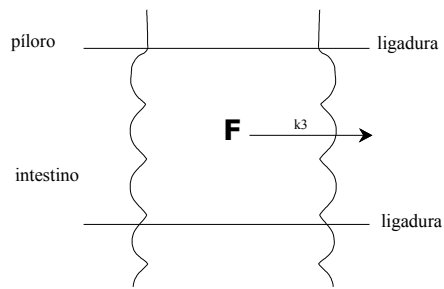


figura 6.7

Comparando el valor de k_3 obtenido con los datos de $[F^-]$ para $t > 45$ minutos de la tabla 6.IV, con el valor de la k_3 hallado a partir de los datos de la tabla 6.V, se puede deducir que el proceso de absorción del F^- es independiente del metabolismo del MFP.

Con el fin de investigar el proceso de hidrólisis del MFP en la luz intestinal, se llenó el intestino con una solución de MFP 80 mM, figura 6.8. Luego de 5 minutos se extrajo el contenido y se lo incubó *in vitro* a 37° C durante 90 minutos. De esta manera se pudo estudiar el proceso de hidrólisis anulando el proceso de absorción intestinal. A intervalos de 15 minutos se extrajeron alícuotas del incubado y se determinó la concentración de fluoruro y monofluorofosfato de sodio.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 6.VI.

Estos resultados indican que el MFP se hidroliza a F^- en la luz intestinal.

Tabla 6.V: concentración de F^- en la luz intestinal luego de llenar la luz con NaF 80 mM

tiempo, min	F^- mM	n
0	75 ± 4	3
15	72 ± 7	3
30	61 ± 6	3
45	49 ± 5	3
60	40 ± 4	3
75	31 ± 6	3
90	23 ± 4	3
105	19 ± 5	3
120	19 ± 1	3

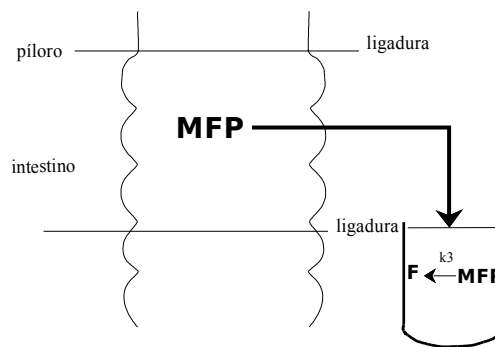


figura 6.8

El MFP es un sustrato de la fosfatasa alcalina [1]. Para comprobar que el proceso de hidrólisis es llevado a cabo por dicha enzima, se realizó un experimento similar al descrito pero en presencia de L-fenilalanina (FAL, inhibidor específico de la fosfatasa alcalina intestinal). Se llenó el intestino con solución de MFP 80 mM en

Tabla 6.VI. Incubación de contenido de intestino

Tiempo	[F ⁻], mM	[MFP] mM
0	6 ± 3	74 ± 5
15	10 ± 9	63 ± 16
30	21 ± 4	58 ± 9
45	29 ± 10	45 ± 5
60	39 ± 4	39 ± 4
75	41 ± 15	30 ± 6
90	65 ± 1	20 ± 4

un grupo de animales en presencia de FAL 14 mM y en el grupo control en ausencia del aminoácido. A los 5 minutos se extrajo la solución y se incubó a 37 ° C. A los tiempos indicados en la tabla 6.VII se extrajeron alícuotas y se determinó la concentración de MFP remanente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.VII.

En ambos casos existe una correlación significativa entre el $\ln[\text{MFP}]$ y el tiempo, confirmando que la velocidad de desaparición del MFP depende de la concentración de MFP. En ausencia de L-fenilalanina, $k_4 = 0,0352 \pm 0.0014 \text{ min}^{-1}$, mientras que en presencia de L-fenilalanina 14 mM, $k_4 = 0,0071 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$. Ambas pendientes discrepan significativamente de cero y son diferentes entre sí ($p < 0,0001$). Estos datos indican que al menos en

Tabla 6.VII. Concentración de MFP (mM) en asa intestinal aislada

tiempo, min	[FAL]=0	[FAL]=14mM
0	99	97
1	97	97
2	94	96
5	85	96
10	71	93
15	56	89
20	50	85
25	43	82
30	30	77
45	22	72

parte el decrecimiento de la concentración de MFP se debe al proceso de hidrólisis catalizado por la fosfatasa alcalina.

Aún con concentraciones muy elevadas de Fenilalanina no se logró una inhibición completa de la hidrólisis. Esto puede deberse a que existe en intestino una fracción de la fosfatasa alcalina insensible a la inhibición por fenilalanina [12]. La imposibilidad de producir una hidrólisis completa no permite utilizar al aminoácido para inhibir la hidrólisis *in vivo* y medir de esta manera el proceso de absorción de MFP intacto cuya constante de velocidad llamamos k_5 . Por lo tanto si bien es posible afirmar que el proceso de hidrólisis de MFP a F⁻ existe, es imposible con estos datos verificar la presencia o ausencia del proceso de absorción de MFP intacto.

Por lo tanto, en base a las evidencias obtenidas con los experimentos descriptos se aceptó como modelo el planteado en la figura 6.6; las constantes k_3 y k_4 han sido verificadas mientras que el proceso cuya constante es k_5 no ha sido aún comprobado.

$$k = k_4 + k_5$$

$$\frac{dMFP}{dt} = -k \cdot MFP$$

aplicando Transformadas de Laplace

$$s \cdot \overline{MFP} - MFP_o = -k \cdot \overline{MFP}$$

$$\overline{MFP} \cdot (s + k) = MFP_o$$

$$\overline{MFP} = \frac{MFP_o}{(s + k)} \quad (*)$$

aplicando antitransformadas

$$MFP = MFP_o \cdot e^{-k \cdot t}$$

dividiendo por volumen:

$$[MFP] = [MFP_o] \cdot e^{-k \cdot t}$$

que corresponde a la ley que ajusta la concentración de MFP en el intestino en función del tiempo.

Para la cantidad de fluoruro en la luz del intestino podemos plantear la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF^-}{dt} = k_4 \cdot MFP - k_3 \cdot F^-$$

aplicando las Transformadas de Laplace correspondiente a cada miembro de la ecuación anterior, obtenemos:

$$s \cdot \overline{F^-} - F_o^- = k_4 \cdot \overline{MFP} - k_3 \cdot \overline{F^-}$$

suponemos que $F_o^- = 0$ (si el MFP tiene un grado de hidrólisis pequeño esta aproximación es correcta)

$$s \cdot \overline{F^-} = k_4 \cdot \overline{MFP} - k_3 \cdot \overline{F^-}$$

reemplazando la transformada de la cantidad de MFP en el intestino (*), resulta

$$\overline{F^-} \cdot (s + k_3) = k_4 \cdot \frac{MFP_o}{(s + k)}$$

$$\overline{F^-} = \frac{k_4 \cdot MFP_o}{(s + k) \cdot (s + k_3)}$$

aplicando las antitransformadas para ambos miembros de la expresión anterior obtenemos:

$$F^- = \frac{k_4 \cdot MFP_0}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

dividiendo ambos miembros por el volumen:

$$[F^-] = \frac{k_4 \cdot [MFP_0]}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

se obtiene la ley que ajusta la concentración de F^- en la luz del asa intestinal aislada.

Se le debe sumar $[F_0^-]$ si el MFP tiene un porcentaje de hidrólisis importante.

Si se analiza esta expresión para $t > 45$ minutos, se puede suponer que la desaparición del MFP fue total y por lo tanto el término $e^{-kt} = 0$. Por lo tanto la expresión queda reducida a

$$[F^-] = \frac{-k_4 \cdot [MFP_0]}{k_3 - k} \cdot e^{-k_3 \cdot t}$$

Si aplicamos \ln a ambos miembros obtenemos una recta, cuya pendiente es $-k_3$. Como se puede observar esto fundamenta el modo en que se obtuvo la constante k_3 a partir de los datos de la tabla 6.VI.

El problema que se planteó a esta altura del análisis fue hallar el valor de k_4 . Dado que los valores de k_3 y k han sido obtenidos de las correlaciones entre $\ln[F^-]$ y $\ln[MFP]$ y el tiempo, se puede calcular el valor de k_4 utilizando dichos valores, la ecuación para la concentración de F^- y los valores experimentales de la tabla 6.IV. En este ajuste la constante k_4 se deja como variable, de manera que un programa de ajuste halle el valor de esta constante que haga mínima la suma de cuadrados de las diferencias de los valores experimentales y los calculados por la función, figura 6.9.

Como $k = k_4 + k_5$
 entonces $k_5 = k - k_4$

El valor de k fue hallado en base a los datos de la tabla 6.IV
 obteniéndose, $k = 0.0502 \pm 0.0042 \text{ min}^{-1}$

El valor de k_4 fue hallado como se explicó en el
 párrafo anterior, el valor obtenido fue: $k_4 = 0.04720 \text{ min}^{-1}$

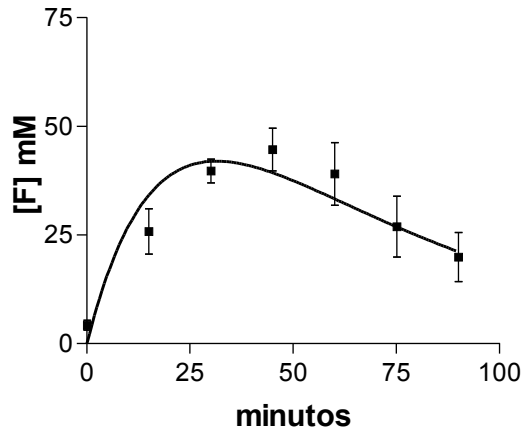


figura 6.9

Se puede calcular entonces k_5

$$k_5 = 0.0502 - 0.04720 = 0.003 \pm 0.0042 \text{ min}^{-1}$$

Como se puede observar la k_5 , no es diferente de cero
 Al considerar $k_4 = 0$, el modelo planteado queda:

$$[F^-] = \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

Análisis de la función hallada para la concentración de fluoruro

En todos los casos es posible estudiar la función y comprobar si la misma se ajusta a lo esperado desde el punto de vista biológico. A partir de la ley obtenida

$$[F^-] = \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

se obtiene la derivada primera con respecto al tiempo

$$[F^-]' = \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (-k \cdot e^{-k \cdot t} + k_3 \cdot e^{-k_3 \cdot t})$$

y se investiga si la función presenta extremos relativos. Para que esto ocurra se debe cumplir que la derivada primera sea cero

$$[F^-]' = 0$$

Para que la derivada primera sea cero, se debe cumplir que

$$-k \cdot e^{-k \cdot t} + k_3 \cdot e^{-k_3 \cdot t} = 0$$

o sea

$$k_3 \cdot e^{-k_3 \cdot t} = k \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$\ln k_3 - k_3 \cdot t = \ln k - k \cdot t$$

reagrupando

$$\ln k_3 - \ln k = (k_3 - k) \cdot t$$

se obtiene

$$\frac{\ln k_3 - \ln k}{k_3 - k} = t$$

Para comprobar si este tiempo corresponde a un máximo o mínimo, se debería reemplazar este tiempo en la derivada segunda de la función y de acuerdo al signo se obtendría la información requerida. En este caso es mas sencillo hacer el siguiente razonamiento. Si se trata de un máximo para

$$t > \frac{\ln k_3 - \ln k}{k_3 - k}$$

se debería cumplir que la función decreciera y por lo tanto la derivada primera debe ser negativa. Para tiempos menores la función debe crecer y por lo tanto la derivada primera ser positiva.

A continuación se hará el razonamiento para tiempos mayores. Si a partir de la última expresión se opera, se obtiene

$$t(k_3 - k) > \ln k_3 - \ln k \quad k_3 - k > 0$$

$$tk_3 - tk > \ln k_3 - \ln k$$

$$\ln k - tk > \ln k_3 - tk_3$$

$$\ln k - \ln e \cdot tk > \ln k_3 - \ln e \cdot tk_3$$

$$\ln k + \ln e^{-tk} > \ln k_3 + \ln e^{-tk_3}$$

$$\ln ke^{-tk} > \ln k_3 e^{-tk_3}$$

$$ke^{-tk} > k_3 e^{-tk_3}$$

Como se cumple esta desigualdad, la derivada primera será negativa, lo que confirma que la función decrece para t mayores al tiempo correspondiente al extremo relativo. El mismo razonamiento puede hacerse para t menores.

Esto indica que la función tiene un máximo, lo cual es coherente con el comportamiento de la concentración de fluoruro observado en la tabla 6. V.

Otra comprobación que puede hacerse es analizar el comportamiento de la función para tiempos muy grandes, es decir obtener el límite de la función para el tiempo tendiendo a infinito

$$[F^-] = \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [F^-] = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t})$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} [F^-] = \frac{k \cdot [MFP_o]}{k_3 - k} \cdot (1 - 1) = 0$$

como se puede observar el límite es cero, lo cual es también compatible con los datos de tabla 6.IV, aun cuando en el intervalo de duración del experimento la concentración de fluoruro no se hizo cero.

ABSORCIÓN INTESTINAL DE MFP EN PRESENCIA DE CALCIO

En este capítulo se planteó un mecanismo para la absorción de MFP en intestino y se desarrolló un modelo matemático que describe dicho mecanismo (figura 6.10).

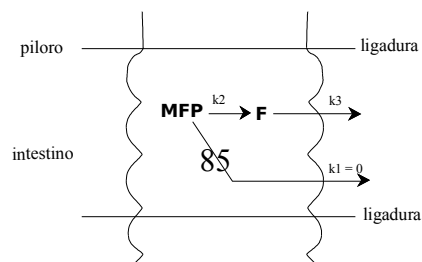


figura 6.10

Se demostró que en el intestino aislado *in situ* de la rata, el MFP sufre hidrólisis a fluoruro (F^-), proceso cuya constante de velocidad simbolizamos k_2 . El fluoruro generado por el proceso hidrolítico se absorbe a través de la mucosa con una constante de velocidad k_3 . Utilizando el modelo matemático desarrollado previamente en este mismo capítulo, se demostró que en las condiciones de los experimentos realizados no existe absorción de MFP sin hidrolizar. Por lo que en estas condiciones k_1 no difiere de cero. Esto podría deberse a que el proceso de hidrólisis es cinéticamente favorable respecto de la absorción del MFP. Los procesos químicos que ocurren en el intestino han sido modelizados obteniéndose las siguientes leyes para la concentración de MFP y Fluoruro:

$$[MFP] = [MFP]_0 e^{-k_1 t} \quad (1)$$

$$[F^-] = \frac{k_2 [MFP]_0}{k_3 - k_2} (e^{-k_2 t} - e^{-k_3 t}) \quad (2)$$

Los experimentos que se mostraron anteriormente, destinados a investigar el mecanismo de absorción del MFP se realizaron en ausencia de calcio. Sin embargo la terapia de la osteoporosis con MFP es habitualmente acompañada por sales de calcio. Se demostró a través de experimentos *in vitro*, que la fosfatasa alcalina intestinal es inhibida por el calcio 50 mM [13]. Si el fenómeno se repitiera *in vivo*, se debería observar una disminución en el valor de k_2 . Este cambio produciría un aumento de la vida media del MFP en la luz intestinal, posibilitando su absorción. Por otra parte, el MFP forma con el calcio un compuesto de características más liposolubles y mejor permeabilidad [13] a membranas. Trabajos anteriores utilizando un modelo experimental similar al descrito en este capítulo no demostraron efectos del calcio sobre la absorción del MFP [14].

Tabla 6.VIII. Concentraciones de MFP y F en la luz del intestino aislado <i>in situ</i> en ausencia y en presencia de calcio						
	[Ca ⁺⁺] = 0 mM			[Ca ⁺⁺] = 50 mM		
minutos	[MFP] mM	[F], mM	n	[MFP] mM	[F], mM	n
0	65±14	4.2±2.1	5	62±9	5.1±2.0	4
15	41±18	26±8.7	5	30±12	11±1.0	4
30	15±14	40±4.7	5	16±11	11±1.8	4
45	3.7±5	45±8.5	5	4.3±3.4	16±1.0	4
60	0.6±1	39±12.5	5	2.7±2.4	14±1.5	4
75	2.7±6	27±12	5	0.3±0.6	13±3.2	4
90	1.8±4	20±9.7	5	0.01±0.001	6.7±7.8	4

A continuación se describirá el uso el mismo modelo experimental y el modelo matemático planteado para investigar el efecto del calcio sobre el mecanismo propuesto.

Con el objetivo de investigar los efectos del calcio sobre los procesos intestinales involucrados en la absorción de la droga, se realizaron experimentos de intestino aislado *in situ*, como se detalló anteriormente. En la luz intestinal de un grupo de animales se colocó una solución de MFP 70 mM en ausencia de calcio (repetiendo el experimento detallado anteriormente en este capítulo).

El asa intestinal de otro grupo de animales se llenó con la misma solución con el agregado de cloruro de calcio con una concentración final de 50 mM¹². Se extrajeron muestras a los tiempos indicados en la tabla 6.VIII en la que se muestran los valores obtenidos para [MFP] y [F⁻]. Los datos se expresan como media ± desvío standard.

¹² La concentración de calcio 50 mM fue elegida teniendo en cuenta que habitualmente un comprimido de MFP tiene 500 mg de Calcio y al ingerir este con un vaso de agua (aproximadamente 250 ml) la concentración que se alcanzaría sería 50 mM.

La figura 6.11 muestra la representación gráfica de los datos y el ajuste realizado con las funciones (1) y (2).

La regresión entre $\ln [MFP]$ y tiempo fue altamente significativa. La pendiente de esta recta da el valor de la constante k . Analizando dichas regresiones en presencia y ausencia de Calcio se obtuvieron los siguientes valores: $k_{\text{sin calcio}} = 0,04713 \text{ min}^{-1}$ y $k_{\text{con calcio}} = 0,0545 \text{ min}^{-1}$.

Como $k = k_1 + k_2$, el valor hallado de k en presencia de calcio no parece corresponder con una disminución de k_2 (por inhibición de la hidrólisis). De existir una inhibición de la fosfatasa alcalina, el resultado hallado estaría indicando que la presencia de calcio permitiría la absorción intestinal del MFP. Este fenómeno no había sido observado en experimentos previos realizados sin calcio.

Para corroborar la suposición anterior se analizaron los datos de $[F]$, con el objetivo de hallar el valor de k_2 . De la observación de los datos de la tabla 6.VIII se puede deducir que a partir de los 45 minutos, el proceso de hidrólisis del MFP es

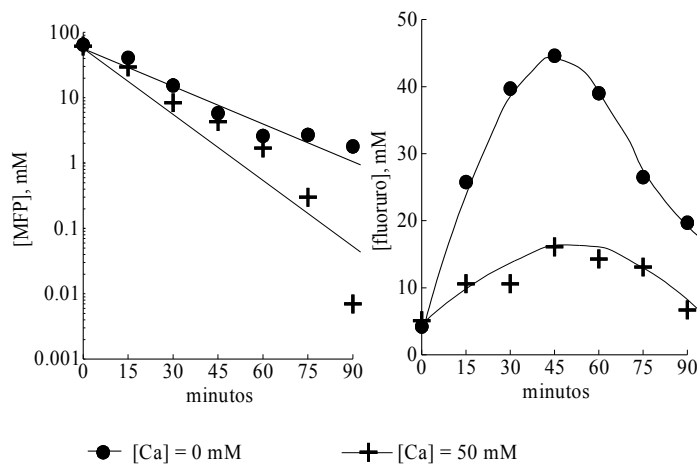


figura 6.11

despreciable debido al agotamiento del sustrato, por lo tanto el primer término exponencial de la ecuación (2) se puede aproximar a cero. Con esta aproximación la ley 2 resulta:

$$[F^-] = \frac{-k_2[MFP]_0}{k_3 - k} e^{-k_3 t} \quad (3)$$

La recta que ajusta los valores de los $\ln[F^-]$ en función del tiempo tiene como pendiente k_3 . Los valores hallados utilizando los datos de la tabla 6.VIII fueron: en ausencia de calcio $k_3 = 0.02278 \pm 0.006997 \text{ min}^{-1}$ $p < 0,01$, en presencia de calcio $k_3 = 0.04996 \pm 0.02052 \text{ min}^{-1}$ $p < 0,05$. La diferencia entre las pendientes no es estadísticamente significativa. Esto estaría indicando que la presencia de calcio no afectaría el proceso de absorción del fluoruro generado por la hidrólisis del MFP. Sí podría estar modificándose la velocidad de absorción del mismo, ya que el fluoruro con el calcio forman compuestos insolubles que disminuirían la concentración del anión.

Cálculo de k_2 y k_1

Se pueden obtener los valores de estas constantes utilizando los datos experimentales y el modelo matemático de las siguientes maneras:

1- *Utilizando los valores de k_3 y k hallados:* con los valores de k_3 obtenidos de la regresión $\ln[F^-]$ y tiempo (para $t > 45 \text{ min}$) y los valores de k , obtenidos de la regresión de $\ln[MFP]$ y tiempo, se calcula k_2 ajustando la función 2 a los datos experimentales de la concentración de F^- . En este cálculo sólo k_2 se mantiene como variable, el valor hallado es aquel que hace mínima la suma de cuadrados de las diferencias de los valores experimentales con el valor hallado con la función, para cada valor de k_2 . En este caso se obtuvieron los siguientes valores: sin calcio $k_2 = 0.05705 \text{ min}^{-1}$, con calcio $k_2 = 0.03388 \text{ min}^{-1}$. Las sumas de cuadrados obtenidas fueron, sin calcio 3310 y con calcio 1404. Los valores hallados de k_1 con

este método fueron sin calcio $k_1 = 0.04713 - 0.05705 \cong 0 \text{ min}^{-1}$, con calcio $k_1 = 0.0545 - 0.03388 = 0.02062 \text{ min}^{-1}$. Se debe tener en cuenta que en este cálculo la constante k_3 utilizada fue obtenida sólo con 4 puntos, incluyendo aún el tiempo del máximo donde la hidrólisis no ha finalizado.

2- *Utilizando sólo el valor de k hallado*: el valor de k es más confiable que el de k_3 , ya que el primero es obtenido en base a 7 puntos. En este caso, k_3 y k_2 se mantienen como variables, ajustando la función 2 a los valores experimentales de concentración de Fluoruro. Los valores hallados de k_3 y k_2 fueron: sin calcio $k_3 = 0.01592 \text{ min}^{-1}$, $k_2 = 0.04740 \text{ min}^{-1}$, con calcio $k_3 = 0.01036 \text{ min}^{-1}$ y $k_2 = 0.01607 \text{ min}^{-1}$. Las sumas de cuadrados fueron: 2878 sin calcio y 472 con calcio. Los valores hallados de k_1 con este método fueron sin calcio $k_1 = 0.04713 - 0.04740 \cong 0$, con calcio $k_1 = 0.0545 - 0.01607 = 0.03843 \text{ min}^{-1}$. Como se puede observar en este caso las sumas de cuadrados halladas, que miden la aproximación de la curva a los datos experimentales son menores, indicando un mejor ajuste.

3- *Utilizando la ordenada al origen de la regresión $\ln[F]$ y tiempo*: la ordenada al origen de la recta obtenida a partir de (3) está dada por la expresión

$$\ln \frac{k_2 \cdot [MFP]_o}{k - k_3} = \text{ordenada al origen}$$

Los valores hallados de la ordenada al origen en ausencia y presencia de calcio fueron 4.875 y 5.448. Utilizando estos valores y las constantes k y k_3 hallados a partir de las regresiones mencionadas, se obtuvieron para k_2 los siguientes valores en ausencia y presencia de calcio 0.0455 y 0.01507 respectivamente. A partir de estos últimos se calculó k_1 : en ausencia de calcio $k_1 = 0.00163 \text{ min}^{-1}$ y en presencia de calcio $k_1 = 0.03943 \text{ min}^{-1}$.

Analizando los valores obtenidos por los tres métodos descritos se puede concluir que independientemente del método

utilizado la relación entre las constantes no difiere significativamente. Por los tres métodos se demuestra que el MFP en presencia de calcio tiene una constante de velocidad de absorción que es diferente de cero y que el calcio produce una disminución del proceso de hidrólisis.

CAPÍTULO 7

FARMACOCINÉTICA DEL FLUORURO DE SODIO (NaF)

El fluoruro de sodio es una droga que se encuentra en la naturaleza y es utilizada desde hace décadas para el tratamiento de las caries y de la osteoporosis [15]. Esta aplicación surgió de observaciones acerca de la incidencia de osteoporosis en zonas con agua de consumo con alto contenido de flúor comparadas con otras sin flúor [16]. Este beneficio se debe a que el fluoruro reemplaza al oxhidrilo en el cristal de hidroxiapatita ósea, formando flúorapatita que tiene mayor cristalinidad [17]. El metabolismo del fluoruro ha sido muy estudiado tanto en seres humanos como en animales de laboratorio y una revisión extensa de este se encuentra disponible en la actualidad [18, 19]. La única forma posible de administración de fluoruro de sodio para actuar a nivel sistémico es a través de una dosis oral. En la figura 7.1 se esquematiza el metabolismo del F^- , luego de una dosis oral (D_o).

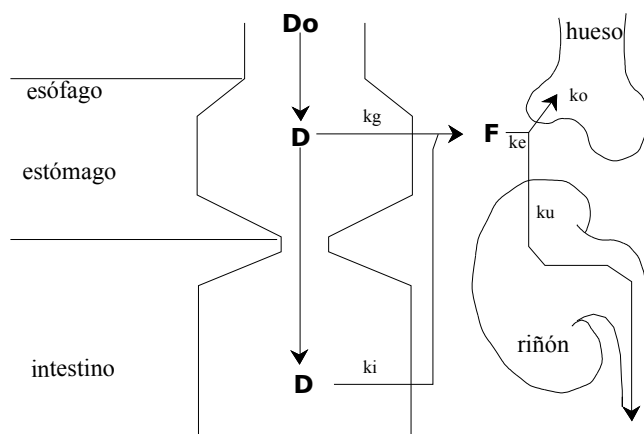


figura 7.1

Luego de administrar la dosis, en el tubo digestivo existe una cantidad de fluoruro: D que irá decreciendo a medida que progresa el proceso de absorción. Este proceso es influenciado por el pH de los compartimientos. Esta influencia se debe a que el F⁻ es una base conjugada fuerte, que puede generar HF (pKa = 3,45) que es más lipofílico y puede atravesar las membranas con más facilidad que el F⁻. El fluoruro se absorbe a nivel gástrico, proceso cuya constante de velocidad será representada como k_g. El fluoruro no absorbido a nivel gástrico se absorbe a nivel intestinal, cuya constante de velocidad es k_i. Ambos procesos contribuyen a la absorción gastrointestinal cuya constante de velocidad es k_a

$$k_a = k_g + k_i$$

Luego de la absorción aparece una cantidad de fluoruro (F⁻) en plasma y demás fluidos del organismo. El espacio de distribución del fluoruro, no coincide con su volumen de distribución (V_d)¹³.

El fluoruro se encuentra en el plasma sin ligarse a componentes del mismo. El F⁻ es depurado del plasma, proceso caracterizado por una constante de velocidad: k_e. Este proceso es llevado a cabo principalmente por el tejido óseo y los riñones. El F⁻ puede ser incorporado al tejido óseo por dos mecanismos: incorporación al hueso en formación y reemplazando al oxhidrilo

¹³ El volumen de distribución de una sustancia es un valor teórico que surge del cálculo

$$[sustancia] = \frac{\text{cantidad de droga en un espacio}}{Vd}$$

Si de la cantidad de sustancia una parte se fija en membranas, su concentración en la solución será baja y como consecuencia el Vd elevado.

En el caso en que la sustancia no se fije a ninguna estructura el Vd será igual al volumen del espacio de distribución*, mientras que si la sustancia presenta fijación el Vd aumentará.

* el espacio de distribución es el compartimiento líquido en que se distribuye la sustancia. Como los volúmenes de los compartimientos líquidos pueden ser estimados, el cálculo del Vd puede dar idea de cuáles compartimientos alcanza la sustancia y si se liga o no a estructura.

del cristal de hidroxiapatita existente. En ambos casos la constante de velocidad del fenómeno se denominará k_o . A nivel glomerular el fluoruro filtra libremente por ser un soluto de bajo peso molecular y no encontrarse ligado a las proteínas. Este proceso tiene una constante de velocidad, k_u . Por lo tanto se puede decir que

$$k_e = k_u + k_o$$

Una vez que el fluoruro filtró a nivel renal, puede ser reabsorbido, proceso que es dependiente del pH. Esta dependencia de la acidez se debe a que el HF es un ácido débil con características más hidrofóbicas que el F^- . Del balance entre el fluoruro filtrado y reabsorbido surgirá la masa de fluoruro en orina (U).

A continuación se analizarán los procesos mencionados, obteniéndose el orden de los mismos y sus constantes de velocidad en la rata.

Absorción gástrica de Fluoruro

Con el objetivo de comprobar el orden del proceso de absorción gástrico se realizó un experimento de estómago aislado *in situ* (ver capítulo 6). En este experimento se llenó el estómago de 6 ratas, con una solución de FNa (58 ± 13) μ M. Se realizaron dos ligaduras, una a la altura del cardias y otra en el píloro. En este último se colocó un catéter para obtener muestras a los tiempos indicados en la tabla 7.I.

Tabla 7.I: concentraciones de NaF en luz gástrica de ratas con estómago aislado

Tiempo, minutos	[F] μ M	n
0	58 \pm 13	6
15	52 \pm 3	6
30	42 \pm 7	6
45	37 \pm 8	6
60	34 \pm 10	6
75	31 \pm 10	6
90	26 \pm 1	6

Realizando las regresiones de los datos experimentales ($[]$ vs tiempo, $\ln[]$ vs tiempo y $1/[]$ vs tiempo, ver apéndice 1), se obtuvieron los valores de los coeficientes de correlación (r). En todos los casos los ajustes fueron estadísticamente significativos ($r = 0.979$; $r = 0.992$; $r = 0.991$)

respectivamente). Cualquier ajuste es aceptable, debido al elevado grado de correlación entre los datos. Para un proceso de absorción regido por fenómenos pasivos el más adecuado es el segundo caso, que corresponde a orden 1.

En base a este análisis se puede plantear la siguiente ecuación diferencial, que expresa la variación de la cantidad de fluoruro (D) en la luz gástrica

$$\frac{dD}{dt} = -k_g D$$

aplicando las transformadas de Laplace

$$s\bar{D} - D_o = -k_g \bar{D}$$

reagrupando

$$\bar{D} \cdot (s + k_g) = D_o$$

y despejando, se obtiene

$$\bar{D} = \frac{D_o}{s + k_g}$$

cuya antitransformada es

$$D = D_o \cdot e^{-k_g t}$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de la solución

$$\frac{D}{V} = \frac{D_o}{V} \cdot e^{-k_g \cdot t}$$

se obtiene

$$[F^-] = [F_o] \cdot e^{-k_g \cdot t}$$

que es la ecuación que ajusta la concentración de fluoruro en estómago

Absorción intestinal de Fluoruro

Para averiguar el orden del proceso de absorción intestinal se realizó un experimento utilizando el modelo de intestino aislado *in situ* (ver capítulo 6). En este experimento se llenaron aproximadamente 4 cm de intestino delgado con una solución de FNa (74.8 ± 4.8) μM . El experimento se realizó con 6 ratas, que recibieron el mismo tratamiento. Durante el experimento los animales se mantuvieron anestesiados con uretano.

Se realizaron dos ligaduras del intestino delgado, uno en el píloro y otra ligadura distal, en la que se colocó un catéter para introducir la solución. Por este mismo catéter se obtuvieron las muestras a los tiempos indicados en la tabla 7.II.

Con los datos de la tabla 7.II se realizaron las regresiones lineales ([] vs tiempo, $\ln[]$ vs tiempo y $1/[]$ vs tiempo ver apéndice 1). Se obtuvieron los valores de los coeficientes de correlación (r). En todos los casos los ajustes fueron altamente significativos ($r = 0,9855$; $r = 0,9913$; $r = 0,9723$ respectivamente). Se puede observar que el mejor ajuste se logró con el $\ln[]$, lo que indica que proceso tiene una cinética de orden uno.

En base a este análisis se puede plantear la siguiente ecuación diferencial para la variación de la cantidad de fluoruro (D) en la luz del intestino:

$$\frac{dD}{dt} = -k_i \cdot D$$

Tabla 7.II: concentraciones de NaF en luz del duodeno de ratas con intestino aislado *in situ*

tiempo, minutos	[F] μM	n
0	$74,8 \pm 4,8$	6
15	$64,2 \pm 16,8$	6
30	$58,0 \pm 8,5$	6
45	$47,9 \pm 5,4$	6
60	$39,2 \pm 3,9$	6
75	$29,9 \pm 6,2$	6
90	$22,2 \pm 4,0$	6
105	$19,7 \pm 6,5$	6
120	$18,0 \pm 8,5$	6

aplicando las transformadas de Laplace, se obtiene

$$s\bar{D} - D_o = -k_i \bar{D}$$

que reagrupando términos, resulta

$$\bar{D} \cdot (s + k_i) = D_o$$

despejando la transformada de D

$$\bar{D} = \frac{D_o}{s + k_i}$$

y hallando la antitransformada, se obtiene la expresión que relaciona la cantidad de fluoruro en intestino luego de una dosis en función del tiempo

$$D = D_o \cdot e^{-k_i t}$$

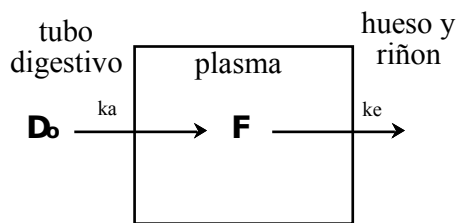


figura 7.2

dividiendo ambos miembros por el volumen, se obtiene la ley para la concentración de fluoruro en el intestino

$$\frac{D}{V} = \frac{D_o}{V} \cdot e^{-k_i \cdot t}$$

$$[F^-] = [F_o] \cdot e^{-k_i \cdot t}$$

Concentración plasmática de fluoruro

Para obtener una ley que describa el comportamiento de la concentración plasmática del fluoruro luego de una dosis oral, se

simplificará el esquema de la figura 7.1, utilizando en este punto el esquema de la figura 7.2. En este caso se considerará la entrada desde el aparato digestivo como una única vía, cuya constante es k_a .

La eliminación de fluoruro del compartimiento plasmático se considerará como un único proceso, cuya constante de velocidad es k_e .

Si a priori se acepta que los órdenes de los procesos de excreción y absorción son iguales a uno, la variación de la cantidad plasmática de fluoruro, queda descrita por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF}{dt} = k_a \cdot D - k_e \cdot F$$

aplicando transformadas de Laplace

$$s\bar{F} - F_0 = k_a\bar{D} - k_e\bar{F}$$

En el tratamiento de esta expresión se considerará que la cantidad de fluoruro en plasma a tiempo cero es despreciable ($F_0 = 0$). Afirmación que es correcta si el individuo al que se aplica el estudio no tuvo ingesta previa de fluoruro. En este caso esto es avalado por el valor de $[F]$ a tiempo 0 (ver tabla 7.III). Si se desprecia F_0 por la razón expuesta más arriba y se reemplaza la transformada de la cantidad de flúor en aparato digestivo (\bar{D})¹⁴, se obtiene

$$s \cdot \bar{F} = k_a \cdot \frac{D_o}{s + k_a} - k_e \cdot \bar{F}$$

que reordenando, resulta

$$\bar{F} \cdot (s + k_e) = k_a \cdot \frac{D_o}{s + k_a}$$

despejando la transformada de la cantidad de fluoruro

¹⁴ Variación de la cantidad de fluoruro en tubo gastrointestinal

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

$$\bar{D} - sD_o = -k_a \cdot \bar{D}$$

$$\bar{D} \cdot (s + k_a) = D_o$$

$$\bar{D} = \frac{D_o}{s + k_a}$$

$$\bar{F} = \frac{k_a D_o}{(s + k_a)(s + k_e)}$$

aplicando la antitransformada de la expresión anterior, se obtiene la función que ajusta la cantidad de fluoruro en plasma

$$F = \frac{k_a D_o}{k_e - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

dividiendo por el volumen de distribución del fluoruro: V_d , se obtiene

$$\frac{F}{V_d} = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a)V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

como la cantidad de fluoruro (F) dividido por el volumen de distribución (V_d) es la concentración de fluoruro en plasma $[F^-]$, la expresión resulta

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a)V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

Es importante tener en cuenta que la expresión anterior se obtuvo bajo ciertas suposiciones, algunas de las cuales fueron ya mencionadas y posteriormente se demostrarán experimentalmente ($F_o = 0$ y órdenes de los procesos iguales a 1). Además se ha considerado que la absorción de fluoruro a nivel gastrointestinal es igual a un 100%. Esta última consideración determina que en la expresión la cantidad inicial de fluoruro es D_o , que es la dosis total administrada. Esta suposición es correcta dado que luego de una dosis oral de fluoruro la excreción por materia fecal es despreciable.

Si la concentración basal de F_o no pudiera ser considerada igual a cero, la ecuación resultaría:

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t}) + [F_o]$$

es decir que simplemente a la expresión hallada se le suma el valor basal que tiene el fluoruro al momento de comenzar el estudio.

Comprobación de los supuestos

Absorción total del Fluoruro a nivel gastrointestinal: Este planteo tiene en cuenta que la absorción sea aproximadamente 100%. Para verificar esta suposición se realizó un experimento en el que se administró a ratas una dosis diaria de 80 μ moles de FNa por sonda gástrica. Se recolectó material fecal y se determinó la excreción de F en heces. Se pudo determinar que en estas condiciones la excreción de F no discrepaba de cero. Es importante tener en cuenta que el modelo podría fracasar si la dosis fuera administrada simultáneamente con cationes como Fe^{+++} , Co^{+++} , Al^{+++} con los cuales el F^- forma compuestos de poca absorción, provocando un aumento de la pérdida de fluoruro por materia fecal.

Orden del proceso de excreción: Con el fin de obtener los órdenes de los procesos de excreción y absorción, se realizó un experimento con animales intactos. Se administró a ratas adultas ayunadas durante 24 hs, una dosis de NaF de 80 μ mol por sonda gástrica. Antes de la administración de la dosis y a los tiempos indicados en la tabla 7.III, se extrajo sangre y se determinó la concentración de F en plasma. Como se puede observar en la tabla 7.III y en la figura 7.3, la fluoremia alcanza un máximo a los 45 minutos de

tiempo, min.	[F ⁻] μ M	n
0	2 \pm 0.6	5
7.5	60 \pm 11	3
15	81 \pm 17	2
30	110 \pm 56	2
45	119 \pm 56	2
60	105 \pm 25	2
75	80 \pm 24	2
90	50 \pm 18	2
120	21 \pm 13	2
180	18 \pm 6	2
360	2 \pm 1	2

administrada la dosis. A partir de este momento existe un decrecimiento de la concentración para alcanzar valores que no discrepan de los basales al cabo de 6 hs.

A partir del máximo en la concentración

plasmática, se puede considerar que la

excreción es el proceso dominante. Por lo tanto si la ecuación deducida anteriormente

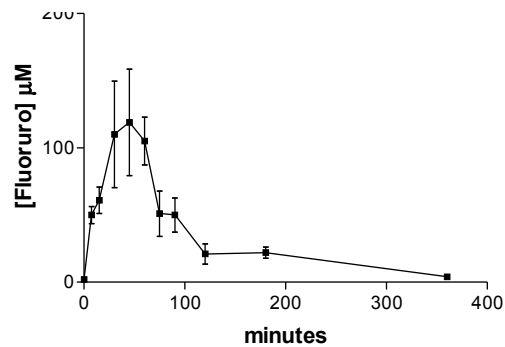


figura 7.3

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

es considerada sólo para tiempos superiores a aquel en que se alcanza el máximo en la concentración (t_0), se puede considerar que el proceso de absorción es despreciable. En estas condiciones, el primer término exponencial se anula, resultando

$$[F^-] = -\frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_e t}$$

Esta ecuación exponencial ajustaría los valores de concentración plasmática a tiempos superiores a t_0 , en el caso que el orden del proceso fuera 1. Con el objetivo de constatar dicha suposición se realizaron las correlaciones habituales entre la [F] y el tiempo (apéndice 1), considerando sólo los datos para t iguales o superiores a 60 minutos. Los valores hallados para las correlaciones

fueron: $[F]$ vs tiempo, $r = -0.7753$, en este caso la pendiente no discrepa significativamente de cero. $\ln[F]$ vs tiempo, $r = -0.9775$, en este caso la correlación es estadísticamente significativa y la pendiente toma el valor $-0.01254 \pm 0.001354 \text{ min}^{-1}$. Este último valor sería la constante de velocidad k_e . $1/[F]$ vs tiempo, $r = -0.9564$, correlación que con un menor significado que la anterior, también es significativa.

Ya comprobado que el orden del proceso de excreción es 1, si se aplica logaritmo a la función anterior, se obtiene la ecuación de una recta.

$$\ln[F] = \ln\left[\frac{-k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d}\right] - k_e \cdot t$$

que es la ecuación de la recta B¹⁵, cuya ordenada al origen es

$$\ln\left[\frac{-k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d}\right] = h$$

En la figura 7.4, se grafica B, habiendo tomado logaritmo a la variable dependiente. La pendiente de esta recta da el valor de k_e .

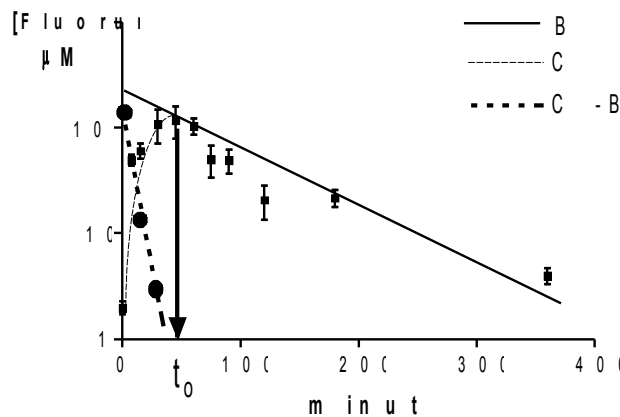


figura 7.4

¹⁵ Se representa con una letra minúscula a la ecuación y con la misma letra mayúscula a su correspondiente gráfica

Aunque esta recta es aplicable a los datos para $t > t_0$, si se extrapola a $t = 0$ se obtiene el valor h , que es la ordenada al origen.

Para estos datos ese valor es $5,112 \pm 0.2432$. Este valor será finalmente utilizado para obtener el valor del V_d .

La función exponencial obtenida mas arriba:

$$[F^-] = -\frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad \text{b}$$

ajusta la concentración de F sólo en presencia de excreción, mientras que la expresión

$$[F^-] = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (e^{-k_a \cdot t} - e^{-k_e \cdot t})$$

ajusta los valores de concentración plasmática de F cuando existe proceso de excreción y absorción. Al aplicar propiedad distributiva en esta expresión se obtiene

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_a t} - \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_e t}$$

c
restando c - b

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_a t} - \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_e t} + \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_e t}$$

simplificando los dos últimos términos que son opuestos, se obtiene

$$[F^-] = \frac{k_a D_o}{(k_e - k_a) V_d} e^{-k_a t}$$

expresión que da la concentración de fluoruro remanente en la luz gastrointestinal luego de una dosis oral de fluoruro: D_o .

Si a esta expresión se le aplica logaritmo, resulta

$$\ln[F^-] = \ln \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} - k_a \cdot t \quad \text{c - b}$$

Esta expresión en la figura 7.4 queda representada por la línea C-B. A partir de la pendiente de esta recta se obtiene el valor de k_a . Esta ecuación equivale a restar los valores experimentales y la extrapolación de la ecuación B. Por lo tanto si se utiliza la ecuación en presencia sólo de excreción (B), con los parámetros obtenidos (k_e y h), y se reconstruye la ecuación, se obtiene

Tabla 7.IV: concentraciones de NaF en plasma en ratas luego de una dosis oral de NaF.

min.	[F ⁻] experimental	[F ⁻] extrapolación	diferencia
0	2 ± 0.6	166	164
7.5	70 ± 11	151	91
15	91 ± 17	138	57
30	110 ± 56	114	4

$$[F^-] = 166 \cdot e^{-0,01254 \cdot t}$$

Método de los residuales para obtener k_a

Con la ecuación anterior se obtienen los valores de $[F^-]$ para $t < t_0$. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 7.IV, junto con los valores ya conocidos obtenidos al realizar el experimento.

La última columna de la tabla 7.I.V, muestra la diferencia, que corresponde a la concentración residual en tubo digestivo.

Realizando las correlaciones habituales, obtenemos: para la regresión [] vs tiempo, $r = -0.9667$. La correlación $\ln []$ vs tiempo, tiene un valor de $r = -0.9729$, y la pendiente de la recta de regresión es -0.125 ± 0.021 , que corresponde a la constante k_a . Finalmente la regresión $1/[]$ vs tiempo, presentó un valor de $r = -0.8963$.

Como se puede observar y coincidiendo con los experimentos de estómago e intestino aislado, el proceso de absorción tiene una cinética de orden uno y la constante de velocidad del proceso es $-0.1246 \pm 0.02091 \text{ min}^{-1}$.

Finalmente, de la ordenada al origen de la recta B (h), se obtiene el valor del V_d , utilizando los valores de las constantes k_a y k_e halladas anteriormente.

$$\frac{-k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} = 166$$

$$\frac{-0.1246 \cdot 80}{(0.01254 - 0.1246) \cdot V_d} = 166$$

despejando V_d

$$\frac{-0.1246 \cdot 80}{(0.01254 - 0.1246) \cdot 166} = V_d$$

resulta

$$V_d = 0.535 \text{ litros}$$

Este valor indica que el fluoruro no se distribuye uniformemente, dado que el volumen hallado es mayor que el volumen de la rata utilizada¹⁶.

Excreción urinaria de Fluoruro después de una dosis oral

La cantidad de fluoruro en orina (U), depende de la concentración plasmática de fluoruro (F). La velocidad de cambio

¹⁶ Para una rata de 200 g, como las utilizadas en estos experimentos, se puede suponer que el volumen total del animal es 200 ml, suponiendo una densidad promedio de 1 g/ml.

de U es proporcional a la cantidad de F en plasma. El fluoruro filtra libremente a nivel de los glomérulos renales, por tener bajo peso molecular y no estar ligado a proteínas del plasma. Por lo tanto la derivada de U respecto de t queda expresada como:

$$\frac{dU}{dt} = k_u F$$

aplicando transformadas de Laplace a la expresión anterior, se obtiene

$$s\bar{U} - U_o = k_u \bar{F}$$

Si el animal no recibió previamente fluoruro, a $t = 0$ la cantidad de fluoruro en orina es despreciable, por lo que podemos considerar que $U_o = 0$. Con esta última suposición y reemplazando la transformada de la cantidad de F en plasma, hallada al desarrollar la ecuación de fluoremia

$$\bar{F} = \frac{k_a \cdot D_o}{(s + k_a)(s + k_e)}$$

se obtiene

$$s\bar{U} = \frac{k_u \cdot k_a \cdot D_o}{(s + k_a) \cdot (s + k_e)}$$

despejando la transformada de la excreción urinaria

$$\bar{U} = \frac{k_u \cdot k_a \cdot D_o}{s(s + k_a)(s + k_e)}$$

y aplicando la antitransformada a esta expresión, se obtiene

$$U = k_u k_a D_o \left[\frac{1}{k_a k_e} + \frac{1}{k_a (k_a - k_e)} e^{-k_a t} - \frac{1}{k_e (k_a - k_e)} e^{-k_e t} \right]$$

que da la cantidad de fluoruro en orina en función del tiempo luego de una dosis oral de fluoruro de sodio.

CAPÍTULO 8

FARMACOCINÉTICA DEL MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO

El monofluorofosfato de sodio (MFPNa₂ o simplemente MFP) se utiliza en el tratamiento de caries dentales y osteoporosis [20]. Como se detalla en la figura 8.1, el MFP administrado por vía oral se hidroliza a F⁻ en el intestino por acción de la fosfatasa alcalina intestinal [2]. A nivel gástrico el MFP es absorbido intacto sin sufrir hidrólisis [4]. Esto determina que a nivel plasmático existan dos formas de flúor: el fluoruro iónico (F⁻) y el MFP. Este último en el plasma sanguíneo, se encuentra ligado a las proteínas alfa-2-macroglobulina (α₂M) y al componente C3 del sistema del complemento [5,6]. Esta última fracción determina que la composición de la fluoremia de pacientes que reciben fluoruro de sodio o MFP sea muy diferente [21].

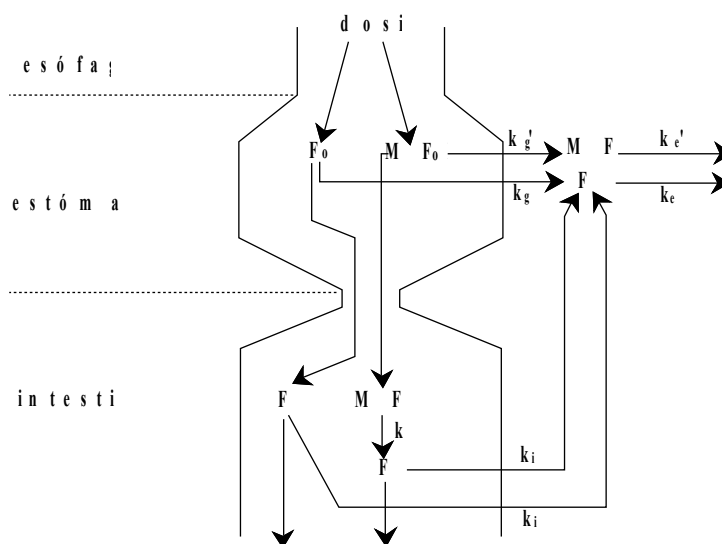


figura 8.1

El MFP es una sustancia que se hidroliza espontáneamente a fluoruro, aun almacenado en condiciones de baja humedad, sin exposición a altas temperaturas ni a radiaciones. Por esta razón es prácticamente imposible obtener MFP con 100 % de pureza. Aún en el caso de contar con MFP de gran pureza, éste es acompañado por fluoruro [22]. Por esta razón al administrar una dosis de MFP, ésta estará compuesta por una parte de fluoruro (F_o) y otra de MFP (MFP_o). Al llegar al estómago el fluoruro se absorbe a través de la mucosa gástrica en forma de ácido fluorhídrico con una constante de velocidad k_g . Simultáneamente el MFP se absorbe a nivel de la mucosa estomacal con una constante k'_g . El fluoruro y el MFP que no se absorben a nivel del estómago pasan al duodeno. El fluoruro se absorbe en este caso como anión fluoruro con una constante de velocidad k_i . Por otro lado el MFP es hidrolizado a F por acción de la fosfatasa alcalina intestinal. Este fluoruro originado de la hidrólisis se absorbe de la misma manera que el fluoruro que acompaña al MFP, como se ha demostrado en el capítulo 6. En ausencia de calcio la absorción del MFP intacto a nivel intestinal es despreciable.

En base a estos fenómenos se pueden plantear ecuaciones que ajustarán tanto la concentración de F^- como la de MFP en los diferentes compartimientos, en función del tiempo.

En plasma, la variación de la cantidad de MFP queda expresada por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dMFP}{dt} = k'_g MFP_{estómago}^{\delta=1} - k'_e MFP^{\delta=1}$$

donde $MFP_{estómago}$ es la cantidad de MFP en la luz gástrica a un tiempo t . MFP es la cantidad de MFP en plasma a un dado tiempo.

El orden del proceso de absorción se considera igual a 1 en base a los experimentos de estómago aislado, detallados en el capítulo 6. Por otro lado el orden de la cinética del proceso de eliminación es 1, orden que queda establecido del análisis de la correlación entre el $\ln[MFP]$ en plasma y el tiempo.

aplicando transformadas de Laplace, se obtiene

$$s \overline{MFP} - MFP_i = -k'_g \overline{MFP}_{est} - k'_e \overline{MFP}$$

reemplazando $\overline{MFP}_{estomago}$ por la expresión detallada en nota al pie ¹⁷, se obtiene

$$s \overline{MFP} = k'_g \frac{MFP_0}{s + k'_g} - k'_e \overline{MFP}$$

reagrupando

$$\overline{MFP} (s + k'_e) = k'_g \frac{MFP_0}{s + k'_g}$$

y despejando la transformada de la cantidad de MFP en plasma (\overline{MFP})

$$\overline{MFP} = k'_g \frac{MFP_0}{(s + k'_g)(s + k'_e)}$$

aplicando la antitransformada, se obtiene la expresión para la cantidad de MFP en plasma, proveniente de la absorción gástrica, luego de una dosis oral MFP_0 .

$$MFP = \frac{k'_g MFP_0}{(k'_g - k'_e)} \left(e^{-k'_e t} - e^{-k'_g t} \right)$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de distribución del MFP (V_d), se obtiene

$$\begin{aligned} \overline{\frac{dMFP_{est}}{dt}} &= -k'_g \overline{MFP}_{est} \Rightarrow s \overline{MFP}_{est} - MFP_0 = -k'_g \overline{MFP}_{est} \\ \Rightarrow \overline{MFP}_{est} (s + k'_g) &= MFP_0 \Rightarrow \overline{MFP}_{est} = \frac{MFP_0}{s + k'_g} \end{aligned}$$

$$\frac{MFP}{V_d} = \frac{k'_g MFP_0}{(k'_g - k'_e) V_d} (e^{-k'_e t} - e^{-k'_g t})$$

en esta última expresión el cociente $\frac{MFP}{V_d}$, es la concentración plasmática del MFP, por lo que la expresión se puede escribir

$$[MFP] = \frac{k'_g MFP_0}{(k'_g - k'_e) V_d} (e^{-k'_e t} - e^{-k'_g t}) \quad (1)$$

esta última expresión relaciona la concentración de MFP luego de una dosis oral de la droga (MFP_0), con las constantes de absorción gástrica y de eliminación del compartimiento plasmático como función del tiempo. Si se dispone de medidas de concentración de MFP en plasma, se pueden obtener los valores de las constantes k'_g , k'_e y V_d . A tiempos mayores al máximo de concentración, se puede suponer que el proceso de absorción ha finalizado o es en todo caso despreciable, por lo tanto la expresión de la $[MFP]$ queda:

$$[MFP] = \frac{k'_g MFP_0}{(k'_g - k'_e) V_d} e^{-k'_e t}$$

si se aplica logaritmo a ambos miembros se obtiene

$$\ln[MFP] = \ln \left[\frac{k'_g MFP_0}{(k'_g - k'_e) V_d} \right] - k'_e \cdot t$$

La representación gráfica de esta función es la recta que ajusta los valores de concentración luego que se ha superado el máximo de la función (figura 8.2).

La pendiente de esta recta de regresión permite conocer el valor de k'_e . Como la rectificación se logra aplicando \ln a la [MFP], el orden del proceso de excreción es 1. El valor de k'_g , se obtiene de aplicar el método de los residuales para los valores de concentración plasmática

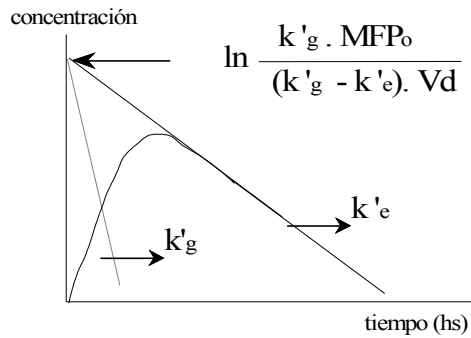


Figura 8.2

anteriores al tiempo en que se alcanza el máximo en la concentración. Este método consiste en restar a los valores teóricos de concentración obtenidos con la función cuando sólo existe excreción, los valores reales de concentración cuando existe excreción y absorción. Los valores obtenidos corresponden a los valores de concentración residual en el tubo digestivo. La regresión lineal con estos valores (----) permite conocer k'_g , valor que se obtiene de la pendiente de la recta. El orden del proceso de absorción de MFP es 1, dado que el logaritmo de las concentraciones residuales ajusta perfectamente a los valores obtenidos. A partir del valor de la ordenada al origen, los valores calculados de k'_g y k'_e y la dosis MFP_o , se puede conocer el valor del volumen de distribución

La variación de la concentración de fluoruro en plasma:[F] queda representada por la expresión

$$\frac{dF}{dt} = k_a F_{g(est+int)} - k_e F$$

donde $F_{f(est+int)}$ representa la cantidad de fluoruro en estómago e intestino. Cuando se analiza la variación de la cantidad de fluoruro plasmático, se deben tener en cuenta ambos aportes, dado que el

fluoruro ingresa al compartimiento plasmático a través de la mucosa gástrica con una constante de velocidad (k_g) y a través de la mucosa intestinal con una constante de velocidad k_i . Si los órdenes del proceso gástrico e intestinal son iguales (en este caso 1) dicha variación se podría expresar como

$$k_g \cdot F + k_i \cdot F = F(k_g + k_i) = F \cdot k_a$$

aplicando las transformadas de Laplace adecuadas, se obtiene

$$s\bar{F} - F_i = k_a \bar{F}_g - k_e \bar{F}$$

F_i , la cantidad de fluoruro inicial, se puede considerar cero para la resolución. Luego se hará la corrección en el caso que F_i sea distinto de cero.

y, reemplazando \bar{F}_g por la expresión deducida al pie de la página

$$s\bar{F} = k_a \frac{F_0}{s + k_a} - k_e \bar{F}$$

reagrupando

$$\bar{F}(s + k_e) = k_a \frac{F_0}{s + k_a}$$

y despejando la transformada de la cantidad de fluoruro en plasma :
 \bar{F}

se obtiene

$$\frac{dF_g}{dt} = -k_a F_g \Rightarrow s\bar{F}_g - F_0 = -k_a \bar{F}_g \Rightarrow$$

$$\bar{F}_g(s + k_a) = F_0 \Rightarrow \bar{F}_g = \frac{F_0}{s + k_a}$$

$$\bar{F} = k_a \frac{F_0}{(s + k_a)(s + k_e)}$$

que buscando su antitransformada resulta:

$$F = \frac{k_a F_0}{(k_e - k_a)} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

dividiendo ambos miembros por el volumen de distribución del fluoruro: V_d

$$\frac{F}{V_d} = \frac{k_a F_0}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t})$$

se obtiene la expresión que da la concentración de fluoruro en plasma $[F]$ proveniente del F que acompaña al MFP, como función del tiempo

$$[F] = \frac{k_a F_0}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t}) \quad (2)$$

En el caso que F_i no pudiera ser despreciado, a esta expresión se le sumará dicho valor, resultando

$$[F] = \frac{k_a F_0}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t}) + [F]_i$$

La variación de la cantidad de fluoruro en plasma proveniente de la hidrólisis del MFP en intestino queda expresada por la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dF}{dt} = k_i F_{\text{int}} - k_e F$$

F_{int} y F son las cantidades de fluoruro en intestino proveniente del proceso de hidrólisis y en plasma. Aplicando transformadas de Laplace, se obtiene

$$s\bar{F} - F_o = k_i \bar{F}_{\text{int}} - k_e \bar{F}$$

suponiendo que F_o es despreciable y reemplazando las transformadas detalladas al pie ¹⁹ y ²⁰ se obtiene

$$s\bar{F} = k_i \frac{k MFP_o}{(s+k)(s+k_i)} - k_e \bar{F}$$

reagrupando

$$\bar{F}(s+k_e) = \frac{k_i k MFP_o}{(s+k)(s+k_i)}$$

y despejando la transformada de F en plasma,

$$\bar{F} = \frac{k_i k MFP_o}{(s+k)(s+k_i)(s+k_e)}$$

$$^{19} \frac{dF_{\text{int}}}{dt} = k MFP - k_i F_{\text{int}} \Rightarrow s\bar{F}_{\text{int}} - F_o = k\bar{MFP} - k_i \bar{F}_{\text{int}}$$

$$\Rightarrow \text{(Por } ^{20}) \quad s\bar{F}_{\text{int}} = k \frac{MFP_o}{s+k} - k_i \bar{F}_{\text{int}} \Rightarrow$$

$$\bar{F}_{\text{int}}(s+k_i) = k \frac{MFP_o}{s+k} \Rightarrow \bar{F}_{\text{int}} = k \frac{MFP_o}{(s+k_i)(s+k)}$$

$$^{20} \frac{dMFP}{dt} = -k MFP \Rightarrow s\bar{MFP} - MFP_o = -k\bar{MFP} \Rightarrow$$

$$\bar{MFP} = \frac{MFP_o}{s+k}$$

por el proceso de antitransformada, se obtiene la variación de la cantidad de fluoruro en plasma proveniente del proceso hidrolítico del MFP en intestino como función del tiempo

$$F = \frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)(k - k_i)} \left[(k_i - k_e) e^{-k t} + (k_e - k) e^{-k_i t} + (k - k_i) e^{-k_e t} \right]$$

si se dividen ambos miembros de la expresión anterior por el volumen de distribución del fluoruro: V_d , se obtiene

$$\frac{F}{V_d} = \frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)(k - k_i) V_d} \left[(k_i - k_e) e^{-k t} + (k_e - k) e^{-k_i t} + (k - k_i) e^{-k_e t} \right]$$

que da la concentración de fluoruro en plasma en función del tiempo. Esta función ajusta aquella fracción del fluoruro proveniente del proceso hidrolítico.

$$[F^-] = \frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)(k - k_i) V_d} \left[(k_i - k_e) e^{-k t} + (k_e - k) e^{-k_i t} + (k - k_i) e^{-k_e t} \right]$$

(3)

Sumando las expresiones (2) y (3) se obtiene la ecuación que describe el comportamiento de la concentración de fluoruro en plasma. Esta expresión tiene en cuenta tanto la variación de F^- en plasma proveniente de la hidrólisis del MFP como la del fluoruro que acompaña al MFP como consecuencia de su hidrólisis espontánea.

$$[F^-]_P = \frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)(k - k_i) V_d} \left[(k_i - k_e) e^{-k t} + (k_e - k) e^{-k_i t} + (k - k_i) e^{-k_e t} \right] + \frac{k_a F_o}{(k_e - k_a) V_d} (e^{-k_a t} - e^{-k_e t}) + [F_o]_P \quad (4)$$

Al terminar los procesos de absorción e hidrólisis la concentración de fluoruro plasmático como función del tiempo queda representada por la ecuación:

$$[F^-]_P = \frac{-k_i k MFP_{0o}}{(k_i - k_e)(k_e - k)V_d} [(k - k_i)e^{-k_e t}] + \frac{k_a F_o}{(k_e - k_a)V_d} (-e^{-k_e t}) + [F_o]_P$$

despreciando $[F_o]_P$ y simplificando y eliminando paréntesis, se obtiene

$$[F^-]_P = \frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)V_d} e^{-k_e t} - \frac{k_a F_o}{(k_e - k_a)V_d} e^{-k_e t}$$

sacando como factor común el término exponencial

$$[F^-]_P = \left[\frac{-k_i k MFP_o}{(k_i - k_e)(k_e - k)V_d} - \frac{k_a F_o}{(k_e - k_a)V_d} \right] e^{-k_e t}$$

Si llamamos A al corchete de la expresión anterior

$$A = \left[\frac{-k_i k MFP_0}{(k_i - k_e)(k_e - k)V_d} - \frac{k_a F_0}{(k_e - k_a)V_d} \right]$$

la expresión se puede escribir

$$[F^-] = A \cdot e^{-k_e t}$$

calculando el logaritmo de ambos miembros, se obtiene la ecuación de una recta donde la ordenada al origen es $\ln A$ y la pendiente $-k_e$ (figura 8.3). Utilizando el valor de la ordenada al origen ($\ln A$), MFP_o , F_o , los valores de V_d y k_a obtenidos en un estudio farmacocinético con FNa, y una estimación de k (constante de hidrólisis de MFP en intestino) se puede obtener el valor de k_i .

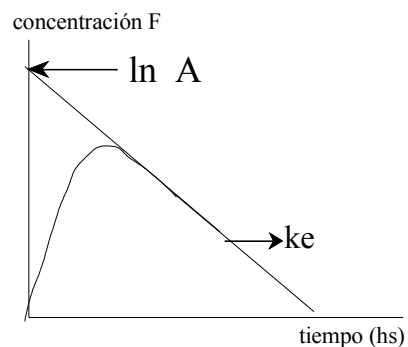


figura 8.3

CAPÍTULO 9

FARMACOCINÉTICA SIMPLIFICADA DEL NaF

Uno de los métodos para obtener información respecto de la farmacocinética de una droga es a través del análisis de las curvas que ajustan los valores de la concentración plasmática de la sustancia en función del tiempo. La obtención de los valores de concentración plasmática presenta ciertas dificultades de índole práctica. En primer lugar, la técnica de medición de la sustancia y el instrumental necesario. Por otro lado la molestia que se ocasiona al paciente. Normalmente se requiere una importante cantidad de determinaciones por lo que el paciente deberá ser sometido a numerosas extracciones sanguíneas. Como consecuencia de esto el tiempo que dura el estudio suele ser largo, lo que acarrea dificultades, especialmente para un paciente que no se encuentra internado.

En el caso del fluoruro de sodio, la segunda dificultad es la más difícil de solucionar. Son necesarias aproximadamente 10 muestras de sangre del paciente, para obtener una curva de concentración plasmática de fluoruro, que permita calcular valores confiables de las constantes farmacocinéticas del fluoruro.

Se debe recordar que luego de una dosis de fluoruro por vía oral (D_o), el fluoruro se absorbe a nivel gastrointestinal [4,8] (figura 9.1). Este proceso sigue una cinética de primer orden con una constante de velocidad de absorción gastrointestinal: k_a . El fluoruro absorbido se distribuye en el espacio sanguíneo (F), en un volumen de distribución:

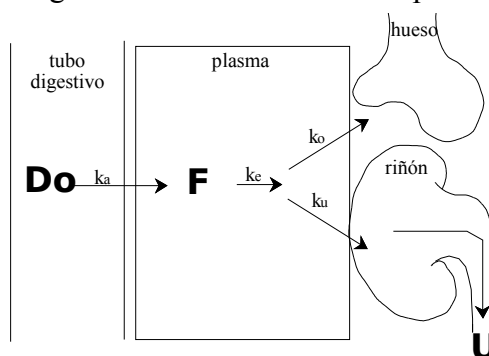


figura 9.1

Vd. En plasma puede existir una concentración basal de fluoruro: F_o , valor que puede o no ser despreciable, dependiendo de la exposición previa del paciente a compuestos con flúor. De este espacio es depurado siguiendo un proceso de primer orden, con una constante de velocidad de eliminación: k_e . Este proceso de depuración tiene dos componentes. Por un lado la depuración renal, ya que el fluoruro al hallarse libre en plasma y ser un compuesto de bajo peso molecular, filtra libremente en el riñón. Este proceso tiene una constante de velocidad de eliminación urinaria que se representará como k_u . Por otro lado el hueso capta fluoruro por la afinidad que tiene éste último por el cristal de hidroxiapatita, donde reemplaza al oxhidrilo, formando fluorapatita. Este último proceso tiene una constante de captación ósea: k_o . De la dosis administrada (D_o), una fracción variable es excretada por orina (U) dentro de las 24 horas.

La obtención de 10 muestras de sangre es un problema real para el paciente, teniendo en cuenta que se deberían obtener dichas muestras en un período de 6-8 hs.

Como ya se ha demostrado, luego de una dosis oral de fluoruro: (D_o), la concentración plasmática de flúor iónico: $[F^-]$, se ajusta por la siguiente ecuación

$$[F^-] = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (e^{-k_a \cdot t} - e^{-k_e \cdot t}) + [F_o^-]_o \quad \text{Ecuación 9.1}$$

y la excreción urinaria acumulada hasta un tiempo t , queda expresada por la siguiente ecuación

$$U = k_u \cdot k_a \cdot D_o \cdot \left[\frac{1}{k_a \cdot k_e} + \frac{1}{k_a \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_a \cdot t} - \frac{1}{k_e \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_e \cdot t} \right]$$

Ecuación 9.2

A partir de ellas, utilizando límite y derivación, se pueden obtener algunas expresiones, útiles para un análisis farmacocinético. A continuación se detallan ecuaciones obtenidas a partir de 9.1 y 9.2:

1) Derivando la ecuación 9.1 respecto del tiempo se obtiene:

$$\left[F^- \right]' = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (-k_a \cdot e^{-k_a \cdot t} + k_e \cdot e^{-k_e \cdot t})$$

valorizando la ecuación anterior en $t = 0$, se obtiene

$$\left[F^- \right]'_o = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (-k_a + k_e)$$

que reordenándola

$$\left[F^- \right]'_o = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (k_e - k_a)$$

simplificando se obtiene así la derivada de la ecuación 9.1 a $t = 0$.

$$\left[F^- \right]'_o = \frac{k_a \cdot D_o}{V_d} \quad \text{Ecuación 9.3}$$

Si la concentración basal de fluoruro fuera distinto de cero, la derivada de $[F^-]$ plasmática sería la misma función que cuando la $[F^-]$ basal es cero. Esto se debe a que la derivada de una constante es cero.

2) obteniendo el límite de U a tiempo infinito

$$\lim_{t \rightarrow \infty} U = \lim_{t \rightarrow \infty} k_u \cdot k_a \cdot D_o \cdot \left[\frac{1}{k_a \cdot k_e} + \frac{1}{k_a \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_a \cdot t} - \frac{1}{k_e \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_e \cdot t} \right]$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} U = k_u \cdot k_a \cdot D_o \cdot \frac{1}{k_a \cdot k_e} = U_\infty$$

simplificando se obtiene

$$U_{\infty} = \frac{k_u D_o}{k_e} \quad \text{Ecuación 9.4}$$

que es la excreción urinaria de fluoruro a tiempo infinito, contando el tiempo a partir del momento que se administra una dosis oral. Este valor es la cantidad de fluoruro que no es retenida en el organismo y se elimina por orina. Se puede considerar que por esta vía se elimina aproximadamente el 100 % de flúor no retenido. Este valor no es difícil de obtener en un caso como el fluoruro, dado que dentro de las 24 horas, se excreta por orina la mayor parte del flúor no retenido. En el caso de drogas donde el tiempo de excreción sea más prolongado, puede ser difícil obtener su valor dado que se debería recolectar orina durante varios días, lo que sería prácticamente complejo y además ocasionaría molestias a los pacientes.

3) derivando la ecuación 9.2 respecto del tiempo

$$U' = k_u \cdot k_a \cdot D_o \cdot \left[0 + \frac{1}{k_a \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_a \cdot t} \cdot (-k_a) - \frac{1}{k_e \cdot (k_a - k_e)} \cdot e^{-k_e \cdot t} \cdot (-k_e) \right]$$

simplificando y reordenando, resulta

$$U' = \frac{k_u \cdot k_a \cdot D_o}{(k_a - k_e)} \cdot [e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}]$$

La gráfica de la función $U'(t)$ es una campana, su máximo valor se obtiene en el tiempo:

$$t_m = \frac{\ln\left(\frac{k_e}{k_a}\right)}{(k_e - k_a)} \quad \text{Ecuación 9.5}$$

En base a las ecuaciones 9.3, 9.4 y 9.5 se puede diseñar un método para obtener datos farmacocinéticos sólo con tres extracciones de sangre, en un período de 2 a 3 horas. Como se esquematiza en la figura 9.2, este método consiste en dar una dosis

de fluoruro D_o . Cuando la concentración de fluoruro comienza a bajar (aproximadamente 4 hs. después de la dosis) se obtiene una muestra de sangre, 1-2 horas más tarde se obtiene una segunda muestra sanguínea. En este período se puede asumir que la variación de la concentración de fluoruro es sólo debido a la eliminación, por lo tanto los niveles plasmáticos de fluoruro quedarían ajustado por la ecuación

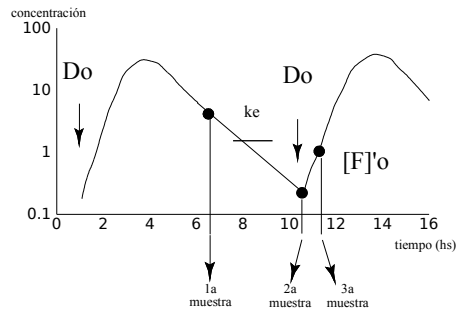


figura 9.2

es sólo debido a la eliminación, por lo tanto los niveles plasmáticos de fluoruro quedarían ajustado por la ecuación

$$[F^-] = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_e - k_a) \cdot V_d} \cdot (-e^{-k_e t})$$

que reordenada

$$[F^-] = \frac{k_a \cdot D_o}{(k_a - k_e) \cdot V_d} \cdot e^{-k_e t}$$

es una función exponencial. Aplicando logaritmo y valorizándola para la 1ª y 2ª muestra

$$\ln[F^-]_{1^a \text{ muestra}} = \ln\left(\frac{k_a \cdot D_o}{(k_a - k_e) \cdot V_d}\right) - k_e t_{1^a \text{ muestra}}$$

$$\ln[F^-]_{2^a \text{ muestra}} = \ln\left(\frac{k_a \cdot D_o}{(k_a - k_e) \cdot V_d}\right) - k_e t_{2^a \text{ muestra}}$$

restando miembro a miembro

$$\ln[F^-]_{2^a \text{ muestra}} - \ln[F^-]_{1^a \text{ muestra}} = -k_e t_{2^a \text{ muestra}} + k_e t_{1^a \text{ muestra}}$$

reordenando

$$\frac{\ln[F^-]_{2^a \text{ muestra}} - \ln[F^-]_{1^a \text{ muestra}}}{t_{1^a \text{ muestra}} - t_{2^a \text{ muestra}}} = k_e$$

Utilizando esta última expresión, los logaritmos de los dos valores de concentración obtenidos, y el intervalo de tiempo comprendido entre la 1ª y 2ª muestra, se puede obtener el valor de k_e .

Inmediatamente se da otra dosis oral de fluoruro y se obtiene una muestra de sangre a los pocos minutos (15-30) de la dosis. Con la diferencia de concentración plasmática de flúor de las dos últimas determinaciones y el intervalo de tiempo se puede calcular un valor aproximado de la derivada de la concentración de fluoruro plasmática a tiempo cero: $[F]'_o$. A partir de la segunda dosis se recolecta orina por 24 hs. Durante las primeras 5 horas se debe juntar la orina en recipientes separados para poder calcular la derivada de la excreción urinaria. Con estos valores se obtiene una aproximación de U' . Con la gráfica de U' vs. t se obtiene el valor de t_m , que corresponde al máximo de la función.

Utilizando la ecuación 9.4 y los valores de U_∞ , D_o y k_e , se obtiene k_u . Con k_e y k_u se obtiene k_o , dado que $k_e = k_u + k_o$. Utilizando t_m y k_e se obtiene k_a , a partir de la ecuación 9.5. Con el valor calculado de k_a y $[F]'_o$ y la dosis administrada: D_o , se halla V_d , utilizando la ecuación 9.3.

CAPÍTULO 10

METABOLISMO DEL COMPLEJO α_2 MMFP

En este capítulo se desarrollarán dos modelos matemáticos para el estudio del metabolismo de la α_2 -macroglobulina. El primero de ellos, aplicable a animales de experimentación, sirvió como exploración del fenómeno para luego desarrollar un modelo aplicable a seres humanos. El segundo modelo que se desarrollará tiene la ventaja de ser aplicable a animales de experimentación y seres humanos bajo condiciones experimentales menos rígidas.

El monofluorofosfato de sodio (MFP) es un compuesto que contiene flúor en su estructura. Esta sal es utilizada en el tratamiento de la osteoporosis [23]. La hidrólisis del enlace F-P produce fluoruro iónico, especie química que tiene actividad sobre las células óseas, estimulando la proliferación osteoblástica [24].

El MFP es hidrolizado a fluoruro y fosfato por la acción catalítica de la fosfatasa alcalina intestinal. El fluoruro producto de la reacción, se absorbe a nivel intestinal [2]. Una fracción de la droga (1-2%) se absorbe intacta a nivel gástrico [4] y se une a las globulinas plasmáticas [8]. La α_2 -macroglobulina (α_2 M: antiproteasa del suero) y el C3 (componente del sistema del complemento) son las proteínas responsables de esta unión [5]. El sitio y mecanismo de unión del MFP a estas proteínas es aún desconocido. Se ha podido determinar que la relación molar de MFP a proteína es 1:1 y la unión del MFP a la α_2 M y C3 produce pérdida de la actividad biológica de ambas proteínas. El complejo formado por la α_2 M y el MFP es captado *in vitro* por células hepáticas y óseas; el mecanismo es dependiente de energía, requiere la participación de microtúbulos y la acción de enzimas lisosomales [6]. Se ha demostrado que el MFP tiene el doble de biodisponibilidad de flúor que el NaF (fluoruro de sodio) en dosis equivalentes de flúor. La mayor biodisponibilidad fue demostrada en ratas y seres humanos [25]. El responsable de la mayor biodisponibilidad de flúor, que presenta el MFP respecto de otras

sales como el NaF, sería el metabolismo de la fracción de flúor ligado a las proteínas.

Aunque se conoce el gen y la regulación de la expresión del receptor de $\alpha_2\text{M}$, el control de la concentración plasmática de $\alpha_2\text{M}$ es desconocido. Su inactivación (por tripsina) determina cambios estructurales que aceleran su captación por receptores tisulares. El estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la concentración plasmática utilizando tripsina como disparador del proceso es inadecuado, sin embargo el MFP al imitar parcialmente este proceso es una herramienta útil para estudiar los mecanismos involucrados en el control de la concentración plasmática. Una de las ventajas de utilizar MFP radica en la posibilidad de determinar las concentraciones del complejo formado por el MFP y la $\alpha_2\text{M}$ ($\alpha_2\text{MMFP}$) y a partir de estos datos es posible conocer las constantes de velocidades de los procesos involucrados en la homeostasis plasmática de la proteína.

MODELO EXPLORATORIO.

En esta sección del capítulo se desarrollará un modelo matemático que permite estudiar la cinética de los procesos de inactivación de $\alpha_2\text{M}$ por su unión al MFP, la reposición de $\alpha_2\text{M}$ a la circulación como consecuencia de su inactivación y la cinética de captación del complejo $\alpha_2\text{MMFP}$. Este modelo es aplicable a animales de experimentación dado que requiere de la inyección endovenosa de MFP y del complejo $\alpha_2\text{M}$ -MFP purificado a partir de un pool de plasmas.

La determinación del complejo $\alpha_2\text{MMFP}$ se realizó utilizando la técnica descrita en un trabajo de nuestro laboratorio [7]. Para la determinación de la concentración plasmática del complejo, las muestras se ultrafiltraron a través de membranas sintéticas AMICON[®] que permiten el paso de sustancias de peso molecular menor a 30 KDa. La concentración de flúor total en plasma y en el ultrafiltrado (flúor difusible) se determinó por potenciometría. Antes de la lectura potenciométrica el flúor es aislado de las muestras utilizando la técnica de difusión isotérmica

[²⁶]. Simultáneamente se procesaron testigos de fluoruro de sodio en agua destilada de concentraciones 1, 10, 20, 100 y 1000 mM. El flúor ligado a las proteínas se determinó por diferencia entre el flúor total y el difusible. Para la determinación de flúor se utilizó un electrodo de ión específico Orion 94-09 conectado a un electrodo de referencia Ag/AgCl adaptado para la medición de volúmenes de 50-100 μ l [²⁷].

La determinación de actividad de α_2 M se realizó utilizando la propiedad del complejo α_2 M-tripsina de hidrolizar sustratos de bajo peso molecular [²⁸]. Las muestras con α_2 M se incubaron con un exceso de tripsina, luego de formado el complejo α_2 M-tripsina, se adicionó un sustrato que el complejo puede hidrolizar, determinando un aumento de absorbancia que se midió espectrofotométricamente a 243 nm. El cambio que se produce en la absorbancia es proporcional a la cantidad de α_2 M presente en la muestra.

En aquellos experimentos en que se requirió el complejo α_2 MMFP purificado, éste fue obtenido por adición de MFP a plasma de ratas, de manera que la concentración de MFP supere 10 veces la concentración de α_2 M. Luego de incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, el complejo α_2 MMFP se purificó de acuerdo a la técnica de Swenson [28]. Finalmente utilizando una columna de Sephadex G100 se obtuvo la fracción de proteínas de PM 180 KDa (peso molecular de la α_2 M).

Estudio de la cinética de secreción e inactivación.

En los experimentos se utilizaron ratas adultas (línea "m" hembras de 200 \pm 20 gramos), anestesiadas con uretano 120 mg/100 g de peso corporal, por vía intraperitoneal.

A través de un catéter en la arteria femoral se inyectó 1 ml de solución 1 mM de MFP en solución fisiológica, con heparina (5mg de heparina/kg de peso corporal).

Antes de la inyección del MFP ($t = 0$) y en los tiempos indicados en tabla 10.I y figura 10.2 se extrajeron muestras de sangre, por el catéter colocado en la arteria femoral. La solución de

MFP²¹ fue preparada en base al tamaño de la rata y la concentración de la proteína en sangre.

Como se puede observar en el esquema representado en la figura 10.1, la actividad de α_2 M en plasma es la resultante de tres

TABLA 10.I: Valores de α_2 M, Ftotal, Fiónico y F ligado luego de una dosis i.v de MFP (n=4)

tiempo minutos	α_2 M $\mu\text{mol}/\text{min.L}$	Ftotal $\mu\text{mol}/\text{L}$	Fdifusible $\mu\text{mol}/\text{L}$	Fligado $\mu\text{mol}/\text{L}$
0	35,3	3,3	2,4	1,2
10	37,0	21,8	15,3	6,5
20	38,3	6,2	7,8	1,5
30	36,5	5,5	7,9	0,7
40	33,8	2,3	6,1	0,0
50	30,7	3,9	5,3	1,4
60	28,8	5,1	5,3	0,0
70	26,1	3,4	3,8	0,0

fenómenos, por lo menos, cada uno de ellos caracterizado por una velocidad:

²¹ Cálculo de la concentración MFP a inyectar por vía endovenosa: Los cálculos se realizaron de manera que la concentración de MFP (teórica) alcanzada en plasma luego de la inyección de MFP supere al menos 10 veces la concentración de α_2 M. La concentración de α_2 M en el plasma de ratas es aproximadamente 0,2 g% (10 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Las ratas de 200 g tienen aproximadamente 10 ml de plasma [Guy Poumeau-Delille. Technique Biologiques en endocrinologie Experimentale Chez le Rat Masson et Cie, Ed. Paris. 1953.] , lo que indica que una rata contiene aproximadamente 0,1 μmol de α_2 M. Al inyectar 1 ml de MFP 1 mM (1 μmol) en solución fisiológica, suponiendo una distribución inmediata en el espacio plasmático, la concentración alcanzada de MFP sería aproximadamente 100 μM (10 veces mayor que la concentración teórica de α_2 M plasmática).

- a) velocidad de secreción de α_2M activa por tejidos: v_s .
- b) velocidad de inactivación por unión de MFP a α_2M : v_i .
- c) velocidad de captación por los receptores tisulares: v_c .

Cada uno de estos procesos fue estudiado utilizando los datos del experimento en períodos de tiempo adecuados, como se muestra en la figura 10.1 y se fundamenta más adelante.

En la figura 10.2 se muestra la representación de los datos

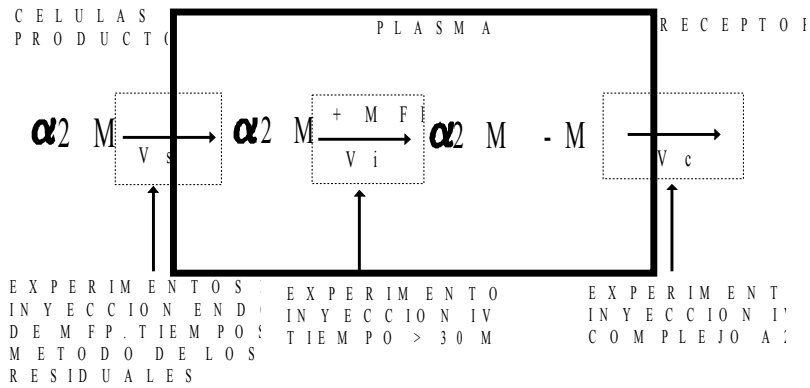


figura 10.1

de la tabla 10.I.

Para analizar los datos de la figura 10.2, el estudio cinético fue dividido en tres períodos de tiempo. Con esta división se logró segregar los fenómenos mencionados en el párrafo anterior:

- A) 0-20 minutos
- B) 20-30 minutos

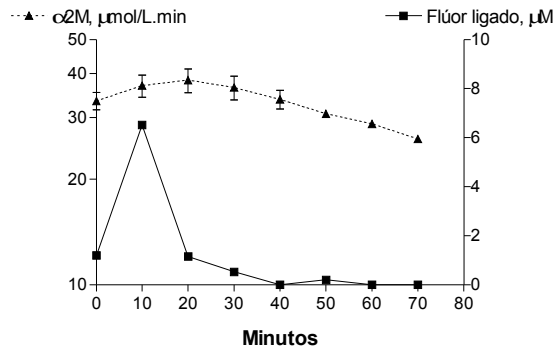


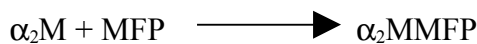
figura 10.2

C) más de 30 minutos

Análisis del proceso a tiempos superiores a 30 minutos (C)

Como se muestra en la figura 10.2, durante este período se observa decaimiento de la actividad de α_2M y ausencia de flúor ligado a las proteínas. Estos datos indican que la velocidad de formación del complejo es inferior a la de captación del mismo por los receptores de los tejidos. El decaimiento de la actividad de α_2M observado a partir de los 30 minutos está representado por la inactivación que sería el paso limitante del proceso global. Se puede considerar la velocidad de secreción despreciable (Ver más adelante).

En este período la reacción



se comportaría como una reacción aislada, dado que $[\alpha_2MMFP] \cong 0$, por lo tanto podemos escribir la reacción como



La velocidad de inactivación de MFP por α_2M (v_i), como reacción aislada será regida por la ecuación

$$v_i = k_i \cdot [\alpha_2M]^{\delta\alpha_2M} \cdot [MFP]^{\delta MFP}$$

v_i : velocidad de inactivación de MFP a α_2M .

k_i : constante de inactivación α_2M por MFP *in vivo*.

$[\alpha_2M]$: concentración de α_2M activa

$\delta\alpha_2M$: orden de la reacción para la α_2M .

$[MFP]$: concentración de MFP libre

δMFP : orden de la reacción para el MFP

Como la concentración de MFP en el plasma (consecuencia de la inyección) es muy superior a la de α_2M , se puede suponer que la v_i será independiente de la [MFP], haciendo a la reacción de pseudo-orden cero respecto del MFP. La ecuación que expresaría la velocidad sería

$$v_i = k_i \cdot [\alpha_2M]^{\delta\alpha_2M}$$

Del análisis de las regresiones de los datos de actividad (o sus transformaciones: log, inversas, etc) de α_2M en función del tiempo se deducirá el orden ($\delta\alpha_2M$) de la cinética del proceso de inactivación, k_i y el tiempo de vida medio de α_2M en presencia de MFP *in vivo*: $t_{1/2}$.

Análisis del proceso en el intervalo 0-20 minutos (A).

En este período se observa un aumento de la actividad de α_2M . Durante esta fase la concentración de MFP fue elevada (MFP: $\alpha_2M = 10:1$). existiendo fijación de MFP a α_2M ya que se observa flúor ligado a las proteínas.

Esta fijación a la α_2M , produciría una disminución transitoria de la concentración de α_2M activa, lo que serviría de estímulo para producir la liberación de α_2M activa (posiblemente a partir de un pool intracelular). El aumento de la actividad y presencia de flúor ligado a las proteínas observados en este período en la figura 10.2, confirman la hipótesis anterior. Las observaciones del párrafo anterior

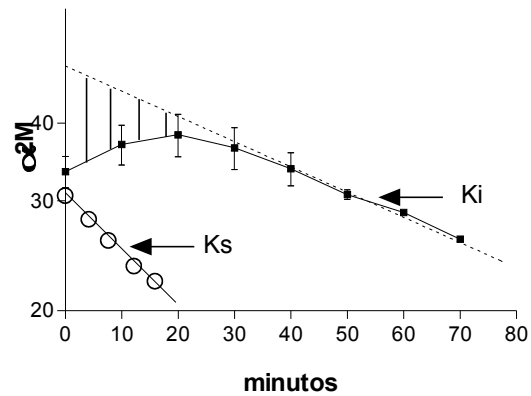


figura 10.3

también indican que en este período la velocidad de producción de la α_2M activa es mayor que la velocidad de inactivación de la α_2M por el MFP y su posterior captación por los tejidos. La presencia de flúor ligado estaría indicando que la velocidad de formación del complejo α_2MMFP es mayor que la velocidad de captación del complejo por los receptores. Esto es congruente con los elevados niveles de [MFP] y α_2M en plasma, que contribuirían a una elevada velocidad de formación del complejo. Inicialmente la concentración del complejo y la velocidad de captación son despreciables. Esta velocidad se iría incrementando con el tiempo al aumentar la concentración del complejo α_2MMFP circulante.

En conclusión hasta los 20 minutos el aumento de actividad de la α_2M observado en la figura 10.2 sería la resultante de los procesos de secreción e inactivación por MFP.

Se aplicó el método de las residuales (ver capítulo 7) para obtener la actividad de α_2M en las células productoras. Para ello se extrapoló a tiempo cero la función que representa el proceso de inactivación (figura 10.3). Por diferencia entre las actividades de α_2M teóricas (extrapolación de la función del proceso de inactivación) con las actividades de α_2M reales, se obtuvo el decaimiento en la actividad de α_2M en las células productoras. A partir del análisis de regresión de la actividad de α_2M en las células productoras (o sus transformaciones) en función del tiempo se pudo conocer el orden de este proceso.

Análisis del período 20-30 minutos (B)

En este período la actividad de α_2M comienza a decrecer, fenómeno que sugiere un agotamiento del pool de reserva, y como consecuencia se observa una disminución de la concentración de α_2M activa, este proceso es acompañado de una disminución en la velocidad de formación del complejo (debido a que disminuyen las concentraciones de α_2M y MFP). Este período no es utilizado para el cálculo dado que concurren simultáneamente los fenómenos de secreción, inactivación y fijación.

En base al modelo matemático planteado para tiempos mayores a 30 minutos (período C), se determinó la cinética de inactivación de α_2M y su constante: k_i .

Cálculo de los parámetros

El mejor ajuste de los datos a partir de los 30 minutos se logró utilizando el logaritmo de los valores de la actividad de la antiproteasa, en este caso el coeficiente de correlación fue: $r = 0,997$. Esto indica que el proceso sigue una cinética de orden 1, cuya ley de velocidad es:

$$v_i = k_i \cdot [\alpha_2M]$$

ó

$$d[\alpha_2M]/dt = - k_i \cdot [\alpha_2M]$$

Se obtuvo un valor de $k_i = -0.0083 \pm 0,0012 \text{ min}^{-1}$ y un $t_{1/2} = 82,9 \text{ min}$. La correlación de las actividades de α_2M en la células secretoras, obtenidas por el método de las residuales en el período A: 0-20 minutos, permitió identificar que el mecanismo de secreción es ajustado a una cinética de orden cero, indicando que es un proceso independiente de concentración intracelular. El valor obtenido para la constante de secreción fue: $k_s = -0,512 \pm 0,031 \text{ } \mu\text{mol}/\text{minuto} \cdot L$.

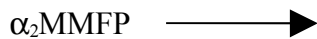
Análisis del proceso de captación del complejo α_2M –MFP

En los experimentos donde se investigó la captación α_2MMFP por los receptores, se inyectó 1 ml de solución fisiológica con heparina (5mg/kg peso corporal) conteniendo 75 nmoles del complejo α_2MMFP . El complejo se purificó como se indica más arriba y se inyectó por el catéter ubicado en la arteria femoral. Por el mismo catéter se extrajeron muestras de sangre antes de la inyección del complejo y a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se determinó flúor total, flúor difusible y flúor ligado a las proteínas en el plasma como se indicó anteriormente. Todo el flúor ligado a las proteínas fue considerado como complejo α_2MMFP ,

debido a que estos animales no poseían tratamiento previo con compuestos fluorados. Se realizaron correlaciones entre la concentración de α_2 MMFP y el tiempo con el objeto de determinar la cinética de captación del complejo, en el período de 0-30 minutos.

En animales con las mismas características, se realizó un experimento en el que se administraron 5 mg de ácido poliinosínico por el catéter arterial, 5 minutos antes de la inyección del complejo α_2 MMFP. El ácido poli-inosínico es un inhibidor específico del receptor de α_2 M. El objetivo de este experimento fue verificar si la desaparición del complejo α_2 MMFP era debido al clearance por lo tejidos que contienen receptores que reconocen al complejo α_2 MMFP.

En estos experimentos con ratas, se inyectó el complejo α_2 MMFP preformado. La etapa limitante del proceso es la captación del mismo por los receptores. Este proceso esta inicialmente representado por la ecuación



cuya ley de velocidad es

$$v_c = k_c \cdot [\alpha_2\text{MMFP}]^{\delta\alpha_2\text{MMFP}}$$

o bien

$$d[\alpha_2\text{MMFP}]/dt = -k_c \cdot [\alpha_2\text{M-MFP}]^{\delta\alpha_2\text{M-MFP}}$$

donde

v_c : velocidad de captación del complejo α_2 MMFP

k_c : constante de captación del complejo α_2 MMFP *in vivo*.

$[\alpha_2\text{MMFP}]$ concentración del complejo α_2 MMFP en plasma

$\delta\alpha_2\text{MMFP}$: orden de la reacción para el complejo α_2 MMFP.

La velocidad de formación del complejo en esta experiencia es nula, ya que se inyectó el complejo α_2 MMFP purificado *in vitro*.

Del análisis de las correlaciones entre la concentraciones del complejo α_2 MMFP y el tiempo, se pudo deducir que la cinética de desaparición del complejo del plasma, es de primer orden, con una constante de captación, $k_c=0,1266\pm 0,019 \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2}= 5,5$ minutos). figura 10.4

En presencia de ácido Poli-inosínico la k_c fue $0,00057\pm 0,014 \text{ min}^{-1}$ que no difirió significativamente de cero.

Estos últimos resultados confirman que la depuración del complejo del espacio plasmático es realizada predominantemente por los receptores no específicos para el complejo α_2 MMFP (figura 10.4).

Los fenómenos de inactivación de la α_2 M y la captación del complejo siguen cinéticas de orden 1 respecto de la concentración de α_2 M en plasma. Sin embargo esto no coincide con los resultados obtenidos en otros experimentos. En aquellos experimentos, al reducir a la mitad la dosis de MFP administrada a ratas, el

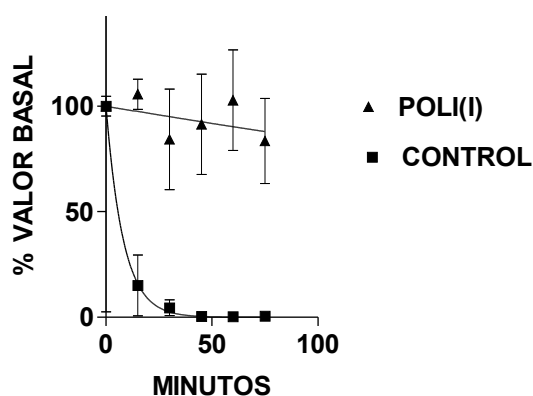


figura 10.4

contenido de flúor óseo se redujo en forma proporcional [8]. Esto indica que si bien en estos experimentos (por el diseño aplicado MFP: α_2 M =10:1) el orden es 1 respecto a α_2 M, *in vivo* no se obtendría tal relación molar y la concentración limitante sería el MFP. Esto estaría indicando que cuando el MFP es el limitante, el orden de la reacción es uno respecto del MFP.

La cinética del proceso secretorio es de orden cero. Esta independencia de la concentración intracelular sería entendible dado

que las proteínas de secreción se hallan empaquetadas en vesículas y su velocidad de secreción está regida por los mecanismos que involucran señales que sensan las concentraciones plasmáticas. Los resultados de estos experimentos indicarían que el restablecimiento de la concentración de α_2M es un fenómeno altamente regulado. Los resultados también estarían indicando que los niveles plasmáticos de α_2M activa serían los encargados de esta regulación.

MODELO MATEMÁTICO COMPLETO

El desarrollo que se muestra tiene como objetivo obtener un modelo matemático para estudiar la cinética de los procesos de inactivación de α_2M por su unión al MFP, la reposición de α_2M a la circulación como consecuencia de su inactivación y la cinética de captación del complejo α_2MMFP utilizando técnicas no invasivas y que puedan ser aplicables a seres humanos.

La determinación de la concentración de α_2MMFP se realizó como se detalló en el modelo anterior.

La concentración plasmática de α_2M depende de ciertos procesos que se representan en la figura 10.5.

Descripción de los términos

k_s : constante de velocidad de secreción de α_2M .

k_i : constante de velocidad de inactivación de α_2M por MFP.

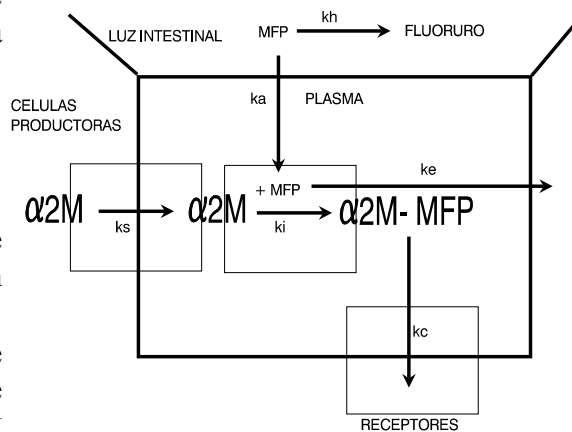


figura 10.5

k_c : constante de velocidad de captación del complejo α_2 MMFP.
 k_e : constante de velocidad de depuración del MFP por vía renal y otras vías posibles.
 k_h : constante de velocidad de hidrólisis de MFP en intestino.
 k_a : constante de velocidad de absorción intestinal de MFP.
 $\alpha_2M(t)$: concentración de α_2M a tiempo t .
 α_2M_0 : concentración de α_2M basal a tiempo 0 .
 $MFP(t)$: concentración de MFP en plasma a tiempo t .
 $MFP_i(t)$: concentración de MFP en intestino a tiempo t .
 $\alpha_2MMFP(t)$: concentración del complejo α_2 Macroglobulina en plasma a tiempo t .
 $d\alpha_2M/dt$: velocidad de cambio de la α_2M activa en plasma.
 $d\alpha_2M\text{-MFP}/dt$: velocidad de cambio de la concentración del complejo $\alpha_2M\text{-MFP}$ en plasma .
 $dMFP/dt$: velocidad de cambio del MFP en plasma.
 $dMFP_i/dt$: velocidad de cambio del MFP en intestino.

Fundamentación del sistema

La concentración de α_2M plasmática tiene un valor constante, que indica la presencia de un proceso regulador. Ante aumentos o disminuciones de la concentración de α_2M existirían mecanismos que restablecerían la concentración plasmática a su valor basal.

El proceso involucrado en la regulación de la concentración puede representarse por el término: $-k_s(\alpha_2M_{(t)} - \alpha_2M_0)$. Cuando la concentración de α_2M supere valores normales, la diferencia de concentraciones ($\alpha_2M - \alpha_2M_0$) será positiva, lo que indica que la concentración de α_2M descenderá. En aquellas situaciones en las que α_2M sea inferior a lo normal, el término ($\alpha_2M - \alpha_2M_0$) será negativo indicando que la concentración de α_2M aumentará.

El MFP libre en plasma, producirá descenso de la concentración de α_2M activa, al producir su inactivación. Experimentos previos en los que se determinó la $d\alpha_2M/dt$

utilizando MFP en concentración 10 veces superior a α_2M indicaron que es de primer orden respecto a α_2M .

Por lo tanto la velocidad de cambio de la concentración de α_2M en plasma queda modelizada por la ecuación 1

$$d\alpha_2M/dt = -k_s(\alpha_2M(t) - \alpha_2M_o) - k_i.MFP(t) \quad \text{Ecuación 1}$$

Dado que la formación del complejo α_2MMFP depende de las concentraciones de α_2M y MFP, por la ley de acción de masas la velocidad de cambio del complejo α_2MMFP queda representada por la siguiente ecuación

$$d\alpha_2MMFP/dt = k_i.\alpha_2M(t). MFP(t) - k_c.\alpha_2MMFP$$

El término: $k_i.\alpha_2M(t). MFP(t)$, se dividió en dos términos, $k_i.\alpha_2M(t)$ y $k_i.MFP(t)$, de manera de linealizar la ecuación, con el objetivo de facilitar su resolución analítica.

De esta manera la ecuación anterior, queda planteada

$$d\alpha_2MMFP/dt = k_i.\alpha_2M(t) - k_c.\alpha_2MMFP(t) + k_i.MFP(t) \quad \text{Ecuación 2}$$

Esta ecuación representa la velocidad de cambio de la concentración del complejo α_2MMFP en plasma. Este complejo existe cuando hay MFP. El primer término indica que a mayor concentración plasmática de α_2M existirá mayor velocidad de formación del complejo

El segundo término representa el proceso de captación del complejo por los receptores de membrana, cuanto mayor sea su concentración mayor será la captación del complejo (siempre y cuando el proceso de captación y reexposición de receptores no se convierta en el paso limitante). El tercer término indica que a mayor concentración de MFP libre la velocidad de formación del complejo será mayor. La igualdad de los órdenes utilizados en MFP y α_2M esta avalada por trabajos previos en que se determinó que la relación molar α_2M : MFP de 1:1.

En experimentos previos en los que se midió la desaparición del complejo α_2 MMFP purificado e inyectado a la rata se demostró que la $d\alpha_2$ MMFP/dt es de primer orden respecto de α_2 MMFP

La variación de la concentración de MFP en plasma queda representada por la ecuación 3.

$$dMFP/dt = -k_i \cdot \alpha_2 M(t) - k_e \cdot MFP(t) + k_a \cdot MFP \quad \text{Ecuación 3}$$

El primer término indica que a mayor concentración de α_2 M mayor será la velocidad de desaparición del MFP. El segundo término da cuenta de la desaparición de MFP por otros mecanismos (especialmente renal debido a ser soluto que filtra a nivel glomerular, su peso molecular es 144 Da). El tercer término representa el proceso de absorción gástrica cuando el MFP es administrado por vía oral.

El proceso de absorción gastrointestinal de MFP sigue una cinética de primer orden, como ha sido demostrado en trabajos anteriores realizados en la rata con estómago e intestino aislado. La velocidad de desaparición es directamente proporcional a la cantidad de MFP en la luz del tubo digestivo cuya constante de velocidad de desaparición es $(k_a + k_h)$. Entonces la variación de la concentración de MFP en la luz gastrointestinal luego de una administración oral queda representada por la ecuación 4

$$dMFP_i/dt = -(k_a+k_h)MFP_i \quad \text{Ecuación 4}$$

En base a estos modelos se planteó el siguiente sistema de ecuaciones lineales a coeficientes constantes, aplicable a seres humanos y ratas, a los que se administra MFP por vía oral, endovenosa, o administración del complejo α_2 MMFP por vía

endovenosa.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\alpha_2 M}{dt} = -k_s(\alpha_2 M(t) - \alpha_2 M_0) - k_i M F P(t) \quad E c \ 1 \\ \frac{d\alpha_2 M M F P}{dt} = k_i \alpha_2 M(t) - k_c \alpha_2 M - M F P(t) \quad E c \ 2 \\ \frac{dM F P}{dt} = -k_i \alpha_2 M(t) - k_e M F P(t) + k_a M F P(t) \quad E c \ 3 \\ \frac{dM F P_i}{dt} = -(k_a + k_h) M F P(t) \quad E c \ 4 \end{array} \right.$$

Con las condiciones iniciales :

$$\alpha_2 M_0 = \alpha_2 M(0)$$

$$M F P_0 = M F P(0)$$

$$\alpha_2 M M F P_0 = \alpha_2 M M F P(0)$$

$$M F P_{i0} = M F P_i(0)$$

Las variables originales se cambiaron por los siguientes símbolos

$$x = \alpha_2 M(t)$$

$$z = \alpha_2 M M F P(t)$$

$$y = M F P(t)$$

$$w = M F P_i(t)$$

El sistema en estas variables resulta

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = -k_s(x - x_0) - k_i y \quad \text{Ec 1} \\ \frac{dz}{dt} = k_i x - k_c z + k_i y \quad \text{Ec 2} \\ \frac{dy}{dt} = -k_i x - k_e y + k_a w \quad \text{Ec 3} \\ \frac{dw}{dt} = -(k_a + k_h) w \quad \text{Ec 4} \end{array} \right.$$

Con las condiciones iniciales :

$$\alpha_2 M_0 = x_0$$

$$MFP_0 = y_0$$

$$\alpha_2 MMFP_0 = z_0$$

$$MFP_{i_0} = w_0$$

Resolución matemática del sistema

Este modelo corresponde a un sistema de ecuaciones diferenciales lineales, de primer orden con coeficientes constantes:

$$\begin{cases} x'(t) - k_s x(t) - k_i y(t) = k_s x_0 \\ z'(t) - k_i x(t) - k_c z(t) = k_i y(t) \\ y'(t) - k_i x(t) - k_e y(t) = k_a w(t) \\ w'(t) - (k_a + k_h) w(t) \end{cases}$$

$$\begin{aligned} x(0) &= x_0 & ; & & y(0) &= y_0 \\ z(0) &= 0 & ; & & w(0) &= w_0 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta las características del sistema, la última ecuación se resuelve con el método de separación de variables obteniendo la siguiente solución general:

$$w(t) = w_0 \cdot e^{-(k_a + k_h) \cdot t}$$

El sistema anterior resulta :

$$\begin{cases} x'(t) - k_s x(t) - k_i y(t) = k_s x_0 \\ z'(t) - k_i x(t) - k_c z(t) = k_i y(t) \\ y'(t) - k_i x(t) - k_e y(t) = k_a w_0 \cdot e^{-(k_a + k_h) \cdot t} \end{cases}$$

SIST. 1

$$x(0) = x_0 \quad ; \quad y(0) = y_0 \quad ; \quad z(0) = 0$$

El uso de la notación matricial simplifica la escritura del sistema y se adecua a la aplicación del método de valores propios para su resolución.

$$\text{Sean } X(t) = \begin{pmatrix} x(t) \\ z(t) \\ y(t) \end{pmatrix} \text{ y } X'(t) = \begin{pmatrix} x'(t) \\ z'(t) \\ y'(t) \end{pmatrix}$$

$$\text{Si definimos la matriz de coeficientes } A = \begin{pmatrix} -k_s & 0 & -k_i \\ k_i & k_c & k_i \\ -k_i & 0 & -k_e \end{pmatrix} \text{ y}$$

$$B = \begin{pmatrix} k_s \cdot x_0 \\ 0 \\ k_a \cdot w_0 \cdot e^{-(k_a+k_h)t} \end{pmatrix} \text{ el vector de términos independientes, el}$$

sistema tiene la escritura matricial:

$$X' = AX + B$$

Una solución de esta ecuación en un intervalo I es un vector columna $X(t)$ tal que las funciones componentes verifican las ecuaciones del sistema en el intervalo I.

El problema a valores iniciales:

$$\begin{cases} X' = AX + B \\ X(t_0) = C \end{cases} \text{ siend } C = \begin{pmatrix} x(t_0) \\ z(t_0) \\ y(t_0) \end{pmatrix} \text{ tiene solución única}$$

Para resolver este sistema se utilizó la metodología del álgebra vectorial.

Se obtuvieron soluciones de la forma: $\bar{v} \cdot e^{rt}$ donde r es un autovalor de la matriz A y \bar{v} el correspondiente autovector asociado. En este sistema en particular se obtienen tres autovalores:

$$r_1 = -k_e$$

$$r_2 = -\frac{k_e + k_s + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4.k_i^2}}{2}$$

$$r_3 = -\frac{k_e + k_s - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4.k_i^2}}{2}$$

Para garantizar la estabilidad del sistema, los autovalores deben ser reales, negativos y distintos. Estas condiciones se cumplen si: $k_i^2 - k_e.k_s < 0$

Los valores de las constantes obtenidas en la rata luego de una inyección endovenosa cumplen con esta condición.

Utilizando el método de resolución convencional y el software adecuado se obtuvo la solución del sistema, que puede expresarse como :

$$X(t) = \begin{pmatrix} x(t) \\ z(t) \\ y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A.e^{r_2.t} + B.e^{r_3.t} + C.e^{-(k_a+k_h).t} + D \\ E.e^{r_1.t} + F.e^{r_2.t} + G.e^{r_3.t} + H.e^{-(k_a+k_h).t} + I \\ J.e^{r_2.t} + K.e^{r_3.t} + L.e^{-(k_a+k_h).t} + M \end{pmatrix} \quad \text{SIST. 2}$$

Donde A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L y M dependen no linealmente de las constantes de velocidades y las condiciones iniciales. Su obtención se detalla en el Anexo 10.

En las figuras 10.6 se muestran las representaciones de las funciones solución utilizando las constantes de velocidades obtenidas en los experimentos descritos al principio de este capítulo.

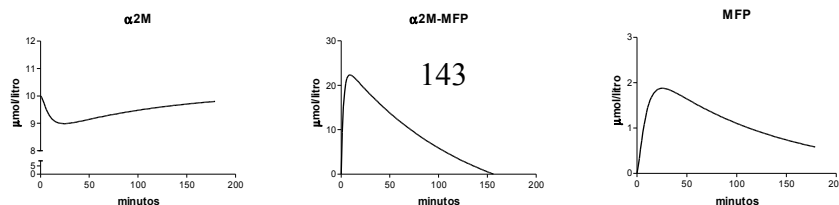


figura 10.6

El comportamiento de las funciones solución graficadas responde satisfactoriamente a los procesos estudiados *in vivo*. Por lo tanto la solución del sistema planteado predice el comportamiento de las concentraciones plasmáticas de α_2M , α_2MMFP y MFP en plasma y de MFP_i en aparato digestivo.

Determinación de las constantes de velocidades

Se utilizó un software matemático [29] que permite:

- a) Graficar en un sistema cartesiano los datos experimentales.
- b) Obtener los parámetros involucrados (Constantes de velocidades) aproximando los datos a través de la función correspondiente utilizando el método Simplex.

Validación del modelo en ratas y seres humanos

A) Experimentos con ratas: se utilizaron animales IIM/FcM hembras, sublínea "m" [30] de 200 ± 20 g, las que recibieron 80 μ moles de MFP por sonda gástrica. En algunos experimentos los animales se anestesiaron con uretano (120 mg/100 g de peso corporal, por vía intraperitoneal) cateterizando la arteria femoral para obtener muestras de sangre cada 15 minutos durante 4 horas. En el plasma se determinó el complejo α_2MMFP como se indicó más arriba.

Para la validación del modelo se utilizaron dos sustancias que afectan procesos metabólicos medidos por el modelo. El ácido [5']-poliinosínico [Poli(I)], es un inhibidor de la captación de la α_2M inactivada [31] y el Calcio que aumenta la absorción de MFP a nivel intestinal [32].

En los experimentos con ácido [5']-poliinosínico, las ratas recibieron 80 μ moles de MFP por sonda gástrica. Un subgrupo recibió además 5 mg de Poli(I) por un catéter colocado en la vena femoral, 15 minutos antes del máximo en la concentración plasmática del complejo. El tiempo en el que se produce el máximo en la concentración plasmática del complejo α_2MMFP , fue estimado en base a resultados de trabajos publicados anteriormente. Se extrajeron

muestras de sangre por el mismo catéter y en el plasma se determinó la concentración del complejo α_2 MMFP como se detalló más arriba.

En las validaciones con calcio las ratas recibieron 80 μ moles de MFP por sonda gástrica. Un subgrupo recibió el MFP simultáneamente con una solución 50 mM de CaCl_2 [32].

En la tabla 10.II se muestran las constantes que surgen de analizar los datos de los animales que recibieron MFP por sonda gástrica. La figura 10.7 muestra los valores de la concentración del complejo α_2 MMFP y la función de ajuste

Tabla 10.II. Constantes obtenidas en la rata en presencia y ausencia de Poli(I) luego de una dosis oral MFP en ratas.			
	Sin Poli(I)	Con Poli(I)	
K_i, min^{-1}	0.047 ± 0.011	0.046 ± 0.015	$p > 0,05$
K_s, min^{-1}	0.48 ± 0.27	0.52 ± 0.40	$p > 0,05$
K_c, min^{-1}	0.029 ± 0.02	0.000025 ± 0.000003	$p < 0.05$
K_a, min^{-1}	0.026 ± 0.009	0.041 ± 0.003	$p > 0,05$
α_2 MMFP máxima, μM	72 ± 10	212 ± 18	$p < 0.05$

Como se puede observar en la tabla 10.II, las constantes obtenidas con este modelo están de acuerdo con los efectos esperados para la presencia de ácido poliinosínico. La presencia de ácido poliinosínico produjo una disminución significativa de la constante de captación del complejo (k_c) y un aumento de la concentración máxima del complejo (figura 10.7).

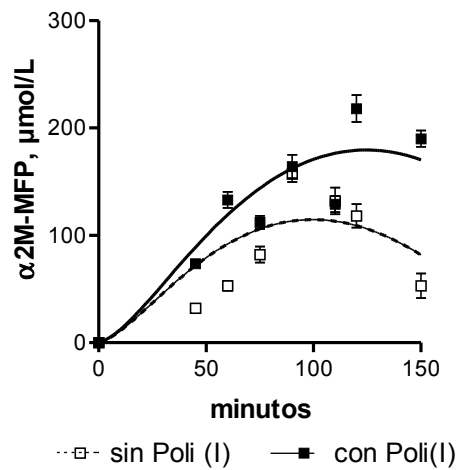


figura 10.7

En la tabla 10.III se muestran los valores de las constantes obtenidas en presencia y ausencia de calcio, estimulador de la absorción intestinal de MFP.

Tabla 10.II. constantes de velocidad en la rata luego de una dosis oral MFP con y sin Calcio			
	Sin calcio	Con calcio	
k_i, min^{-1}	0.029 ± 0.011	0.030 ± 0.015	$p > 0,05$
k_s, min^{-1}	0.068 ± 0.027	0.079 ± 0.040	$p > 0,05$
k_c, min^{-1}	0.0041 ± 0.002	0.0042 ± 0.0035	$p > 0,05$
k_a, min^{-1}	0.028 ± 0.003	0.052 ± 0.008	$p < 0,005$

La figura 10.8 muestra las concentraciones del complejo en presencia y ausencia de calcio con las funciones de ajuste.

Como se puede observar las constantes obtenidas con el modelo son las esperadas para la presencia de calcio. La presencia de este catión aumentó significativamente la constante de absorción intestinal de MFP (k_a).

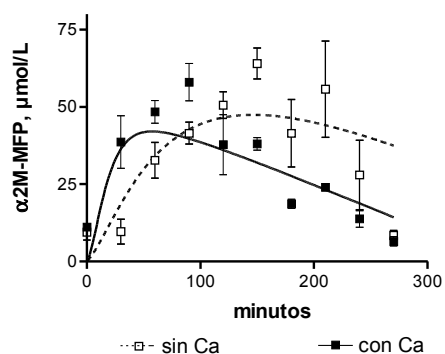


figura 10.8

B) Experimentos en seres humanos: 2 voluntarios recibieron 750 μmoles de MFP por vía oral y se extrajo sangre venosa a tiempo 0 y a la $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8, 10 horas, utilizando heparina como anticoagulante. Se determinó $\alpha_2\text{MMFP}$ en el plasma como se detalló anteriormente.

Los valores hallados fueron:

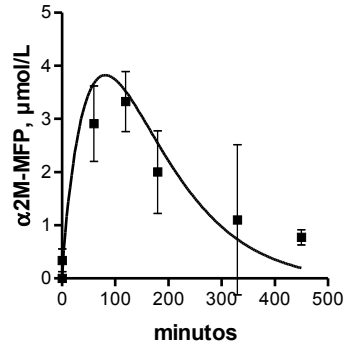
$$k_e = 0.014 \pm 0.005 \text{ min}^{-1},$$

$$k_i = 0.015 \pm 0.012 \text{ min}^{-1},$$

$$k_s = 0.80 \pm 0.08 \text{ min}^{-1},$$

$$k_c = 0.16 \pm 0.08 \text{ min}^{-1}.$$

La figura 10.9 muestra los valores de la concentración del complejo en seres humanos y la función de ajuste obtenida con el modelo, a partir de la cual se obtuvieron los valores de las constantes.



ANEXO 10

figura 10.9

inyección endovenosa de MFP

En el caso de suministro de MFP por medio de una inyección endovenosa a partir del SIST. 1, con $w_0=0$ se obtiene el siguiente sistema:

$$\begin{cases} x'(t) = -k_s x(t) - k_i y(t) + k_s x_0 \\ z'(t) = k_i x(t) - k_e z(t) + k_i y(t) \\ y'(t) = -k_i x(t) - k_e y(t) \end{cases}$$

$$x(0) = x_0 \quad ; \quad y(0) = y_0 \quad ; \quad z(0) = 0$$

En este caso particular el vector solución dado por SIST. 2 tiene los siguientes coeficientes:

$$A = \frac{k_i \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e (x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) + k_i \cdot (2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{2 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)}$$

$$B = \frac{k_i \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e(x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) - k_i(2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{2 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)}$$

$$C = 0$$

$$D = -\frac{x_0 \cdot k_e \cdot k_s}{k_i^2 - k_e \cdot k_s}$$

$$E = -\frac{k_i \left(k_c^2 \cdot (x_0 + y_0) + k_c \left((k_i - k_s) \cdot (x_0 + y_0) - x_0 \cdot k_e \right) + x_0 \cdot k_s \cdot (k_e - k_i) \right)}{k_c \left(k_c^2 - k_c \cdot (k_e + k_s) - (k_i^2 - k_e \cdot k_s) \right)}$$

$$F = \frac{k_i \left(\sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e + 2k_i - k_s \right) \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e \cdot (x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) + k_i \cdot (2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{2 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s) \left(2k_c - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right)}$$

$$G = -\frac{k_i \left(\sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - 2k_i + k_s \right) \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e \cdot (x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) - k_i \cdot (2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{2 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s) \left(2k_c + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right)}$$

$$H = 0$$

$$I = -\frac{x_0 \cdot k_i \cdot k_s \cdot (k_e - k_i)}{k_c \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)}$$

$$J = \frac{\left(\sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e - k_s \right) \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e \cdot (x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) + k_i \cdot (2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{4 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)}$$

$$K = - \frac{\left(\sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e + k_s \right) \left(x_0 \cdot k_i \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e \cdot (x_0 \cdot k_i + 2y_0 \cdot k_s) - k_i \cdot (2y_0 \cdot k_i - x_0 \cdot k_s) \right)}{4 \cdot \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)}$$

$$L = \mathbf{0}$$

$$M = \frac{x_0 \cdot k_i \cdot k_s}{k_i^2 - k_e \cdot k_s}$$

Como $z(t)$ debe anularse para algún valor finito de t o hacerse muy pequeño, del coeficiente I surge la condición: $k_e \cong k_i$

Esta condición se cumple, como se puede observar comparando el valor de k_i obtenido en los experimentos preliminares mostrados en el modelo anterior y el valor de k_e calculado en trabajos previos.

dosis oral de MFP

Los coeficientes del vector solución dados por el SIST. 2 son los siguientes :

$$A = \frac{k_i(k_a A_1 + x_0 k_i A_2)}{A_3}$$

$$A_1 = x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e(x_0 k_i + 2w_0 k_s) + k_i(2w_0 k_i - x_0 k_s)$$

$$A_2 = k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e(k_h - 2k_s) - k_h k_s - 2k_i^2$$

$$A_3 = \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_i^2 - k_e k_s) \left(2k_a - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s + 2k_h \right)$$

$$B = \frac{k_i(k_a B_1 + x_0 k_i B_2)}{B_3}$$

$$B_1 = x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e(x_0 k_i + 2w_0 k_s) - k_i(2w_0 k_i - x_0 k_s)$$

$$B_2 = k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e(k_h - 2k_s) + k_h k_s + 2k_i^2$$

$$B_3 = \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_i^2 - k_e k_s) \left(2k_a + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s + 2k_h \right)$$

$$C = \frac{w_0 k_a k_i}{k_a^2 - k_a(k_e + k_s - 2k_h) + k_e(k_s - k_h) + k_h^2 - k_h k_s - k_i^2}$$

$$D = -\frac{x_0 \cdot k_e \cdot k_s}{k_i^2 - k_e \cdot k_s}$$

$$E = -\frac{k_i \cdot (k_a \cdot (k_c \cdot (k_c \cdot (w_0 + x_0) - x_0 \cdot k_e + k_i \cdot (w_0 + x_0)) - k_s \cdot (k_c \cdot (w_0 - x_0) + x_0 \cdot (k_e - k_i))))}{k_c \cdot (k_a - k_c + k_h) \cdot (k_c^2 - k_c \cdot (k_e + k_s) - (k_i^2 - k_e \cdot k_s))} +$$

$$+ \frac{-k_i x_0 \cdot (k_c - k_e + k_i) \cdot (k_h - k_c) \cdot (k_s + k_c)}{k_c \cdot (k_a - k_c + k_h) \cdot (k_c^2 - k_c \cdot (k_e + k_s) - (k_i^2 - k_e \cdot k_s))}$$

$$F = \frac{k_i (k_a \cdot F_1 + x_0 k_i \cdot F_2) \cdot (F_3 + F_4)}{F_5 \cdot F_6}$$

$$F_1 = x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e (x_0 k_i + 2w_0 k_s) + k_i (2w_0 k_i - x_0 k_s)$$

$$F_2 = k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e (k_h - 2k_s) - k_h k_s - 2k_i^2$$

$$F_3 = (k_e + 2k_i - k_s) \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_e k_s - k_i^2) + k_e^3 k_s$$

$$F_4 = -k_e^2 (k_i^2 + 2k_s^2) + k_e k_s (6k_i^2 + k_s^2) - k_i^2 (4k_i^2 + k_s^2)$$

$$F_5 = ((k_e - k_s)^2 + 4k_i^2) \left(2k_c - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right)$$

$$F_6 = \left(2k_a - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s + 2k_h \right) (k_i^2 - k_e k_s)^2$$

$$G = \frac{k_i (k_a \cdot G_1 + x_0 k_i \cdot G_2) \cdot (G_3 + G_4)}{G_5 \cdot G_6}$$

$$G_1 = x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e (x_0 k_i + 2w_0 k_s) - k_i (2w_0 k_i - x_0 k_s)$$

$$G_2 = k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e (k_h - 2k_s) + k_h k_s + 2k_i^2$$

$$\begin{aligned}
G_3 &= (k_e + 2k_i - k_s) \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_e k_s - k_i^2) - k_e^3 k_s \\
G_4 &= k_e^2 (k_i^2 + 2k_s^2) - k_e k_s (6k_i^2 + k_s^2) + k_i^2 (4k_i^2 + k_s^2) \\
G_5 &= ((k_e - k_s)^2 + 4k_i^2) \left(2k_c + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right) \\
G_6 &= \left(2k_a + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s + 2k_h \right) k_i^2 - k_e k_s)^2 \\
H &= \frac{w_0 k_i (k_a + k_h + k_i - k_s)}{(k_a + k_h - k_c) \left(k_a^2 - k_a (k_e + k_s - 2k_h) + (k_e - k_h)(k_s - k_h) - k_i^2 \right)} \\
I &= - \frac{x_0 \cdot k_i \cdot k_s \cdot (k_e - k_i)}{k_c \cdot (k_i^2 - k_e \cdot k_s)} \\
J &= - \frac{J_1 \cdot (k_a \cdot J_2 + x_0 \cdot k_i \cdot J_3)}{2 \cdot J_4} \\
J_1 &= (k_e - k_s) \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_e \cdot k_s - k_i^2) + k_e^3 k_s - k_e^2 (k_i^2 + 2k_s^2) + \\
&\quad + k_e \cdot k_s (6k_i^2 + k_s^2) - k_i^2 (4k_i^2 + k_s^2) \\
J_2 &= x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e (x_0 k_i + 2w_0 k_s) + k_i (2w_0 k_i - x_0 k_s) \\
J_3 &= k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e (2k_s - k_h) - k_h k_s - 2k_i^2 \\
J_4 &= ((k_e - k_s)^2 + 4k_i^2) (k_e k_s - k_i^2)^2 \left(2k_a + 2k_h - \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right) \\
K &= - \frac{K_1 \cdot (k_a \cdot K_2 + x_0 \cdot k_i \cdot K_3)}{2 \cdot K_4} \\
K_1 &= (k_e - k_s) \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} (k_e \cdot k_s - k_i^2) - k_e^3 k_s + k_e^2 (k_i^2 + 2k_s^2) - \\
&\quad - k_e \cdot k_s (6k_i^2 + k_s^2) + k_i^2 (4k_i^2 + k_s^2) \\
K_2 &= x_0 k_i \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} + k_e (x_0 k_i + 2w_0 k_s) - k_i (2w_0 k_i - x_0 k_s) \\
K_3 &= k_h \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e (2k_s - k_h) + k_h k_s + 2k_i^2
\end{aligned}$$

$$K_4 = \left((k_e - k_s)^2 + 4k_i^2 \right) (k_e k_s - k_i^2)^2 \left(2k_a + 2k_h + \sqrt{(k_e - k_s)^2 + 4k_i^2} - k_e - k_s \right)$$

$$L = - \frac{w_0 k_a (k_a + k_h - k_s)}{k_a^2 - k_a (k_e + k_s - 2k_h) + (k_s - k_h)(k_e - k_h) - k_i^2}$$

$$M = \frac{x_0 \cdot k_i \cdot k_s}{k_i^2 - k_e k_s}$$

CAPÍTULO 11

VALORIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DIASTÓLICA

Modelización matemática de los fenómenos que ocurren en el seno del miocardio ventricular durante el período diastólico. Un intento para valorar la función diastólica del ventrículo izquierdo

El corazón podría ser comparado, funcionalmente, a una bomba hidráulica: ésta toma el agua de las napas subterráneas y la expulsa a presión hasta una cisterna ubicada a una determinada altura.

En el caso del corazón, son dos bombas dispuestas en serie en el sistema circulatorio que permiten con su aporte de energía de presión, la circulación de la sangre por el mismo, figura 11.1.

Estudiemos particularmente el funcionamiento del

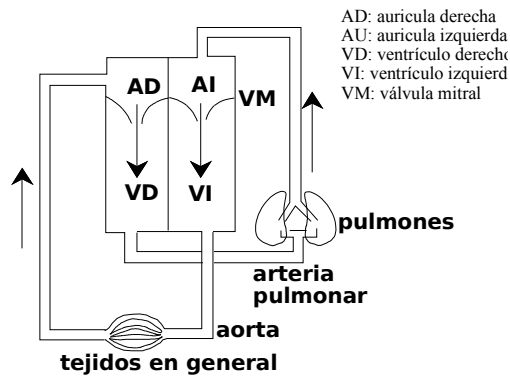


figura 11.1

Ventrículo Izquierdo (V.I.): Este, como bomba hemodinámica que es, recibe la sangre que se encuentra en la aurícula izquierda y que proviene del circuito pulmonar, y la eyecta hacia la Aorta gracias a la presión que genera en su interior.

Con transductores adecuados se pueden medir las presiones en forma continua, del interior del V.I., de la Aurícula izquierda (A.I.) y de la Aorta. Al graficar los valores, se obtienen curvas que

representan la evolución de la presión en el tiempo en cada cámara (figura 11.2)

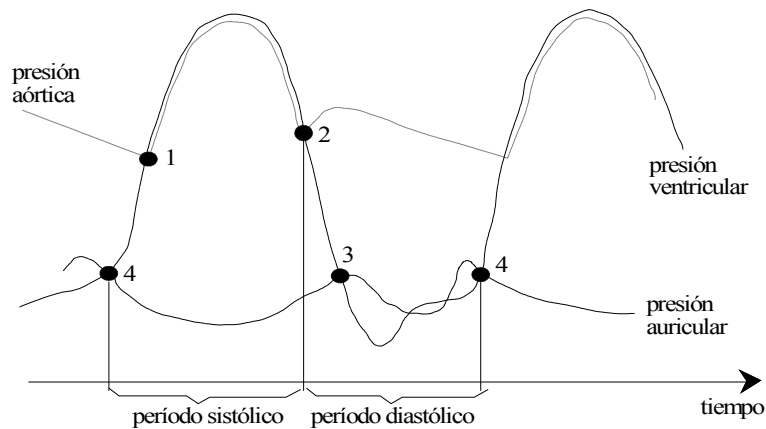


figura 11.2

Se observan en la figura 11.2 cuatro cruces de presiones, a saber:

- En el primer cruce de presiones, el V.I., cuya presión interior viene aumentando, supera a la correspondiente de la raíz Aórtica, con lo cual se abre la válvula Aórtica y comienza la expulsión de la sangre hacia el circuito arterial sistémico
- En el cruce número dos, la presión del V.I. que está descendiendo por la pérdida del volumen eyectado y por el fin de la contracción de sus fibras musculares, cae por debajo de la presión Aórtica, ocasionando el cierre de la válvula.
- En el cruce número tres, la presión del V.I. desciende por debajo de la presión Auricular izquierda, provocando la apertura de la válvula Mitral e iniciando el llenado ventricular.
- Finalmente, en el cuarto cruce, empieza nuevamente la contracción de las células miocárdicas con lo cual se eleva la presión del V.I. y al superar a la presión interior de la Aurícula izquierda, produce el cierre de la válvula Mitral

Específicamente nos referiremos al intervalo de la curva comprendido entre los cruces de presiones 2 y 4.

En este intervalo de tiempo, llamado Período Diastólico, ocurren una serie de procesos en el V.I. cuyo objetivo es cumplir con una Función Diastólica Normal [33].

Función Diastólica Normal del V.I.

Es el conjunto de procesos cardíacos que permiten:

- a) obtener un volumen de llenado (V.LL.) adecuado, tal que, en su transformación a volumen sistólico durante la eyección, permita generar un gasto cardíaco o volumen minuto cardíaco suficiente para las necesidades metabólicas del organismo.
- b) que el volumen de fin de diástole que contiene a ese V.LL. **no** produzca una presión de fin de diástole superior a 12 mm Hg, la cual alteraría el correcto funcionamiento del aparato respiratorio al originar hipertensión veno-capilar pulmonar en forma retrógrada.

De esta manera, para que no ocurra una Disfunción Diastólica del V.I. se deben cumplir ambas premisas.

El estudio e investigación de la función diastólica contribuiría a aportar información sobre las causas que conduzcan a una disfunción diastólica, así como a encontrar las variables más apropiadas para valorar la anormalidad funcional en los estadios más incipientes.

¿Qué es lo que ocurre en el V.I. durante el período diastólico?

Si bien el objetivo final de este período es el de lograr un V.LL. adecuado, la diástole no es sinónimo de llenado ventricular, sino de “todos los procesos y etapas que intervienen en la producción del llenado ventricular”.

Comprende cuatro etapas hemodinámicas, las que resultan de dos procesos o mecanismos diferentes y que en parte se superponen.

Las fases hemodinámicas son:

- 1° Relajación isovolumétrica
- 2° Llenado rápido
- 3° Llenado lento o Diastasis

4° Sístole auricular

Los procesos son:

1° Proceso activo: requiere de un gasto de energía para su desarrollo.

2° Proceso pasivo: depende fundamentalmente de las propiedades elásticas de la pared.

Proceso Activo : corresponde a la relajación de los elementos contráctiles (E.C.) de la pared ventricular, o sea que las variaciones de fuerza y longitud son el resultado de los cambios que ocurren en el propio seno del miocardio. Esto se logra con gasto de energía y la consecuencia es el descenso de la tensión de los elementos elásticos (E.E.) de la pared [34, 35]. De hecho, en esta etapa de relajación, los E.C. se alargan permitiendo el acortamiento de los E.E., por lo tanto la tensión disminuye y el cambio neto de longitud entre ambos es nulo. Surge de ahí el nombre de Fase de Relajación Isovolumétrica.

Proceso Pasivo : en éste, las variaciones de fuerza y longitud son el resultado de fuerzas externas al miocardio que interactúan con las fuerzas residuales del miocardio y sus elementos elásticos.

Ambos fenómenos se superponen en el tiempo en grado variable.

Hemos visto que en la fase activa la tensión parietal desciende y con ésta cae la presión ventricular.

¿Cómo está relacionada la tensión con la presión?

Esta relación queda establecida a través de la ley de Laplace[36].

Si consideramos, en forma simplificada, al ventrículo con la forma de una esfera, tenemos que la ecuación de Laplace relaciona a la tensión de la pared con la presión interior y el radio de la esfera de la siguiente manera:

$$T = \frac{P \cdot r}{2}$$

Si además se considera el espesor de la pared:

$$\frac{T}{e} = \frac{P \cdot r}{2 \cdot e} \quad \text{en donde} \quad \frac{T}{e} = S \quad S = \frac{P \cdot r}{2 \cdot e}$$

S: stress parietal
e: espesor parietal

Consideremos ahora, del gráfico de las presiones, únicamente el intervalo de las curvas correspondiente al período diastólico (figura 11.3).

La primera parte de la curva de la presión del V.I. que se extiende desde el cierre de la válvula Aórtica (punto 2) hasta la apertura de la válvula Mitral (punto 3) corresponde al proceso activo de relajación de los E.C. A partir de ahí, la presión del V.I. medida con

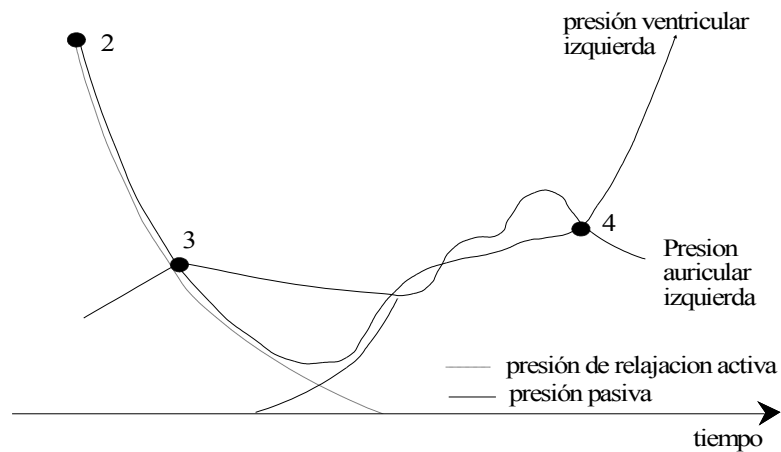


figura 11.3

el catéter millar*, no solamente está influenciada por la relajación activa, sino que también depende de las propiedades elásticas de la pared ventricular, la cual comienza a distenderse debido al ingreso de sangre en el ventrículo (luego de la apertura de la válvula Mitral). En esta etapa de superposición de ambos procesos, la presión medida (P.M) en cada instante sería la resultante de la suma

* Catéter con micromanómetro en uno de sus extremos

algebraica entre la presión de la relajación activa (P.R.A) más la presión pasiva (P.P.).

$$P.P. = P.M. - P.R.A.$$

Análisis de la primera etapa: en la primera etapa de la fase de relajación isovolumétrica, donde el proceso de relajación activa es puro, la tensión parietal y la presión interior del V.I. están relacionadas en forma directamente proporcional, puesto que el volumen del V.I. permanece constante (radio y espesor constante).

$$T \downarrow = \frac{\downarrow P \cdot r}{2 \cdot e}$$

Entonces, la caída de la tensión provoca el descenso de la presión, y ambas disminuyen de la misma manera. Así, con la cateterización del V.I., los valores de las presiones que se registran en cada momento, permiten conocer indirectamente la evolución de la tensión en el tiempo. Weiss demostró que en esta primera parte de la curva la presión cae exponencialmente acompañando a un descenso similar de la tensión [37].

Veamos como se podría demostrar esta afirmación: Tomemos los valores registrados de la presión "P" del V.I. para cada instante "t", confeccionemos con los mismos una tabla de valores, tal que: y = P, x = t

Notaremos que las variaciones que sufre la presión de un valor a otro : ΔP , no son lineales con las variaciones correspondientes al tiempo: Δt

$$P_1 - P_0 = \Delta P_a$$

$$P_3 - P_2 = \Delta P_b$$

$$t_1 - t_0 = \Delta t_a$$

$$t_3 - t_2 = \Delta t_b$$

$$\frac{\Delta P_a}{\Delta P_b} \neq \frac{\Delta t_a}{\Delta t_b}$$

P	t
P ₀	t ₁
P ₁	t ₂
P ₂	t ₃
P	t ₄

Y si lo graficamos en un sistema de ejes, como se observa en la figura 11.3: la línea entrecortada, que corresponde a la presión derivada del proceso activo, resulta en una curva que decrece en sus valores a medida que transcurre el tiempo. Por lo tanto, la velocidad de cambio de “P” respecto al cambio de “t” no es igual a una constante “K”.

$$\frac{dP}{dt} \neq -K \quad \text{lo que implica que}$$

$$\frac{dP}{dt} = -K \cdot P^\delta \quad \text{en donde} \quad \delta \neq 0$$

Problemos entonces un orden δ de P igual a 1: $\delta=1$

$$\frac{dP}{dt} = -K \cdot P^1$$

$$\frac{dP}{P} = -K \cdot dt$$

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = -K \cdot \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln P - \ln P_0 = -K \cdot (t - t_0) \quad \text{donde} \quad t_0 = 0$$

$$\ln P = -K \cdot t + \ln P_0$$

Con un proceso de 1^{er} orden llegamos a una función lineal. A continuación apliquemos el logaritmo natural a los valores de presión “P” calculados en el cateterismo para cada instante “t”; luego grafiquemos $\ln P$ en función de t , y con estos datos realicemos la regresión lineal.

Seguramente que el coeficiente r^2 estará cercano a 1 y la “p” obtenida será significativa, indicando una alta probabilidad de que los $\ln P$ se pueden generar al aplicar la función lineal:

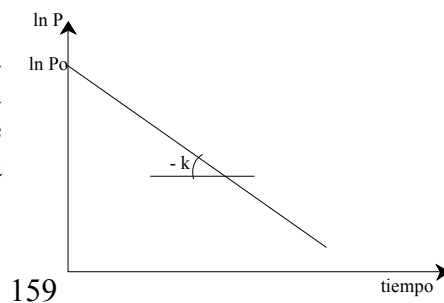


figura 11.4

$$\ln P = -K \cdot t + \ln P_0 ;$$

y su gráfico se aproximará al de una recta (figura 11.4).

Esta función lineal parte de la ecuación: $dP/dt = -K \cdot P^1$, lo que demuestra que el orden \mathcal{S} de P es igual a 1.

Si a esta ecuación: $\ln P = -K \cdot t + \ln P_0$ explicitando P resulta: $P = P_0 \cdot e^{-k \cdot t}$.

Como el exponente de e tiene que ser adimensional, entonces la magnitud de k es t^{-1} para poder ser simplificado con t : $K = \frac{1}{T}$

donde a “ T ” es la constante de tiempo y se la denomina Tau .

Finalmente la ecuación resultante es: $P_{(t)} = P_0 \cdot e^{-\frac{t}{T}}$ que es la función con la cual se ajustan los valores de “P” del V.I. para cada instante “t”. P_0 es la presión del VI en el momento del cierre de la válvula Aórtica.

Esto avalaría que, en esta fase del ciclo cardíaco, la caída de la presión $P_{(t)}$ responde a una función exponencial decreciente, tal como lo demostró Weiss y colaboradores .

Comprendido esto, volvamos a uno de los objetivos del análisis de esta primera etapa: hallar un parámetro que al ser constante, caracterice un estado particular de la relajación activa, propio de un determinado ventrículo y en un momento dado; y luego, previa determinación de los valores normales de referencia, permitir, a través de la comparación de estos índices con sus valores normales, detectar precozmente una anormalidad funcional.

Algunos de los índices hasta ahora estudiados han sido:

a) Medición del período de relajación isovolumétrico (PRIV)

Comprende el tiempo transcurrido desde el cierre de la válvula Aórtica hasta la apertura de la válvula Mitral.

b) Cálculo del dp / dt máximo negativo:

Para su medición se utiliza un catéter millar colocado en el interior de la cavidad ventricular. El $-dp / dt$ pico se lo encuentra en el momento del cierre de la válvula Aórtica.

Cuando se deteriora la relajación activa ante una isquemia miocárdica, la PRIV aumenta y el $-dp/dt$ pico disminuye. Lo inverso ocurre cuando mejora la relajación por efecto de alguna droga simpaticomimética.

Las desventajas de estos índices es que en algunas situaciones pueden alterarse sin modificar la curva de relajación, ejemplo:

-ante un aumento de la presión sistólica Aórtica el $-dp/dt$ pico se incrementa.

-cuando la resistencia periférica se eleva, el cierre de la válvula Aórtica se adelanta y por ende el $-dp/dt$ máximo aumenta mientras que el PRIV se prolonga, permaneciendo en la misma curva de relajación isovolumétrica.

c) Medición de la constante Tau:

Hay dos métodos para calcularla:

1) *Por cateterismo del VI*: se registran los valores de la presión del VI a intervalos regulares, conformándose una curva que va a estar comprendida entre P_0 (donde ocurre el cierre de la válvula Aórtica y coincide con el $-dp/dt$ pico) y el momento de la apertura de la válvula Mitral, que se encuentra aproximadamente a una presión del VI de 5 mm Hg. A dichos valores de P se les calcula el ln y luego se los grafica en función del tiempo. Se realiza la regresión lineal y se obtiene la pendiente K y su inversa T . La otra posibilidad es calcular la primera derivada de P para cada intervalo y luego, con los datos graficar

$y = dp/dt$ versus $x = P$. Se efectúa la regresión lineal y con ella se estima la pendiente K .

2) *Por medio del Doppler cardíaco* [38]: se calcula a partir de la señal espectral obtenida de un flujo regurgitante mitral en el sector que corresponde a su pendiente de desaceleración. Cada punto que delimita el borde de la señal Doppler nos informa de la velocidad máxima del flujo entre el VI y la AI en ese instante. A través de la ecuación de Bernoulli modificada podemos conocer el gradiente de presión instantáneo entre ambas cámaras utilizando los valores de velocidad que aporta la señal del Doppler continuo.

$$\Delta P = 4 \cdot v^2$$

siendo

ΔP = PVI - PAI : gradiente de presión

y v : velocidad

Con los valores del ΔP de cada instante se puede conformar una curva similar a la pendiente de desaceleración de la señal doppler de la Insuficiencia Mitral. Dado que las variaciones de la PAI son pequeñas y pueden despreciarse, los ΔP calculados se correlacionan directamente con los valores de la presión del VI . En consecuencia el descenso de los ΔP derivados de la pendiente de desaceleración del reflujo mitral siguen la misma evolución que la caída de la PVI coincidiendo con la porción de la curva de presión ventricular correspondiente al proceso activo de relajación, ver figura. 11.5.

Con esta premisa y recordando que esta parte de la curva responde a una función exponencial decreciente se podría graficar tanto la función: $\ln P = -K \cdot t + \ln P_0$ como: $\ln \Delta P = -K \cdot t + \ln \Delta P_0$ y ambas darían rectas similares. Aceptando esto en base a las conclusiones previas y seleccionando específicamente los ΔP calculados de las velocidades: 1m/s y 3m/s, las que se encuentran dentro del sector de la curva de relajación activa, (fig.11.5):

$$\Delta P_1 = 4 \cdot (3 \text{ m/s})^2 = 36 \text{ mm Hg}$$

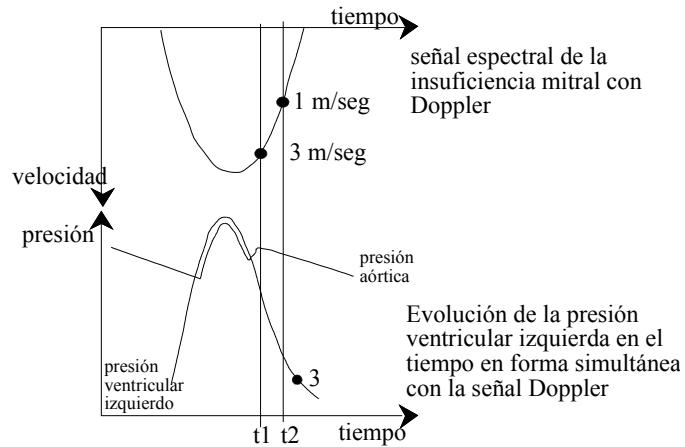


figura 11.5

$$\Delta P_2 = 4 \cdot (1 \text{ m/s})^2 = 4 \text{ mm Hg}$$

y con ellos calculamos K como la pendiente de la recta graficada, figura 11.6:

$$-K = \frac{\ln \Delta P_2 - \ln \Delta P_1}{t_2 - t_1}$$

$$T = \frac{1}{K}$$

Para la resolución de esta ecuación, precisamos medir en la señal espectral de Doppler

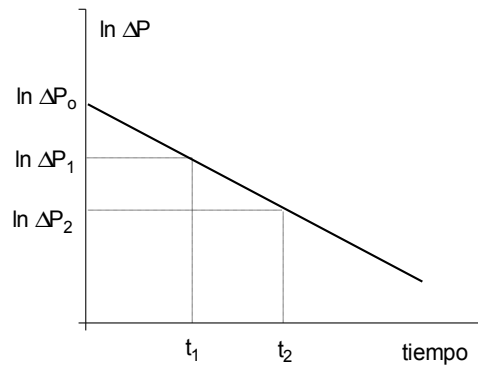


figura 11.6

el tiempo que transcurre de t_1 a t_2 (t_1 corresponde a la $v = 3$ m/s y t_2 a la $v = 1$ m/s).

Surge así un parámetro que es propio de cada curva y que permite evaluar el proceso de relajación activa. De hecho, puede ser utilizado clínicamente para el diagnóstico de la disfunción diastólica generada por una alteración en el proceso activo de relajación, por ejemplo: en la isquemia miocárdica. Cuando la isquemia no es intensa no llega a alterar la contractilidad, siendo la prolongación de la relajación activa su primera manifestación y el aumento de la Constante de Tiempo el signo que la corrobora. Situación similar ocurre ante los aumentos crónicos y severos de la postcarga. En cambio, las variaciones de la precarga, dentro de ciertos límites, no la modifican.

Como ya explicitamos al comienzo, existen dos procesos del VI que participan en su llenado diastólico. El primero es un proceso totalmente activo de la pared ventricular, mientras que el segundo depende de fuerzas extrínsecas (PVP y PAI*) y donde el miocardio sólo interviene a través de sus propiedades elásticas, pudiendo facilitar o restringir el ingreso de sangre a la cavidad. No podemos dejar de mencionar aquí otros factores que por ser extrínsecos al miocardio no los vamos a desarrollar pero que también suman sus fuerzas a las de éste, en esta etapa de adaptabilidad ventricular; ellos son: la limitación pericárdica, la interacción interventricular y el llenado coronario. De esta forma, el análisis de las propiedades pasivas del VI completa el estudio de la Función Diastólica en su intento de pesquisar anomalías incipientes.

Estudio de las propiedades pasivas diastólicas

A continuación de la fase de Relajación Isovolumétrica le sigue la etapa de Llenado Rápido (LLR). La primera mitad de esta fase esta influida por la superposición de la porción final del proceso activo y el comienzo del efecto ejercido por las propiedades elásticas pasivas del ventrículo. En realidad la fase activa tiene relevancia en el tercio inicial del LLR., siendo nulo a partir de la segunda mitad del mismo. Ver figura 11.7 [^{39, 40}]

· PVP: presión venosa pulmonar- PAI: presión de aurícula izquierda

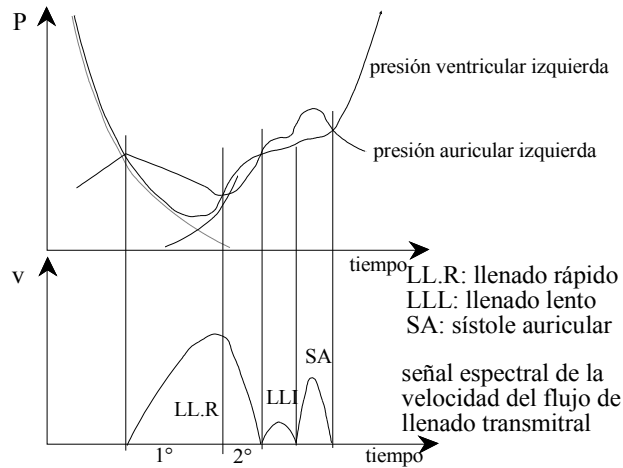


figura 11.7

El aumento del volumen (aumento radio) da origen a un aumento de la tensión de los elementos elásticos que conforman la pared ventricular con lo cual se incrementa la presión de la sangre dentro de la cavidad. Recordando la Ley de Laplace, en esta superposición de ambos procesos, la presión, por un lado caería por el descenso de la tensión activa **(1)** y por el otro, ascendería por el aumento del volumen (aumento de radio) **(2)** que se produce por el ingreso de sangre proveniente de la aurícula:

$$(1) \left[\begin{array}{c} \downarrow T \uparrow \uparrow \\ \uparrow P \downarrow \cdot r \uparrow \\ \hline 2 \cdot e \end{array} \right] \quad (2)$$

La segunda mitad del LLR depende exclusivamente del proceso pasivo **(2)**, lo que sugiere que a partir de aquí puede ser evaluado sin interferencias de los mecanismos activos de relajación.

Como vemos, las propiedades elásticas del miocardio se manifiestan ante los cambios de volumen del ventrículo modificando la tensión (pasiva) y secundariamente la presión interior.

De esta manera se puede construir una curva de presión-volumen con los valores obtenidos a partir de esta segunda mitad del LLR o experimentalmente empleando un ventrículo detenido en diástole al que se le introducen distintos volúmenes y se registran las presiones correspondientes a cada uno de ellos.

Si confeccionamos con esos datos una tabla de valores, siendo para $y = P$, para $x = V$ y lo graficamos en un sistema de coordenadas, daría por resultado una curva, (fig 11.8 A).

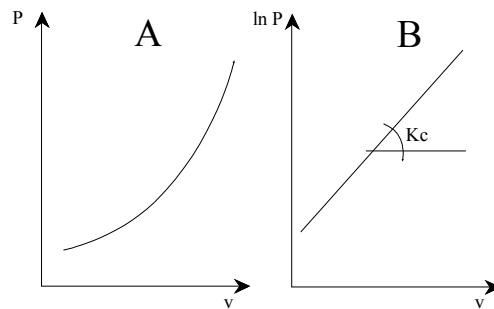


figura 11.8

En ella podemos percibir que la *velocidad de cambio de P*, o sea, la proporción entre la variación de P (ΔP) respecto a un cambio unitario de V (ΔV), aumenta a medida que se incrementa el volumen. Esto nos induce a pensar que los valores de P crecen en forma exponencial. Por lo tanto su ecuación debiera escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dP}{dV} = K \cdot P^\delta \quad \text{teniendo P un orden } \delta = 1$$

Veamos si se cumple esta afirmación:

$$\frac{dP}{dV} = K \cdot P$$

$$\frac{dP}{P} = K \cdot dV$$

integramos ambos miembros

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = K \cdot \int_{V_0}^V dV$$

resolvemos las integrales

$$\ln P - \ln P_0 = K \cdot (V - V_0) \quad \text{siendo } V_0 = 0$$

$\ln P = K \cdot V + \ln P_0$, obtuvimos una ecuación lineal.

Si se utiliza esta función lineal para demostrar que la ecuación $dP/dV = K \cdot P$ tiene a P con un orden $\mathcal{S} = 1$.

Primero se calculará el logaritmo natural a cada valor de “P” registrado durante la cateterización del VI, a continuación se conforma con estos datos una tabla de valores en donde $y = \ln P$, $x = V$ y se grafican los datos. El dibujo que se origina se asemejará a una recta si realmente la ecuación era lineal, fig.11.8 B. Luego apliquemos la regresión lineal con esos mismos datos. Si el valor de “p” es significativo y el coeficiente r^2 es cercano a 1 indicará una alta probabilidad de que esa función es lineal y como la cual proviene de la ecuación $dP/dV = K \cdot P$ entonces el orden \mathcal{S} de P es igual a 1.

Si se explicita P de la ecuación $\ln P = K \cdot V + \ln P_0$, quedará $P = P_0 \cdot e^{K \cdot V}$. Esta ecuación representaría la función que mejor ajusta a los valores de “P” para cada valor del volumen “V”, haciendo notar que la dinámica de los fenómenos pasivos de esta fase del ciclo cardíaco responden a una función exponencial creciente.

Resumiendo, ¿Qué variables hemos visto hasta aquí, que se vinculen con las propiedades elásticas del ventrículo?

En primer lugar tenemos la variación de cambio de P respecto a un cambio de V: dP/dV , a la cual se la conoce como Rigidez Cavitaria “Rc”. Esta variará a medida que aumenta o disminuye el volumen.

Un segundo parámetro sería la constante K, llamada Constante de Rigidez Cavitaria: “Kc” [41] que es propia y específica de cada curva y por ende de cada estado de los componentes

elásticos de un ventrículo. Se la puede obtener a partir de la regresión lineal de la recta que se generó al graficar el $\ln P$ versus V , o sea que es la pendiente de la función lineal: $\ln P_{(V)}$, (figura 11.8 B); o utilizando la función: $P' = K \cdot P + b$, aunque para esta última, previamente, hay que calcular la dP/dV para cada valor de P .

En base a esta descripción y siguiendo con la búsqueda de variables que aporten información sobre probables alteraciones en la función diastólica y particularmente en lo que corresponde al proceso pasivo del llenado ventricular, podemos considerar dos situaciones: La primera de ellas, figura 11.9: que el ventrículo (B) en estudio tenga una curva de la relación presión-volumen comparativamente distinta a la de un ventrículo (A) que presenta una función diastólica normal. Esto es que el Kc (B) sea mayor que el Kc (A). Eventualmente el ventrículo (B) puede estar operando en algún momento con una rigidez cavitaria igual a la del ventrículo (A); en consecuencia comprobamos que la variable Rc en esta caso no es fiable para la comparación de ambos ventrículos y sí lo sería la constante de rigidez Kc , que como dijimos, caracterizará a cada curva: $Kc(B) > Kc(A)$. El caso del ventrículo (B) es el que se observa en una Miocardiopatía Hipertrófica [42].

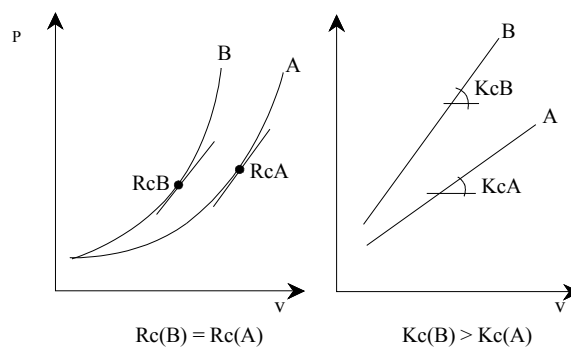


figura 11.9

La segunda posibilidad: que el ventrículo (B), patológico, presente una curva igual a la del ventrículo (A), es decir, que sea paralela pero desplazada hacia la derecha, figura.11.10.

Si las curvas son paralelas tienen igual K_c , en tal caso, para iguales presiones, las rigideces de ambos ventrículos (dP/dV) serán las mismas lo que implica que se van a llenar con iguales volúmenes (VLL). La diferencia se presenta en los distintos volúmenes de fin de diástole (VFD). Sería el caso en donde uno de los ventrículos, el (B), corresponde a una Miocardiopatía Dilatada (figura 11.10).

Se plantea pues, emplear una variable que tenga en cuenta el volumen con que está operando el ventrículo. Esto es, calcular para ese valor de presión de fin de diástole (PFD) la Rigidez Cavitaria

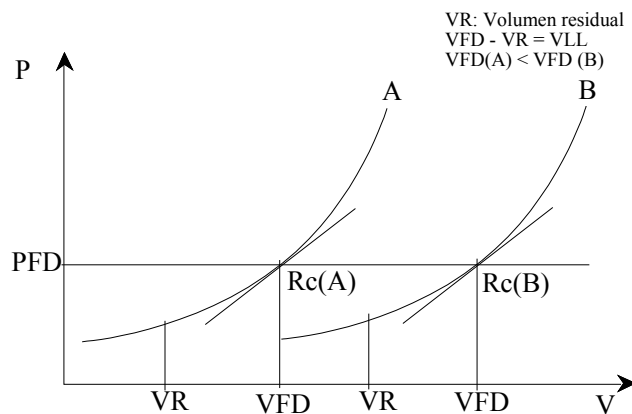


figura 11.10

Normalizada (RcN).

$$RcN = \frac{dP}{\frac{dV}{V}} = \frac{dP}{dV} \cdot V$$

dV/V es la proporción entre la variación del volumen y el volumen final. El $dP/(dV/V)$ representa la razón de cambio de P respecto al

cambio porcentual del volumen. Particularmente: $dP/(dV/VFD)$ sería la medida empleada en la comparación de ambos ventrículos.

El ventrículo(B), que maneja igual R_c con mayor volumen, tiene una mayor R_{cN} con igual K_c que el ventrículo(A).

Esto tiene implicancias ya no sólo desde el punto de vista de la función diastólica, sino también desde la óptica de la función sistólica: puesto que tener una curva de la relación presión-volumen desplazada hacia la derecha implica manejar fracciones de eyección (F.Ey) menores, hecho que refleja la disfunción sistólica del ventrículo dilatado. El intento de mantener un volumen sistólico adecuado se logra a través de un mayor estiramiento de sus fibras miocárdicas durante la diástole [43]. De esto resulta que el ventrículo debe trabajar con PFD más elevada, acercándose al límite de precarga, lo que acota las posibilidades de compensación [44] figura 11.11

Si llevamos la PFD de (A) al valor que necesita operar el ventrículo (B) para mantener la compensación sistólica (VS

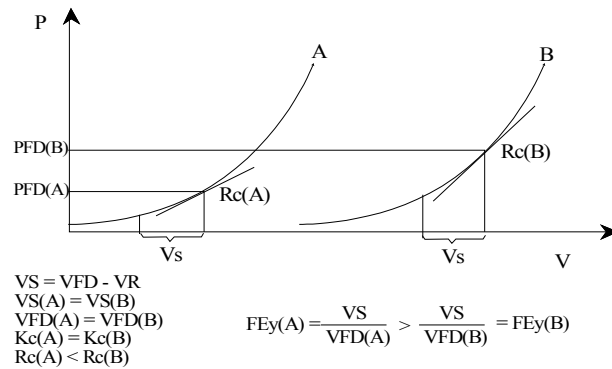


figura 11.11

adecuado) vamos a tener que la $R_c(A) = R_c(B)$ pero si la normalizamos por su VFD: $R_{cN}(A) < R_{cN}(B)$ dado que el $VFD(A) < VFD(B)$.

Concluimos que una rigidez cavitaria normalizada (R_{cN}) elevada como en el caso B nos indica que el ventrículo en estudio ha puesto en marcha los mecanismos compensadores de su

disfunción sistólica, esto es, mayor estiramiento de sus fibras, lo que conlleva a una mayor tensión pasiva y por ende a una PFD más elevada; o sea que la rigidez cavitaria de B que permite mantener un VLL efectivo* (VS adecuado) es **mayor** que la rigidez cavitaria que tiene (A) en el punto de la curva para el cual se obtiene el mismo VLL efectivo: $Rc(B) > Rc(A)$.

ANEXO 11

Principios físicos de la ecografía Doppler

En investigación hemodinámica se utiliza el Doppler de la energía ultrasónica [⁴⁵, ⁴⁶, ⁴⁷].

Los ultrasonidos son, al igual que el sonido, movimientos vibratorios u oscilatorios que se propagan por un medio elástico en forma longitudinal (la dirección de la vibración es paralela a la dirección de la propagación), con frecuencias que están en el rango de 1 a 10 MHz.

Se producen con cristales piezoeléctricos, los cuales al ser sometidos a un campo eléctrico deforman sus caras generando ondas de presión y a la inversa, al ser expuestos a una onda de presión producen entre sus caras un campo eléctrico.

El transductor es el que traduce la energía mecánica en eléctrica y viceversa.

El efecto Doppler es el cambio de frecuencia que se produce entre la frecuencia del haz del ultrasonido emitido por un transductor y la frecuencia del haz reflejado en un blanco que se mueve respecto al receptor del transductor.

Pueden presentarse 3 situaciones:

- a) Si el blanco está quieto, la frecuencia del sonido que se refleja de éste, es constante.
- b) Cuando el blanco se acerca al receptor, la frecuencia aumenta respecto a la emitida.
- c) En el caso que el blanco se aleje del transductor, la frecuencia disminuye en relación a la emitida.

* VLL efectivo es el que se transforma durante la sístole en volumen sistólico.

La frecuencia Doppler “Fd” es la diferencia entre la frecuencia reflejada FR y la frecuencia emitida FE. La Fd representa el Efecto Doppler.

La Fd depende de una serie de factores que se discriminan en la ecuación Doppler:

$$Fd = \frac{2 \cdot FE \cdot v \cdot \cos \alpha}{c}$$

1º) La FE está determinada por cada transductor, siendo constante.

2º) v : es la velocidad del blanco que refleja el sonido. En nuestro caso el blanco en movimiento es la sangre y más específicamente: los glóbulos rojos.

3º) α : es el ángulo entre el vector de velocidad del flujo sanguíneo y la dirección del haz del ultrasonido.

4º) c : es la velocidad del sonido en la sangre: aproximadamente 1540 m/s. Es constante.

De la ecuación despejamos v , que es el dato que nos interesa evaluar para conocer la velocidad de la sangre:

$$v = \frac{c \cdot Fd}{2 \cdot FE \cdot \cos \alpha}$$

Los equipos de ecografía Doppler nos proporcionan un registro del análisis espectral de la “Frecuencia Doppler” en cada momento del flujo sanguíneo. La Fd es proporcional a la v por lo que cada Fd está representada en la pantalla como velocidad. Es decir, nos da información puntual de la velocidad del flujo en cada instante. En realidad la velocidad será la que corresponda a esa Fd que obtuvo el aparato siempre que el ángulo α sea $0^\circ \Rightarrow \cos \alpha = 1$.

Con la ecuación Doppler se puede deducir:

a) *El sentido del vector de velocidad del flujo sanguíneo*

Si $FR < FE$ deducimos que el elemento se aleja del transductor y por convención en el registro del análisis del espectro de frecuencias Doppler (velocidades) aparece con una deflexión negativa.

Si $FR > FE$, los hematíes se acercan al receptor, por lo tanto se indica como una deflexión positiva.

Esto es útil para el diagnóstico de sentidos patológicos de ciertos flujos, como en las regurgitaciones o para establecer la dirección y sentido de cortocircuitos.

b) *Características del flujo: Laminar o Turbulento*

Flujo Laminar: en éste las células se mueven casi todas a velocidades similares y en la misma dirección. En el registro del espectro de velocidades que se observa en la pantalla encontramos un espectro fino de frecuencias que indica la escasa dispersión de frecuencias o velocidades.

Flujo Turbulento: es un flujo que se acelera y se vuelve inestable. Los glóbulos se mueven a distintas velocidades y en distintas direcciones (el cambio de direcciones es captado en el equipo como Fd menores: menores velocidades). Encontramos un espectro de velocidades ancho, que significa la irregularidad del flujo o sea, las múltiples direcciones y velocidades. Esto ocurre cuando la sangre atraviesa obstrucciones en vasos u orificios valvulares estrechos.

Existen dos procedimientos para el análisis de la velocidad del flujo sanguíneo:

Doppler Pulsado DP

Consiste en un transductor con un solo cristal piezoeléctrico que actúa en forma alternada, emite el ultrasonido y luego se comporta como receptor del sonido reflejado y así en forma repetitiva.

El tiempo de emisión de cada ciclo E-R depende de la frecuencia de repetición de los impulsos FRP: a menor frecuencia, mayor tiempo de emisión, lo que permite llegar a mayor profundidad el ultrasonido y a la inversa.

$v = \frac{d \cdot 2}{t}$ siendo d : distancia entre el transductor y la profundidad máxima alcanzada por el ultrasonido en ese momento; t : tiempo de emisión; v : velocidad del sonido en los tejidos.

Como $t = \frac{1}{F}$; además $F = \text{FRP}$; reemplazando en la ecuación superior y despejando d :

$$d = \frac{v}{2 \cdot FRP}$$

El equipo analiza sólo las Fd que retornan al transductor en un tiempo determinado, el cual es precisado por el operador, Fig.1:

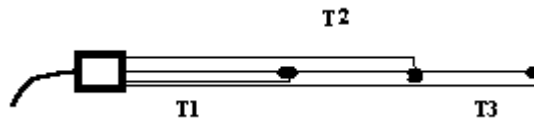


Fig 1

t_3 : tiempo de emisión que permite alcanzar la máxima profundidad.

$$d = \frac{v \cdot t_2}{2}$$

t_2 : tiempo sugerido por el técnico a través de una compuerta electrónica que permite analizar las señales que llegan sólo en ese tiempo y no las anteriores o las que lleguen después. Por lo tanto la ventaja que tiene es que evalúa las señales (Fd o velocidades) a la profundidad que el operador desea.

La máxima profundidad está dada por el tiempo de emisión que a su vez depende de la FRP.

El DP sólo puede muestrear una vez por cada pulso transmitido. Si el blanco tiene velocidad muy elevada, tal que la Fd sea la mitad o mayor que la FRP, el sistema es incapaz de medir esa Fd puesto que supera la capacidad de muestreo. Se produce el fenómeno de aliasing o saturación: un ensanchamiento de la señal que no permite medir velocidad ni dirección. De ahí que la desventaja del DP es la imposibilidad de detectar altas velocidades de flujo.

Doppler Continuo DC

El transductor consta de dos cristales piezoeléctricos: uno emite sonido en forma continua y el otro recapta también en forma constante a todas las ondas reflejadas a lo largo del haz de sonido. La emisión y recepción continua le otorga una elevada frecuencia de muestreo que permite medir cualquier velocidad, por más alta que

sea; pero con la desventaja de no poder discriminar la zona exacta de donde proviene la señal.

Una de las utilidades que tiene la ecografía Doppler es la de poder calcular el gradiente de presión entre dos cavidades con una válvula intermedia o entre dos sitios de un vaso separados por una estrechez. Para ello se emplea la ecuación de Bernoulli modificada:

$$\Delta P = 4 \cdot v^2$$

v : velocidad del flujo

$$\Delta P = P_2 - P_1$$

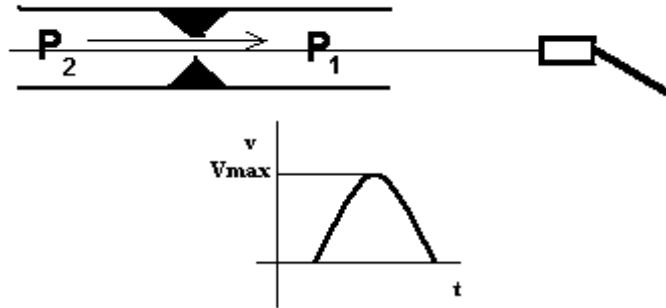
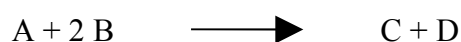


Fig.2

APÉNDICE 1

LEY DE VELOCIDAD

La velocidad de un proceso químico es la rapidez con que cambia la concentración de alguno de los reactivos o los productos. Expresándola en términos matemáticos, la velocidad es *la derivada de la concentración de la sustancia con respecto del tiempo*. Por ejemplo en una reacción química, como la que se detalla a continuación



la velocidad se puede escribir siguiendo la ley de acción de masas. Esta ley establece que la velocidad de una reacción es igual al producto de una constante de velocidad específica (k) por las concentraciones de los reactivos elevadas cada una a sus respectivos órdenes de reacción (δ). Esta ley es una *ecuación diferencial*, ya que en ella figuran la función y su derivada.

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k \cdot [A]^{\delta_A} \cdot [B]^{\delta_B}$$

Esta ecuación indica que la velocidad de la reacción, en este caso medida por la velocidad de desaparición de la sustancia A depende de las concentraciones de las sustancias A y B elevadas a sus respectivos órdenes de reacción. Estos órdenes indican el peso que tiene cada sustancia sobre la velocidad. Por ejemplo, si se incrementa la concentración de una sustancia al doble y simultáneamente la velocidad de desaparición de A aumenta dos veces, el orden respecto de esa sustancia es 1. En cambio si al variar la concentración de una sustancia la velocidad de desaparición de A no varía, el orden respecto de esa sustancia es cero. En este último caso la concentración de esa sustancia no aparece en la ecuación. La constante k , involucra todas las variables diferentes a las

concentraciones, ya que la velocidad de un dado proceso podrá ser influenciada por la temperatura, presencia de catalizadores, presión, etc. Habitualmente es más interesante conocer el valor de esta constante, ya que su valor dará información de las características intrínsecas del proceso. En todo caso, si se desea, la velocidad del proceso (reacción) podrá ser calculada luego para cada situación de acuerdo a la concentración de cada sustancia.

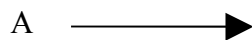
En el caso mencionado anteriormente la concentración de la sustancia A varía porque participa en una reacción con B, dando como productos C y D. En algunas situaciones la concentración de una sustancia puede variar por más de un proceso. En la misma reacción, por ejemplo, si el tiempo transcurrido desde que se mezclaron las sustancias A y B es grande, las sustancias C y D podrán comenzar a reaccionar entre sí. Esta última reacción generará las sustancias A y B por lo tanto la ley de velocidad respecto de A tendrá dos términos

$$v = \frac{d[A]}{dt} = -k_d \cdot [A]^{\alpha_1} \cdot [B]^{\alpha_2} + k_i \cdot [C]^{\alpha_3} \cdot [D]^{\alpha_4}$$

El primer término representa la desaparición de A por reacción entre A y B (de allí su valor negativo), mientras que el segundo es positivo, dado que este proceso contribuye a un aumento de la concentración de la sustancia a lo largo del tiempo.

Órdenes y constantes de velocidad

Como se dijo anteriormente el orden de un proceso es un número que indica el grado de participación de una variable en la velocidad de un proceso. La velocidad de un proceso en el que se consume o forma una sustancia A, puede o no depender de la concentración de esta sustancia. A continuación se desarrollarán las ecuaciones y el cálculo de los órdenes de reacción para situaciones en que la velocidad depende solamente de la concentración de la sustancia A. Si el compuesto A se transforma en otra sustancia, este proceso se puede representar por la siguiente reacción



1- Orden cero:

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

$$\frac{d[A]}{dt} = -k.[A]^{\delta^4}$$

si el orden del proceso es cero, resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = -k.[A]^0 = -k$$

resolviendo esta ecuación diferencial obtenemos

$$[A] = [A_0] - k.t$$

que es la ley que relaciona la concentración de A en un dado tiempo, ([A]), con su concentración a tiempo cero ([A₀]) y la constante de velocidad y el tiempo. Esta ecuación indica que si un proceso es de orden cero, la concentración de la sustancia A variará linealmente con el tiempo.

En la tabla A.1 se muestran una serie de valores de concentración para la sustancia A a lo largo del tiempo. Los valores experimentales se ajustan con un alto significado estadístico por una función lineal (r = 0.9884), ver figura A.1. Esto indica que esta reacción es de orden cero respecto de la concentración de A.

La pendiente de la recta vale -1.213 ± 0.07034 , a partir de la cual se obtiene la constante de velocidad. En el caso que la [A] no se ajustara por una función lineal no sería de orden cero. En tal caso se deberían investigar otros órdenes para el proceso.

2- Orden uno:

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

tiempo (min)	[A] mM
0.0	85.0
5.0	76.0
10.0	64.0
15.0	60.0
20.0	56.0
25.0	50.0
30.0	45.0
35.0	40.0
40.0	33.0

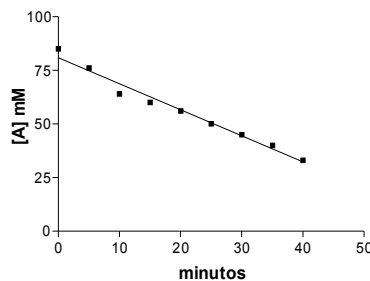


figura A.1

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

si el orden del proceso es uno, resulta

$$\frac{d[A]}{dt} = -k \cdot [A]^1 = -k \cdot [A]$$

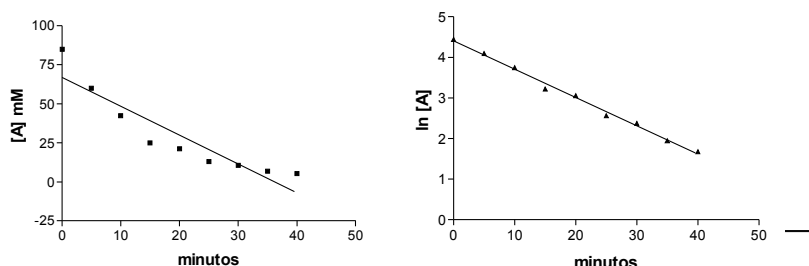


Figura A.2

tiempo minutos	[A] mM	ln[A]
0.0	85.0	4.442651
5.0	60.0	4.094345
10.0	42.5	3.749504
15.0	25.0	3.218876
20.0	21.25	3.056357
25.0	13.0	2.564949
30.0	10.75	2.374906
35.0	7.0	1.945910
40.0	5.35	1.677096

resolviendo esta ecuación diferencial obtenemos

$$\ln[A] = \ln[A_0] - k \cdot t$$

Esta ley relaciona el logaritmo de la concentración de A en un dado tiempo, ($\ln[A]$), con el logaritmo de su concentración a tiempo cero ($\ln[A_0]$), la constante de velocidad y el tiempo. Esta ecuación indica que si un proceso es de orden uno, el logaritmo de la concentración de la sustancia A variará linealmente con el tiempo.

En la tabla A.2 se muestra una serie de valores de concentración y sus logaritmos para la sustancia A a lo largo del tiempo.

La figura A.2 muestra las gráficas correspondientes a los ajustes lineales de la concentración y del logaritmo de la concentración. En el primer caso $r = 0.9233$ mientras que para el ajuste del logaritmo r fue 0.9970. Estos resultados indican que el orden respecto de la sustancia A es uno. La pendiente de la recta es

$-0.070 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, que a su vez es la constante de velocidad del proceso.

En el caso que la correlación se realice utilizando logaritmo de base 10, la pendiente de la recta no coincidirá con la constante de velocidad del proceso. En este caso deberá hacerse una pequeña corrección. Como se desarrolló anteriormente, cuando el orden es 1, la ecuación válida para el proceso es

$$\ln[A] = \ln[A_o] - k.t$$

la que puede escribirse

$$[A] = [A_o] \cdot e^{-k.t}$$

si se aplica logaritmo de base 10

$$\log[A] = \log[A_o] - k.t \cdot \log e$$

por lo tanto, la pendiente de la recta de regresión entre $\log[A]$ y el tiempo resulta igual a la constante k por el logaritmo de e . Por lo tanto la constante de velocidad se hallará como

$$k = \frac{\text{pendiente}}{\log e}$$

3- Orden dos:

Cuando el orden de reacción es 2, la ley de acción de masas para la velocidad directa de reacción queda expresada por la ecuación

$$\frac{d[A]}{dt} = -k.[A]^2$$

de la resolución de esta ecuación diferencial obtenemos

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A_o]} + k.t$$

Esta ley relaciona la recíproca de la concentración de A en un dado tiempo, $(1/[A])$, con la recíproca de su concentración a tiempo cero $(1/[A_0])$ y la constante de velocidad y el tiempo. Esta ecuación indica que si un proceso es de orden dos, la recíproca de la concentración de la sustancia A variará linealmente con el tiempo.

Por lo tanto si al graficar la recíproca de la concentración de la sustancia A en función del tiempo, la regresión lineal es estadísticamente significativa, el orden del proceso será 2 y la constante de velocidad será la pendiente de la curva.

4- Órdenes superiores

De manera similar a lo planteado para órdenes cero, uno y dos, se puede plantear para un orden genérico n. En este caso la ecuación diferencial es

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

cuya resolución conduce a la ecuación

$$\frac{1}{[A]^{n-1}} = \frac{1}{[A_0]^{n-1}} + (n-1) \cdot k \cdot t$$

Esta ecuación puede ser utilizada para investigar cualquier orden. Si el proceso tuviera orden 4, la regresión lineal entre la función $1/[A]^3$ y el tiempo debe ser significativa y la pendiente de esa recta será igual a $3 \cdot k$.

Resumen del procedimiento para hallar el orden

Una vez obtenidos los datos de concentración para cada tiempo se analizan las siguientes regresiones lineales [⁴⁸, ⁴⁹]

- concentración vs. tiempo
- ln de concentración vs tiempo
- 1/concentración vs tiempo
- $1/\text{concentración}^{n-1}$ vs tiempo

Aquella regresión que mejor ajuste los datos indicará el orden del proceso, de acuerdo al siguiente cuadro:

Mejor ajuste de los datos	orden	ecuación de concentración
concentración vs. tiempo	cero	$[A] = [A_o] - k \cdot t$
ln concentración vs tiempo	uno	$\ln[A] = \ln[A_o] - k \cdot t$
1/concentración vs. tiempo	dos	$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A_o]} + k \cdot t$
1/concentración ⁿ⁻¹ vs tiempo	n	$\frac{1}{[A]^{n-1}} = \frac{1}{[A_o]^{n-1}} + (n-1) \cdot k \cdot t$

La pendiente de la recta de regresión permite obtener la constante de velocidad del proceso analizado. Con este valor es posible calcular el tiempo de vida medio del compuesto analizado, es decir el tiempo que tarda la sustancia en disminuir su concentración a la mitad del valor inicial.

Las expresiones de los tiempos de vida media se deducen a partir de las ecuaciones de la tabla anterior, valorizando $t = t_{1/2}$ y $[A] = [A_o]/2$. En la tabla siguiente se muestran las expresiones finales para los $t_{1/2}$ para los diferentes órdenes

orden	$t_{1/2}$
cero	$\frac{[A_o]}{2 \cdot k}$
uno	$\frac{\ln 2}{k}$
dos	$\frac{1}{[A_o] \cdot k}$

$$n \quad \frac{2^{n-1} - 1}{[A_o]^{n-1} \cdot (n-1) \cdot k}$$

APÉNDICE 2

Abreviaturas

α_2 MMFP	complejo α_2 Macroglobulina-Monofluorofosfato
α_2 M	α_2 -macroglobulina
[A]	concentración de la sustancia A.
c	concentración de un ligando
\bar{D}	Transformada de Laplace de la función D.
δ	orden de un proceso
E	enzima
ES	complejo Enzima-sustrato
Ki	constante de equilibrio del sitio i.
ki	constante de disociación de un ligado a una macromolécula.
K	constante equilibrio o afinidad
ln	logaritmo de base e
log	logaritmo de base 10
i.v.	vía intravenosa
m	concentración de una macromolécula.
MFP	monofluorofosfato de sodio
NaF	fluoruro de sodio
n	número de datos de un experimento
P	producto
pNFF	p-nitrofenilfosfato
Poli(I)	ácido [5']-poliinosínico
r	1) coeficiente de correlación. 2) moles de ligando unido por mol de macromolécula
r_i	número de moles de ligando unido por mol de macromolécula en el i-ésimo sitio.
S	sustrato
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
μ DI	microdestilación isotérmica
VI	ventrículo izquierdo
VD	ventrículo derecho

APÉNDICE 3

Transformadas de Laplace

Transformación de Laplace de algunas funciones de uso frecuente en Farmacocinética.

F(t)	L F(t) = f(s)
1) 1	1 / s
2) k	k / s
3) Q	\bar{Q}
4) $\frac{dQ}{dt}$	$s\bar{Q} - Q_0$
5) e^{-at}	$\frac{1}{s+a}$
6) $A \cdot e^{-at}$	$\frac{A}{s+a}$
7) $A \cdot t \cdot e^{-at}$	$\frac{A}{(s+a)^2}$
8) K · Q	K · \bar{Q}
9) t	$\frac{1}{s^2}$
10) $\frac{A}{a} (1 - e^{-at})$	$\frac{A}{s(s+a)}$
11) $\frac{A}{b-a} (e^{-at} - e^{-bt})$	$\frac{A}{(s+a)(s+b)}$

$$12) \quad \frac{(B - Aa)e^{-a.t} - (B - Ab)e^{-b.t}}{b - a} \dots\dots\dots$$

$$\frac{A.s + B}{(s + a)(s + b)}$$

$$13) \quad \frac{A}{a}t - \frac{A}{s^2}(1 - e^{-a.t}) \dots\dots\dots$$

$$\frac{A}{s^2.(s + a)}$$

$$14) \quad A \left[\frac{1}{a.b} + \frac{1}{a(a - b)}e^{-a.t} - \frac{1}{b(a - b)}e^{-b.t} \right] \dots\dots$$

$$\frac{A}{s.(s + a).(s + b)}$$

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Fernley, H.N., Walker, P.G. Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem. J.* 104, 1011. 1967.
- ² Ericsson, Y. Monofluorophosphate physiology: general considerations. *Caries Res.* 17 (Suppl 1) 46-55. 1983
- ³ Delmas, P.D., Dupuis, J., Duboeuf, F., Chapuy, M.C., Meunier, P.J. Treatment of Vertebral osteoporosis with disodium monofluorophosphate: Comparison with Sodium Fluoride. *J. Bone and mineral Res.* 5:S143-S147. 1990
- ⁴ Rigalli, A., Cabrerizo, M., Beinlich, A., Puche, R.C. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittel Forschung. Drug Research* 44(I), 651-655. 1994.
- ⁵ Rigalli, A., Esteban, L., Pera, L., Puche, R.C. Binding of monofluorophosphate to α_2 -macroglobulin and C3. *Calcified Tissue International* 60(I) 86-89. 1997.
- ⁶ Esteban, L., Rigalli, A., Puche, R.C. Metabolism of the complex monofluorophosphate- α_2 -macroglobulin in the rat. *Medicina (Buenos Aires)* 59:151-156. 1999
- ⁷ Alfredo Rigalli, Rosa Alloatti, and Rodolfo C. Puche. Measurement of Total and Diffusible Serum Fluoride. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 13:151-157 (1999)
- ⁸ Rigalli, A., Ballina, J.C., Beinlich, A., Alloatti, R., Puche, R.C. Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds, in the rat. *Arzneimittel Forschung. Drug Research.* 44(I), 762-766. 1994.
- ⁹ Lehninger, A. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Ed. Omega SA Barcelona. 1980
- ¹⁰ Ericsson, Y. Biological splitting of PO₃F ions. *Caries Research.* 1:144-152. 1967.
- ¹¹ Taves, D. Determination of submicromolar concentrations of fluoride biological samples. *Talanta*, 15: 1015-1023. 1968.
- ¹² Birge, S.J., Avioli, R.C. Intestinal Phosphate transport and alkaline phosphate activity in the chick. *Am.J.Physiol.* 240: E384-E390. 1981
- ¹³ Villa, A., Carrasco, G., Valenzuela, A., Garrido, A. The effect of calcium on disodium monofluorophosphate absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Res. Comm. in Chem. Path. and Pharmacology* 77: 367- 373. 1992.
- ¹⁴ Villa, A., Rosenkranz, C., Garrido, A. Fluoride absorption from disodium and calcium Monofluorophosphates from the gastrointestinal tract of rats *Res. Comm. in Chem. Path. and Pharmacology* 81:53 67. 1993
- ¹⁵ Bernstein, D.S., Cohen, D. J. Use of sodium fluoride in the treatment of osteoporosis. *Clin. Endoc.* 27:197 210. 1967.
- ¹⁶ Bernstein, D.S., Sadowsky, J. Prevalence of Osteoporosis in High and Low Fluoride Areas in North Dakota. *Am. Med. Assoc (JAMA)* 193: 499-504. 1966.
- ¹⁷ Baud, C.A., Bang, S. Fluoride and bone mineral substance. *Fluoride in medicine.* H. Huber. Bern. 1970.
- ¹⁸ Whitford, G.M. *Monographs in Oral Science. Vol 13. The Metabolism and toxicity of Fluoride.* Ed. Howard M. Myers. Karger. San Francisco Calif. 1989.
- ¹⁹ Review of water fluoridation and fluoride intake from discretionary fluoride supplements. Review for NHMRC (National Health and Medical Research Council. Melbourne 1999
- ²⁰ Delmas, P.D., Dupuis, J., Duboeuf, F., Chapuy, M.C., Meunier, P.J. Treatment of Vertebral osteoporosis with disodium monofluorophosphate: Comparison with Sodium Fluoride. *J. Bone and mineral Res.* 5:S143-S147. 1990
- ²¹ Rigalli, A., Pera, L., Morosano, M., Masoni, A., Bocanera, R., Tozzini, R., Puche, R.C. In postmenopausal osteoporosis the bone increasing effect of monofluorophosphate is not depending of serum fluoride. *Medicina (Buenos Aires)* 59:157-161. 1999.
- ²² Rigalli, A., Iglesias, A.M., Puche, R.C. Long term stability of sodium monofluorophosphate. *Drug.Dev. and Ind. Pharm* 21(4):517-521. 1995.
- ²³ Delmas, P.D., Dupuis, J., Duboeuf, F., Chapuy, M.C., Meunier, P.J. Treatment of Vertebral osteoporosis with disodium monofluorophosphate: Comparison with Sodium Fluoride. *J. Bone and mineral Res.* 5:S143-S147. 1990
- ²⁴ Lau, K.H., Farley, J.R., Freeman, T.K., Baylink, D.J. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 38:858-868. 1989.
- ²⁵ Rigalli, A., Morosano M., Puche, R.C. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human volunteers. *Arzneimittel Forschung. Drug Research.* 46(I), 531-533. 1996.
- ²⁶ Taves D. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexametil-disiloxane. *Talanta* 15: 969-874. 1968.
- ²⁷ Hallsworth, A.S., Weatherell, J.A., Deutsch, D. Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode, *Anal Chem* 48 1660-1664. 1976.
- ²⁸ Swenson, R., Howard, J.B. Structural characterization of human α_2 -Macroglobulin subunits. *J. Biol. Chem.* 254: 4452-4456. 1979.
- ²⁹ Origin 6.1 V6.1052(B232). Copyright 1991-2000 Origin lab Corporation. One Roundhouse Plaza. Northampton MA 01060 USA
- ³⁰ Font, M.T., Garroq, O., Martínez. S.M, Morini, J.C., Puche, R.C., Tarrés, M.C. The inbred IIM/Fm stock. *Rat Newslett.* 25: 28-29. 1991.
- ³¹ Van Dijk, M.C.M., Boers, W., Linthorst, C., Berkel, T.J.C. Role of the scavenger receptor in the uptake of methylamine-activated α_2 -macroglobulin by rat liver, *Biochem. J.* 287: 447-455. 1992.
- ³² Beinlich, A.D., Brun, L.R.M., Rigalli, A., Puche, R.C. Intestinal absorption of disodium monofluorophosphate as affected by concurrent administration of calcium, *Arzneim.Fosch/Drug Res.* In Press
- ³³ Bertolasi, C.A. et al. *Cardiologia* 2000. T1:411. 1997
- ³⁴ Hori, M., Yellin, E.L., Sonnenblick E.H. Left ventricular diastolic suction as a mechanism of ventricular filling. *Jpn. Circ. J.* 46:124-129. 1982.

- ³⁵ Yellin, E.L., Hori, M., Yoran, C., et al: Left ventricular relaxation in the filling and nonfilling intact canine heart. *Am. J. Physiol.* - 250: H620-629. 1986.
- ³⁶ Guimpel, A.J. *Fisiopatología de la insuficiencia cardíaca*- Ed.1986
- ³⁷ Weiss, J.L., Frederiksen, J.W., Weisfeldt, M.L. Hemodynamic determinants of the time course of fall in canine left ventricular pressure. *J. Clin. Invest.* 58:751. 1976.
- ³⁸ Nishimura, R.A., Schwatz, R.S., Tajik J.A., Holmes D.R. Noninvasive measurement of rate of left ventricular relaxation by Doppler echocardiography. Validation with simultaneous cardiac catheterization. *Circulation* 1993; 88:146.
- ³⁹ Bertolasi, C.A. y col., *Cardiología* 2000, T1:104. 1997.
- ⁴⁰ Courtois, M., Kovacs, S.J.Jr., Ludbrook, P.A. Transmitral pressure flow velocity relation. *Circulation* 78:661-671. 1988.
- ⁴¹ Bertolasi, C.A. y col., *Cardiología clínica*. T2:1394. 1989
- ⁴² Del Rio, M., Romero, J.C., *Función cardiovascular*, 161-163. 1992
- ⁴³ Bertolasi, C.A. y col., *Cardiología* 2000, T1:97-99. 1997.
- ⁴⁴ Del Rio, M., Romero, J.C., *Función cardiovascular*. 46-49. 1992
- ⁴⁵ Weyman A.E. *Principles and Practice of Echocardiography*. Second Edition. Lea and Febiger. 1994.
- ⁴⁶ Feigenbaum. *Ecocardiografía*. Editorial Médica Panamericana.
- ⁴⁷ García Fernández, M.A. *Principios y práctica del Doppler cardíaco*. Interamericana Mcgraw Hill. 1995.
- ⁴⁸ GraphPad Prism 1.0. GraphPad Software, Inc. San Diego. USA 1994
- ⁴⁹ Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames. IA.