



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y MODELACIÓN MATEMÁTICA  
DE LOS FLUJOS DE TRANSPORTE DE HIERRO EN CÉLULAS CACO-2**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,  
MENCIÓN QUÍMICA.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA.

**ANDREA JUSTINA COLINS RODRÍGUEZ**

PROFESOR GUÍA:  
JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

PROFESOR CO-GUÍA:  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ALVARO OLIVERA NAPPA  
MARCO TULIO NUÑEZ GONZÁLEZ  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE  
2015

## DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y MODELACIÓN MATEMÁTICA DE LOS FLUJOS DE TRANSPORTE DE HIERRO EN CÉLULAS CACO-2

El hierro es un metal traza, fundamental para la existencia de la vida. Los niveles de hierro en el organismo deben ser altamente controlados ya que pequeñas variaciones desencadenan numerosas enfermedades, entre ellas la anemia y hemocromatosis. En seres humanos la presencia de este metal se controla regulando su absorción intestinal, en donde el hierro ingresa al organismo a través de la proteína DMT1, ubicada en la cara apical de los enterocitos. Luego, el hierro es transportado a la cara basolateral y finalmente, es expulsado al torrente sanguíneo mediante la proteína FPN1.

El objetivo de este trabajo es analizar el transporte de hierro en células Caco-2 mediante métodos experimentales y modelación matemática. Para esto se determinaron experimentalmente los flujos de hierro en el tiempo, a diferentes concentraciones iniciales en el medio apical. Se determinó la velocidad inicial de la absorción en función de la concentración apical. Y además, se midió la cantidad de hierro que ingresa a las células luego de una segunda exposición al metal. Los resultados de estos experimentos concuerdan con las magnitudes reportadas en casos similares, pero muestran un comportamiento no lineal en los flujos de absorción, lo cual no había sido observado anteriormente.

Para analizar matemáticamente los resultados experimentales obtenidos, se desarrolló un modelo empírico y un modelo fenomenológico. El modelo empírico se construyó utilizando un algoritmo de programación genética modificado para lograr mejores resultados. El modelo representa adecuadamente los datos experimentales utilizados en la etapa de entrenamiento, alcanzado un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.85$  y un error de generalización de  $MSE_{jk} = 1.32$ . Además, el modelo permite representar la velocidad inicial de absorción apical, es decir, datos que no fueron empleados en la etapa de entrenamiento del algoritmo. Por otro lado, el modelo exhibe características básicas del fenómeno, sin que se le entregue información a priori al respecto.

El modelo fenomenológico consta de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias que capturan dos fenómenos relevantes. La actividad de DMT1 y la variación de la cantidad de ésta en la membrana apical. Este modelo permite simular todos los escenarios estudiados experimentalmente, asimismo representa los flujos de absorción apical con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.867$ , mientras que su error de generalización es de  $MSE_{jk} = 1.39$ .

Del análisis realizado, se concluye que la endocitosis de DMT1 desde la cara apical, es un fenómeno relevante en el proceso de absorción de hierro. Este fenómeno no había sido considerado anteriormente y debe ser estudiado en detalle para poder caracterizar el sistema.

En el trabajo se planteó una metodología para desarrollar modelos empíricos que puede utilizarse en otros sistemas biológicos complejos. Su principal ventaja es que permite mejorar la capacidad de generalización de los modelos realizados.

*Para mi mamá y el Perro*

# Agradecimientos

En primer lugar a mi mamá, por ser mi mamá, por su no tan infinita paciencia y por enseñarme que tenía que estudiar algo, no importa qué, pero tenía que estudiar. Al Perro por despertarme todos los días con su energía y llevarme sus juguetes cuando llego en las tardes.

A Roberto por las fotos de gatos cuando estoy cansada, por los mails a las 3 de la mañana, por su sinceridad y sus sarcasmos, sobre todo sus sarcasmos.

A Felipe por los tés después de almuerzo, por dejarme ver tele, dejarme jugar con Sherlocke, por escucharme cuando reclamo sin parar y por todas las fotos, videos y gifs de gatitos.

A Willy y Mati por ayudarme a que este escrito quedara lo mejor posible, tanto en la forma como en el fondo.

A los integrantes del laboratorio PMDC, en especial a Daniel y Carla por nuestras largas conversaciones sobre el hierro. A Álvaro, Daniela, Ximena, Guillermo, Waldo y Pilar, por sus críticas, comentarios y cuestionamientos.

Al profesor Tulio Nuñez por facilitarme las instalaciones de su laboratorio, por su ayuda en el diseño y ejecución de la sección experimental. Además, quisiera agradecer a los integrantes de su laboratorio, en especial a Andrés y Victoria por apoyo y orientación.

A la profesora Ziomara Gerdtzen por su apoyo, orientación y consejos a lo largo del proceso. Y al profesor Álvaro Olivera por sus comentarios y preguntas, que hicieron que mirara las cosas de otra forma.

Al profesor Cristian Salgado por ser mi profesor guía, por su paciencia, su apoyo y sus comentarios, que no solo permitieron la construcción de este trabajo, sino que además me enseñaron a trabajar de una mejor manera.

# Tabla de contenido

<b>Índice de tablas</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de ilustraciones</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes generales . . . . .	1
1.2. Motivación . . . . .	4
1.3. Definición del proyecto . . . . .	4
<b>2. Objetivos</b>	<b>5</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	5
2.2. Objetivos específicos . . . . .	5
<b>3. Marco teórico</b>	<b>6</b>
3.1. Transporte a través de la membrana plasmática . . . . .	6
3.1.1. Difusión facilitada . . . . .	6
3.1.2. Transporte activo . . . . .	7
3.2. Modelos matemáticos de transporte a través de membranas celulares . . . . .	11
3.2.1. Modelos matemáticos . . . . .	11
3.2.2. Modelos empíricos . . . . .	12
3.2.3. Programación genética . . . . .	13
3.2.4. Modelos semi-empíricos . . . . .	22
3.2.5. Modelos fenomenológicos . . . . .	23
3.2.6. Modelos biológicos oscilatorios . . . . .	27
3.3. Definición del sistema . . . . .	31
3.3.1. El hierro . . . . .	31
3.3.2. Absorción intestinal de hierro . . . . .	32
3.3.3. Componentes relevantes de la absorción . . . . .	34
3.3.4. Mecanismos de regulación de la absorción de hierro . . . . .	39
3.3.5. Determinación experimental de flujos . . . . .	43
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>45</b>
4.1. Materiales . . . . .	45
4.1.1. Reactivos y equipos utilizados . . . . .	45
4.1.2. Hardware . . . . .	45
4.1.3. Software . . . . .	45
4.2. Métodos . . . . .	46

4.2.1.	Determinación experimental de la absorción de hierro . . . . .	46
4.2.2.	Construcción del modelo empírico . . . . .	47
4.2.3.	Construcción del modelo fenomenológico . . . . .	49
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>51</b>
5.1.	Determinación experimental de los flujos de hierro . . . . .	51
5.1.1.	Absorción apical de hierro a distintas concentraciones . . . . .	52
5.1.2.	Velocidades iniciales de absorción apical . . . . .	54
5.1.3.	Bloqueo mucosal . . . . .	56
5.2.	Modelo Empírico . . . . .	59
5.2.1.	Modelo desarrollado con el algoritmo clásico . . . . .	59
5.2.2.	Modelo desarrollado con la metodología de ajuste de parámetros . . .	63
5.2.3.	Modelo desarrollado con la metodología de error de generalización . .	67
5.3.	Modelo fenomenológico . . . . .	73
5.3.1.	Modelo de rampa . . . . .	75
5.3.2.	Modelo LIP (Labile Iron Pool) . . . . .	80
5.3.3.	Modelo Lotka-Volterra . . . . .	83
5.3.4.	Modelo auto-catalítico . . . . .	87
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Participación en congresos</b>	<b>102</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>103</b>
	<b>Anexos</b>	<b>115</b>
<b>A.</b>	<b>Protocolos experimentales</b>	<b>116</b>
A.1.	Preparación de Solución L-ácido ascórbico . . . . .	116
A.2.	Condiciones de cultivo . . . . .	116
<b>B.</b>	<b>Determinación experimental del los flujos de hierro</b>	<b>117</b>
B.1.	Cuantificación de la internalización de DMT1 . . . . .	117
B.2.	Verificación de la integridad de la monocapa . . . . .	118
B.3.	Velocidades iniciales de absorción . . . . .	119
B.4.	Bloqueo mucosal . . . . .	119
<b>C.</b>	<b>Modelos empíricos</b>	<b>120</b>
C.1.	Determinación de la cantidad de iteraciones en la etapa de ajuste de parámetros	120
C.2.	Evaluación del MSE al optimizar los parámetros con un mayor número de iteraciones . . . . .	121
C.3.	Determinación de la cantidad de iteraciones en la etapa de determinación de error de generalización . . . . .	121
C.4.	Análisis del modelo final . . . . .	122
C.4.1.	Características del modelo . . . . .	122
C.4.2.	Velocidades iniciales respecto a la concentración . . . . .	123

C.4.3. Absorción apical en el tiempo . . . . .	123
<b>D. Modelos fenomenológicos</b>	<b>125</b>
D.1. Modelo de rampa . . . . .	125
D.2. Modelo LIP . . . . .	128
D.3. Modelo Lotka-Volterra . . . . .	130
D.4. Modelo autocatalítico . . . . .	132

# Índice de tablas

4.1. Parámetros utilizados en el algoritmo de Programación Genética. . . . .	49
5.1. Parámetros del ajuste realizado para la ecuación de Michaelis-Menten . . . .	56
5.2. Resultados de la validación Jackknife para el modelo creado con algoritmo original de GP . . . . .	62
5.3. Resultados de la validación Jackknife para el modelo creado con GP y ajuste de parámetros . . . . .	66
5.4. Resultados de la validación Jackknife para el modelo creado con algoritmo GP y error de generalización . . . . .	71
5.5. Parámetros y resultados de la validación Jackknife del modelo autocatalítico	94
A.1. Características del cultivo celular. . . . .	116
D.1. Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo de rampa. . . . .	126
D.2. Parámetros del modelo tipo rampa. . . . .	126
D.3. Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo LIP.	128
D.4. Parámetros del modelo tipo LIP. . . . .	129
D.5. Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo Lotka-Volterra. . . . .	130
D.6. Parámetros del modelo Lotka-Volterra. . . . .	131
D.7. Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo autocatalítico. . . . .	132

# Índice de ilustraciones

1.1. Transporte del hierro a través de los enterocitos . . . . .	2
1.2. Efecto de la exposición a hierro de un segmento de intestino de rata . . . . .	3
3.1. Representación de la acción de la bomba sodio/potasio . . . . .	8
3.2. Modelo de estados de las proteínas con actividad simporte y antiporte . . . . .	9
3.3. Esquema de trabajo de los algoritmos genéticos . . . . .	14
3.4. Representación de una función en la sintaxis de programación genética . . . . .	15
3.5. Representación de la operación de crossing over clásica . . . . .	17
3.6. Simulación de una curva tipo Michaelis-Menten . . . . .	24
3.7. Ejemplo de diagrama de estados para una enzima . . . . .	26
3.8. Diagramas de estados de proteínas transportadoras de membrana . . . . .	27
3.9. Diagrama de estados de modelo oscilatorio . . . . .	29
3.10. Flujos de hierro en células Caco-2 . . . . .	34
3.11. Variantes de los transcritos de ARNm de DMT1 y las respectivas isoformas . . . . .	35
3.12. Modelo cinético de DMT1 . . . . .	36
3.13. Mecanismo de regulación traduccional de absorción de hierro . . . . .	40
3.14. Resumen de las condiciones de síntesis de las proteínas reguladas mediante el mecanismo de traducción. . . . .	41
3.15. Cinética de internalización de transportadores inducida por la oferta de hierro . . . . .	42
3.16. Esquema de la disposición experimental para los ensayos de flujo. . . . .	43
4.1. Esquemas de los algoritmos de programación genética utilizados . . . . .	48
5.1. Ensayos de absorción apical a distintas concentraciones iniciales de hierro . . . . .	52
5.2. Transporte total de hierro a distintas concentraciones iniciales . . . . .	53
5.3. Velocidad inicial de absorción a diferentes concentraciones . . . . .	55
5.4. Absorción apical de hierro luego de la segunda exposición a hierro. . . . .	57
5.5. Absorción apical de hierro en la primera y segunda exposición a hierro. . . . .	58
5.6. Simulación de la absorción apical utilizando el modelo empírico de la ecuación 5.2. . . . .	61
5.7. Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.2. . . . .	62
5.8. Simulación del modelo empírico de la ecuación 5.3. . . . .	65
5.9. Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.3. . . . .	66
5.10. Simulación de la absorción apical utilizando el modelo de la ecuación 5.4. . . . .	69
5.11. Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.4. . . . .	70
5.12. Modelo de estados de DMT1 propuesto . . . . .	74
5.13. Diagrama de estados del modelo tipo rampa. . . . .	76

5.14. Simulación de la absorción apical con el modelo tipo rampa . . . . .	77
5.15. Distribución de los estados del modelo tipo rampa ( $20[\mu M]$ ). . . . .	77
5.16. Conservación de la cantidad de proteína total del modelo tipo rampa. . . . .	78
5.17. Simulación de la fracción de proteína en membrana en el tiempo del modelo tipo rampa . . . . .	79
5.18. Fracción de proteína endocitada a distintas concentraciones según modelo tipo rampa. . . . .	79
5.19. Simulación del bloqueo mucosal según modelo tipo rampa . . . . .	80
5.20. Diagrama de estados de modelo tipo LIP. . . . .	81
5.21. Simulación de la absorción apical con el modelo tipo LIP . . . . .	82
5.22. Distribución de estados del modelo tipo LIP ( $20[\mu M]$ ). . . . .	83
5.23. Distribución del hierro entre el medio contiguo a la cara apical y el compartimento . . . . .	84
5.24. Diagrama de estados del modelo tipo Lotka-Volterra. . . . .	84
5.25. Simulación de la absorción apical con el modelo tipo Lotka-Volterra . . . . .	85
5.26. Distribución de estados del modelo Lotka-Volterra ( $20[\mu M]$ ). . . . .	85
5.27. Diagrama de estados del modelo auto-catalítico. . . . .	87
5.28. Simulación de la absorción apical del de modelo auto-catalítico . . . . .	88
5.29. Distribución de los estados del modelo de rampa ( $20[\mu M]$ ). . . . .	89
5.30. Conservación de cantidad de proteína del modelo auto-catalítico. . . . .	90
5.31. Proteína endocitada a distintas concentraciones según modelo auto-catalítico. . . . .	90
5.32. Simulación de la cantidad de proteína en membrana en el tiempo . . . . .	91
5.33. Simulación del bloqueo mucosal según el modelo auto-catalítico . . . . .	92
5.34. Simulación de las velocidades de absorción en los 3 primeros minutos. . . . .	93
B.1. Cuantificación de la internalización de DMT1. . . . .	117
B.2. Medición de la TEER en el periodo de cultivo. . . . .	118
B.3. Comparación de las velocidades iniciales de absorción con resultados bibliográficos . . . . .	119
B.4. Comparación de la absorción apical de hierro en la primera y segunda exposición a hierro. . . . .	119
C.1. Evaluación de la función objetivo $MSE$ obtenidas con distinto número de iteraciones . . . . .	120
C.2. Evaluación del MSE al optimizar los parámetros con un mayor número de iteraciones . . . . .	121
C.3. Evaluación de la función objetivo $MSE_{jk}$ obtenidas con distinto número de iteraciones . . . . .	122
C.4. Simulación de la sección oscilatoria del modelo . . . . .	122
C.5. Simulación del modelo empírico sin la sección oscilatoria . . . . .	123
C.6. Simulación de la velocidad inicial de absorción respecto a la concentración de hierro en el medio apical . . . . .	123
C.7. Simulación de la absorción apical a distintas concentraciones en el tiempo . . . . .	124
D.1. Variación de proteína endocitada en el tiempo según el modelo tipo rampa. . . . .	125
D.2. Distribución de los estados del modelo de rampa $5\mu M$ . . . . .	127
D.3. Distribución de los estados del modelo de rampa $10\mu M$ . . . . .	127
D.4. Distribución de los estados del modelo autocatalítico $5\mu M$ . . . . .	133
D.5. Distribución de los estados del modelo autocatalítico $10\mu M$ . . . . .	133

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes generales

El hierro es un metal traza necesario para el desarrollo de la vida de los seres vivos. En el caso de los seres humanos, es de vital importancia ya que actúa en el centro catalítico de numerosas enzimas, como la hemoglobina, mioglobina, proteínas de regulación transcripcional, estabilización estructural y varios componentes de la cadena transportadora de electrones [1,2]. Sin embargo, debido a la capacidad oxidativa del hierro, altas concentraciones fisiológicas de este metal catalizan la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), desencadenando daño en lípidos, DNA y proteínas [3,4]. En concordancia con lo anterior, tanto el déficit como el exceso de hierro dan pie a diversas enfermedades, como la anemia o la hemocromatosis, es por esto que la absorción de este metal debe ser altamente regulada. Esta es la motivación para la investigación sobre el tema, el cual es el tópico principal de la tesis que se ha de realizar.

El hierro ingresa al organismo por su absorción en el intestino delgado, en particular, es incorporado en las células epiteliales del duodeno. El hierro disponible en la dieta se puede dividir en 3 tipos, el hierro-hemo proveniente de fuentes animales, el hierro-no hemo proveniente de fuentes vegetales y hierro-no hemo en forma de sales o quelatos [5]. Aunque además es posible considerar en este grupo la absorción de ferritina alimentaria [6].

Los enterocitos son las células epiteliales que recubren el intestino delgado, son células polarizadas que constan de un lado apical y uno basolateral (Figura 1.1). El lado apical es la barrera entre el lumen intestinal y el medio intracelular, se caracteriza por presentar microvellosidades que permiten aumentar la superficie de absorción [7]. Mientras que la cara basolateral limita el medio intracelular con el torrente sanguíneo [8].

El proceso de absorción de hierro a través de los enterocitos se puede dividir en 3 etapas, la incorporación a través de la membrana apical, luego el transporte de hierro hacia la cara basolateral y finalmente la expulsión al torrente sanguíneo a través de la membrana basolateral. Un esquema del proceso general es mostrado en la Figura 1.1.

Si bien el pH del intestino y estómago ayudan en la liberación del hierro desde el grupo hemo y a la estabilización del ion ferroso, el hierro presente en la dieta se encuentra comúnmente en forma de ion férrico  $\text{Fe}^{3+}$  [9]. En la cara apical de los enterocitos se ha encontrado la actividad ferrereductasa del Dcytb (Citocromo Duodenal B) que permite la reducción del ion férrico a ferroso [10], luego de esto el ion ferroso puede traspasar la membrana apical a través de la proteína co-transportadora DMT1 (Divalent Membrane Transporter 1), la cual utiliza como sustrato un ion  $\text{Fe}^{2+}$  y un ion  $\text{H}^+$  [11].

Los iones de hierro presentes en el citoplasma, pueden encontrarse unidos con alta afinidad a proteínas específicas, o bien, con baja afinidad a componentes celulares de bajo peso molecular como fosfatos y nucleótidos además de a grupos hidroxilos, aminos y sulfidrilos [12], constituyendo el pool de hierro lábil (LIP) [13]. El hierro puede ser ingresado a la mitocondria para llevar a cabo procesos intracelulares, o si no es requerido de manera inmediata por el organismo, puede ser almacenado en la ferritina citoplasmática.

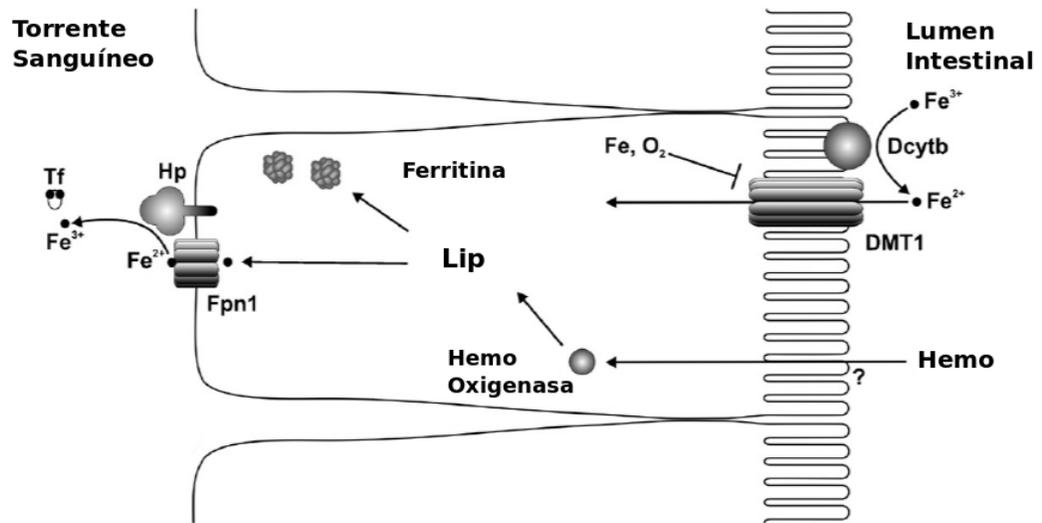


Figura 1.1: Transporte del hierro a través de los enterocitos [8].

El hierro puede atravesar la membrana basolateral gracias a la proteína de transmembrana FPN1 ( Ferroportina1), la cual es la única proteína conocida con esta función [14]. Una vez en el medio extra-celular, el metal es oxidado nuevamente a ion férrico por la acción de la ferroxidasa Hp (Hefaestina). Posteriormente los iones férricos pueden unirse a la proteína transferrina, la cual es capaz de añadir 2 iones de este metal a su estructura. Esta proteína recorre el torrente sanguíneo transportando el hierro a todo el organismo [15].

En humanos el hierro-hemo es absorbido de manera más eficiente que el no-hemo, pero su proceso de internalización es menos entendido. Aunque hay evidencia de que el grupo hemo

es ingresado mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor, no se ha identificado un receptor que posea alta afinidad por este complejo en los enterocitos. Además, es sabido que una vez que el grupo hemo es endocitado, una hemo oxigenasa libera hierro en forma de ion férrico al medio intracelular [9].

La excreción de hierro del organismo es un proceso que no es controlado de manera específica, ya que se basa en las fugas de hierro causadas por pérdidas de sangre y el recambio de las células epiteliales en tejidos como la piel, el cabello, el tracto intestinal y urinario [16]. Es por esto, que la homeostasis de hierro es realizada mediante la regulación de la absorción intestinal, ya sea a nivel transcripcional, traduccional o sistémica [17].

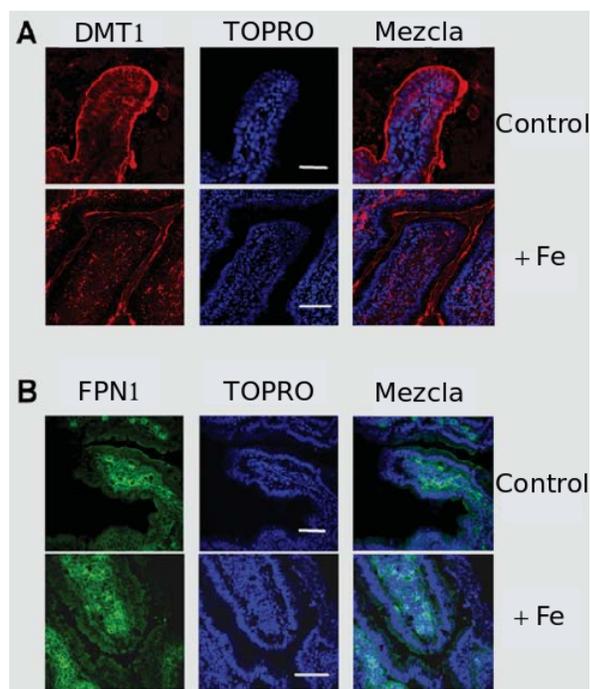


Figura 1.2: Efecto de la exposición a hierro por 3.5 *hrs* de un segmento de intestino de rata. A) Distribución de DMT1 (rojo) en una muestra sin hierro (control) y en una muestra expuesta a 20 [mg] de  $\text{FeSO}_4$  (+Fe). B) Distribución de FPN1 (verde) en una muestra sin hierro y en una muestra expuesta a 20 mg de  $\text{FeSO}_4$ . TOPRO es usado como un marcador del núcleo [17].

Un fenómeno relevante de la absorción de hierro es el bloqueo mucosal, el cual se define como el proceso en el que una primera dosis de hierro, puede disminuir la absorción de una segunda dosis [17]. Estudios al respecto, sugieren que este suceso se debe al movimiento vesicular de los transportadores desde la membrana apical hacia la basolateral y viceversa [17,18]. En la Figura 1.2 se muestra el cambio en las posiciones de los transportadores DMT1 y FPN1 en una sección de intestino de una rata, la cual fue previamente expuesta durante 3.5 hrs a una solución de 20 [mg] de  $\text{FeSO}_4$  y 0.01 [N] HCl. Se ha postulado que este proceso puede ser parte del transporte del hierro a través de las células [18], o bien un mecanismo de control de la absorción, en cuyo caso, sería el mecanismo más rápido conocido hasta el momento ya que se han visto señales hasta 30 minutos luego de la exposición a hierro [17]. Hasta el momento los estudios del bloqueo mucosal solamente se han desarrollado *in vivo*, y

sus causas y características no están completamente definidas, ya que que la descripción del fenómeno es muy reciente.

Los estudios *in vitro* realizados respecto a la absorción intestinal de hierro se han desarrollado típicamente en células Caco-2, una línea celular de adenocarcinoma colonorectal humano que tienen la capacidad de diferenciarse espontáneamente en un cultivo, formando una monocapa de células de gran similitud a los enterocitos [19]. En particular, expresa de manera endógena las proteínas de membrana de los enterocitos, como DMT1 y FPN1 [20]. A pesar de que esta línea celular es el mejor modelo utilizado para los ensayos de absorción intestinal, cabe destacar que los cultivos de este tipo se caracterizan por su alta variabilidad y por tanto el bajo nivel de reproducibilidad de los experimentos [19].

## 1.2. Motivación

A pesar del gran interés que ha despertado este tema en los últimos años, todavía permanecen una serie de incógnitas respecto a las características de cada una de las etapas del transporte. En particular en la etapa de transporte a través de la membrana apical y basolateral, las cuales son etapas críticas dentro de la regulación de la cantidad de hierro que ingresa al organismo. Por lo tanto, el estudio del comportamiento de los flujos de hierro a través de estas membranas ayudaría a identificar nuevos componentes que pueden ser utilizados como objetivos de nuevas terapias para enfermedades relacionadas a la homeostasis de hierro.

## 1.3. Definición del proyecto

Debido a la relevancia que posee el fenómeno de la absorción de hierro, se hace necesario el estudio de la cantidad de hierro que ingresa al organismo bajo diferentes escenarios. Para esto se hace necesario la construcción de un modelo matemático que permita describir esta situación, ya que con esa información es posible determinar cuáles son los actores y procesos más relevantes del fenómeno, diseñar nuevos experimentos que ayuden a ampliar el conocimiento del sistema, proponer nuevas terapias para las enfermedades relacionadas con el hierro y evaluar el efecto de fármacos de manera rápida y económica.

Desafortunadamente, no existe información detallada acerca de los componentes que participan en el fenómeno y de sus respectivas interacciones, por lo que el modelamiento matemático se puede enfrentar de dos formas. Primero, desarrollar un modelo fenomenológico del transporte a través de la membrana apical con la conocimiento existente hasta el momento, el cual se describa la cinética de los componentes más relevantes mediante ecuaciones diferenciales ordinarias. El segundo, crear un modelo en base a datos experimentales y sin necesidad de conocer detalladamente el sistema. Una de las técnicas que podría aplicarse en este caso sería la programación genética, ya que suele ser utilizada en problemas de alta complejidad, en particular cuando se espera que la solución óptima sea altamente no lineal [21].

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1. Objetivo general

El objetivo general del trabajo es analizar el transporte de hierro en células Caco-2 mediante métodos experimentales y modelación matemática.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar los componentes celulares y moleculares asociados al transporte de hierro.
- Analizar las interacciones entre los componentes del sistema de transporte y su vinculación con el funcionamiento celular general y la homeostasis de hierro celular.
- Analizar experimentalmente los flujos de hierro a través de la membrana apical bajo distintos escenarios, utilizando isótopos radiactivos para medir el transporte de este metal.
- Plantear un modelo empírico que permita describir el transporte de hierro a través de la membrana apical bajo distintas condiciones.
- Plantear un modelo fenomenológico del transporte de membrana basado en la información disponible en bibliografía y los resultados de los ensayos experimentales.
- Validar los modelos matemáticos con respecto a las mediciones experimentales.

# Capítulo 3

## Marco teórico

### 3.1. Transporte a través de la membrana plasmática

La membrana plasmática es selectivamente semipermeable a moléculas pequeñas y no polares, por lo que la mayoría de las moléculas no son capaces de atravesarla mediante difusión simple; de esta manera la membrana plasmática actúa como una barrera entre los componentes de la célula y las moléculas del medio que las rodea. Los transportadores de membrana posibilitan el paso de una gran cantidad de moléculas de manera selectiva, permitiendo el control de la composición del medio intracelular. A continuación se describen las características principales de los tipos de transporte mediado por proteínas.

#### 3.1.1. Difusión facilitada

La difusión facilitada es el proceso en el que proteínas de transmembrana interactúan con sus respectivos sustratos permitiendo el paso desde un medio a otro de manera pasiva, es decir, el proceso es dirigido por los gradientes de concentración o potencial electroquímico, al igual que el proceso de difusión [22]. Existen dos tipos de proteínas transportadoras que cumplen estas características, los canales y los carriers (o uniportadores). A continuación se enumeran las diferencias principales entre difusión y difusión facilitada:

1. *Especificidad y selectividad:* Los transportadores se unen a sus sustratos de manera selectiva, por ejemplo, los canales son capaces de distinguir entre cationes y aniones, mientras que los uniportadores pueden diferenciar, por ejemplo, entre configuraciones de azúcares *l*- y *d*- [23].

Existe una relación recíproca entre la selectividad por los sustrato y la velocidad de transporte de estos. Esto podría suceder por ejemplo debido a la cantidad de interacciones necesarias para reconocer el sustrato, ya que mientras más específico sea mayor es la cantidad de interacciones entre las moléculas, lo que retrasa el transporte de los sustratos. Debido a esto, como regla general los canales son menos selectivos que

los uniportadores, por lo que pueden trasladar sustrato a una velocidad varios órdenes de magnitud mayor que un transportador, pero de manera mucho menos selectiva [22].

2. *Saturabilidad*: La ley de Fick indica que la velocidad de transporte aumenta linealmente respecto a la diferencia de concentración. Mientras que el transporte mediado por proteínas presenta saturabilidad, es decir, la velocidad crece asintóticamente hasta alcanzar un máximo. Esto se debe en el caso de los uniportadores, al límite de la velocidad de traslocación en la membrana, mientras que en los canales puede suceder debido al ancho del poro [22].
3. *Inhibición, activación cooperatividad*: El transporte de un sustrato se puede ver influenciado, entre otras cosas, por la presencia de componentes en el medio que interactúan con el canal o uniportador, pero que no son su sustrato principal. Esta interacción puede aumentar o disminuir la velocidad de transporte dependiendo de si es un inhibidor, si interactúa cooperativa o competitivamente con el sustrato y la proteína.
4. *Efecto trans*: Se denomina como lado *trans* al medio hacia donde se está transportando el sustrato, mientras que el medio desde donde se transporta es el lado *cis*. En algunos casos de difusión facilitada puede variar la velocidad de transporte de sustrato al variar otros solutos en el medio trans [24].
5. *Efecto de la temperatura*: Cuando existe difusión simple, un aumento en la temperatura produce una disminución de la viscosidad de los fluidos y un consecuente aumento en la velocidad del transporte. Mientras que en la difusión facilitada produce un aumento en la velocidad de los cambios conformacionales que puede sufrir la proteína transportadora, lo que trae consigo un aumento en la velocidad de transporte. En el caso de difusión facilitada el aumento de temperatura entre los 20 a 37 °C produce una gran variación en la velocidad de transporte en comparación al fenómeno de difusión simple [22].

### 3.1.2. Transporte activo

Como se describió en la sección anterior, en el caso de difusión facilitada el transporte ocurre a favor del potencial electroquímico entre ambos medios. En el caso del transporte activo esto no sucede, en su lugar las especies pueden traspasar la membrana desde un medio donde existe un potencial electroquímico menor a un medio donde el potencial es mayor [25]. Este fenómeno puede ocurrir de dos maneras diferentes: Obteniéndose energía de una reacción química, o bien, acoplando el flujo de soluto principal con el flujo de un co-soluto que sí siga el gradiente electroquímico [22], estos casos son conocidos como transporte activo primario y secundario respectivamente, los cuales se detallan a continuación.

#### Transporte activo primario

Cuando la energía necesaria para transportar el soluto en contra de su gradiente de concentración proviene de la reacción de hidrólisis de ATP, se le denomina transporte activo primario [22]. Por esta razón muchos de los transportadores que cumplen esta característica son conocidos como *ATP-asas* y son denominadas como bombas ya que transportan los

solutos desde un medio con menor potencial químico a uno con mayor potencial. Existen tres tipos de ATP-asas que transportan cationes, divididas según el tipo de membrana donde se encuentran ubicadas, las ATP-asas de tipo P que se encuentran en la membrana plasmática, las de tipo F que se encuentran en la membrana mitocondrial y las de tipo V que se presentan en membranas vacuolares de plantas [25].

Es necesario notar que, este tipo de transporte crea un gradiente de concentración que podría guiar un flujo del soluto en sentido contrario mediante transporte pasivo, dicho flujo podría encontrarse acoplado a una segunda especie, la cual podría ser transportada en contra de su gradiente electroquímico. Un ejemplo de esto se produce con la ATP-asa tipo P  $3Na^+/2K^+$  o bomba de sodio/potasio (Figura 3.1), la cual une tres iones de sodio en el medio citoplasmático y luego es fosforilada por una molécula de ATP, lo que da pie a un cambio conformacional en la proteína que permite su salida al medio extracelular. Con esta nueva conformación, la proteína se puede unir a dos iones de potasio que se encuentren en el medio extracelular, luego puede desfosforilarse cambiando su conformación permitiendo el paso de los iones al citosol. La actividad de esta bomba aumenta la concentración de sodio en el medio extracelular, produciendo un gradiente de concentración y aumentando la diferencia de potencial eléctrico en la membrana, ambos gradientes son utilizados por proteínas co-transportadoras como fuente de energía [26].

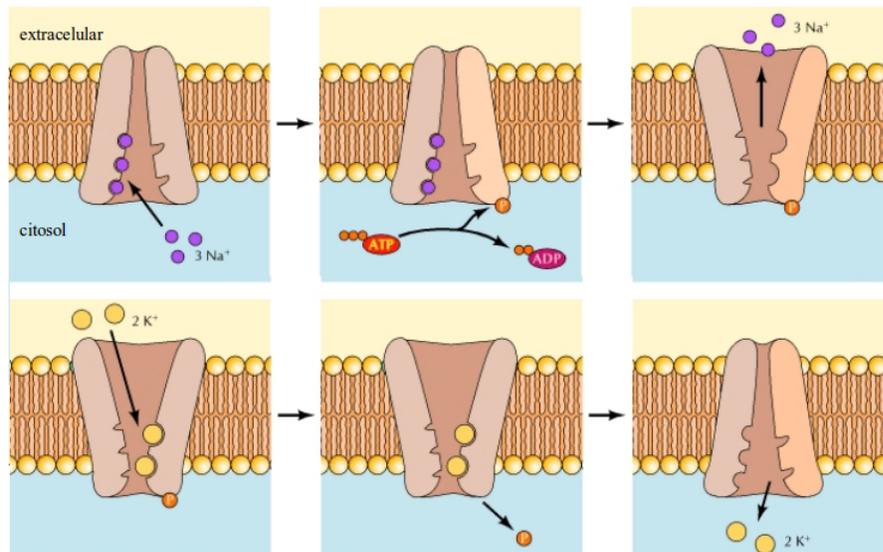


Figura 3.1: Representación de la acción de la bomba sodio/potasio. Adaptado de [27].

### Transporte activo secundario

Es el tipo más común de transporte para no electrolitos, como por ejemplo, aminoácidos, azúcares y algunos solutos inorgánicos. Este mecanismo se caracteriza por acoplar dos flujos, el del sustrato principal, que es transportado en contra del gradiente electroquímico, y un *co-soluto*, el cual es transportado a favor de su gradiente de concentración y por tanto el que permite el transporte del sustrato principal [22]. Entre los metabolitos más comunes reconocidos como co-solutos se encuentran el ion de sodio  $Na^+$  y protones  $H^+$ . La fuerza

motriz inmediata es el gradiente electroquímico producido por el co-soluto (por ejemplo  $H^+$ ).

Una de las formas de este tipo de transporte sucede con la unión del transportador con el co-soluto en el lado I (por ejemplo, medio extracelular), con esto el transportador se activa y el soluto puede unirse en otro sitio de unión en el lado I para translocar todo el complejo y liberar ambos sustratos en el lado II (por ejemplo, medio intracelular). Este tipo de transporte es conocido como co-transporte, simporte o unión positiva. En el fenómeno antiporte, el gradiente del co-soluto permite el transporte del mismo desde el lado II al lado I, por lo que aumenta la disponibilidad de transportador en la configuración adecuada para que el sustrato pueda transportarse al lado II aunque vaya en contra de su gradiente de concentración.

### 1. Simporte:

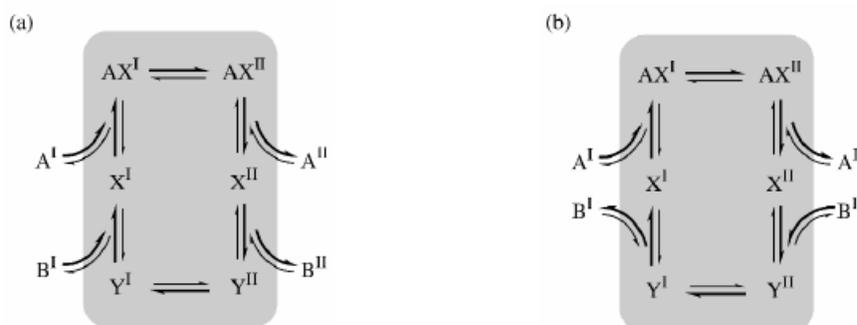


Figura 3.2: Modelo de estados de las proteínas con actividad simporte (a) y antiporte (b). Adaptado de [22].

Este tipo de proteínas comparten ciertas similitudes con los unitransportadores ya que operan a velocidades similares, muestran similitudes estructurales y sufren cambios conformacionales cíclicos [28]. La actividad de estas proteínas se puede representar por un modelo de estados como que se muestra en la Figura 3.2.a y su actividad presenta numerosas características que permiten identificarlas [22]:

- Al aumentar la concentración de B (co-soluto) en la fase I aumenta el transporte de A (conocido como estimulación cis).
- Al aumentar A en la fase I aumenta la velocidad de transporte de B (estimulación recíproca).
- Cuando el potencial químico es igual a ambos lados, cambia el signo del flujo de soluto, esto sucede ya que la única fuerza motriz es el gradiente de co-solutos.
- La energía total de transporte asociado entre el soluto y co-soluto debe ser negativa. Por ejemplo, en co-transporte se pierde más energía por el transporte del co-soluto, que va a favor de su gradiente, que la energía que se gana por transportar el soluto en contra de su gradiente. Esta es una condición necesaria para las reacciones irreversibles.

Una proteína que funciona bajo este tipo de régimen es la proteína simportadora  $2Na^+/1glucosa$ , la cual se presenta en células epiteliales del intestino delgado, en túbulos de los riñones, entre otras. Su función es ingresar glucosa al citoplasma en contra de su gradiente de concentración; para esto acopla el flujo de ingreso de dos iones de sodio hacia la célula aprovechando su gradiente electroquímico [28].

## 2. **Antiporte**

En este tipo de transporte los sustratos se mueven en direcciones opuestas, por lo que si bien las características difieren en algunos aspectos con el fenómeno simporte, las características de inhibición y de las fuerzas motrices son las mismas. En la Figura 3.2.b se puede ver un modelo de estados para una proteína antiporte.

La mayoría de las células presentan al menos un tipo de proteínas antiportadoras, en el caso de las células musculares cardíacas se presentan las proteínas  $3Na^+/Ca^{+2}$ , las cuales utilizan la diferencia de potencial electroquímico del sodio, para ingresar tres iones de este tipo y expulsar un ion de calcio al medio extracelular. De esta manera se regula la concentración de calcio en el citosol a niveles de  $10^{-7}M$ , mientras que en el exterior la concentración de este ion puede alcanzar el orden de  $10^{-3}M$  [28].

## 3.2. Modelos matemáticos de transporte a través de membranas celulares

A continuación se definen qué es un modelo matemático como tal, los principales tipos y ejemplos desarrollados para transporte de sustancias a través de membranas biológicas. El primer tipo son los modelos empíricos, los cuales se basan en los datos experimentales y no necesitan de información del sistema para su construcción. El segundo tipo se refiere a los modelos de absorción de drogas, los cuales se pueden considerar semi-fenomenológicos, ya que parte importante de ellos no considera factores característicos de los componentes, como la naturaleza iónica o no electrolítica del soluto que se está estudiando. El tercer tipo se refiere a los modelos fenomenológicos propiamente tal, donde las ecuaciones tratan de describir los componentes y sus interacciones de acuerdo a su naturaleza física o química.

### 3.2.1. Modelos matemáticos

Para comenzar, es necesario definir un modelo matemático de la manera más general y concisa posible. Bender [29] lo define acertadamente como “ Un modelo matemático es un constructo matemático abstracto y simplificado, que se relaciona a una parte de la realidad (sistema) y con un objetivo definido”. El objetivo de un modelo matemático es resolver una pregunta acerca del sistema que intenta describir, el cual es representado mediante planteamientos matemáticos. En la mayoría de los casos, para poder aproximarse de manera correcta al sistema es necesario hacer uso de datos experimentales relevantes, pero también es necesario establecer hipótesis y supuestos basados en el conocimiento del sistema.

Es posible dividir los modelos matemáticos en dos tipos según el grado de conocimiento del sistema. Los primeros, los modelos empíricos, se construyen solamente en base a los datos experimentales, tratando el sistema como una caja negra, es decir, sin utilizar ninguna información acerca de los procesos internos que ocurren en el sistema [30]. Por otro lado los modelos fenomenológicos utilizan información *a priori* para determinar algunos o todos sus planteamientos matemáticos [30].

En la mayoría de los casos los modelos obtenidos tienen componentes de los dos tipos de modelos definidos anteriormente, ya que en muchas ocasiones se utiliza información *a priori* para desarrollar el modelo, pero existen componentes o procesos internos de los cuales no se posee información, a estos se les denomina comúnmente modelos semi-empíricos [30].

El tipo de modelo que se desea construir depende del objetivo particular que este tenga, ya que ambos poseen enfoques muy diferentes. Los modelos fenomenológicos poseen algunas importantes ventajas como que, en general realizan mejores predicciones del comportamiento de los sistemas, además dado que se basan en conocimiento establecido, la validez de sus predicciones es confiable en un rango mayor al de los datos experimentales utilizados, esto no sucede en los modelos empíricos, donde su validez se acota al o los intervalos donde se encuentran los datos experimentales utilizados, es decir, su error de generalización es

mayor. Por otro lado, los modelos fenomenológicos realizan mejores predicciones en sistemas modificados y poseen parámetros interpretables físicamente. Sin embargo, los modelos empíricos al no necesitar información *a priori*, comúnmente requieren menor cantidad de tiempo para su construcción y menor cantidad de recursos [30]. Por lo tanto, el objetivo del modelo puede ser utilizado como guía para la definición del tipo de modelo a seguir, ya que si por ejemplo, solamente se desea encontrar una relación entre los datos experimentales, un modelo empírico bastaría para esta tarea, en cambio si el objetivo es comprender los procesos internos o las causas de un fenómeno, es más adecuado un modelo fenomenológico.

A continuación se detallan los tipos de modelos matemáticos y ejemplos utilizados en estudios de transporte a través de membranas biológicas.

### 3.2.2. Modelos empíricos

El punto de partida de los modelos empíricos son las observaciones experimentales, ya que en base a ellos se desarrolla el modelo. Existen análisis estadísticos que pueden ser realizados sobre los datos experimentales con la finalidad de definir qué metodología aplicar a la hora de construir el modelo final. La mayoría de los modelos empíricos son modelos basados en regresiones, ya que esta técnica provee de una descripción matemática de la relación existente entre las variables de entrada y de salida. Gracias a esto, este tipo de modelos puede ser utilizados tanto para predicción de nuevos datos como para interpolación.

En una regresión, la variable dependiente es expresada en términos de la o las variables independientes usando diferentes tipos de ecuaciones. Por ejemplo, una regresión lineal se denomina como tal cuando la relación entre la variable dependiente  $Y$  e independiente  $X$  están relacionadas mediante la ecuación 3.1. En donde los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  se conocen como parámetros del modelo, estos son ajustados de manera de que la simulación del modelo y los datos experimentales calcen de la mejor manera posible. Comúnmente la determinación de estos parámetros se hace minimizando el residuo de la suma de los cuadrados (RQS) entre los datos experimentales  $\hat{Y}(X)$  y la predicción realizada por el modelo  $Y(X)$ , como se muestra en la ecuación 3.2.

$$Y(X) = \alpha X + \beta \quad (3.1)$$

$$\min_{\alpha, \beta} RSQ = \sum_{i=1}^{i=N} (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (3.2)$$

Una regresión lineal es el modelo más simple que se puede desarrollar mediante esta técnica, la cual puede ser extendida a múltiples variables (regresión lineal múltiple) o funciones de regresión no-lineales (regresión no-lineal). En cualquier caso es necesario conocer explícitamente la función, la elección de esta función suele realizarse en base a las tendencias observables en los datos experimentales. Sin embargo, en algunos casos donde la dinámica

de los fenómenos es compleja, no es posible establecer una función de regresión desde el razonamiento teórico [31]. En estos casos es posible utilizar otras técnicas que no requieran de una función de antemano, como por ejemplo, el uso de redes neuronales artificiales o programación genética.

Las Redes Neuronales Artificiales (ANN por su sigla en inglés), es un algoritmo que está basado en el conocimiento existente del sistema nervioso biológico. Su buen desempeño se basa en la alta conectividad de elementos computacionales simples, de la misma manera que en el sistema nervioso se presenta conectividad entre las neuronas [32]. Dado que este algoritmo es un método de optimización [33], tiene una variedad de aplicaciones, en particular para sistemas celulares.

Los algoritmos de programación genética son parte de los algoritmos evolutivos, los cuales poseen una vasta gama de aplicaciones en problemas de optimización. Este tipo de algoritmos intenta imitar los conceptos presentes en la teoría de la evolución de Darwin y poseen 2 ventajas principales respecto a otros métodos de optimización, la capacidad de enfrentar problemas complejos y la posibilidad de utilizar el algoritmo en condiciones de paralelismo [21]. Esto se debe a que este tipo de algoritmo permite lidiar con distintos tipos de optimización, definir funciones objetivo en estado estacionario, no-estacionario, continuas, discontinuas o con ruido aleatorio. Además permite analizar distintos espacios de búsqueda simultáneamente. Sin embargo, para que el algoritmo funcione adecuadamente se deben escoger adecuadamente los parámetros principales como el tamaño de la población, la cantidad de generaciones, etc.

Dada la complejidad del sistema se utilizó el algoritmo de programación genética para desarrollar el modelo empírico, por lo que en la siguiente sección se describe en detalle el algoritmo y sus principales parámetros.

### 3.2.3. Programación genética

El objetivo de la programación genética es resolver problemas de optimización donde los métodos clásicos no presentan soluciones adecuadas, para esto su algoritmo se basa en la teoría de la evolución de Darwin [21].

La teoría de la evolución de Darwin plantea que la naturaleza sigue dos principios: Si mediante selección genética, como mutación o recombinación, se crea un individuo que se adapta al entorno por sobre la media de la población, entonces dicho individuo tiene una mayor probabilidad de supervivencia. En caso contrario, el individuo tiene una menor probabilidad de supervivencia. En el caso de la programación genética, la población está compuesta por posibles soluciones, mientras que el entorno es una función objetivo, de esta manera se genera inicialmente una población, se selecciona un conjunto de individuos bajo criterios similares a los establecidos por la teoría de Darwin, y posteriormente se crea una nueva población que se ajusta en mayor medida a la función objetivo.

Este tipo de métodos tiene 3 características relevantes que lo diferencian de los métodos

tradicionales de optimización:

1. *Independencia del gradiente*: Dado que no se utiliza la información del gradiente, es posible enfrentar problemas mucho más complejos que con los métodos clásicos, como por ejemplo, problemas de naturaleza discreta.
2. *Paralelismo*: En cada generación se crea una población de individuos, los cuales podrían ser tratados como secciones independientes bajo las condiciones adecuadas, por lo que sería posible paralelizar el problema.
3. *Capacidad exploratoria y de explotación*: Para crear los nuevos individuos se utilizan los operadores de mutación y cruce. Estos operadores presentan una naturaleza estocástica que permite explorar de manera más eficiente el dominio de búsqueda y evita que la solución final se entrampe en un mínimo local. Además, gracias al operador de cruce es posible combinar soluciones sub-óptimas, con lo que se obtiene la capacidad de explotación.

### Características propias de la programación genética

La programación genética nace como una evolución de los algoritmos genéticos (AG) clásicos, su principal objetivo es resolver los problemas mediante la inducción de programas y algoritmos que puedan solucionarlos. Si bien siguen las mismas bases biológicas que los AG y su funcionamiento es similar, su diferencia principal radica en la decodificación del problema, ya que la programación genética representa a los individuos estudiados como árboles binarios, permitiendo abordar problemas que con los algoritmos genéticos no es posible [34].

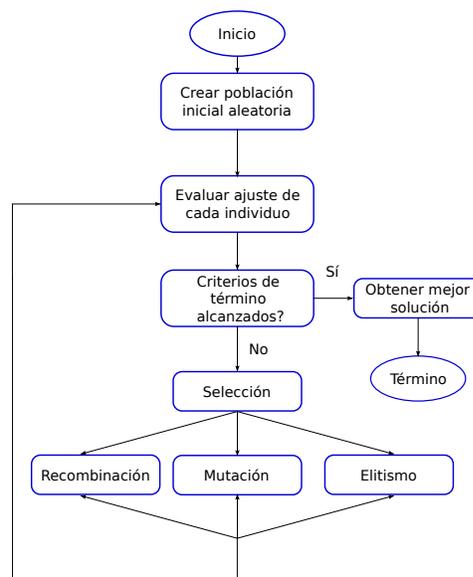


Figura 3.3: Esquema de trabajo de los algoritmos genéticos. Adaptado de [35].

En la Figura 3.3 se muestran los pasos principales de los algoritmos genéticos. En ella se observa que el algoritmo comienza creando una población inicial de posibles soluciones, luego se evalúan todos individuos de la población, si se alcanzan los criterios de término, el proceso finaliza y entrega la solución más mejor evaluada. De no ser así, se crea una nueva población que se debe evaluar y el proceso prosigue. A continuación se describen las principales características de la programación genética en comparación a los algoritmos genéticos clásicos.

### 1. Representación [36]

En programación genética se codifican los individuos como estructuras de árboles, los cuales presentan las variables o constantes en sus nodos hojas y son llamadas *terminales*, mientras que en sus nodos internos las operaciones o funciones permitidas que son llamadas *funciones*, estos nodos presentan una cantidad de nodos hijos igual al número de variables que requiere la función que representan, tal como se muestra en el ejemplo de la Figura 3.4.

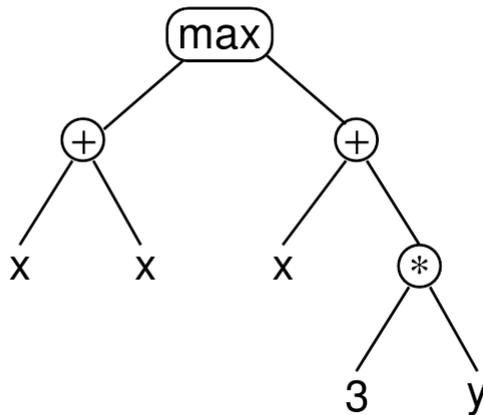


Figura 3.4: Representación de la función  $max(x + x, x + 3 * y)$  en la sintaxis de programación genética. Adaptado de [36].

### 2. Creación de la población inicial [36]

Existen diferentes métodos para crear la población inicial de individuos, todos ellos tienen en común que presentan componentes estocásticas y que cumplen las restricciones de cantidad máxima de individuos por generación y de máxima profundidad, donde la *profundidad* de un nodo se define como la cantidad de aristas que deben cruzarse para alcanzar dicho nodo desde la raíz, es necesario notar que bajo esta definición la profundidad de la raíz es cero. Se define la profundidad de un árbol como la profundidad de la hoja que esté más alejada de la raíz.

Generalmente se utilizan dos métodos para la creación de poblaciones iniciales, el método *full* y el método *grow*, ambos generan árboles aleatoriamente utilizando como datos el conjunto de funciones ( $F$ ), el conjunto de terminales ( $T$ ) y profundidad. En el caso del método *grow*, se procede eligiendo aleatoriamente una función perteneciente a  $F$  para conformar la raíz, luego se eligen aleatoriamente elementos del conjunto  $T$  o  $F$ , si el nodo elegido es una función se repite el procedimiento, si es una terminal se finaliza [37]. Mientras que para el caso del método *full*, siempre se escogen elementos

del conjunto  $F$  a menos que el nodo esté en la profundidad máxima, en cuyo caso se escoge una terminal [37], debido a esto, con este método siempre se obtiene un árbol balanceado donde todas sus hojas tienen una profundidad igual a la profundidad máxima permitida.

### 3. Selección

En GP las generaciones se crean seleccionando a los padres probabilísticamente en base a la función de bondad, y luego se aplican operadores genéticos sobre ellos para crear a los hijos. Es decir, que al igual que en la teoría de la evolución los individuos que presentan una mayor adaptación tienen más probabilidad de tener descendencia. A continuación se describen los métodos más utilizados para realizar esta tarea.

#### (a) Torneo:

En este tipo de selección se escogen aleatoriamente  $k$  individuos que participarán en el torneo, se evalúan todos los participantes y se escoge el que tenga mejor desempeño [38].

#### (b) Ruleta:

Este método es el más utilizado desde los orígenes de la programación genética. En este caso a cada uno de los individuos de la población se le asigna una parte de la ruleta, esta sección es proporcional a su desempeño y de manera tal que todas ellas sumen la unidad. Para escoger al individuo que será padre solo basta con elegir un número aleatorio en el intervalo  $[0, 1]$  y retornar el individuo que está situado en esa posición. Este método es muy sencillo, pero dado que la mayoría de las veces las posiciones en la ruleta están ordenadas en base al ajuste, se vuelve ineficiente cuando la cantidad de individuos es muy grande, ya que presenta una complejidad  $O(n^2)$  [38].

### 4. Operadores

Una vez seleccionados los padres, se generan nuevos individuos, para esto se aplican los operadores genéticos sobre los padres según la probabilidad asignada a cada operador. A continuación se detallan los operadores genéticos más comunes.

#### (a) Cruce o crossing over

Sin duda alguna, el operador de cruce es el más utilizado en la programación genética y su probabilidad suele estar entre 0.9 y 0.95. Este operador permite combinar dos individuos de la población para crear 2 nuevos individuos, para esto se escoge aleatoriamente un nodo en cada padre, estos nodos son conocidos como *puntos de crossover*. Luego, en el primer padre se reemplaza el sub-árbol que tiene como raíz el punto de crossover, por el sub-árbol que tiene como raíz el punto de crossover del segundo padre [36]. A continuación se inserta el sub-árbol escogido del primer padre en el punto de crossover del segundo padre. Esto se puede visualizar en el ejemplo de la Figura 3.5.

#### (b) Mutación

La probabilidad de utilización de este operador es mucho menor (entre 0.1 y 0.01) en comparación al operador de cruce. Es posible encontrar casos de *mutaciones de tipo sub-árbol*, donde se escoge un nodo como punto de mutación y se reemplaza el sub-árbol que presenta la raíz en dicho punto por un árbol nuevo creado aleatoriamente. Por otro lado, se puede encontrar un tipo de *mutación puntual* donde se escoge el punto de mutación y si es un nodo hoja se escoge una terminal

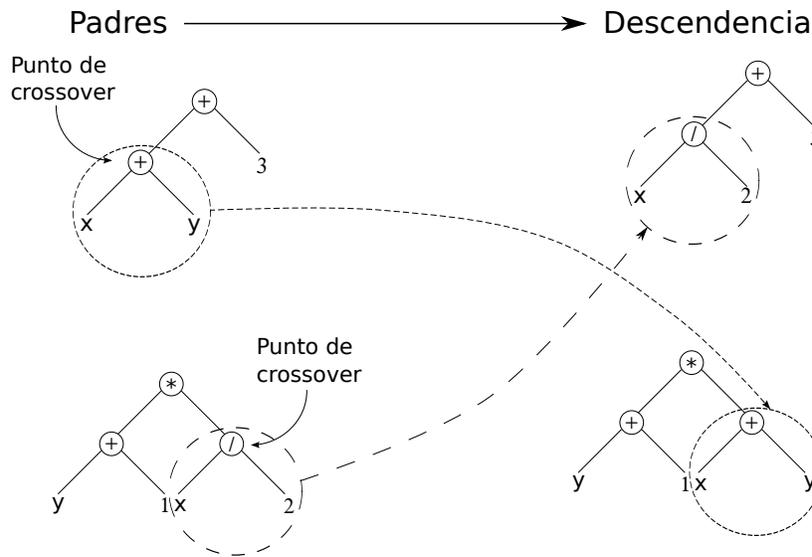


Figura 3.5: Representación de la operación de crossing over clásica. Adaptado de [36].

del conjunto  $T$  para reemplazarlo. Al realizar este tipo de operaciones se crean saltos en los espacios de búsqueda por lo que produce un aumento en la variabilidad de la población, por este motivo su probabilidad de uso es mucho menor que la del operador de cruce [36].

(c) Reproducción o copia

Existe un último tipo de operador que puede utilizarse para complementar las operaciones descritas, este es el operador de reproducción o copia, en el cual se selecciona un padre y se crea una copia que se inserta en la generación siguiente. Es necesario notar que la probabilidad de utilización de este operador debe ser muy baja, ya que si se crea un gran número de copias de un o varios individuos se perderá variabilidad en la población debido al aumento de la presión selectiva [36]. Un caso particular de este operador es conocido como *elitismo* donde se escoge el mejor individuo de la población de padres y se crea una copia que se inserta en la siguiente generación. Esto permite asegurar que a medida que se avanza en el número de generaciones la calidad de la mejor solución sea mayor o igual a la generación anterior.

En el Algoritmo 1 se muestra un pseudocódigo del algoritmo general de programación genética, en él se puede observar que se definen como variables de entrada la cantidad máxima de individuos que puede tener la población en cada generación  $P_{size}$ , las funciones permitidas para realizar la búsqueda  $Nodo_{func}$ , las terminales disponibles (constantes o variables)  $Nodo_{term}$  y las probabilidades de cruce, mutación y reproducción respectivamente  $P_{cruce}$ ,  $P_{mutacion}$  y  $P_{reproduccion}$ . Con estas variables se crea una población inicial con el método deseado, se evalúa esta población respecto a la función de adaptación y se selecciona el individuo (o solución) con mejor resultado. En este momento comienza un proceso iterativo sobre las generaciones que se crearán hasta que se cumpla con alguno de los criterios de término. En este ciclo se crea un conjunto de hijos que inicialmente está vacío, este conjunto representa la generación siguiente a la población inicial, para poder definir los individuos que

---

**Algorithm 1** Algoritmo programación genética [39].

---

```
1: procedure GP( $P_{\text{size}}, \text{Nodo}_{\text{func}}, \text{Nodo}_{\text{term}}, P_{\text{cruce}}, P_{\text{mutacion}}, P_{\text{reproduccion}}$ )
2:    $Poblacion \leftarrow \text{IniciarPoblacion}(P_{\text{size}}, \text{Nodo}_{\text{func}}, \text{Nodo}_{\text{term}})$ 
3:    $\text{EvaluarPoblacion}(Poblacion)$ 
4:    $S_{\text{best}} \leftarrow \text{MejorSolution}(Poblacion)$ 
5:   while  $\neg \text{Condicionfin}$  do
6:      $\text{Hijos} \leftarrow \emptyset$ 
7:     while  $\text{Size}(\text{Hijos}) \leq P_{\text{size}}$  do
8:        $\text{Operador} \leftarrow \text{SelectOperador}(P_{\text{cruce}}, P_{\text{mutacion}}, P_{\text{reproduccion}})$ 
9:       if  $\text{Operador} = \text{OperadorCruce}$  then
10:         $\text{Padre}_1, \text{Padre}_2 \leftarrow \text{SelectPadres}(Poblacion, P_{\text{size}})$ 
11:         $\text{Hijo}_1, \text{Hijo}_2 \leftarrow \text{Cruce}(\text{Padre}_1, \text{Padre}_2)$ 
12:         $\text{Hijos} \leftarrow \text{Hijo}_1$ 
13:         $\text{Hijos} \leftarrow \text{Hijo}_2$ 
14:       else if  $\text{Operador} = \text{OperadorMutacion}$  then
15:         $\text{Padre}_1, \text{Padre}_2 \leftarrow \text{SelectPadres}(Poblacion, P_{\text{size}})$ 
16:         $\text{Hijo}_1 \leftarrow \text{Mutacion}(\text{Padre}_1)$ 
17:         $\text{Hijos} \leftarrow \text{Hijo}_1$ 
18:       else if  $\text{Operador} = \text{OperadorReproduccion}$  then
19:         $\text{Padre}_1, \text{Padre}_2 \leftarrow \text{SelectPadres}(Poblacion, P_{\text{size}})$ 
20:         $\text{Hijo}_1 \leftarrow \text{Reproduccion}(\text{Padre}_1)$ 
21:         $\text{Hijos} \leftarrow \text{Hijo}_1$ 
22:       end if
23:     end while
24:      $\text{EvaluarPoblacion}(\text{Hijos})$ 
25:      $S_{\text{best}} \leftarrow \text{MejorSolution}(\text{Hijos})$ 
26:      $Poblacion \leftarrow \text{Hijos}$ 
27:   end while return  $S_{\text{best}}$ 
28: end procedure
```

---

participan en esta generación se realiza un nuevo proceso iterativo hasta alcanzar el número máximo de individuos en la población  $P_{size}$ . Para definir cada hijo es necesario determinar a los padres y el operador que se utilizará para crear a los hijos, este último factor se determina estocásticamente dependiendo de las probabilidades de cada uno de los operadores, y por tanto es el que le da las características exploratorias a esta técnica. Una vez alcanzado el número necesario de hijos, se evalúa la población y se escoge el mejor individuo, luego si se cumple el criterio de término el programa termina y retorna la mejor solución obtenida, de no ser así entra nuevamente al ciclo principal para crear una nueva generación.

Es necesario notar que en el algoritmo presentado no se incluye el criterio de término de número máximo de generaciones aunque este criterio también es comúnmente utilizado en esta técnica.

## Componentes principales

### 1. Conjunto de terminales [36]

Como se dijo las terminales son representadas por los nodos hojas de los árboles utilizados. Por lo que es posible dividir los tipos de terminales en 3:

- Variables: Entradas externas a los programas.
- Constantes: Pueden ser fijadas de antemano, creadas aleatoriamente dentro del proceso de generación de los árboles o creadas mediante mutación.
- Funciones sin argumentos: También llamadas funciones de aridad cero, son consideradas terminales ya que no es posible asignarles nodos hijos. Por ejemplo la función *rand()* donde se crea un número aleatorio.

### 2. Conjunto de funciones

El conjunto de funciones está guiado por la naturaleza del problema, ya que por ejemplo para un problema de tipo numérico se podrán especificar las funciones aritméticas básicas (+, -, \*, /), mientras que para un problema del área lógica se podría describir las funciones booleanas *AND*, *OR*, *XOR*, *NOT*. En cualquier caso, existen dos propiedades que los conjuntos de funciones deben satisfacer:

- Clausura: Para cumplir esta propiedad todas las funciones deben recibir como argumentos y retornar variables del mismo tipo, por ejemplo las operaciones +, -, \*, / pueden ser definidas para los números reales positivos, pero para el caso de las funciones +, -, *AND*, *OR* no se cumple. Además deben ser seguras ante todas sus posibles evaluaciones, ya que mientras se entrena el programa podrían retornar valores que hicieran fallar el algoritmo, por ejemplo, realizar una división por cero. Para evitar este tipo de problemas se definen las *funciones protegidas*, las cuales contienen la función original y una condición de retorno para los puntos que podrían producir problemas, en el ejemplo anterior la función protegida de la división podría retornar 1 cada vez que reciba como segundo argumento el valor 0.
- Suficiencia: El conjunto de funciones es suficiente si, el conjunto de todas las posibles composiciones recursivas del conjunto original contiene al menos una solución del problema de estudio. Esta propiedad es muy difícil de comprobar en comparación a la propiedad de clausura y lamentablemente sólo es posible garantizarla cuando la teoría, la experiencia u otro método indica que sí lo es.

### 3. Función de adaptación (fitness) [38]

El objetivo de la función de adaptación es evaluar de forma numérica qué tan buena es una solución propuesta para el problema planteado, por lo tanto, cada tipo de problema tiene una función de adaptación (o evaluación) diferentes. En el caso de las regresiones, la función de adaptación suele ser el fitness puro, el cual indica la diferencia entre el valor deseado para el componente  $i$  del individuo  $d(i)$  y su valor obtenido  $c(i)$ , tal como se muestra en la ecuación 3.3.

$$r(i) = \sum_{i=1}^{i=N} |d(i) - c(i)| \quad (3.3)$$

### 4. Criterios de término [38]

A continuación se describen los criterios de término más comunes en programación genética.

- Los individuos de la población presentan una solución lo suficientemente buena. Por ejemplo, cuando un individuo tiene una diferencia menor al 5 % respecto al valor deseado.
- La población ha convergido. Se dice que una población ha convergido cuando un 95 % de la población representa la misma solución.
- El número máximo de generaciones se ha alcanzado. Para problemas muy complejos donde no se puede encontrar una solución exacta puede utilizarse este criterio.

### 5. Parámetros

La programación genética puede ser considerada un método robusto, por lo que puede entregar buenos resultados utilizando diferentes conjuntos de parámetros, esto conlleva a tener en mente ciertas consideraciones generales para la elección de los parámetros, pero no es necesario dedicar demasiado tiempo a la búsqueda de los parámetros óptimos [36]. Los principales parámetros que se pueden variar en la ejecución de programación genética y algunas recomendaciones para su elección se indican a continuación:

- Tamaño de la población [37]: Es el parámetro más importante del conjunto. Como regla general es bueno preferir poblaciones grandes, de esta manera se puede probar un mayor número de soluciones por generación, se suelen utilizar poblaciones de entre 100 a 500 individuos por generación y puede aumentarse según la complejidad del problema.
- Número de generaciones [36]: Generalmente se limita el número de generaciones entre 10 y 50. Esto se debe a que en las primeras generaciones se obtienen mejoras sustanciales, pero esta característica se pierde rápidamente a medida que transcurren las generaciones, por lo que no es conveniente extender la ejecución del algoritmo aumentando la cantidad de iteraciones. Sin embargo, es sabido que si la cantidad de individuos por generación es pequeña es recomendable utilizar un número mayor de generaciones.
- Profundidad o altura del árbol [38]: Este parámetro debe ajustarse de forma proporcional al problema y a la cantidad de funciones y terminales que se esté utilizando. Al igual que en el caso anterior, la elección de este parámetro tiene relación directa con el tamaño de la población ya que si existe una gran cantidad

de individuos en la población y la profundidad del árbol es baja, muchos de las soluciones serán similares o iguales lo que induce una pérdida de diversidad en la población y sus respectivas consecuencias. Como estimación general se han utilizado valores para alturas límite entre 8 y 50 [40].

- Probabilidad de operadores: Como se dijo anteriormente el operador de cruce es el más utilizado alcanzando valores entre 0.9 a 0.95, le sigue el operador de mutación con 0.1 a 0.05 y finalmente el operador de reproducción con una probabilidad menor a 0.01.

## Validación

Una vez que se ha creado un modelo que es capaz de representar los datos experimentales, es necesario evaluar su calidad. Para esto, se pueden utilizar los métodos de remuestreo, los cuales son originalmente métodos para la estimación de parámetros que no suponen una distribución teórica a priori [41]. A partir de las muestras obtenidas por remuestreo se construye una distribución empírica de los parámetros que se desea estimar, lo que permite una evaluación de la estabilidad de los valores encontrados.

Los 3 métodos de remuestreo mas utilizados son: Bootstrap, validación cruzada y Jackknife [42]. El método de Bootstrap consiste en aproximar la función de distribución desconocida,  $F$ , de los datos observados mediante muestreo aleatorio con reemplazo obteniendo  $\hat{F}$ . El procedimiento determina un conjunto de  $k$  muestras del mismo tamaño sobre las cuales se obtiene el valor estadístico a inferir. Si el proceso es repetido se puede obtener una distribución simulada del valor estadístico [43].

En el caso de validación cruzada, el método original es como sigue: Se divide aleatoriamente el conjunto de datos en dos mitades, la primera mitad es utilizada para ajustar los parámetros o entrenar el modelo. Luego se usa este modelo con los nuevos parámetros para predecir los datos de la segunda mitad [42]. En general, la predicción de la segunda mitad de los datos no es tan buena como cuando se usan todos los datos observados, por lo que se dice que en ese caso la capacidad de predicción observada era optimista. No es necesario dividir el conjunto de datos en sólo dos grupos, en su lugar se puede dividir en  $k$  grupos, usar  $k-1$  grupos para entrenar el modelo y el grupo restante utilizarlo para medir el error de predicción. Luego se puede repetir este proceso  $k$  veces cambiando el grupo de validación y finalmente medir el error de predicción total como el promedio de los errores obtenidos en los  $k$  subconjuntos. A esto se le conoce como  $k$ -fold cross-validation [44].

El método de Jackknife consiste en repetir el ajuste de parámetros una cantidad de veces igual al número de muestras  $N$ , donde en cada iteración se retira uno de los datos experimentales del conjunto de entrenamiento y utilizando los nuevos parámetros encontrados se predice el valor del elemento que fue retirado, de la misma manera en que realizaría una validación cruzada con  $N$  subconjuntos. De esta manera en cada iteración se calcula el error de predicción del modelo y la variación entre los parámetros originales y los obtenidos con cada subconjunto de datos. Esto permite que al final del proceso se tenga una estimación del error de generalización calculando el valor Jack Knife Mean Square Error ( $MSE_{jk}$ ), definido en la ecuación 3.4 como la suma de la diferencia entre el valor experimental  $Y_i$  que es retirado en la iteración  $i$  y el valor predicho para esta muestra [45]. Es necesario notar que no es

posible analizar este valor en sí mismo, si no que es un término utilizado para comparar la capacidad de generalización de diferentes los modelos.

$$MSE_{jk} = \sum_{i=1}^N abs(\hat{Y}_i^{-i} - Y_i) \quad (3.4)$$

Con este método también es posible calcular los pseudo-valores usando la ecuación 3.5, donde  $a$  corresponde al valor original del parámetro,  $N$  es la cantidad de datos observados y  $a_i$  es el parámetro obtenido en el ajuste al retirar el valor  $Y_i$ . Estos valores corresponden a un estimador no sesgado de los parámetros obtenidos en la etapa de ajuste. Por lo que es posible utilizar los pseudo-parámetros en para determinar los parámetros de interés, además, su desviación estándar es comúnmente utilizada para estimar los intervalos de confianza de los parámetros analizados [45].

$$a^* = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Na - (N - 1)a_i) \quad (3.5)$$

Los intervalos de confianza se calculan mediante la ecuación 3.6, donde  $t_{\alpha,\nu}$  es el valor t de Student para un valor crítico  $\alpha = 0.05$  y  $\nu$  grados de libertad y  $\hat{\sigma}_{a^*}$  es el error estándar del pseudo-valor [45].

$$CI(a^*) = a^* \pm t_{\alpha,\nu} \hat{\sigma}_{a^*} \quad (3.6)$$

Este último método, también conocido como leave-one-out, aproxima de mejor manera los valores estadísticos deseados en comparación con el método de validación cruzada, ya que no sacrifica una gran parte de los datos de entrenamiento, sin embargo este método es más costoso computacionalmente debido a la cantidad de veces que es necesario ajustar o entrenar el modelo [43]. Es por esto que es utilizado en ocasiones en que no se poseen una gran cantidad de datos observados.

### 3.2.4. Modelos semi-empíricos

Los modelos semi-empíricos intentan representar el transporte a través de la membrana plasmática, utilizando solo características de la sustancia que se estudia [46]. Los modelos más utilizados en casos se pueden dividir en:

1. *Modelos de barrera única* (Single barriers models)

Se basa en el supuesto de que una barrera única separa el compartimento del donante del receptor [46]. Derivan de la primera ley de difusión de Fick, por lo que se asume un gradiente de concentración lineal a lo largo de la barrera (Eq.3.7). Estos modelos

poseen un parámetro característico, la permeabilidad efectiva  $P_{eff}$  que da cuenta de la permeabilidad total producto de todas las barreras existentes en el interior.

$$\frac{dQ}{dt} = P_{eff}(C_d - C_r) \quad (3.7)$$

En la ecuación además se definen las concentraciones del soluto en el medio donante  $C_d$  y el receptor  $C_r$ .

### 2. Modelos compartimentalizados

Este tipo de modelo describe la transferencia del compuesto en distintos compartimentos [46]. La complejidad del modelo puede ir desde ecuaciones diferenciales unidimensionales con 3 compartimentos, hasta ecuaciones que incorporen la disposición espacial de los compuestos, degradación y movimiento de metabolitos [47]. La aplicación de este tipo de modelos radica en fenómenos donde los compuestos de interés interactúan con compartimentos de la célula, como organelos, o que posean diferentes mecanismos de traspaso de las membranas apical y basolateral, ya sea mediado por proteínas o por difusión, por estas razones se considera este tipo de modelos como semi-mecanicista. Un ejemplo de esto es el modelo realizado para los transportadores *GLUT1* y *GLUT4* donde se realiza un análisis del tránsito de glucosa a través de las células epiteliales intestinales hacia el plasma sanguíneo [48].

### 3. Modelos biológicos ejecutables

Este tipo de modelo, al igual que los modelos compartimentales, buscan predecir la distribución espacial del compuesto de interés, sin embargo este tipo de modelo se caracteriza por representarse mediante una discretización del espacio, por lo que no se basan en ecuaciones diferenciales, si no más bien en eventos discretos que pueden representarse por ecuaciones algebraicas [46]. Además, estos modelos se basan en una mirada mecanicista en comparación con los modelos compartimentales [49]. Por ejemplo, ha sido utilizado para comprender el metabolismo del saquinavir en células Caco-2 [50].

## 3.2.5. Modelos fenomenológicos

Como se dijo en la sección 3.2.1, en los modelos fenomenológicos los planteamientos matemáticos para describir cierto fenómeno se construyen en base al conocimiento existente acerca del mismo. Es por esto que cada modelo fenomenológico será diferente según la naturaleza del proceso que se desea abordar. Es posible dividir el tipo de transporte en: difusión a través de la membrana, en el caso de moléculas hidrófobas; transporte a través de poros o canales, en el caso de la mayoría de los electrolitos; y el paso a través de proteínas transportadoras, en el caso de moléculas de mayor tamaño, o algunas partículas cargadas [22]. En esta sección se describen los modelos fenomenológicos más utilizados para transporte de elementos a través de proteínas de membrana.

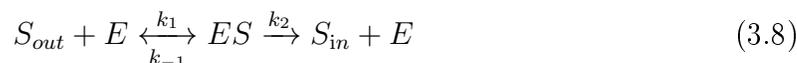
### Transporte mediado por proteínas

Cuando se presenta el transporte mediado por proteínas, existen 2 enfoques comunes a la hora de realizar un modelo fenomenológico, ambos se basan en las características

cinéticas de las proteínas. El primero se basa en la aproximación de Michaelis-Menten, el cual puede ser utilizado para la gran mayoría de reacciones enzimáticas y en particular para proteínas transportadoras. La segunda aproximación se basa en los modelos de estados de proteínas, donde se define una cantidad de conformaciones (estados) que debe seguir la proteína para transportar el sustrato, mientras que la transición entre dichos estados se consideran reacciones de primer orden.

1. *Aproximación de Michaelis-Menten:*

El transporte mediado por proteínas de membrana es en la mayoría de los casos un proceso saturable, aunque la concentración necesaria para alcanzar la velocidad máxima pueda variar hasta en 6 órdenes de magnitud [51]. Más importante aún, dichas concentraciones suelen ser cercanas a las concentraciones fisiológicas. Dada esta información, se ha visto que la velocidad de transporte de una cantidad importante de proteínas transportadoras presenta un comportamiento hiperbólico respecto al aumento de la concentración, tal como se muestra en la Figura 3.6. Esta forma que presenta la curva indica que el sustrato se une transientemente a una molécula mediadora (la proteína) cuya cantidad es limitada. Este fenómeno puede representarse mediante la siguiente reacción [52]:



Donde  $S_{out}$  representa la cantidad de sustrato en el medio extra celular,  $E$  la cantidad de enzima disponible la reacción,  $SE$  el complejo de unión entre el sustrato y la enzima y  $S_{in}$  la cantidad de sustrato que fue transportada hacia el interior. Cabe mencionar que el siguiente análisis se considera que la concentración inicial de sustrato en el medio intracelular es insignificante y por tanto la velocidad reversa de la segunda reacción es despreciable [52].

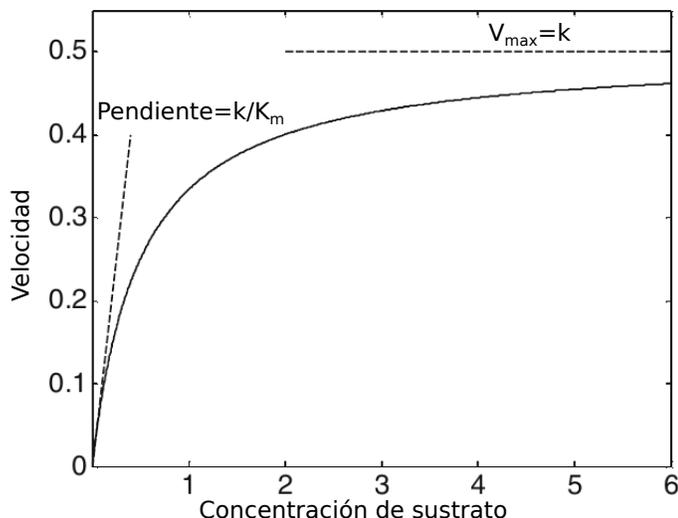


Figura 3.6: Curva de Michaelis-Menten: Velocidad inicial de transporte respecto a la concentración de soluto. Adaptado de [22].

Realizando un balance de masa para cada una de las especies, se obtiene una ecuación diferencial para cada componente. En el caso del complejo de unión sustrato enzima, se

puede suponer que la cantidad es prácticamente constante en el tiempo, es decir, existe un "pseudo-estado estacionario" [53]. Con esto se obtiene que:

$$\frac{dES}{dt} = 0 = k_1[e][s] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (3.9)$$

Además, si se considera que la cantidad de enzima es constante en el tiempo se tiene:

$$e_0 = ES + E \quad (3.10)$$

Despejando el término  $ES$  de la ecuación 3.9 y reemplazando el término  $E$  se obtiene lo siguiente

$$[ES] = \frac{e_0 S}{S + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (3.11)$$

Se define la constante de Michaelis como  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$  y asumiendo que la velocidad de la primera reacción es mucho mayor que la segunda se tiene que la velocidad de aparición de sustrato en el medio intracelular es

$$\frac{dS_{in}}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2 e_0 S}{S + K_m} \quad (3.12)$$

Se denomina el término de la velocidad máxima como  $V_{max} = k_2 e_0$  [54], con esto la ecuación de velocidad de transporte está definida por la ecuación 3.13

$$\frac{dS_{in}}{dt} = \frac{V_{max} S}{S + K_m} \quad (3.13)$$

Cuando existe una concentración suficientemente grande de sustrato en el lado donante, todos los transportadores estarán ocupados, por lo tanto se alcanzará la velocidad máxima  $V_{max}$  [54]. Además, gracias a esta ecuación se puede ver que el parámetro  $K_m$  tiene un sentido físico, ya que cuando la cantidad de sustrato en el medio extra celular es igual a este parámetro, la velocidad de transporte corresponde a la mitad de la velocidad máxima [54]. Una de las grandes ventajas que posee este modelo es que posee parámetros identificables físicamente y simples de obtener en la práctica [55]. Si bien se presentó la ecuación clásica de Michaelis- Menten, existen modelos que permiten relajar ciertas restricciones planteadas anteriormente e incluir otros componentes relevantes para el fenómeno, como por ejemplo, en el caso general, cuando la proteína es capaz de transportar dos o más átomos o moléculas de soluto a la vez, se utiliza la ecuación de Hill [56], donde  $n$  indica la cantidad de sitios de unión del sustrato con la enzima afectan a la afinidad de la unión del sustrato en el resto de las zonas de unión.

$$\frac{dS_{in}}{dt} = \frac{V_{max} S^n}{S^n + K_{0.5}^n} \quad (3.14)$$

El parámetro  $n$  puede tomar valores mayores que 1 si existe cooperatividad positiva o menores que 1 si la cooperatividad es negativa.

## 2. Modelos de diagrama de estados

En el área de la bioquímica, se han mostrado numerosos ejemplos de macromoléculas que se pueden encontrar en un número finito de estados discretos, y que mientras

desarrollan su función en estado estacionario varían entre dichos estados hasta formar un ciclo [57]. Algunos ejemplos de esto son la actividad de la trombina [58] y algunas exonucleasas [59]. Las transiciones entre los estados pueden involucrar interacciones con ligandos, sustratos, productos o cambios conformacionales en la macromolécula debido a un cambio en su energía libre. Este tipo de análisis crea una base para el entendimiento de las transformaciones bioenergéticas sufridas por la proteína.

Para desarrollar un modelo de estados para una proteína se considera esta estructura como la entidad fundamental, la cual puede encontrarse en  $N$  estados diferentes, mientras otros componentes como sustratos o ligandos pueden encontrarse en algunos de esos estados. Cada una de las transiciones entre los estados se considera una reacción de primer orden y sus constantes de velocidades entre los estados  $i \rightarrow j$  se denota  $\alpha_{i,j}$ . En el diagrama propiamente tal, cada estado de la entidad se representa por un punto o un vértice, mientras que las transiciones se representan con flechas en el sentido en que puede ocurrir la transformación, tal como una reacción química. Un ejemplo de esto se puede ver en la figura 3.7.



Figura 3.7: Ejemplo de diagrama de estados para una enzima E que se una a un sustrato S y sintetiza un producto P. Adaptado de [60].

Si denotamos la entidad principal como  $N_i(t)$  en su estado  $i$  en el tiempo  $t$ , podemos describir su balance de masa siguiendo la Figura 3.7 como

$$\frac{dN_1}{dt} = \alpha_{2,1}N_2 - \alpha_{1,2}N_1 + \alpha_{3,1}N_3 - \alpha_{1,3}N_1 \quad (3.15)$$

De manera análoga se podrían describir las ecuaciones para  $N_2$  y  $N_3$ . Además por conservación de masa se tiene que

$$N_1 + N_2 + N_3 = N_T \quad (3.16)$$

Donde  $N_T$  es la cantidad de proteína total.

Para poder determinar los posibles estados y transiciones, es necesario realizar ensayos experimentales que permitan recopilar la información adecuada para cada proteína en particular, como por ejemplo, la modelación realizada para la proteína transportadora DMT1, en la cual se realizaron una serie de análisis de flujos de sus sustratos para determinar los estados y transiciones que caracterizan su actividad [61]. Sin embargo, en

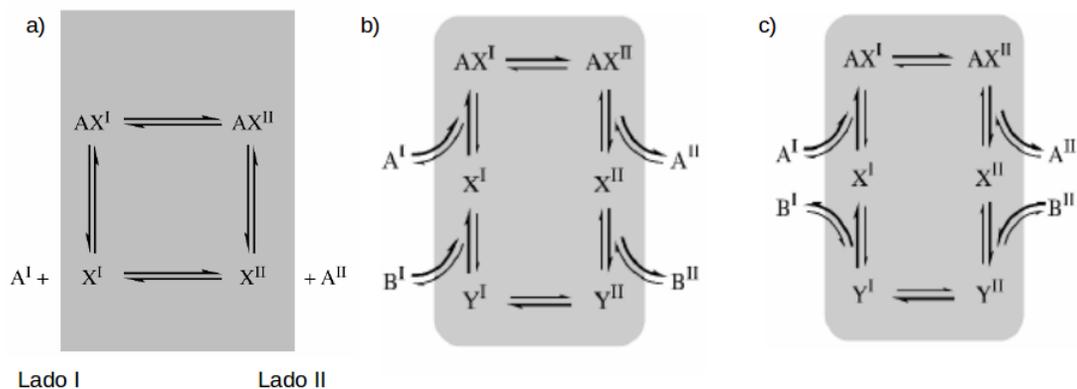


Figura 3.8: Diagramas de estados de proteínas transportadoras de membrana: a) Uniportadores; b) Simportadores; c) Antiportadores. Adaptado de [22].

el caso de transportadores de membrana, se han descrito modelos genéricos de estados para los diferentes tipos de transporte, los cuales se pueden ver en la Figura 3.8.

En algunos casos las velocidades de cada una de las transiciones se pueden determinar mediante técnicas experimentales, pero para la mayoría de los casos se realiza un ajuste de parámetros para determinarlas, basándose en ensayos de la actividad de la proteína [62].

### 3.2.6. Modelos biológicos oscilatorios

Las reacciones oscilatorias son comúnmente observadas en biología, pueden producirse a nivel de regulación transcripcional o traduccional, o bien en fenómenos a mayor escala como los ciclos cicardianos. A escala molecular, este tipo de comportamiento suele producirse por la retroalimentación de las reacciones que componen el sistema, este fenómeno es conocido como feedback [63].

Existen dos tipos de feedback. En el feedback positivo los productos interactúan con los reactantes de manera de formar más producto, esto produce un aumento en la velocidad de la reacción, por lo que se amplifica la causa de la reacción. Por el contrario, en el feedback negativo los productos disminuyen la velocidad de la reacción, por lo que el de disminuyen el efecto de las posibles perturbaciones de los reactantes [64].

Un simple ciclo que contenga un feedback negativo, tiene el potencial para producir oscilaciones sostenidas en el tiempo [63]. Sin embargo, comúnmente los sistemas oscilatorios poseen al menos 3 componentes que interactúan entre sí, además estas interacciones están regidas por reacciones reguladas mediante feedback positivo o negativo [65]. La descripción de

este tipo de modelos suele ser bastante compleja ya que puede poseer una cantidad importante de componentes, por lo tanto la cantidad de interacciones posibles es aún mayor.

A continuación se muestran dos modelos biológicos simples utilizados comúnmente para representar comportamientos oscilatorios en sistemas biológicos.

### Lotka-Volterra

El modelo de Lotka-Volterra fue planteado paralelamente por Lotka y Volterra. El primero estudió el problema de presa-depredador que producía oscilaciones en la dinámica de estas poblaciones [66]. Mientras que el segundo planteó una explicación a las fluctuaciones que habían sido observadas en las poblaciones de peces y tiburones [66]. El modelo se basó en el supuesto de que estas fluctuaciones se producían debido a una interacción presa-depredador entre peces y tiburones. Debido a la similitud de ambos casos, el modelo se conoce con el nombre de ambos científicos

En el modelo, se considera que se cuenta con una cantidad inicial de peces  $x(t)$  y tiburones  $y(t)$ . Es posible suponer que si no existieran peces, los tiburones tendrían una tasa de mortalidad constante  $\mu$ . Mientras que si la cantidad de alimento de los peces es ilimitada, entonces el crecimiento de estos es constante  $\alpha$ . Pero si la cantidad de peces aumenta, será más fácil la captura por parte de los depredadores, luego la cantidad de depredadores aumentará y la cantidad de presas disminuirá. Debido a esto, tiburones no poseen suficiente alimento y su población comienza a decrecer. Dado que hay menos tiburones, la cantidad de peces aumenta y el ciclo vuelve a repetirse. Este sistema fue representado por Lotka y Volterra por las ecuaciones diferenciales 3.17 y 3.18 [67].

$$\frac{dx}{dt} = \alpha x - \beta yx \tag{3.17}$$

$$\frac{dy}{dt} = \gamma yx - \mu y \tag{3.18}$$

Sin embargo, no es posible utilizar directamente estas ecuaciones para representar reacciones químicas, ya que no existe conservación total de la biomasa en el tiempo, debido al supuesto de cantidad ilimitada de alimento. En lugar de las ecuaciones anteriores es posible utilizar las reacciones 3.19-3.21 [68]. En este caso se puede interpretar el sistema de dos maneras. Primero haciendo una analogía con el modelo original, donde A representaría una fuente alimentación para las presas, X serían las presas, Y los depredadores y B la biomasa de los depredadores una vez que desaparecen. Y segundo, se puede ver como una reacción de A a B mediante los intermediarios X e Y, los cuales están gobernados mediante feedback positivo.





### Ball

El modelo propuesto por Ball en 1996, nació con la finalidad de estudiar el potencial del feedback positivo para generar oscilaciones. Además, planteó un modelo genérico que es capaz de representar fluctuaciones sostenidas en el tiempo. Este modelo consta de una cantidad mínima de componentes, que interactúan mediante reacciones auto-catalíticas [64].

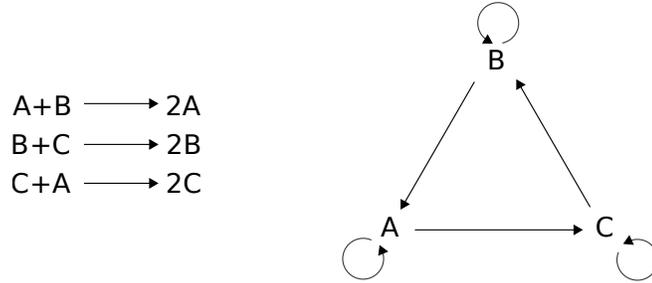
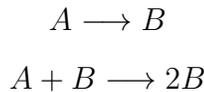
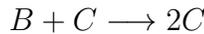


Figura 3.9: Diagrama de estados de modelo oscilatorio [64].

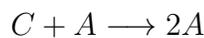
Para representar esta situación se postuló que, las reacciones auto-catalíticas (gobernadas por feedback positivo) son capaces de amplificar pequeñas perturbaciones. Sin embargo para producir oscilaciones sostenidas, es necesario tener un mecanismo competitivo que actúe en contra del ciclo auto-catalítico inicial y un mecanismo que retorne los componentes del sistema al punto de inicio. Es decir, se consideran inicialmente la reacciones:



Sin embargo, estas reacciones por sí mismas no generan oscilaciones en ninguno de sus componentes. Ahora bien, se agrega una nueva reacción auto-catalítica que compita por la utilización del compuesto B:



Entonces, si inicialmente se cuenta con A y C, las primeras dos reacciones producirán el aumento de B rápidamente, sin embargo la última reacción permitirá el aumento de C y el decrecimiento de B. Por lo que se tendrá una oscilación, pero está no se repetirá ya que A se agotará en el paso inicial. Para producir una nueva oscilación es necesario aumentar la cantidad de A y disminuir la cantidad de C, para esto se agrega una nueva reacción que simbolice el paso de C hacia A:



De esta manera se suple la pérdida de A en la etapa, se vuelve al punto inicial y las oscilaciones se repiten continuamente. Es necesario notar que si inicialmente se tienen los 3 componentes es posible omitir la primera reacción, con lo que el sistema queda como se muestra en la Figura 3.9.

## 3.3. Definición del sistema

### 3.3.1. El hierro

El hierro es un micronutriente estrictamente necesario para el desarrollo de la mayoría de los organismos vivos. En mamíferos, el hierro puede encontrarse unido a proteínas como centro catalítico de enzimas clave para el organismo, como la hemoglobina, mioglobina, proteínas de regulación transcripcional, estabilización estructural y varios componentes de la cadena transportadora de electrones [1, 2]. Esto tiene como consecuencia, un rol de vital importancia de este metal en procesos de distribución de oxígeno a los tejidos, regulación del crecimiento y diferenciación celular, control de expresión de genes y respiración celular [69].

La carencia de hierro en el organismo es el problema nutricional más prevalente de los seres humanos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca de 2 billones de personas tienen anemia en el mundo, siendo sus principales causas, deficiencia de hierro alimentaria, enfermedades infecciosas y características genéticas. Además, esta enfermedad trae problemas colaterales como deficiencia en el desarrollo físico y cognitivo en el caso de los infantes, mientras que en adultos se presenta una disminución en la capacidad de realizar trabajos físicos y una reducción en la producción habitual [70].

Debido a la capacidad oxidante del hierro, altas concentraciones fisiológicas de este metal catalizan la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) de acuerdo a las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, desencadenando daño en lípidos, DNA y proteínas [3, 4]. Es por esto que al igual que la carencia de hierro, una sobrecarga de este metal en el sistema se asocia a enfermedades como hemocromatosis hereditaria, talasemia, anemia falciforme [20].

En adultos normales, las pérdidas de hierro varían entre los 0.5 y 2 mg por día [5], esto se debe a la exfoliación natural de las células epiteliales del tracto urinario, intestinal, la piel, el cabello, entre otros. Por lo que la cantidad diaria que debe ingerirse debe ser similar a esta cantidad, de manera de mantener la homeostasis de hierro. Por otro lado, en un adulto promedio se pueden encontrar entre 3 y 4 gr de este metal [71], lo que muestra que los flujos de entrada y de salida de hierro son muy bajos en comparación a la cantidad total presente en el organismo.

El hierro presente en la dieta se puede encontrar en 3 formas nutricionales, el hierro hemo proveniente de fuentes animales, usualmente se encuentra unido a proteínas que contienen el grupo hemo, como por ejemplo, hemoglobina y mioglobina; el hierro no-hemo proveniente de fuentes vegetales como leguminosas, granos, frutas y verduras, el cual se puede encontrar en forma de sales o quelatos y hierro no-hemo unido a ferritina (FTN) presente principalmente en las legumbres [72].

Las enzimas proteolíticas del estómago y el bajo pH del medio, estimulan la liberación del grupo hemo desde las hemo-proteínas. Este grupo presenta muy baja solubilidad, pero puede formar complejos solubles al unirse con otros componentes que se encuentran comúnmente en la dieta. Se estima que este tipo de hierro alcanza un porcentaje de 5-10 % del hierro total

de la dieta, pero su biodisponibilidad es mayor a la del hierro no-hemo, alcanzando entre un 20 y un 30 % [73]. El proceso de absorción de este tipo de hierro no es completamente entendido, aunque hay evidencia de que el grupo hemo es ingresado mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor, no se ha identificado un receptor que posea alta afinidad por este complejo en los enterocitos. Además, es sabido que una vez que el grupo hemo es endocitado, una hemo oxigenasa libera hierro en forma de ion férrico al medio intracelular [9].

La forma no-hemo alcanza entre un 90 a 95 % del hierro disponible en la dieta diaria, pero su baja biodisponibilidad permite que solamente entre un 1 y 10 % de esta cantidad es absorbido por el organismo [16]. Aún así, es la forma de hierro que más internalizada por el organismo. Es posible encontrar hierro no-hemo como ion férrico  $\text{Fe}^{3+}$  o ion ferroso  $\text{Fe}^{2+}$ , el primero se encuentra en mayor cantidad, pero presenta menor biodisponibilidad debido a que los iones de hierro ingresan a los enterocitos mediante la proteína DMT1, la cual utiliza como sustrato un ion ferroso y un protón. Por otro lado, el bajo pH del medio estabiliza este metal a su ion reducido  $\text{Fe}^{2+}$  [8]. Debido a la alta reactividad de este metal en su forma soluble, posee una alta capacidad de interactuar con otros componentes presentes en el medio, lo cual afecta en gran medida la cantidad de hierro que ingresa a los enterocitos. Se ha observado que fitatos y taninos presentes en los vegetales disminuyen la absorción de este metal, mientras que el ascorbato y otros compuestos presentes en la carne estimulan su absorción [5]. A continuación se describe el proceso de absorción del hierro en su forma no-hemo, sus principales componentes y fenómenos más relevantes.

### 3.3.2. Absorción intestinal de hierro

La absorción de hierro ocurre en la primera sección del intestino delgado, el duodeno y en una menor medida en la parte superior del yeyuno. Este proceso se realiza a través del epitelio intestinal o enterocitos, las cuales son células altamente polarizadas, su cara apical contacta las células con el lumen intestinal y poseen micro-vellosidades que aumentan la superficie de absorción, mientras, la cara basolateral entra en contacto con el torrente sanguíneo [8]. Los enterocitos provienen de la división de células madres ubicadas en las criptas del intestino y migran hasta las vellosidades, alcanzando un ciclo de vida de 3 a 4 días [69]. Aparentemente características físicas como la acidez del lumen intestinal, serían esenciales tanto para la etapa de absorción como de transporte al torrente sanguíneo. Además, ambas etapas son inversamente proporcionales a la acumulación de hierro en el cuerpo [74].

El hierro no-hemo atraviesa la cara apical de los enterocitos mediante de la proteína co-transportadora DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), la cual requiere un protón y un ion ferroso para realizar dicha labor [61]. Si bien el pH del intestino y estómago ayudan en la estabilización del ion ferroso, se ha encontrado presencia la presencia del Citocromo Duodenal B, cuya actividad ferrireductasa permite la reducción del ion férrico a ferroso en la cara apical de los enterocitos [10]. Aunque existen otras reductasas que podrían participar en esta labor, como por ejemplo, Steap2 [75].

Los iones de hierro presentes en el citoplasma puede encontrarse unido con alta afinidad a proteínas específicas, o bien, con baja afinidad a componentes celulares de bajo peso

molecular como fosfatos y nucleótidos además de a grupos hidroxilos, aminos y sulfidrilos [12], constituyendo el pool de hierro lábil (LIP) [13]. El hierro puede ser ingresado a la mitocondria para llevar a cabo procesos intracelulares, o si no es requerido de manera inmediata por el organismo, puede ser almacenado como ferritina citoplasmática.

Los iones de hierro son altamente reactivos, por lo tanto, el transporte de este metal desde una membrana hacia otra debe minimizar su reactividad. No existe un consenso respecto a como se produce esta etapa dentro de los enterocitos, pero hay dos mecanismos que se han postulado al respecto: el hierro podría unirse a una chaperona que lo acarrearía hasta la membrana basolateral, o bien, podría ser transportado mediante transcitosis. En el primer caso, hasta la fecha no se ha encontrado ninguna chaperona que sea específica para el hierro, con la excepción del complejo  $\beta_3$ -integrina y mobilferrina [76], se ha postulado que este complejo sería un transportador de hierro férrico en humanos y ratas, ya que se ha observado que en experimentos de desafío de hierro a células intestinales, esta proteína es un intermediario en el transporte de hierro desde una membrana a otra [76]. En el caso de la transcitosis, se ha observado el movimiento de los transportadores DMT1 y FPN en diferentes ensayos donde se desafía a células intestinales con altas concentraciones de hierro, este fenómeno se ha observado tanto *in vivo* [12] como *in vitro* [77], pero no se ha esclarecido si este fenómeno es parte del proceso de transporte de hierro o es un mecanismo de control que limite la cantidad de hierro que ingrese a las células. El proceso de transcitosis de los transportadores se describe con mayor detalle más adelante.

Posteriormente, el hierro puede ser exportado a través de la proteína de transmembrana ferroportina 1 FPN1, la cual es la única proteína conocida con esta función [8], aunque su mecanismo no es completamente entendido. Además, se ha probado que la supresión de FPN en el intestino de ratones, bloquea totalmente la absorción de hierro [78]. Luego, el ion ferroso recientemente expulsado a través de la cara basolateral es oxidado nuevamente a ion férrico por la acción de la hefaestina HP. Se ha mostrado la interacción entre la ferroxidasa y FPN, concluyéndose que sin la actividad de esta ferroxidasa FPN es endocitada y reciclada [79]. Finalmente el ion férrico es capturado por la proteína transferrina, la cual es capaz de añadir 2 iones de este metal a su estructura. Esta proteína recorre el torrente sanguíneo transportando el hierro a todo el organismo [15].

Se han realizado diferentes ensayos de absorción de hierro bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones de hierro en grandes escalas de tiempo ([12], [80], [81]), con la finalidad de observar los efectos macroscópicos de estas variantes. En la Figura 3.10 se observan los resultados de las mediciones de los flujos de hierro a través de las membranas de células Caco-2. Para la determinación de la absorción apical (A) y basolateral (B) se les presentó a las células una oferta de  $5 \mu M$  de  $^{55}Fe$ -ascorbato en los medios respectivos, mientras que para la determinación de la salida apical (C) y basolateral (D) del metal, las células fueron incubadas por 24 horas en medio suplementado con  $1 \mu M$  de  $^{55}Fe$ -ascorbato y posteriormente lavadas para realizar las mediciones.

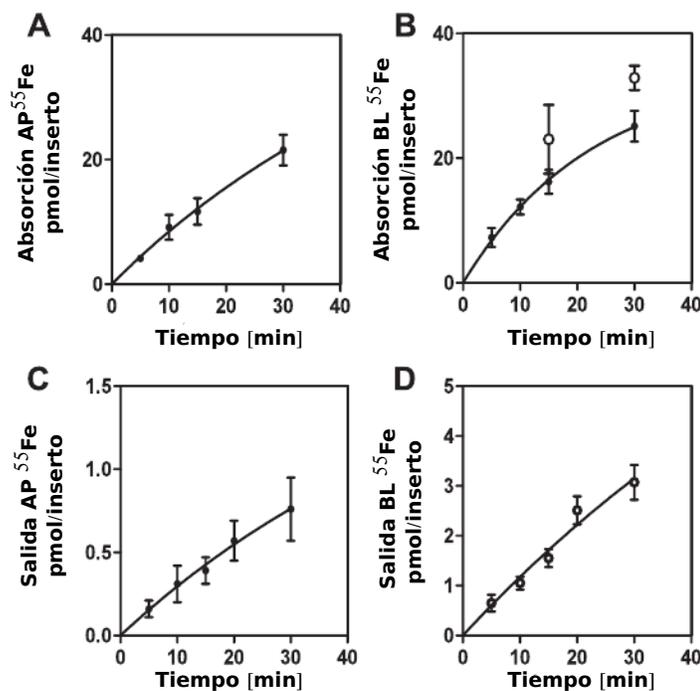


Figura 3.10: Flujos de hierro en las membranas de células Caco-2 [12].

### 3.3.3. Componentes relevantes de la absorción

A continuación se detallan los componentes más relevantes de la absorción de hierro

#### Divalent Membrane Transporter 1 (DMT1)

DMT1 es una proteína de transmembrana también denominada como DCT1 y Nramp2, es un transportador de metales mecánicamente complejo, debido a que presenta múltiples isoformas que actúan en diversos ambientes. Existen al menos 4 isoformas de DMT1 presentes en seres humanos, todas ellas comparten un segmento conservado de 531 aminoácidos pero se diferencian en los extremos N y C terminales debido a variaciones transcripcionales del gen SLC11A2 [82]. Las isoformas que poseen una variación en el extremo 5' son nombradas según el exón donde comienza el procesamiento de su ARNm, ya sea el exón 1A o 1B [83]. Mientras que las isoformas que poseen una diferencia en el extremo 3', poseen diferencias en su regiones codificantes y no codificantes (UTR-untranslated region), la isoforma denotada como IRE(+) presenta en su región 3'-UTR un segmento denominado IRE (Iron Responsive Elements), la cual influye en la estabilidad del ARNm frente a la concentración de hierro en el citoplasma. Por otro lado la isoforma IRE(-) no contiene un IRE [83]. En la Figura 3.11 se muestra un resumen de los transcritos de las isoformas, sus regiones codificantes (destacadas en gris) y no codificantes (verde).

Las isoformas de DMT1 poseen diferentes distribuciones y sistemas de control. Se ha



Figura 3.11: Variantes de los transcritos de ARNm de DMT1 y las respectivas isoformas [84]. El sector gris representa la región codificante de la proteína y en verde las regiones no codificantes.

observado que mientras la isoforma 1B se expresa de manera ubicua, la isoforma 1A se encuentra en tejidos específicos, predominando en el duodeno y riñón [85]. En células epiteliales se expresa de manera predominante la isoforma IRE(+) mientras que en líneas celulares sanguíneas se expresa IRE(-) [86]. Además, la isoforma 1A/IRE(+) es la isoforma que es más sensible al control por la presencia de hierro en el medio y le sigue la isoforma 1A/IRE(-), mientras que tanto la isoforma 1B/IRE(+) y 1B/IRE(-) no responden frente a las diferentes concentraciones de hierro [85]. En la sección 3.3.4 se detalla el mecanismo de control traduccional que afecta a las isoformas de DMT1.

DMT1 es capaz de utilizar diferentes metales como sustrato, se ha mostrado la afinidad del transportador por sustratos como  $Cd^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $VO^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  pero no que cada uno de esos metales sea transportado por se por DMT1 [87], es decir, que estos metales solamente inhiben la absorción de hierro.

Estudios del mecanismo de transporte del hierro mediante DMT1, indican que la fuerza motriz de este proceso es el gradiente electroquímico producido por los protones en los medios extra e intra celular [11], [61], esto permite clasificar a DMT1 como una proteína simportadora o co-transportadora. Además se ha visto que el pH tiene el efecto de aumentar la afinidad por el  $Fe^{2+}$  [61], por lo que DMT1 alcanza su máxima actividad a un pH 6.75 [88]. En células Caco-2 en condiciones en que el medio extracelular presenta pH 7 la  $K_m$  de DMT1 es cercana a  $7 \mu M$  [18].

Si bien se ha determinado que DMT1 es una proteína simportadora, es decir, que los flujos de hierro y protones están acoplados, también se ha observado un fenómeno de desacoplamiento de los flujos tanto de hierro como de protones, por lo que en ocasiones DMT1 se comportaría como una proteína uniportadora y no se cumpliría la razón  $H^+ : Fe^{+2}$  [61], [89]. Gracias estos estudios cinéticos realizados en oocitos, se propuso un mecanismo de la actividad de DMT1 de acuerdo a la evidencia experimental existente. En la Figura 3.12 se observa el modelo propuesto, el cual se compone de 8 estados conformacionales, donde se puede observar una vía de transporte desacoplada del flujo de protones (ciclo de los estados 1, 2a, 5a y 6) y una vía con los flujos de hierro y protones acoplados (ciclo 1-6).

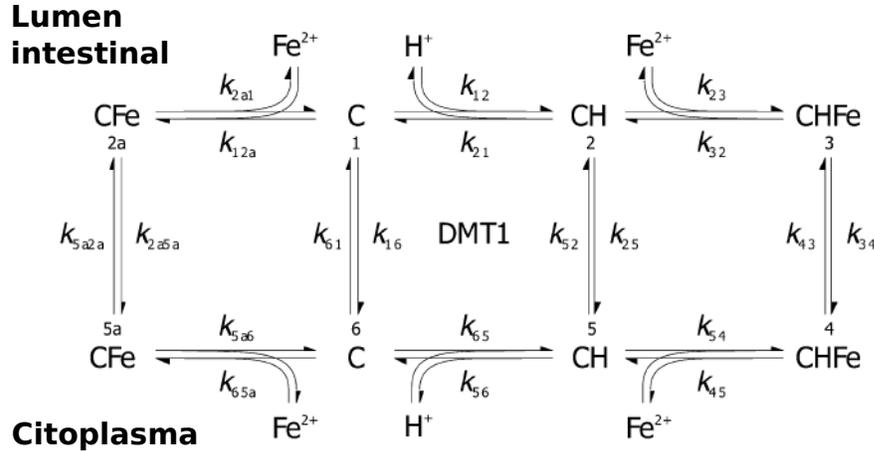


Figura 3.12: Modelo cinético de DMT1 [61].

### Ferroportina (FPN1)

FPN1, también llamada IREG1 o MTP1 es la única proteína exportadora de hierro no-hemo en mamíferos [78, 90]. Esta proteína posee 12 segmentos de transmembrana y es expresada en la mayoría de las células del organismo, pero alcanza niveles especialmente altos en células que interactúan con altas concentraciones de hierro habitualmente, como por ejemplo, enterocitos, hepatocitos y macrófagos [14].

Al igual que DMT1, el sustrato principal de FPN1 es hierro en forma de ion ferroso, pero la información acerca del mecanismo de transporte que posee es muy limitada. Aunque la importancia de esta proteína en la homeostasis de hierro ha sido demostrada en ratas [78], pez cebra [91] y humanos [92]. En estos casos se observó que una delección de FPN1 produce una seria deficiencia de hierro en el organismo y una gran acumulación de este metal en enterocitos, macrófagos y hepatocitos.

El control de la expresión de FPN1, es relativamente complejo ya que se ha visto que es dependiente de su localización, por ejemplo, se ha observado que en el duodeno su expresión disminuye al aumentar la cantidad de hierro en el citoplasma, mientras que en otros tejidos como el hígado su expresión decrece al existir una deficiencia de hierro [90]. Esto puede explicarse debido a que existen dos posibles transcritos de FPN1, uno de ellos presenta un IRE(+) en su extremo 5'-UTR, por lo que solamente este transcrito sería regulado por la presencia de hierro en el citoplasma, mientras que el transcrito IRE(-) puede ser controlado por otros factores como por ejemplo, condiciones de hipoxia [93]. Los detalles de la regulación traduccional y transcripcional de FPN1 se encuentran en la sección 3.3.4.

Una vez que el hierro ha sido transportado la torrente sanguíneo como Fe<sup>2+</sup>, es necesario que sea oxidado a Fe<sup>3+</sup> de manera que pueda unirse a transferrina y ser transportado a través del plasma. Para que este paso ocurra es necesaria la coordinación de FPN1 con una ferroxidasa, en enterocitos la proteína más importante que presenta dicha actividad es conocida como hefaestina o HEPH [94]. El mecanismo mediante el que HEPH estimula a oxidación de

hierro es poco entendido, pero se ha visto que es necesaria la interacción entre esta proteína y FPN1, ya que si el ion ferroso no es oxidado permanece unido a ferroportina, luego es ubiquitinado para posteriormente ser internalizado y degradado [79]. Con esto se muestra que HEPH estabiliza a FPN1 en la membrana basolateral.

## **Ferritina**

Si los requerimientos de hierro del organismo son altos, el metal puede moverse rápidamente al extremo basolateral y al torrente sanguíneo. Si la demanda de hierro es baja y no se necesita absorber una nueva cantidad de metal, entonces el hierro es almacenado en ferritina dentro de los enterocitos [69].

Ferritina posee 24 subunidades que forman una esfera hueca que es capaz de almacenar 4500 átomos de hierro [95]. El hierro en exceso en el citoplasma es dirigido a esta proteína, pero posteriormente puede ser liberado para satisfacer la demanda metabólica. Si el hierro en ferritina no es utilizado, este se pierde al terminar el ciclo de vida de los enterocitos. Por otro lado, si se almacena una gran cantidad de metal en esta proteína, ferritina puede formar un complejo y fusionarse al lisosoma, con esto la estructura es degradada a una mezcla de péptidos y óxidos de hierro llamado hemosiderina [96,97].

La traducción de ferritina se ve controlada mediante la cantidad de hierro en el citoplasma, ya que ésta aumenta su expresión al elevarse la concentración de hierro en el citoplasma, por lo que se cree que esta proteína tiene el rol de prevenir la acumulación del metal e impedir que llegue a niveles tóxicos [95].

En células Caco-2 se estima que la concentración de ferritina es 1.1 pmol por gramo de proteína total, mientras que su vida media es de 16 horas [98]. Además, considerando un promedio de 1000 átomos de hierro almacenados en ferritina, se obtiene un flujo de hierro desde esta proteína al citoplasma equivalente a 30 [pmol/mg de proteína total/hora] en células carentes de hierro [99].

## **Transferrina y receptores de transferrina**

La transferrina sérica es una proteína plasmática que se puede encontrar también en otros fluidos de los vertebrados, como por ejemplo, el líquido celoforraquideo, la leche y el semen [100]. La estructura de esta proteína se caracteriza por ser una cadena polipeptídica a la que se le unen dos hidratos de carbono, formando dos ramas idénticas y casi simétricas [100].

A pesar de que Transferrina es capaz de unirse a múltiples iones polivalentes, su sustrato natural el hierro, el cual se une con una alta afinidad, específicamente adhiere un ion férrico a cada uno de sus dos sitios y a su vez libera 3 protones [101]. Cuando transferrina no está unida a su sustrato se le denomina apotransferrina, mientras que cuando permanece con los dos átomos de hierro se le llama transferrina diférrica u holo-transferrina.

En la mayoría de las superficies celulares existen receptores de transferrina RTf, estas moléculas son glicoproteínas homodiméricas de aproximadamente 190 kDa, sus monómeros se encuentran unidos por dos puentes bisulfuros y cada molécula de RTf es capaz de unirse

a 2 moléculas de transferrina [102]. Su presencia es considerablemente mayor en células hepáticas, precursores de los glóbulos rojos en la médula ósea y células presentes en la placenta para suplementar de hierro al feto [103]. Se ha visto que a pH 7.4 los receptores de transferrina poseen una afinidad mucho mayor a la transferrina diférrica en comparación con la apotransferrina [102]. Una vez que el receptor se une a la transferrina, este complejo es internalizado debido a la formación de vesículas endocíticas, posteriormente el hierro es liberado debido a las bajas condiciones de pH en endosoma, el hierro es transportado fuera de la vesícula mediante DMT1 [104], la cual está incorporada en la vesícula. La transferrina y RTf remanentes en la vesícula son devueltas a la membrana celular, donde la ahora apotransferrina es liberada al torrente sanguíneo, mientras que el receptor permanece en la membrana [105, 106].

La presencia de receptores de transferrina en las células son un buen indicador de los requerimientos de hierro de cada tejido. La concentración de estos receptores es regulada por la cantidad de hierro presente en el citoplasma, específicamente se ha visto que poseen un segmento IRE(+) en un extremo 3'-UTR por lo que al disminuir la concentración de hierro citoplasmático aumenta la expresión de receptores. La descripción de este mecanismo de regulación se detalla en la sección 3.3.4. Existe un segundo receptor de transferrina conocido como RTf2, el cual posee características similares al receptor antes descrito, sin embargo posee una afinidad 25 veces menor por la holo-transferrina y no posee el segmento IRE [107], por lo que se cree que es regulado por otros factores celulares, como por ejemplo la etapa de desarrollo de la célula [108].

Se ha observado que a pesar de que existe un flujo constitutivo de hierro a través de las células Caco-2, el transporte de hierro se ve estimulado por la presencia de apotransferrina en el medio basolateral [109] y que esta molécula puede unirse a la cara basolateral de estas células [110]. Además se ha encontrado evidencia de que en ausencia de hierro en el medio apical, existe un pool de endosomas que contienen DMT1 y RTf, al agregar hierro en la cámara apical la cantidad de ambas moléculas en los endosomas aumenta considerablemente [111–113]. Esto ha sido interpretado como un mecanismo regulador que disminuye la cantidad de DMT1 de la cara apical, y por tanto, decrece el flujo de absorción de hierro, o bien, un mecanismo de transporte de hierro a través de las células Caco-2 [77].

## **Transcitosis**

En adición a la ruta citoplasmática de hierro que cruzaría los enterocitos, existe evidencia de la presencia de transporte vesicular o transcitosis de los componentes que afectan la absorción de hierro, como DMT1, FPN1 y transferrina [110], [12]. Debido a esto, a continuación se describen las características del fenómeno de transcitosis en enterocitos.

El transporte intracelular realizado mediante este mecanismo se basa en transportar las vesículas a través del citoesqueleto, en particular sus microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras polares que poseen un extremo *plus* de rápido crecimiento y un extremo *minus* de lento crecimiento. Esta polaridad es importante para la determinación de la dirección del movimiento a lo largo del microtúbulo [27].

Comúnmente, la distribución del citoesqueleto se basa en la extensión de los microtúbulos

desde un centro organizador cercano al núcleo hacia la membrana plasmática, en este caso el extremo *minus* se encuentra ubicado hacia el centro de las células [114]. En enterocitos esta distribución es diferente, ya que los microtúbulos se extienden desde la cara apical, donde se encuentra el extremo *minus*, hacia la cara basolateral, donde se encuentra el extremo *plus* [115], esto concuerda con el hecho de que la función principal de estas células es la absorción de nutrientes, por lo que el transporte de moléculas debe realizarse comúnmente en dirección apical-basolateral.

Existen diversas proteínas que interactúan con los microtúbulos en este proceso, las más relevantes son kinesina y dineína, las cuales son proteínas motoras que tienen como función el transporte de vesículas y organelos a través de la célula [27]. En ambos casos las proteínas poseen un extremo que se une a los microtúbulos y otro que se une a la cubierta de las vesículas, además ambas poseen un tamaño de paso cercano a los 8  $[\mu m]$  [116] pero difieren en la velocidad con que se desplaza, esto se debe a que la frecuencia con que dan los pasos varía entre una proteína y otra. Una diferencia importante entre estas proteínas es que en el caso de kinesina, permite el movimiento hacia el extremo *plus* (basolateral), mientras dineína permite el movimiento en la dirección *minus* (apical).

Otro factor que afecta la velocidad de desplazamiento es el tamaño de la carga sobre la proteína motora, se han encontrado velocidades de entre 0.5 a 1.5  $[\mu m/s]$  [116] bajo diferentes tamaños de carga. En el caso del transporte de los transportadores presentes en los enterocitos, la carga es comparable al transporte de vesículas del transportador GLUT-4, donde se ha determinado experimentalmente que las velocidades varían entre los 0.3 a 0.4  $[\mu m/s]$  [117].

Una vez conocidos los elementos más relevantes del fenómeno, es importante conocer los mecanismos de regulación que este posee con la finalidad de averiguar que puede ocurrir con la dinámica del sistema bajo distintas condiciones.

### 3.3.4. Mecanismos de regulación de la absorción de hierro

Debido a que no existen mecanismos conocidos destinados a la remoción de hierro del organismo, el control de la mantención de la homeostasis de hierro recae en mecanismos de regulación sobre la absorción de este metal. Existen principalmente 3 formas de regulación absorción de hierro: sistémica, transcripcional y traduccional. Estos mecanismos varían tanto en el tiempo de respuesta, complejidad y factores que desencadenan la regulación.

#### Regulación sistémica

Tanto la absorción intestinal de hierro como la cantidad de este metal utilizado por macrófagos son sistemáticamente controladas por la hormona Hepsidina. Esta proteína de 25 aminoácidos es sintetizada por hepatocitos en el hígado, circula por el torrente sanguíneo y se une a la proteína exportadora de hierro FPN1 ubicada en la superficie de las células, entre ellas los enterocitos [118]. Esta unión desencadena un proceso de endocitosis del complejo y la posterior degradación del mismo por la acción de los lisosomas.

La regulación de la producción de Hepsidina es compleja, pero es sabido que ésta aumenta cuando existe demasiado hierro almacenado, en etapas de infección e inflamación, y que decrece en condiciones de hipoxia, deficiencia de hierro y cuando es necesario amplificar el proceso de eritropoyesis [119]. Otro factor importante de destacar en este mecanismo, es que debido a los agentes involucrados el tiempo de respuesta de este tipo de regulación alcanza los 3-4 días [17].

### Regulación traduccional

Este mecanismo es mediado por interacciones específicas entre secuencias IRE (Iron Responsive Elements) y las proteínas IRP (Iron regulatory proteins). Las IREs son secuencias presentes regiones no codificantes (UTRs) situadas en los extremos 3' o 5' del ARNm de proteínas relacionadas al transporte y almacenamiento de hierro. Estas secuencias poseen en promedio 28 nucleótidos y permiten la formación de estructuras secundarias con forma de horquillas del ARNm y dependiendo de su ubicación en el mismo es el efecto que producen [120].

Las IRPs son proteínas bifuncionales, que pueden actuar como aconitasa citoplasmática en condiciones de alta concentración de hierro, o pueden unirse a las IREs cuando la concentración de este metal disminuye, por lo que se dice que las IRPs actúan como sensores de la concentración de hierro dentro de las células [121].

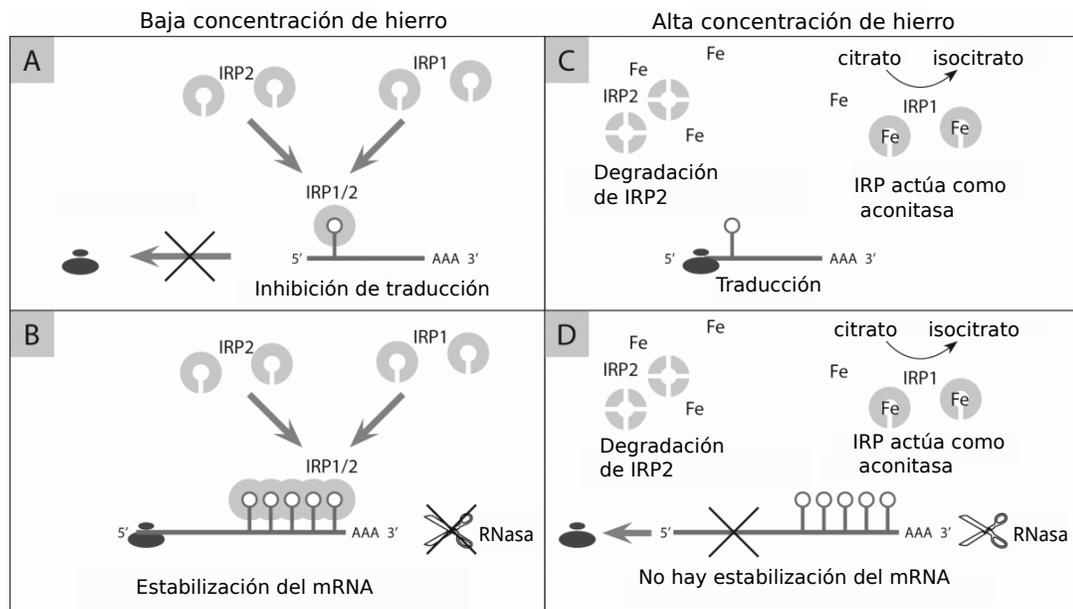


Figura 3.13: Mecanismo de regulación traduccional de absorción de hierro. Adaptado de [122]

A baja concentración de hierro dentro de las células, las IRP poseen una alta afinidad de unión con las IREs. Si la IRE está ubicada en el extremo 5' este complejo impide la unión entre los ribosomas y el ARNm por lo que la proteína no puede ser traducida. Por otro lado, si la IRE está localizada en el extremo 3' el complejo reprime la acción de las ribonucleasas que puedan degradar el ARNm, por lo que la proteína puede ser traducida [123].

En el caso de alta concentración de hierro, las IRP recuperan su función de aconitasa y no pueden unirse a las IREs lo que trae 2 consecuencias:

1. Para los ARNm que contengan IREs en el extremo 5', su traducción aumenta ya que los ribosomas pueden unirse a ellos y comenzar la reacción.
2. Para los ARNm que contengan IRE en el extremo 3', disminuye su traducción ya que las ribonucleasas pueden degradar la cadena.

En la Figura 3.13 se puede ver un esquema resumen que representa cada caso. Se han encontrado IREs en la mayoría de las proteínas participantes en el fenómeno de absorción y almacenamiento de hierro. En particular se han encontrado IREs en el extremo 5' en proteínas de expulsión (FPN1) y almacenamiento (Ferritina) de hierro, por lo que se privilegiaría su síntesis en periodos de altos niveles del metal y por tanto la concentración bajaría producto de la acción de estas proteínas [123]. Por otro lado, se han encontrado IREs en los extremos 3' de proteínas absorción del metal (Rf y DMT1) por lo que a bajas concentraciones de hierro aumentaría su síntesis y finalmente aumentaría el ingreso del metal a la células (Fig. 3.14). Cabe destacar que la presencia de IREs en las proteínas anteriormente nombradas no es generalizada, si no que existen isoformas que exhiben estos elementos y no la totalidad de sus genes, lo que da pie a que otros mecanismos de regulación puedan actuar dependiendo de las necesidades del organismo [123]. Finalmente, las investigaciones realizadas hasta el momento indican que este mecanismo posee un tiempo de respuesta de 1.5-3 horas [124].



Figura 3.14: Resumen de las condiciones de síntesis de las proteínas reguladas mediante el mecanismo de traducción.

### Regulación transcripcional

Este mecanismo no ha sido descrito completamente pero se ha observado que la transcripción de DMT1 es regulada negativamente por aumentos en la concentración de hierro y positivamente por factores pro-inflamatorios como LPS y las citoquinas  $TNF\alpha$  y *IFN-gamma* [125]. Por otro lado, Los estudios realizados sobre este tipo de regulación en la proteína FPN1 se remiten a pruebas efectuadas en macrófagos, donde se ha mostrado que el aumento en la concentración de hierro induce la transcripción de la proteína [126]. Finalmente, las investigaciones muestran que este tipo de regulación tiene un tiempo de respuesta de 12-36 horas [127].

## Bloqueo mucosal

El bloqueo de la mucosa es un proceso putativo que describiría la habilidad de una dosis de hierro ingerida inicialmente para bloquear una segunda dosis [74]. Este fenómeno disminuiría hasta en un 30 % la capacidad de absorción de hierro comparada con la primera dosis, además tendría un tiempo de respuesta de 45 a 90 minutos haciéndolo el mecanismo de regulación más rápido conocido hasta el momento. El efecto producido perduraría por 3 a 9 horas en las células epiteliales [124].

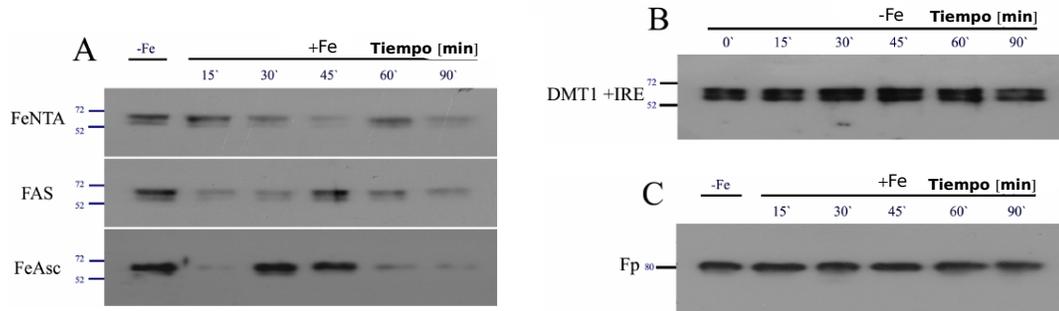


Figura 3.15: Cinética de internalización de DMT1+IRE y FPN inducida por la oferta de hierro [128].

Se han planteado distintas hipótesis acerca de la causalidad de este fenómeno, entre ellas que la concentración de ferritina controlaba la absorción de hierro actuando como un disipador de hierro y frenando el transporte a través de la cara basolateral [129]. Por otro lado, debido a los tiempos que se ha determinado para este fenómeno, también podría explicarse debido a la regulación traduccional de los transportadores mediante los elementos IRP/IRE [130]. Otra posible causa de este fenómeno es la redistribución de proteínas transportadoras, específicamente a la disminución de DMT1 debido a su internalización celular por medio de vesículas [12], [17], lo que traería como consecuencia una disminución en la capacidad de absorción de hierro. En la Figura 3.15 se puede observar un ensayo de biotilación de DMT1 en la cara apical en enterocitos luego de una oferta de 20  $\mu M$  para distintos tipos de hierro (A), un ensayo para la isoforma DMT1/IRE(+) sin oferta de hierro (B) y un ensayo de biotilación de FPN1 luego de una oferta de hierro (C) [128]. Mientras que en la Figura B.1 de Anexos se muestra un análisis cuantitativo realizado a partir de la Figura 3.15.

Las investigaciones realizadas hasta el momento se han realizado *in vivo* en mamíferos como ratas [124] y perros [131], los que muestran que efectivamente existe un método de regulación pero no revelan su mecanismo. Por otro lado, no se registran ensayos realizados *in vitro*.

### 3.3.5. Determinación experimental de flujos

El uso de sistemas *in vitro* posee algunas ventajas sobre sistemas *in vivo*, por ejemplo, se elimina la variación entre animales, es posible determinar con precisión las variables condiciones en que se realiza el experimento (temperatura, pH), es posible utilizar variables diferentes a las existentes en sistemas *in vivo* y se eliminan factores que podrían perturbar los fenómenos estudiados.

Existen distintos modelos que han sido utilizados para el estudio de células epiteliales de intestino. La línea celular Caco-2, proveniente de adenocarcinoma de colon humano tiene la capacidad de diferenciarse espontáneamente y formar monocapas de enterocitos intestinales maduros. Esta línea ha sido utilizada ampliamente en ensayos de toxicología y farmacología, y aunque su cultivo y diferenciación poseen algunos inconvenientes en la reproducibilidad de los experimentos, sigue siendo el mejor modelo de barrera intestinal existente [19]. Las células HT29 también pueden diferenciarse y alcanzan un estado de madurez media, además pueden diferenciarse en células calciformes, pero estas células son más difíciles de transfectar y no forman una monocapa tan compacta como las células Caco-2 [132]. Por otro lado se ha utilizado células T84, que son capaces de diferenciarse y alcanzar un estado similar a un estado de enterocito no maduro, por lo que se asemejan en mayor medida a las células presentes en la cripta y no en el epitelio [133].

La mayor diferencia entre las células Caco-2 y los enterocitos es que estos últimos presentan una gruesa capa de glicocalix en la superficie apical, aunque algunos autores postulan que esta capa es más bien una barrera funcional contra la adherencia e invasión de patógenos, debe ser considerada para la extrapolación de resultados desde modelos *in vitro* a *in vivo* [134].

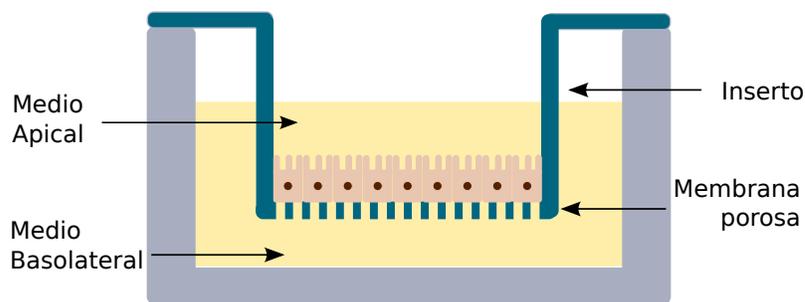


Figura 3.16: Esquema de la disposición experimental para los ensayos de flujo.

Los experimentos desarrollados en células Caco-2, se llevan a cabo en insertos bicamerales donde se cultivan las células hasta formar una monocapa similar al epitelio intestinal. Como se ve en la figura 3.16 las células se adhieren a la membrana porosa existente en el inserto, en la parte superior se encuentra el medio apical y el recipiente que contiene el inserto posee el medio basolateral. Comúnmente las células deben ser sembradas a alta densidad ( $10^4$  [células/inserto]) de manera de que se alcance la diferenciación de manera homogénea, lo cual ocurre entre los 20 a 25 días [135].

Un factor importante a considerar en los ensayos de flujo de hierro en la integridad de la monocapa, de manera de evitar el transporte paracelular. El método más común para analizar la integridad del cultivo es midiendo la resistencia eléctrica de la monocapa también conocida como Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER) [136]. Estudios al respecto indican que la monocapa está integra cuando se alcanza un valor de  $240 [\Omega \cdot cm^2]$  en el inserto [81].

# Capítulo 4

## Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Reactivos y equipos utilizados

Isótopo de Cloruro férrico ( $^{55}\text{FeCl}_3$ ), multímetro Millicell ERS-2 Millipore, Cloruro férrico ( $^{56}\text{FeCl}_3$ ), L-ácido ascórbico, medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Buffer Fosfato Salino (PBS), Suero Fetal Bovino (FSB), contador de centelleo líquido y campana de flujo laminar horizontal.

#### 4.1.2. Hardware

El desarrollo del modelo empírico se llevo a cabo en un cluster de 120 núcleos. 80 núcleos CPU Quad Core AMD Opteron<sup>TM</sup>, 16 x 10 GBi RAM, espacio en disco 1 TBi en RAID 1, conectado mediante un switch de red de 1 Gbs. 40 núcleos Intel Xeon, 2 x GBi RAM, espacio en disco 3 TBi en RAID 1.

#### 4.1.3. Software

**Matlab.** Para todas las simulaciones realizadas en este trabajo se utilizó el software Matlab, además para el desarrollo del modelo empírico se utilizó la toolbox GPLAB implementada en lenguaje M.

**Qtplot** Para la construcción de los gráficos presentados se utilizó el software Qtplot.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Determinación experimental de la absorción de hierro

**Cultivo celular.** Las células Caco-2 fueron cultivadas en insertos bicamerales de 12 *mm* de diámetro, sobre placas de 12 pocillos, que permanecieron en incubadora húmeda de  $CO_2$  al 5 %. Se utilizó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 3,7 *gr/lt* de  $NaOHCO_3$ , 10 % suero FBS y 1 % solución antibiótico y antimicótico, y fue esterilizado con un filtro de 0.22  $\mu m$ . Las células fueron sembradas a una densidad de 30.000 *cel/cm<sup>2</sup>*, para monitorear su crecimiento se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) mediante un multímetro cada 2 días, luego de esto se realizaba un lavado con buffer fosfato salino (PBS) y se cambiaba el medio de cultivo. Se consideró que la monocapa estaba formada cuando los registros de la TEER alcanzaron los 240  $\Omega/cm^2$ .

#### Determinación de la absorción apical de hierro

Una vez formada la monocapa, se cambió el medio de cultivo por DMEM 2% FBS esto con la finalidad de disminuir la replicación celular y la cantidad de transferrina disponible en el medio de cultivo [137]. Se incubó nuevamente el cultivo por 24 horas. Se preparó una solución de ácido ascórbico 100*mM* como se describe en la sección de anexos A y un stock de cloruro férrico a 100  $\mu M$  donde la proporción  $^{55}FeCl_3$ : $^{56}FeCl_3$  es igual a 1:4 y se mantiene una proporción 1:20 entre  $^{55}FeCl_3$ :Ascorbato. Con esta solución se prepararon los medios que se colocaron en el medio apical en los ensayos a 5, 10 y 20  $\mu M$ . De estos se retiraron 10  $\mu L$  para obtener el factor de conversión entre la radiación y concentración molar.

Para realizar los ensayos se utilizó DMEM sin suero en el medio basolateral en cada inserto, se cambió el medio apical del cultivo por los medios que contenían  $^{55}FeCl_3$  y se incubó por el tiempo necesario (3,6,9,12 y 15 min) a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación se colocó inmediatamente la placa en hielo con la finalidad de detener la reacción y se lavaron las secciones apical y basolateral con PBS frío 3 veces. Luego se cortaron los filtros y se colocaron en 1 *mL* de líquido de centelleo. Por otro lado, se retiraron 800  $\mu L$  de los medios basolaterales y se les agregó 3 *mL* de líquido de centelleo. Finalmente se midió la cantidad de radiación emitida por cada muestra durante 5 minutos. Se consideró que la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical es igual a la cantidad de hierro en el interior de las células más la cantidad presente en el medio basolateral.

#### Determinación de la velocidad inicial de absorción hierro

Se determinó la cantidad de hierro traspasa la membrana utilizando concentraciones de 3,5,7,10 y 20  $\mu M$  de hierro en el medio apical. La incubación de los insertos en estos ensayos fue de 3 minutos y se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente.

#### Determinación de la absorción apical luego de un segundo desafío de hierro

Para estos ensayos se cultivaron las células de la forma descrita anteriormente y el día anterior al ensayo se cambió el medio de cultivo a DMEM 2% FBS. Para aplicar el primer desafío de hierro se utilizó una solución de  $20 \mu M$   $^{56}FeCl_3$  y que mantiene una proporción 1:20 entre  $^{56}FeCl_3$ :Ascorbato, es decir, sin presencia del isótopo radiactivo. Los insertos fueron incubados por 15 minutos, luego fueron colocados en hielo, se lavaron 3 veces con PBS frío y se agregó un nuevo medio apical a  $20 \mu M$  marcado con  $^{55}FeCl_3$ . Una vez realizado esto se incubaron nuevamente los insertos por el tiempo necesario (3,6,9,12 y 15 min).

#### 4.2.2. Construcción del modelo empírico

Para determinar el modelo se realizó una regresión simbólica no lineal utilizando 3 diferentes versiones de un algoritmo de programación genética. Para todos los casos el modelo consta de dos variables, la concentración inicial de hierro en el medio apical y el tiempo; mientras que la variable de salida es la cantidad de hierro que traspasa la cara apical de las células, definida como la cantidad de hierro que ingresa a la célula más la cantidad que alcanza el medio basolateral. Los datos experimentales se dividieron en el conjunto de entrenamiento, definido como el conjunto de absorción a distintas concentraciones en los primeros 15 minutos, y el conjunto de validación, definido como el conjunto de velocidades iniciales a distintas concentraciones. Estos últimos valores equivalen a la cantidad de hierro que traspasa la membrana dividido por el tiempo de exposición al metal, es decir, 3 minutos.

Las distintas versiones del algoritmo genético varían en la forma de determinar los parámetros del modelo y en la función de fitness utilizada. La primera forma utilizada es el algoritmo clásico de programación genética, donde la función de fitness utilizada es minimizar el Mean Square Error (MSE) definido en la ecuación 4.1, donde  $Y_i$  es el valor experimental de la absorción y  $\hat{Y}_i$  es el valor predicho por el modelo. Mientras que los parámetros posibles para el modelo son definidos como un conjunto de constantes al comienzo del proceso. Un esquema de los pasos principales del algoritmo se muestra en la Figura 4.1.

$$MSE = \sum_{i=1}^N abs(\hat{Y}_i - Y_i) \quad (4.1)$$

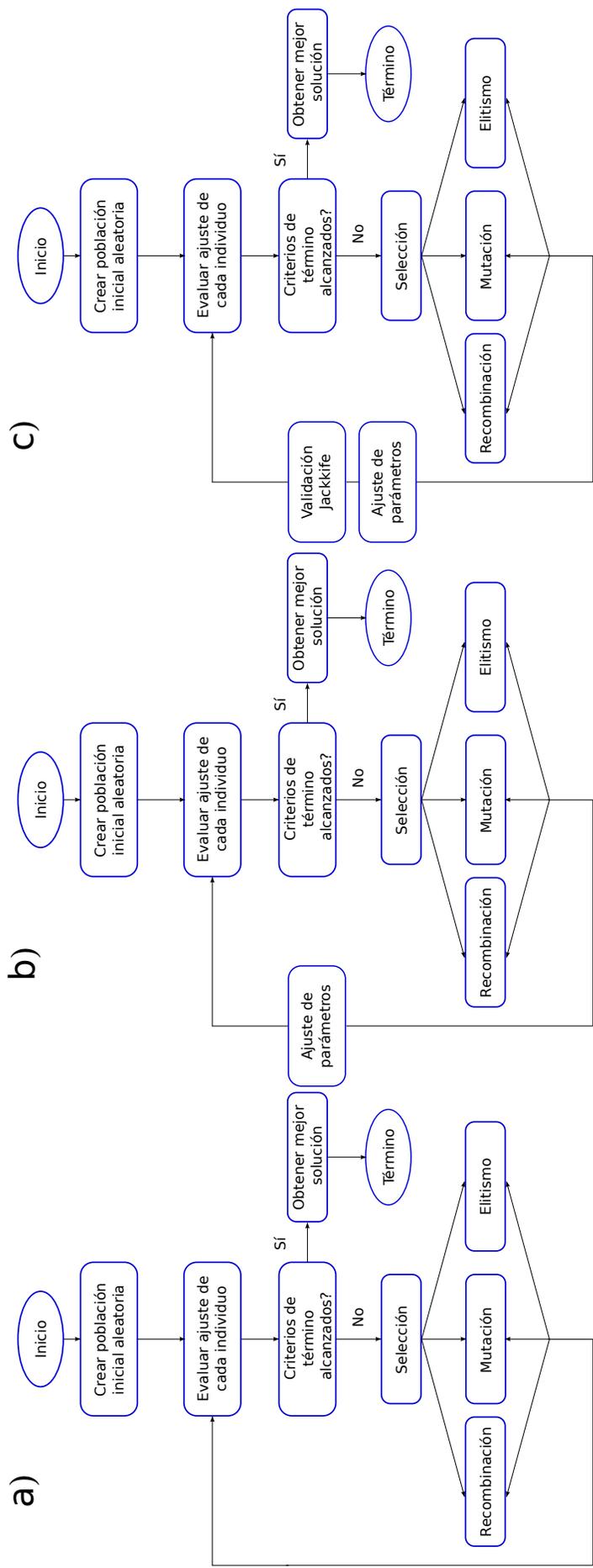


Figura 4.1: Esquemas de los algoritmos utilizados. a) Algoritmo original de programación genética. b) Algoritmo que incluye una etapa de ajuste de parámetros. c) Algoritmo que incluye una etapa de validación según el método de Jackknife.

La segunda versión del algoritmo añade un paso de ajuste de parámetros en la etapa de evaluación de cada individuo, mientras que la función de fitness se mantiene igual a la versión anterior (Ec. 4.1). Finalmente se añadió un paso de estimación del error de generalización mediante el método de Jackknife, cuyo valor fue utilizado como la función de fitness, mientras que los parámetros son determinados en la etapa de ajuste de parámetros incluida anteriormente. En la Figura 4.1 se puede ver una comparación entre los algoritmos utilizados. Además, los parámetros y criterios principales en el entrenamiento de todos los algoritmos se describen en la Tabla 4.1, estos fueron escogidos en base a información bibliográfica y características propias del problema.

Tabla 4.1: Parámetros utilizados en el algoritmo de Programación Genética.

<b>Parámetros</b>	<b>Valor o criterio</b>
Tamaño de la población	500
Número de generaciones	100
Probabilidad de recombinación	0.9
Probabilidad de mutación	0.1
Elitismo o reproducción	Mantener sólo el mejor
Conjunto de funciones	$\cos()$ , $\sin()$ , $+$ , $-$ , $*$ , $/$ , $a^b$ , $\ln()$ , $\exp()$
Conjunto de terminales	Var: $C_0, t$ ; Const: 1, 5, 10, 100, 1000
Población inicial	Full, Grow, Ramped-Half-and-Half
Límite de profundidad del árbol	17
Métodos de selección	Ruleta y torneo

Para las dos primeras versiones del algoritmo se realizaron 50 repeticiones, mientras que para la última versión se realizaron 20. Cada una de estas repeticiones contenía un modelo capaz de representar los datos experimentales. Para escoger los mejores modelos se seleccionó utilizando diferentes criterios, primero, analizando la función de fitness de los modelos obtenidos, midiendo su capacidad de representar los datos del conjunto de validación, verificando que el modelo cumpliera con la mayor cantidad de restricciones fenomenológicas posibles y validando los parámetros utilizando el método de Jackknife cross-validation o leave-one-out.

### 4.2.3. Construcción del modelo fenomenológico

Para construir el modelo fenomenológico fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica de los componentes que intervienen en la absorción intestinal de hierro, posteriormente se seleccionaron los compuestos más relevantes, ya que dada la complejidad del sistema no es posible incluir todos los factores, posteriormente se realizó una búsqueda bibliográfica específica para estos.

En base al conocimiento obtenido en la etapa anterior, se seleccionó un modelo de estados para la proteína DMT1 presentado en bibliografía, luego se aplicaron modificaciones en base a las características de los ensayos de absorción de los realizados en la sección experimental,

con la finalidad de que los resultados del modelo definitivo y los datos experimentales sean comparables.

Dada la complejidad del sistema y la falta de información empírica del fenómeno de endocitosis de DMT1, se realizó una búsqueda bibliográfica de diferentes maneras de representar esta etapa con la información disponible. Una vez realizado esto se implementaron los modelos que eran más factibles y se realizó un ajuste de parámetros con cada uno de ellos utilizando como referencia los datos obtenidos en la determinación de la absorción apical.

Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en las simulaciones de cada modelo verificando que cumplan con las características biológicas planteadas inicialmente, comparando sus resultados estadísticos y sus desempeños al simular los ensayos de velocidad de absorción y de bloqueo mucosal.

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos con la metodología planteada anteriormente, su comparación con resultados presentes en bibliografía y un análisis de los mismos. Estos resultados se dividirán en 3 secciones, de acuerdo a las diferentes actividades propuestas de manera sucesiva: Primero, la determinación experimental de los flujos de hierro, donde se obtuvo información respecto a los diferentes comportamiento de los flujos a través de la cara apical. Luego, se utilizaron estos datos para la construcción de un modelo empírico que pudiera representar estos datos y dar indicios de los factores más relevantes del fenómeno. Y finalmente, la construcción de un modelo fenomenológico, que fuera capaz de representar los datos experimentales, y que estuviera descrito en base a la información existente hasta el momento.

### 5.1. Determinación experimental de los flujos de hierro

Para poder desarrollar los ensayos de absorción, es necesario asegurarse que el cultivo de las células Caco-2 presente las condiciones adecuadas. La característica más importante que debe presentar el cultivo es que la monocapa esté íntegra, de esta manera se evita el paso de hierro por transporte paracelular.

La integridad de la membrana formada se estudió mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), cuya curva de evolución durante el cultivo se puede ver en la Figura B.2 en la sección de Anexos. En ésta se puede observar que a los 18 días alcanza un máximo que bordea los 300 [ $\Omega \cdot cm^2$ ] y luego desciende, lo que concuerda con publicaciones anteriores donde se estudia el comportamiento de la formación de la monocapa [81]. En base a dichos estudios se determinó que los ensayos de flujo se realizarían una vez que se alcanzaran los 240 [ $\Omega \cdot cm^2$ ], ya que en este punto se considera que la monocapa está íntegra.

### 5.1.1. Absorción apical de hierro a distintas concentraciones

Se determinó la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical durante los primeros 15 minutos de exposición. Para esto se utilizaron concentraciones apicales de 5,10 y 20  $[\mu M]$ . Los resultados de estos ensayos de flujo se muestran en la Figura 5.1, donde el eje de las abscisas corresponde al tiempo de exposición al metal y el eje de las ordenadas a la cantidad de hierro que traspuso la membrana apical. Allí se observa con claridad que a medida que aumenta la concentración en el medio apical, mayor es la cantidad de hierro que traspasa la membrana.

En la Figura 5.1 se puede observar que entre los minutos 3 y 12, se observa una considerable disminución de la velocidad de absorción y posteriormente un aumento, esto sucede en todas las concentraciones a distintos tiempos y a distintas magnitudes. Es necesario notar que en la curva de absorción a 10  $[\mu M]$  entre los 6 y 9 minutos, se tiene una velocidad negativa, lo que equivale a una salida neta de hierro desde las células, lo cual no puede suceder ya que en las condiciones del ensayo, la cantidad de DMT1 en la membrana apical es muy superior a la cantidad de FPN1, y es sabido DMT1 no puede transportar iones hacia afuera de la célula, debido al gradiente de concentraciones existente. Además, no es posible que exista un flujo de hierro hacia el medio apical a causa de la actividad de transferrina, ya que se disminuyó la cantidad de FBS del cultivo con anterioridad a los ensayos y durante las mediciones se utilizó medio de cultivo sin FBS, lo cual disminuye drásticamente la cantidad de transferrina [137].

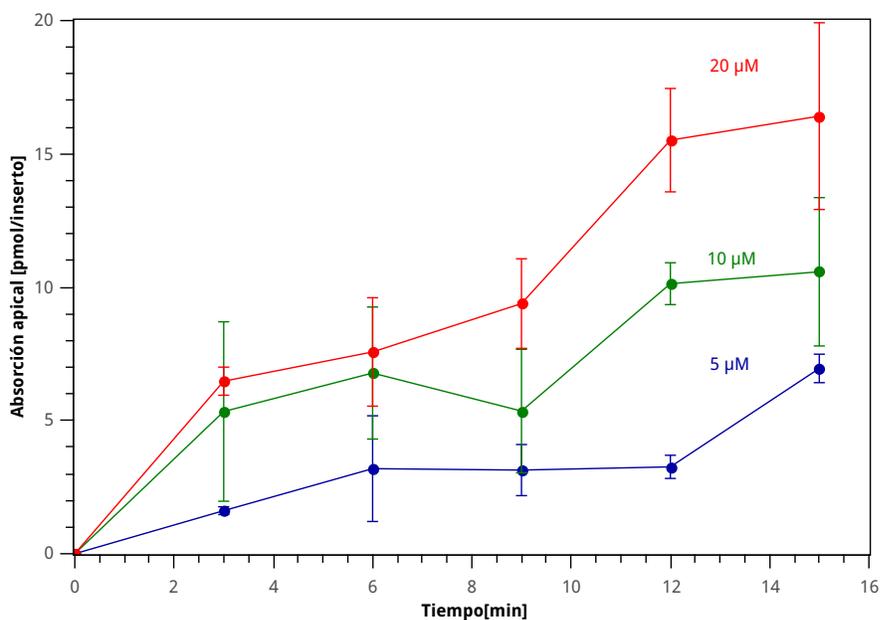


Figura 5.1: Ensayos de absorción apical a distintas concentraciones iniciales de hierro. Las barras error muestran la desviación estándar en cada uno de los puntos.

El cambio en las velocidades de absorción para todas las concentraciones, indica la presencia de componentes no lineales en el proceso, y por tanto no es posible describirlo según un modelo de barrera única como se planteó en la sección 3.2.4. Este comportamiento

podría explicarse debido a la variación de la cantidad de DMT1 en membrana, tal como se mostró en las pruebas de biotilación (Fig. 3.15).

Como se puede observar en la Figura 5.1, el orden de magnitud de la absorción de hierro en los primeros 15 minutos es de  $10 \text{ [pmol]}$ . Es posible comparar este valor con la cantidad de hierro que permanece en el medio apical, para esto se debe considerar que se utilizaron  $200 \text{ [}\mu\text{L]}$  de medio con concentraciones de hierro del orden de  $10 \text{ [}\mu\text{M]}$ , es decir, el medio apical contenía inicialmente  $2000 \text{ [pmol]}$ , y de esta cantidad se absorbe solamente  $10 \text{ [pmol]}$  hasta los 15 minutos, lo que equivale a un  $0.5 \%$  de la dosis inicial.

El hecho de que la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical sea mínima, deja entrever la gran resistencia existente en el sistema al traspaso de hierro. Para analizar qué factor está causando dicha resistencia se determinó el transporte total de hierro a través de las células, es decir, la cantidad de metal que efectivamente alcanza el medio basolateral. Dicho resultado se puede ver en la Figura 5.2, donde se observa que para todas las concentraciones estudiadas la cantidad de hierro en el medio no supera los  $0.1 \text{ [pmol]}$ . Si se compara este valor con la cantidad de hierro que traspasa la cara apical, es posible deducir que prácticamente la totalidad del metal absorbido se encuentra en el medio intracelular. Esto denota que el o los componentes que producen la resistencia al ingreso de hierro son parte de los enterocitos. Es necesario recordar que los valores en esta medición corresponden a una estimación de la cantidad de hierro que alcanza el medio basolateral, ya que estas cifras se ven afectadas por la dilución isotópica del metal.

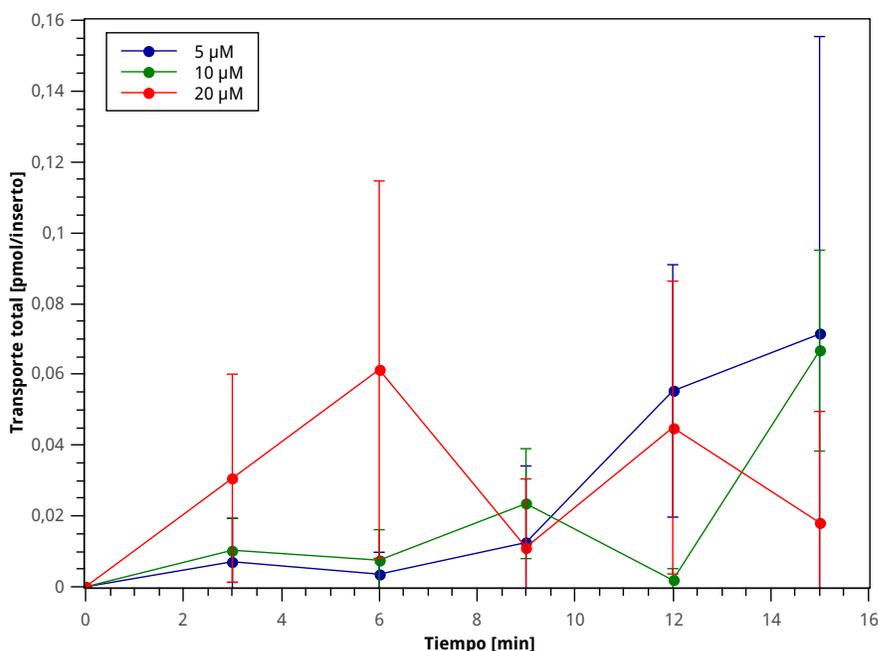


Figura 5.2: Transporte total de hierro a distintas concentraciones iniciales. Las barras error muestran la desviación estándar en cada uno de los puntos.

Dado que cerca del  $99 \%$  del hierro está en el medio intracelular, es posible estimar que la concentración del metal en el interior de las células. Por ejemplo, para el caso de exposición de hierro a  $10 \text{ [}\mu\text{M]}$ , la concentración intracelular alcanzada a los 15 minutos es cerca de  $5 \text{ [}\mu\text{M]}$ .

Esto indica que aún existe un gradiente de concentración importante entre el medio apical y el medio intracelular, por lo que es posible que las células sigan absorbiendo hierro. Es necesario acotar, que a pesar de tener una estimación de la concentración intracelular de hierro en ese momento, el metal puede estar distribuido dentro de la célula de tal forma de aumentar el gradiente de concentración en la cara apical. Ya que como se explicó anteriormente, una vez que el metal ingresa a la célula, puede ser transportado hacia ferritina, unirse a otras proteínas o ser transportado al medio basolateral. Lo que quiere decir que, al ingresar a la célula es removido fácilmente del medio cercano a la cara apical, lo que disminuye la concentración en ese sector.

Ahora bien, en el caso de la membrana basolateral, realizar un análisis de la capacidad de transporte en ese minuto es más complejo, ya que si bien la concentración intracelular promedio sería del orden de  $5 [\mu M]$ , no es posible asegurar que se alcance esa concentración cerca de la membrana basolateral, debido a que la actividad de ferritina podría disminuir la concentración citoplasmática de hierro. Por otro lado, es necesario considerar que la cantidad tiempo que en se expuso las células a un desafío de hierro es corto, por lo que es posible que el metal a los 15 minutos todavía esté siendo transportado a través de la célula sin haber llegado a la membrana basolateral. En ambos casos, el gradiente de concentración en la membrana basolateral sería menor a lo estipulado anteriormente.

Un fenómeno importante a considerar, es el hecho que en la Figura 5.2 no se observa una tendencia clara en el tiempo para cada concentración, es decir, no se observa una diferencia entre las curvas de absorción total entre las diferentes concentraciones estudiadas. Además, estos resultados se ven claramente afectados por la desviación estándar de los datos observados, lo que en este ensayo se debe principalmente al error en la medición de radiactividad del isótopo, ya que en cantidades muy pequeñas de radiación este es un factor importante. No obstante, el orden de magnitud de estos resultados concuerdan con los estudios realizados anteriormente [81], para condiciones experimentales muy similares.

Como se dijo anteriormente, las células Caco-2 poseen la desventaja de presentar una variabilidad natural entre un cultivo y otro, lo que trae como consecuencia una desviación estándar mayor a lo habitual, tal como se puede ver en las Figuras B.2, 5.1, 5.2 y 5.3. Esto además puede verse afectado por la experiencia del manipulador. Para disminuir este efecto se podrían realizar más repeticiones de los experimentos, aunque esta medida sería muy costosa en términos de tiempo.

### 5.1.2. Velocidades iniciales de absorción apical

Se determinaron las velocidades iniciales de absorción en los 3 primeros minutos, para concentraciones de 3, 5, 7, 10 y 20  $[\mu M]$ . Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 5.3. Con esta información se realizó un ajuste a una curva tipo Michaelis Menten (Ecuación 5.1) de donde se obtuvo una constante de Michaelis de  $K_m = 10.36[\mu M]$  y una

velocidad máxima equivalente a  $V_{max} = 0.0029[\mu M/min]$ .

$$\frac{dFe_i}{dt} = \frac{V_{max}Fe_{out}}{K_m + Fe_{out}} \quad (5.1)$$

La  $K_m$  de DMT1 había sido reportado anteriormente para distintos pH, en particular se había reportado que para un pH igual a 7 en el medio apical, este valor era cercano a 7  $[\mu M]$  [18], lo cual es comparable al valor obtenido en el ajuste de parámetros. Sin embargo, en dicho experimento el tiempo utilizado para determinar la velocidad inicial fue de 20 minutos, lo cual trae 2 consecuencias: Dado que se ha observado la variación de la cantidad de DMT1 en los primeros minutos, se rompe el supuesto de conservación de la enzima utilizado en el modelo de Michaelis-Menten y subestimaría las velocidades iniciales. Por otro lado, aunque la cantidad de proteína fuese constante durante ese tiempo, al utilizar largos periodos de incubación se produce una sub-estimación de las velocidades iniciales, ya que el gradiente de concentración de hierro disminuye a lo largo del tiempo. Estos fenómenos se puede observar en la Figura B.3, donde la curva roja muestra los resultados obtenidos utilizando un tiempo de incubación de 20 minutos [18] y la curva azul indica las velocidades obtenidas a los 3 minutos de incubación.

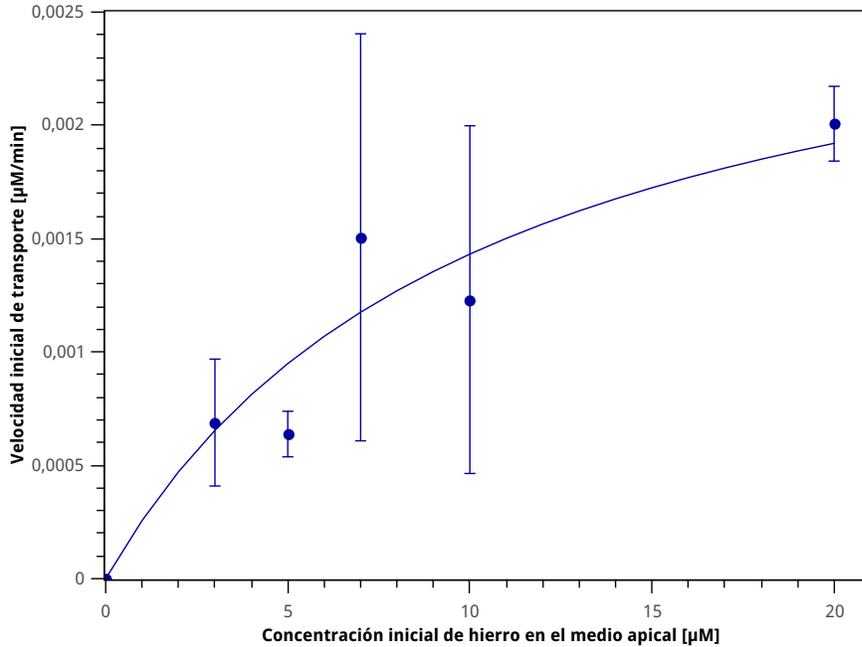


Figura 5.3: Velocidad inicial de absorción a diferentes concentraciones. El ajuste respecto a la curva tipo Michaelis-Menten presenta un  $R^2 = 0.64$ .

En estricto rigor la velocidad inicial debería ser medida en un tiempo muy cercano a 0, pero esto en la práctica no es posible por impedimentos técnicos. Por esto se consideró que 3 minutos era un tiempo razonable para determinar la velocidad en el menor tiempo posible, pero con la factibilidad necesaria para tener un resultado confiable. Aún así, se puede ver que existe una gran desviación estándar en las mediciones, esto puede deberse tanto a la variación al detectar cantidades muy pequeñas de radiactividad, como por la variabilidad

que presentan este tipo de células. Debido a la desviación estándar que presentan la bondad del ajuste de los parámetros se ve afectado, esto se ve reflejado en los amplios intervalos de confianza que se observan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Parámetros del ajuste realizado para la ecuación 5.1.

Parámetros	Valor	Intervalo de confianza ( $\alpha = 0.05$ )
$K_m [\mu M]$	10.36	(-7.624, 28.35)
$V_{max} [\mu M/min]$	0.0029	(0.0003, 0.005)

Un factor importante a considerar es el hecho que la ecuación de Michaelis-Menten considera solamente un sustrato, mientras que DMT1 puede actuar con un flujo de hierro y protones acoplados, por lo que en algunos casos sería relevante utilizar por ejemplo, una ecuación de Hill en su lugar. En cuyo caso deberían ajustarse nuevamente los valores de los parámetros  $V_{max}$ ,  $K_m$  y agregar el parámetro  $n$ .

Finalmente es necesario considerar que a pesar que el tiempo de incubación se disminuyó a 3 minutos, esto no elimina totalmente el factor de la variabilidad de la cantidad de DMT1, si no que lo disminuye ya que como se observa en las Figuras 3.15 y B.1, a este tiempo ya podría existir una variación considerable de la proteína. Sin embargo, este efecto sería mucho menor que en el caso de utilizar 20 minutos de incubación.

### 5.1.3. Bloqueo mucosal

Como se dijo anteriormente el bloqueo mucosal consiste en la habilidad de una dosis de hierro ingerida inicialmente para bloquear una segunda dosis. En estudios anteriores se habían realizado análisis *in vivo* en largos períodos de tiempo [124], [131]. En este caso se realizó un ensayo de absorción apical donde se desafió a las células por 15 minutos con un medio apical a 20  $[\mu M]$  de  $^{56}FeCl_3$ , luego de ese tiempo se cambió por un medio que poseía 20  $[\mu M]$  de  $^{55}FeCl_3$ .

Los resultados obtenidos (Fig. 5.4) muestran una variación en las velocidades de manera similar a lo que ocurre en la Figura 5.1. Lo que indica que al igual que en la primera exposición se mantienen los componentes oscilatorios del sistema. Esto concuerda con la hipótesis de que las variaciones de velocidad observada se deben al cambio en la cantidad de DMT1 en la membrana, ya que como se vio en la Figura 3.15 este fenómeno se observa hasta 90 minutos después de la primera exposición a hierro. En la Figura B.4 se puede observar la curva de absorción de la primera exposición, el minuto en que se realizó el cambio de medio y la cantidad de hierro que traspasó la membrana posteriormente.

En la Figura 5.5 se puede observar la comparación entre las absorciones luego de la primera y segunda exposición a hierro. Allí se puede observar que para todos los tiempos medidos, la cantidad de hierro que traspasa la membrana es mayor en la primera exposición a hierro. Esto concuerda con el fenómeno del bloqueo mucosal, en el cual, una exposición al metal disminuye la capacidad de absorción de las células frente a una segunda exposición.

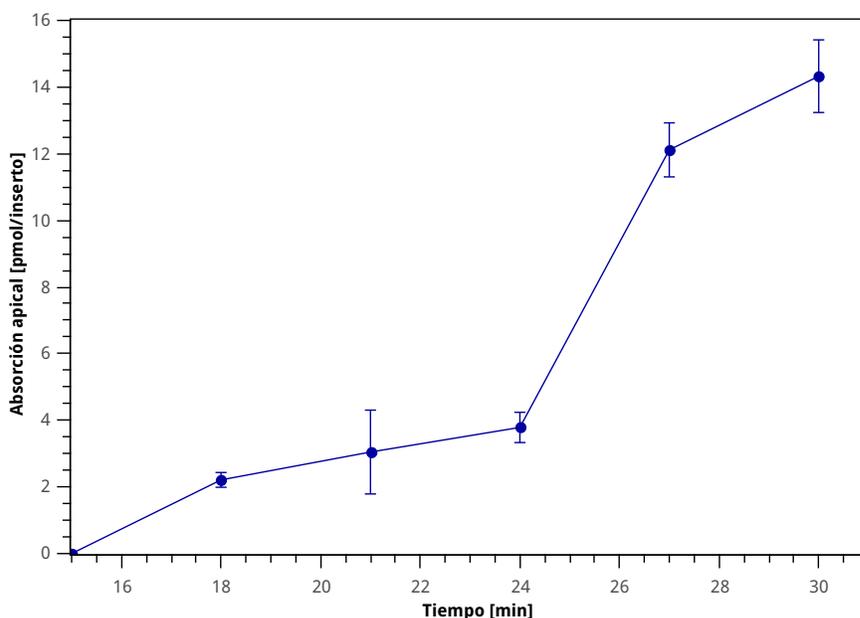


Figura 5.4: Absorción apical de hierro luego de la segunda exposición a hierro.

Ahora bien, tal como se mostró en la Figura 5.1, la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical en los primeros 15 minutos, está dentro del orden de  $10$  [pmol], por lo que la cantidad de hierro en el medio apical durante ese período es prácticamente constante. Esto significa, que al cambiar el medio apical inicial por el medio con hierro marcado, el gradiente de concentración entre el medio apical y el intracelular es prácticamente el mismo. Este punto trae varios análisis que realizar consigo, primero, el fenómeno de bloqueo se observa a tiempos tan cortos como el estudiado, por lo que en caso de ser un mecanismo de control de absorción, efectivamente sería el más rápido conocido.

Si la cantidad en el medio apical permanece prácticamente constante a pesar del cambio de medio, es posible suponer que, la curva de absorción es muy similar a la curva sin haber realizado el cambio de medio. Considerando esto, se podría decir que la velocidad de absorción disminuye en el tiempo, y que la causa principal de esto no es la disminución del gradiente entre los medios. Si no que, más bien, podría deberse a que la cantidad de DMT1 en la membrana, además de oscilar en el tiempo, disminuye a lo largo de los minutos. Esto explicaría por qué, a pesar de que no se presentó una discontinuidad en el gradiente, la cantidad absorbida en la segunda exposición fue considerablemente menor que en la primera.

El hecho de que la cantidad de DMT1 disminuya y oscile en el tiempo, podría indicar que en algún minuto la cantidad de este transportador en la membrana alcance un mínimo y luego vuelva a la cantidad inicial de proteína, de manera de restablecer el sistema a las condiciones fisiológicas comunes. Sin embargo, no existen datos experimentales que estudien la cantidad de DMT1 en la membrana apical en periodos largos de tiempo.

Cabe destacar que para realizar un análisis completo, sería necesario contar con más observaciones en casos similares, en particular, sería interesante realizar un ensayo donde sí

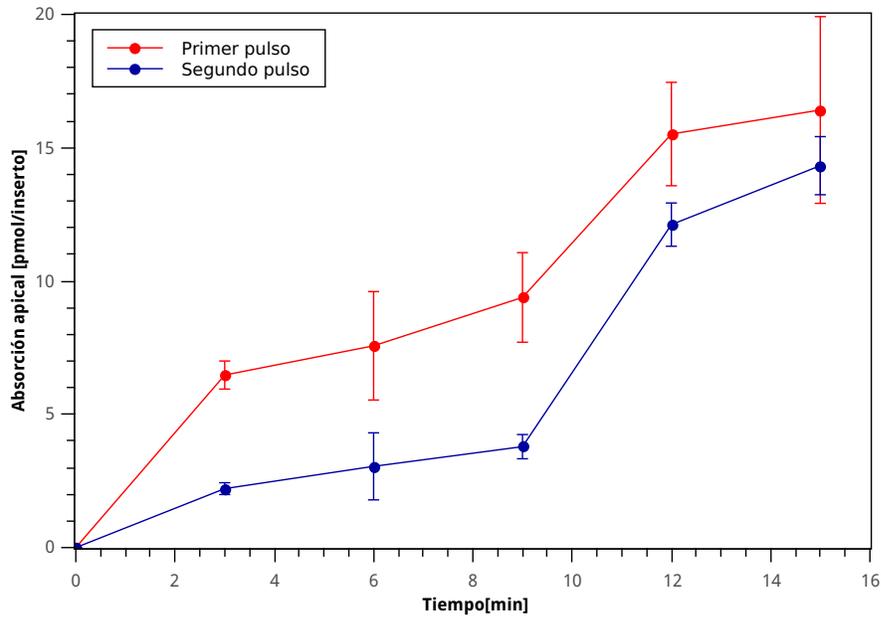


Figura 5.5: Absorción apical de hierro en la primera y segunda exposición a hierro.

existiera una discontinuidad de concentración apreciable en el medio apical, entre la primera y segunda exposición. Como por ejemplo, utilizar una concentración de  $10 \mu M$  en la primera exposición y  $20 \mu M$  en la segunda, ya que esto permitiría ver qué cambios producen una variación repentina del gradiente, por ejemplo, si la velocidad de absorción varía con mayor rapidez frente a un mayor gradiente.

Del análisis realizado se desprenden nuevas preguntas que deben ser respondidas, como cuáles son los componentes que desencadenan la endocitosis de los transportadores, qué mecanismo regula este proceso, cuál es la dinámica de este proceso, etc. Para dilucidar algunas de estas respuestas, sería muy convenientes realizar ensayos donde se determine la velocidad de endocitosis, como por ejemplo, ensayos de biotinilación de DMT1 como el que se muestra en la Figura 3.15 con menores intervalos de tiempo entre las muestras, ya que como se deduce de la Figura 5.1, en los primeros 15 minutos existen cambios considerables en la cantidad de transportadores en la membrana.

Otro experimento sugerido sería la medición de la cantidad DMT1 en el tiempo a lo largo de la célula frente a la exposición de hierro, tal como lo indica [12]. Es necesario especificar que, los ensayos presentados en [12] fueron realizados en intervalos de tiempo adecuados para el análisis, pero se utilizó sulfato de hierro en lugar de cloruro férrico, por lo que los resultados no son comparables. Si bien este tipo de experimentos es mucho más complejo, entrega una gran cantidad de información, ya que no sólo permite observar que sucede en la cara apical, si no que además permite ver la distribución de transportador a lo largo de la célula, lo que a su vez daría indicios acerca del transporte de hierro a través de la célula.

## 5.2. Modelo Empírico

En esta sección se mostrará proceso de construcción del modelo empírico de los flujos de absorción apical de hierro. Lo que se busca estimar con este modelo es la cantidad que ha traspasado la cara apical en el tiempo, considerando como variable principal la concentración inicial en el medio apical. Para esto se utilizaron como referencia, o bien, como datos de entrenamiento, los datos que se mostraron en la Figura 5.1. Por otro lado, se utilizaron los datos de velocidad inicial presentes en la Figura 5.3 como un conjunto de prueba del modelo.

A lo largo de esta sección se presentará el desarrollo que se realizó a partir de tres modelos empíricos, todos ellos construidos a partir del algoritmo de programación genética. Estos modelos representan diversos estados de avance del trabajo, y los dos primeros se descartaron por no cumplir con los requerimientos estadísticos necesarios del problema en cuestión. A su vez, el desarrollo de cada modelo empírico descartado motivó un cuestionamiento acerca de las propiedades del algoritmo que construía los modelos. Estos cuestionamientos culminaron en cambios sustanciales del algoritmo original, lo que condujo a modelos que capturaban de mejor manera los requerimientos del problema abordado en este trabajo.

### 5.2.1. Modelo desarrollado con el algoritmo clásico

A continuación, se analizará el trabajo asociado con el algoritmo de programación genética clásico. Este análisis permite entrever las razones por las que se realizaron los primeros cambios a dicho algoritmo.

Al comienzo del trabajo, se optó por utilizar el algoritmo de programación genética como base para crear los modelos empíricos a ser utilizados para explicar los datos experimentales. Esta decisión se tomó en base a la observación de los datos experimentales obtenidos en la sección anterior, ya que como se dijo anteriormente, es posible notar comportamientos altamente no lineales, lo cual le agrega complejidad al problema, ya que no es posible establecer a priori una función de regresión.

El algoritmo se ejecutó según los parámetros detallados en el Capítulo 4. Es necesario recordar que, el algoritmo posee una gran cantidad de pasos y elementos que son determinados probabilísticamente, por lo que cada vez que es ejecutado se encontrará un nuevo modelo que se ajuste a los datos experimentales, es decir, funciones con estructuras y parámetros diferentes. Debido a esto y con la finalidad de encontrar el modelo más adecuado, se realizaron 50 repeticiones, con lo que se obtuvieron consecuentemente 50 modelos.

En este punto, fue necesario escoger criterios que por un lado permitieran establecer cuáles de estos modelos eran más apropiados para representar los datos experimentales obtenidos. Y por otro lado, permitieran escoger aquél modelo que siguiera las características fenomenológicas del problema, haciéndolo más general. Para esto, se describieron 5 criterios que permitían discernir si el modelo poseía estas características deseables o no. Estos criterios son los siguientes:

1. Descartar los modelos que requieren funciones protegidas (división y logaritmo), por ejemplo, que descartaron modelos que incluían términos como  $\log(t)$  ya que en  $t = 0$  la función se indefine;
2. Descartar los modelos que tuviesen bajo desempeño. Específicamente se descartaron aquellos modelos que presentaron un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) menor a 0.8;
3. Descartar los modelos que careciesen de sentido biológico. Por ejemplo, que presentasen concentraciones negativas;
4. Seleccionar los modelos que fuesen capaces de representar datos experimentales que no fueron utilizados en la etapa de entrenamiento. Para esto se realizó una predicción de las velocidades iniciales de absorción, y se compararon con los datos obtenidos en la Figura 5.3; y
5. Seleccionar el modelo que presentase el menor error de generalización  $MSE_{jk}$ .

Luego de aplicar dichos criterios, se determinó que el mejor modelo obtenido con esta metodología es el que se presenta en la Ec. 5.2. La simulación de los datos observacionales, es decir, los datos usados en la etapa de entrenamiento, se puede ver en la Figura 5.6. El coeficiente de determinación en este caso es de  $R^2 = 0.84$  lo que indica que es capaz de representar adecuadamente el conjunto de datos. Un factor importante a considerar a la hora de evaluar el coeficiente de determinación obtenido es que, dado que los datos experimentales presentan desviación estándar, no es posible alcanzar un coeficiente de determinación igual a 1, es decir, no es posible encontrar una curva que pase por todos los puntos observados.

$$[Fe_{in}(C_0, t)] = C_0 \frac{\sin \left( \sin \left( \left( \frac{t}{\exp(\exp(1))} \right) \cos \left( \sin \left( \frac{t}{\exp \left( \frac{t}{\exp(\exp(1))} \right)} \right) \right)^{-1} \right) \right)}{\cos(\sin(C_0 + 5))} \quad (5.2)$$

Los resultados de las pruebas de validación son dos: La simulación de las velocidades iniciales de absorción, es decir, los datos no utilizados en la etapa de entrenamiento, se puede ver en la Figura 5.7. Mientras, que los resultados principales del método de Jackknife se pueden observar en la Tabla 5.2.1.

Con esta información disponible, es posible notar varias características relevantes: Primero, la ecuación seleccionada es altamente no lineal, tal como se supuso en un comienzo. Además, presenta componentes oscilatorios en el tiempo que podrían corresponder a las variaciones de transportador en la membrana. Sin embargo dichas oscilaciones producen variaciones muy grandes en la velocidad de los flujos de absorción, tanto así que se observan pendientes negativas en las curvas, lo que significarían una salida neta de hierro a través de la cara apical, pero tal como se discutió anteriormente, esto no es posible en el sistema de estudio. Esto implica que este modelo escapa a las características del fenómeno biológico. En este punto es necesario profundizar.

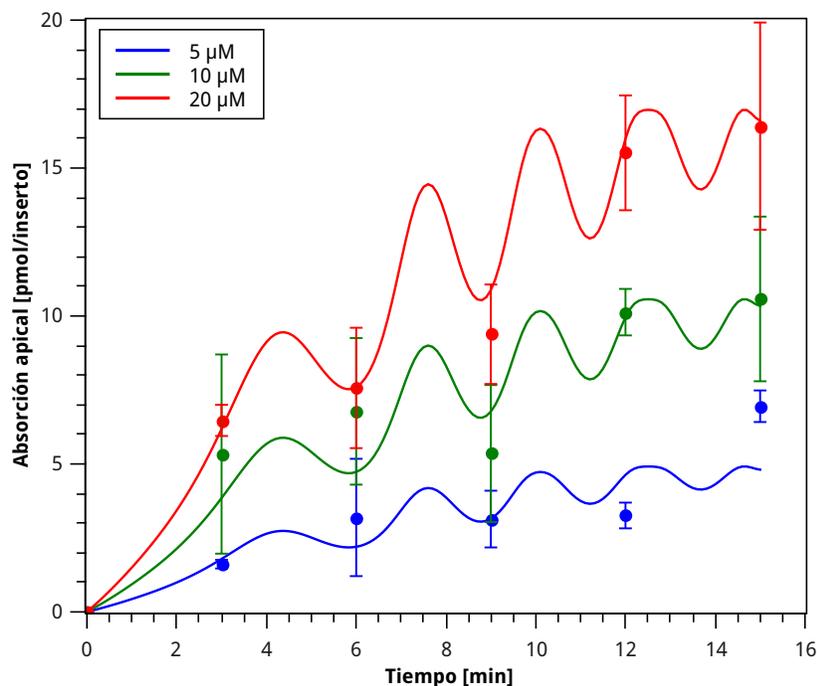


Figura 5.6: Simulación de la absorción apical utilizando el modelo empírico de la ecuación 5.2.

Una de las características más relevantes de los modelos empíricos es que se construyen sin información a priori acerca del sistema. Por lo que su alcance debe acotarse considerando esta característica, es decir, es razonable encontrar un modelo empírico que represente adecuadamente los datos experimentales en términos estadísticos. Sin embargo, intentar que dicho modelo cumpla con todas las características fenomenológicas del problema, es un objetivo mucho más complejo. Es por esto, que a pesar de que el modelo de la ec. 5.2 no cumple todas las características biológicas, se escogió como el mejor modelo en este caso.

Otro rasgo relevante del modelo es la presencia de elementos oscilatorios respecto a la concentración. Si bien se esperaba que presentara características oscilatorias respecto al tiempo, a causa de la variación temporal de DMT1, no se tenía ningún indicio de que podrían presentarse oscilaciones respecto a la concentración. Este fenómeno trae consigo consecuencias como las oscilaciones que se observan en la Figura 5.7, las cuales no corresponden a una curva típica de velocidad respecto al tiempo y carecen de sentido biológico. Esto concuerda con un rasgo típico de los modelos empíricos, su baja capacidad de representar datos que no fueron utilizados en la etapa de entrenamiento, obteniéndose en este caso un  $R^2 = 0.58$ .

En la Tabla 5.2.1 se obtiene más información relativa al desempeño estadístico del modelo. Respecto al valor del error de generalización  $MSE_{jk}$ , no es posible analizar este valor en sí mismo, si no que es un término utilizado para comparar la capacidad de generalización de los modelos. Respecto a los valores de los parámetros del modelo (1 y 5) se observa que difieren considerablemente de los pseudo-parámetros, esto es un indicativo de que podría existir otro conjunto de parámetros que permitiera que el modelo tuviera un mejor desempeño estadístico.

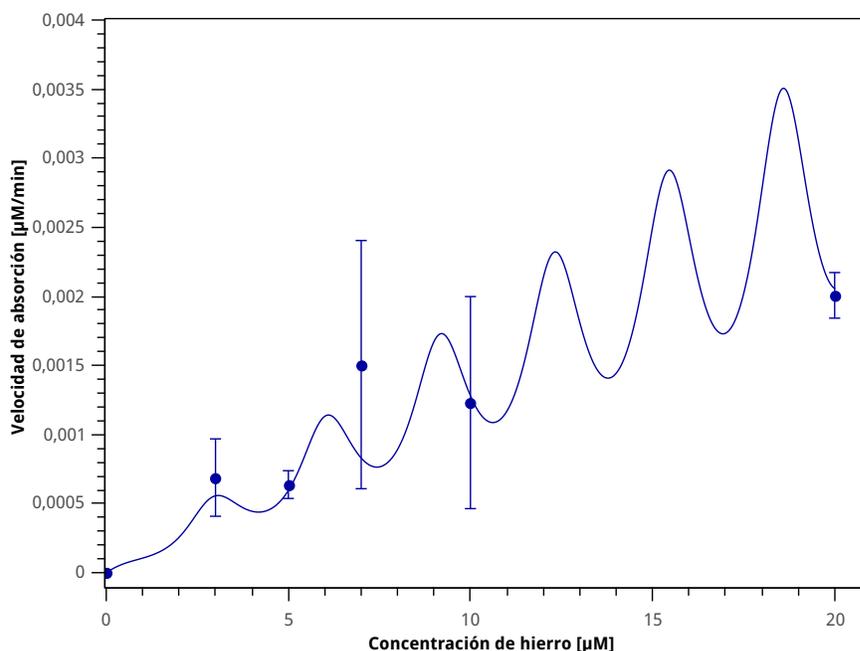


Figura 5.7: Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.2.

No obstante, el algoritmo clásico genera los modelos con los parámetros del conjunto descrito inicialmente. Por lo anterior, no era posible modificar los parámetros dado el algoritmo que se estaba utilizando.

Parámetro	Valor	Pseudo-parámetro	Intervalo de confianza
$\beta_1$	1	0.327	$\pm 1.86 \times 10^{-2}$
$\beta_2$	5	6.47	$\pm 1.58 \times 10^{-1}$
<b>Coefficiente de correlación</b>		$MSE_{jk}$	
0.918		1.45	

Tabla 5.2: Resultados principales de la validación Jackknife para el modelo de la ecuación 5.2.

Un punto importante a destacar, es que en la Ec. 5.2 se tienen dos parámetros, 1 y 5, sin embargo estos valores se ven afectados por otro elementos de la función, como por ejemplo  $\exp(1) \approx 2.72$  ó  $\exp(\exp(1)) \approx 15.15$ , los cuales podrían ser considerados parámetros en sí mismos. Esta ambigüedad en la definición de los parámetros produciría cambios tanto en el valor de los parámetros, como en la cantidad de parámetros del modelo, lo que repercutiría en el análisis estadístico mediante el método de Jackknife.

Ahora bien, es sabido que el algoritmo clásico de programación genética no ajusta los parámetros de los modelo que evalúa. Sin embargo, a lo largo de las generaciones se van produciendo cambios aleatorios a los modelos sobrevivientes, algunos de estos cambios pueden

producirse en las hojas de los árboles creados, es decir, en los parámetros de los modelos. Estos cambios, permanecerán solamente si mejoran el valor de la función de fitness de los modelos, en otras palabras, se producen pequeñas modificaciones aleatorias que van mejorando la elección de los parámetros. Este proceso es similar a un ajuste de parámetros pero que se desempeña de una manera muy ineficiente, ya que no es una etapa específica diseñada con este fin. Considerando esto, es posible suponer que las interacciones entre los parámetros (Ej.  $5 + 1$ ) o las evaluaciones de estos (Ej.  $exp(1)$ ), son una forma de ajustar los parámetros entregados en el conjunto inicial, o bien, una manera de agregar parámetros al modelo. Con la metodología que se ha seguido hasta ahora, no es posible distinguir entre un caso y otro, para poder solucionar esto se podría agregar una etapa específica para la optimización de parámetros, de manera de declarar que solo los parámetros que fueron optimizados son independientes entre sí.

Tanto el problema de ambigüedad en la definición de parámetros, como la selección de los mismos, muestra que es necesario ajustar los parámetros del modelo, por lo que se determinó que era necesario modificar el algoritmo clásico. El objetivo de estos cambios era precisamente incluir la variabilidad de los parámetros dentro del algoritmo. De esta forma, las funciones de los modelos obtenidos serían las mejores de su tipo.

### **5.2.2. Modelo desarrollado con la metodología de ajuste de parámetros**

Continuando con la idea anterior, en esta sección se describirán los principales cambios que se realizaron al algoritmo clásico. Luego se detallará cómo se implementó este nuevo algoritmo en el problema en cuestión. También se mencionarán los resultados obtenidos a partir de esta metodología, y se mostrará cómo se evaluó el desempeño de los mismos. Finalmente se indicarán las razones a partir de las que se decidió continuar modificando el algoritmo.

Se determinó, que para incluir la variabilidad de los parámetros dentro del algoritmo de programación genética clásico, era necesario introducir una etapa de ajuste de parámetros. Esta etapa se incluyó en la etapa inmediatamente anterior a la evaluación de cada individuo, de manera de seguir una estrategia evolutiva Lamarckiana [138]. De este modo cada evaluación estaría considerando el modelo ajustado de cada tipo.

Sin embargo, el ajuste de parámetros es un problema de optimización de la misma complejidad que el de programación genética. Por lo anterior, fue necesario acotar los recursos destinados a resolver esta etapa, para priorizar el algoritmo genético. Para acotar adecuadamente estos recursos, se determinaron una serie de criterios entre los cuales están:

- Escoger el algoritmo de optimización utilizado en el ajuste de parámetros;
- Definir el criterio de término del algoritmo escogido;

A continuación, detallan cada uno de los criterios listados anteriormente.

En primer lugar, para poder introducir un ajuste de parámetros en el algoritmo clásico, era necesario determinar qué algoritmo utilizar. Diferentes algoritmos poseen diferentes características y son mejores o peores para determinados problemas. Puesto que en este caso, no se puede saber con anterioridad el tipo de función que el algoritmo de programación genética propondrá, era necesario escoger un algoritmo lo más general posible.

Del mismo modo, dado que no habían restricciones que permitieran acotar el espacio de soluciones, era necesario escoger un algoritmo que no requiriese restricciones para funcionar adecuadamente. Tomando estas dos condiciones en mente, se decidió finalmente escoger el algoritmo Levenberg-Marquardt [139]. Es necesario acotar que los parámetros utilizados como punto inicial, son escogidos por el algoritmo genético al crear el modelo que se desea evaluar.

En segundo lugar, se debía escoger el criterio de detención del algoritmo escogido. Este punto es de especial importancia, pues permite controlar el tiempo de convergencia y los recursos adicionales que esta nueva etapa requeriría. Para realizar lo anterior existen varias alternativas, entre las cuales están: criterios de detención por tolerancia en el cambio de la función objetivo o los parámetros, criterios de detención por cantidad de llamadas a la función y criterios de detención por cantidad de iteraciones. Dado que el objetivo era ahorrar recursos, se prefirió optar por el más simple de los criterios de detención, el de cantidad de iteraciones. La elección de este criterio está sustentada en bibliografía de escenarios similares, donde se asegura que bajo ciertas circunstancias se puede asegurar la convergencia luego de un número bajo de iteraciones [140].

Luego se procedió a corroborar lo establecido por la literatura a través de un breve experimento. En éste, se buscaba el número mínimo de iteraciones en que la función objetivo no variara ostensiblemente. Los resultados de este procedimiento se presentan la Figura C.1. En ella se puede observar que acotando el número de iteraciones a 10, se logra reducir el error de la función objetivo de forma significativa. Como resultado se contrastó lo sugerido por la literatura, donde se consideraba que 3 iteraciones eran suficientes [140], y se decidió extender este valor según lo obtenido en el caso particular de este algoritmo.

Una vez escogido el algoritmo de optimización y sus criterios asociados, se obtuvo nuevamente un conjunto de 50 modelos. Por lo que se procedió a escoger el mejor modelo de este conjunto, utilizando una vez más, los criterios definidos en la sección 5.2.1.

El modelo seleccionado se presenta en la Ec. 5.3, mientras que la simulación de los datos de entrenamiento se pueden observar en la Figura 5.8, la simulación de los datos de validación en la Figura 5.9 y el análisis con el método de Jackknife en la Tabla 5.3.

$$f(C_0, t) = \sin(\beta_1 C_0) + \sin(\beta_2 C_0) + \sin(\beta_3 + t^{\sin(\beta_4 C_0)}) + t^{\sin(\beta_5 C_0)} \quad (5.3)$$

En esta ocasión el coeficiente de determinación de la simulación arroja un valor de  $R^2 = 0.86$ , lo que advierte que este modelo representa de mejor manera los datos de la Figura 5.8, en comparación al modelo desarrollado con el algoritmo clásico. Esto concuerda con lo esperado, ya que al ajustar los parámetros de los modelos, mejora el desempeño del

mismo. En la Figura C.2 se muestra el valor final del MSE si el proceso de optimización de los parámetros se realizara con una mayor cantidad de iteraciones, allí se observa que aumentar el número de iteraciones disminuye el MSE en menos de un 1 %, por lo que se puede afirmar que la cantidad de iteraciones escogida anteriormente (10) es acertada.

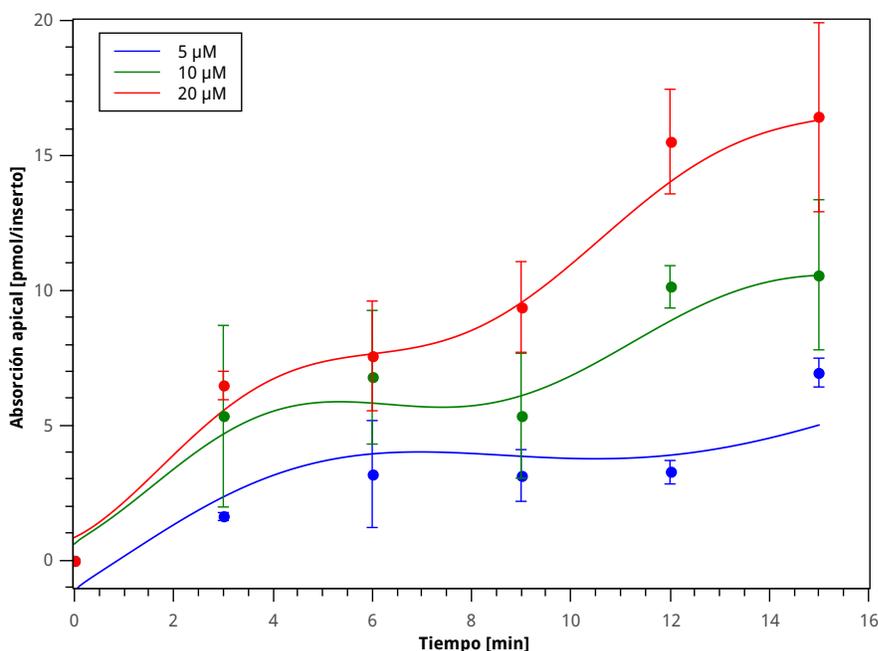


Figura 5.8: Simulación del modelo empírico de la ecuación 5.3.

En este caso, al igual que en la Ec. 5.2 se observan componentes oscilatorios en la función. Una vez más, estos componentes incluyen efectos oscilaciones respecto a la variable temporal y a la concentración. Sin embargo, a diferencia del modelo planteado anteriormente, las variaciones en la velocidad de absorción no producen pendientes negativas significativas a lo largo del tiempo simulado. Una característica importante de la Figura 5.8 es que, en la curva correspondiente a una concentración apical de 5 [ $\mu\text{M}$ ], en el tiempo  $t = 0$ , el modelo predice una concentración negativa. Tal como se discutió en el caso del modelo anterior, esta característica difiere de la fenomenología del problema, sin embargo este modelo fue seleccionado ya que cumple con la mayoría de los rasgos deseados. Además, es necesario considerar que el valor en ese punto es muy cercano a cero, por lo que podría considerarse que la diferencia es despreciable.

En la Figura 5.9 se puede distinguir una tendencia similar a la obtenida en la Figura 5.7. Al igual que en dicha Figura, la curva no corresponde a la forma típica de este tipo de experimentos. Esto indica la baja capacidad de generalización del modelo, ya que predice de mala manera ( $R^2 = 0.58$ ) datos observacionales que no fueron utilizados en el entrenamiento.

En la Tabla 5.3 se puede notar que los valores de los parámetros son prácticamente idénticos a los pseudo-parámetros, lo que indica que ese conjunto de valores efectivamente es el que permite el mejor desempeño del modelo. Además, los intervalos de confianza obtenidos son muy estrechos, de hecho su amplitud es mucho menor a los valores de los parámetros, lo que indica que el conjunto de parámetros obtenido es bastante estable.

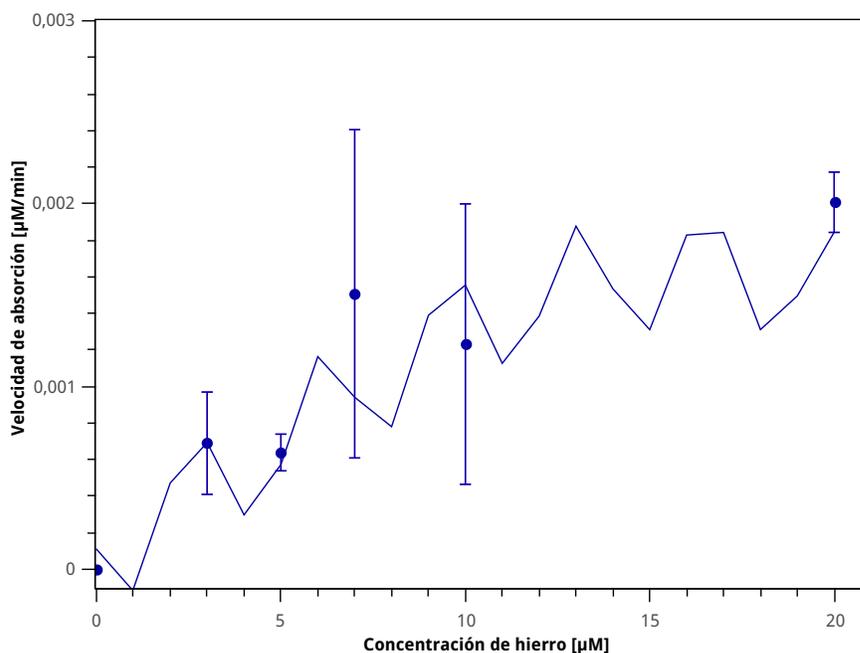


Figura 5.9: Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.3.

Respecto a la capacidad de generalización, como se vislumbra en la Tabla 5.3, el error de generalización  $MSE_{jk} = 1.61$  es mayor que el obtenido en el modelo anterior, es decir, tiene una menor capacidad de generalización y su desempeño es bajo al predecir nuevos valores experimentales. Este fenómeno concuerda con lo que se vio en la Figura 5.9. El hecho de que el modelo seleccionado represente de mejor manera los datos experimentales pero tenga una capacidad de generalización baja es una característica propia del fenómeno de sobreajuste [141]. Vale decir que, esta particularidad se manifestó en un alto porcentaje de los modelos obtenidos con esta metodología, incluso con mayor énfasis.

Tabla 5.3: Resultados principales de la validación Jackknife para el modelo de la ecuación 5.3.

Parámetro	Valor	Pseudo-valor	Intervalo de confianza
$\beta_1$	4.47	4.47	$\pm 3.69 \times 10^{-2}$
$\beta_2$	6.39	6.40	$\pm 2.48 \times 10^{-2}$
$\beta_3$	4.54	2.53	$\pm 4.27 \times 10^{-1}$
$\beta_4$	6.38	6.42	$\pm 4.80 \times 10^{-3}$
$\beta_5$	6.37	6.37	$\pm 6.57 \times 10^{-3}$
<b>Coefficiente de correlación</b>		$MSE_{jk}$	
0.929		1.61	

De este análisis se puede deducir que, utilizando el algoritmo clásico de programación genética se detectaron problemas con la representación de los datos observacionales, y que esto se debía a que no se ajustan los parámetros durante el algoritmo. Para poder mejorar dicha situación se integró una etapa de ajuste de parámetros, la cual efectivamente permitió

una mejorar la representación de los datos utilizados en el entrenamiento. Sin embargo, esta mejora trajo un nuevo inconveniente, la pérdida de generalidad de los modelos creados con el algoritmo.

Para poder sobrellevar dichos inconvenientes a la vez, se planteó una nueva mejora al algoritmo. Esta vez, se propuso integrar la etapa de validación de Jackknife al algoritmo, de manera de minimizar el error de generalización en lugar de el error entre los datos observacionales y su predicción. De esta manera se busca obtener modelos en los que puedan tener un buen desempeño representando los datos de entrenamiento pero que no pierdan la capacidad de generalización.

### 5.2.3. Modelo desarrollado con la metodología de error de generalización

A continuación se detallan los cambios realizados al algoritmo descrito en la sección anterior, y su implementación en el algoritmo general. Se enseña el modelo empírico definitivo obtenido con esta metodología, sus principales características en comparación con los modelos obtenidos anteriormente y su relación con la fenomenología del sistema estudiado.

Con la finalidad de obtener modelos que tuvieran una mayor capacidad de generalización, pero que a su vez representaran adecuadamente los flujos de hierro estudiados, se decidió incluir una etapa de ajuste de parámetros y una etapa de validación según el método de Jackknife al algoritmo de programación genética. Para esto, la etapa de ajuste de parámetros se agregó inmediatamente antes de la evaluación de los individuos, mientras que la etapa de validación se incluyó dentro de la etapa de evaluación. En el caso de la última etapa, se reemplazó la determinación de la función de fitness del algoritmo original de la Ec. 4.1, por la medición del error de generalización  $MSE_{jk}$ .

Anteriormente se comentó que la complejidad de un problema de optimización es equivalente a la del algoritmo general de programación genética. Y que por tanto es necesario acotar los recursos utilizados en la etapa de optimización de cada uno de los individuos. En este nuevo diseño del algoritmo este punto es de vital importancia, ya que en el caso anterior por cada modelo que se evaluaba era necesario realizar un optimización para determinar los parámetros, en cambio en el nuevo algoritmo, es necesario realizar inicialmente esa operación y luego llevar a cabo el cálculo del valor  $MSE_{jk}$ , el cual requiere una cantidad de optimizaciones igual a la cantidad de datos experimentales utilizados, en este caso 54. Por lo que se obtiene un total de 55 optimizaciones por modelo evaluado.

Bajo este escenario, es evidente que los costos de tiempo y recursos que requiere el algoritmo, son mucho mayores que los utilizados en el algoritmo de programación genética clásico. Es por esto que fue necesario reforzar las medidas de ahorro de recursos. Para esto se tomaron las determinaciones que se describen a continuación:

- **Definir el criterio de término de las optimizaciones:** De manera similar al algoritmo propuesto anteriormente, se decidió que el criterio de término que se utilizaría

en la etapa de ajuste de parámetros, sería imponer como máximo de 10 iteraciones. En el caso de la etapa de determinación del valor  $MSE_{jk}$ , se realizó un experimento similar al de la Figura C.1, donde se determinó el mínimo número de iteraciones que debían realizarse en la optimización, con tal de que la función objetivo  $MSE_{jk}$  alcanzara un valor estable. Los resultados de este experimento se pueden ver en la Figura C.3, donde se vislumbra que en la mayoría de los casos, 10 iteraciones es suficiente para encontrar un valor adecuado.

- **Disminuir el número de generaciones del algoritmo:** Como se muestra en la Tabla 4.1, se había determinado que para el caso del algoritmo clásico, se utilizaría un número de generaciones igual a 100. Este valor es bastante alto, ya que comúnmente se utiliza entre 10 y 50 generaciones, debido a que los cambios más relevantes a los modelos probados se realizan en las primeras generaciones. Sin embargo, esta medida había sido tomada con la finalidad de refinar la búsqueda del mejor modelo. En el caso del presente algoritmo, se utilizó un máximo de 50 generaciones, ya que el presente algoritmo posee 2 etapas que refinan los modelos en la etapa de evaluación.
- **Disminuir el número de modelos generados por el algoritmo:** Un punto muy importante a considerar, es el aumento en el tiempo que se utilizaba para ejecutar cada vez el algoritmo, es decir, el tiempo que era necesario para crear un modelo del conjunto a evaluar. En el caso base del algoritmo clásico, este parámetro no era un problema ya que el tiempo necesario para ejecutar las 100 generaciones propuestas era del orden de  $10[min]$ . Luego, al integrar la etapa de ajustes de parámetros el tiempo aumentó cerca de 10 veces. Mientras que, cada ejecución del presente algoritmo tardaba cerca de 100 veces más que el algoritmo clásico considerando sólo 50 generaciones, un valor equivalente a 2 días. Es por esto, que en lugar de realizar un conjunto con 50 modelos seleccionables, se optó por construir solamente 20. Si bien, con esta medida se tiene una menor cantidad de modelos elegibles, se esperaba que los modelos obtenidos fueran más adecuados que los obtenidos con las otras metodologías, lo que compensaría este hecho.

Considerando todas las medidas utilizadas, se procedió a ejecutar el algoritmo para producir un conjunto de modelos utilizables. La selección del modelo más adecuado se realizó utilizando los criterios descritos anteriormente, pero dado que el nuevo algoritmo tiene como función objetivo aumentar la capacidad de generalización, se colocó énfasis en los criterios de cumplimiento de las restricciones biológicas y selección del modelo con el mínimo error de generalización.

Bajo esas restricciones se determinó que el modelo más adecuado es la función representada en la Ec. 5.4. La simulación de los datos utilizados en la etapa de entrenamiento se muestran en la Figura 5.10, mientras que la simulación de las velocidades iniciales de absorción se indican en la Figura 5.11 y en la Tabla 5.4 se muestran los resultados del análisis estadístico con el método de Jackknife.

$$f(C_0, t) = \frac{\sin\left(\frac{1.8985}{-1353.4534} C_0^{-t}\right) + \left(\frac{C_0}{3.3642} \cdot t^{0.138}\right)}{0.9394^t \cdot 1.1086^{C_0}} \quad (5.4)$$

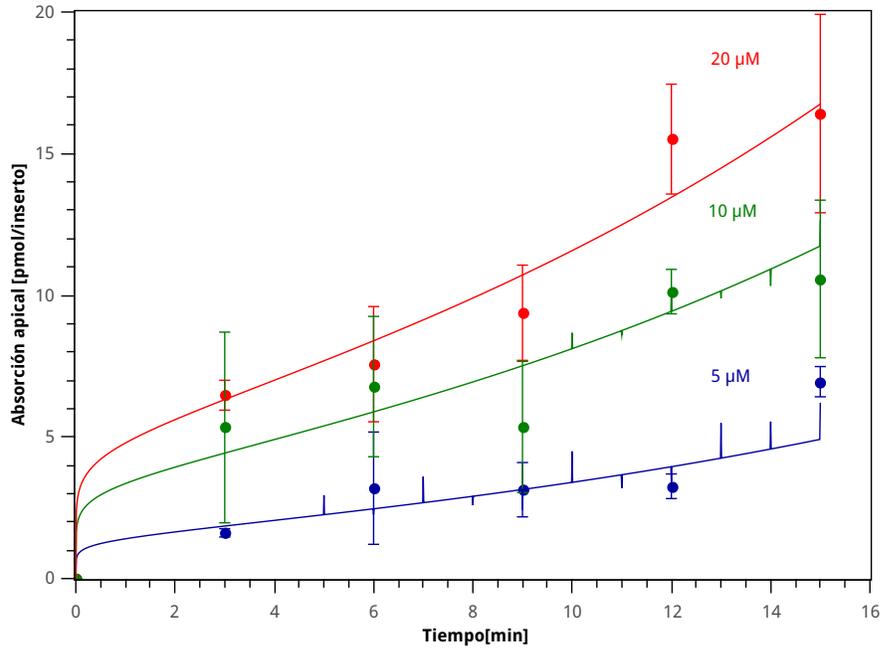


Figura 5.10: Simulación de la absorción apical utilizando el modelo de la ecuación 5.4.

Analizando la Ecuación 5.4 se obtiene que al igual que en los modelos de las Ecuaciones 5.2 y 5.3, se observan componentes no lineales que afectan los flujos de absorción. Esto, como se dijo anteriormente, se debe a la variación de DMT1 en la cara apical a lo largo del ensayo experimental. Si bien se conocía que este fenómeno afectaba el comportamiento de los flujos en los primeros minutos, no se podía afirmar qué tan relevante era.

Si bien, existen componentes oscilatorios en el modelo, es posible ver en la simulación de los datos de entrenamiento que los cambios en la velocidad son menores que los observables en los modelos anteriores. Es más, en la simulación se puede observar que se cumple que las velocidades de absorción siempre son mayores o iguales a cero, tal como debería ocurrir a lo largo del ensayo experimental. No obstante, es posible observar algunas puntas a lo largo de las curvas de absorción, estas se deben al término oscilatorio en la función (Eq. 5.5) la cual además puede presentar una parte imaginaria en algunas evaluaciones, pero no afectan el valor de las evaluaciones de los datos de entrenamiento. En la Figura C.4 se puede observar la simulación de la parte real de esta función en el tiempo, donde se observa que este término en sí mismo presenta violentos cambios a lo largo del tiempo, los que afectan al modelo final. Además, en la Figura C.5 se muestra la simulación del modelo si es que la función 5.5 se retira de la Ecuación 5.4, allí se puede observar que las curvas de absorción son las mismas que las que se muestran en la Figura 5.10 pero sin las puntas observadas y que incluso el coeficiente de determinación es el mismo al retirar dicha función ( $R^2 = 0.85$ ).

$$f_2(C_0, t) = \sin\left(\frac{1.9}{-1353} C_0^{-t}\right) \quad (5.5)$$

Otro factor importante a considerar es que en este caso el coeficiente de determinación es

$R^2 = 0.85$ , el cual es ligeramente menor al coeficiente obtenido para el modelo desarrollado solamente con el ajuste de parámetros. Este resultado era esperable, debido al cambio que se realizó a la función de fitness. En los casos anteriores, esta función consideraba solo la representación de los datos, mientras que el objetivo del nuevo algoritmo era disminuir el error de generalización.

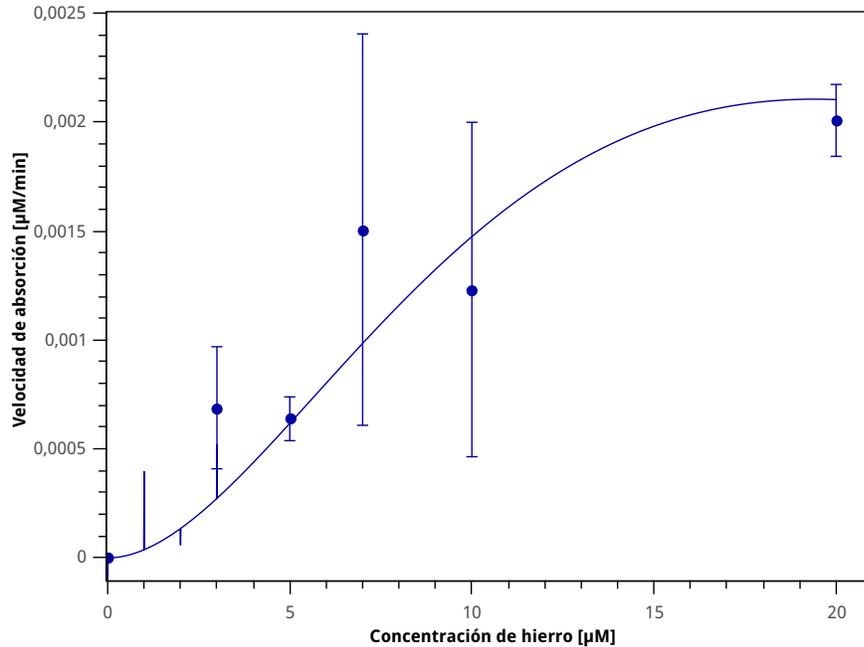


Figura 5.11: Simulación de la velocidad inicial utilizando el modelo de la ecuación 5.4.

La simulación de las velocidades iniciales de absorción (Fig. 5.11), permite observar que finalmente, con este modelo es posible obtener una curva similar a las formas clásicas de velocidades iniciales como Michaelis-Menten o Hill. Es necesario notar que la curva obtenida se asemeja más a una solución de tipo Hill, esto concuerda con el hecho de que DMT1 presenta dos sustratos, es decir el coeficiente de Hill sería diferente de 1 y adoptaría una forma sigmoidea. Si bien, la estructura matemática de la función no es la misma, la representación de los datos es equivalente, ya que se observa una curva suave y no se presentan oscilaciones como en los casos anteriores. Sin embargo, en bajas concentraciones se tienen imprecisiones, similares a las observadas en las curvas de absorción de la Figura 5.10.

Por otro lado, el coeficiente de determinación de la simulación de la Figura 5.11 es igual a 0.61, el cual es mayor a los obtenidos con los modelos anteriores. Este antecedente concuerda con el cambio realizado en la función objetivo, ya que al buscar un modelo que posea una mayor capacidad de generalización tiene como objetivo aumentar la capacidad de predicción del modelo frente a datos que no fueron utilizados durante el entrenamiento. Ahora bien, es necesario acotar el rango de tiempo y concentración en que el modelo es válido, ya que si bien es capaz de representar de buena manera el comportamiento de los flujos en los intervalos utilizados en los datos experimentales, esto no significa que el modelo sea válido para todo tiempo y concentración. Para analizar dicha situación se simuló el modelo de absorción apical

Tabla 5.4: Resultados principales de la validación Jackknife para el modelo de la ecuación 5.4.

Parámetro	Valor	Pseudo-parámetro	Intervalo de confianza
$\beta_1$	1.8985	1.90	$\pm 1.93 \times 10^{-7}$
$\beta_2$	-1353.45	-1353.45	$\pm 2.86 \times 10^{-5}$
$\beta_3$	0.9394	1.19	$\pm 2.62 \times 10^{-1}$
$\beta_4$	3.3642	4.46	$\pm 2.76 \times 10^{-1}$
$\beta_5$	0.138	1.08	$\pm 3.49 \times 10^{-2}$
$\beta_6$	1.1086	1.11	$\pm 6.53 \times 10^{-3}$
<b>Coefficiente de correlación</b>		$MSE_{jk}$	
0.912		1.329	

por 100 [min] (Fig. C.7) y se formó la curva de velocidad inicial hasta los 100 [ $\mu M$ ] (Fig. C.6), en ambos caso fue posible observar que las simulaciones no cumplen con las restricciones biológicas del problema, ya que en el primer caso, la cantidad que traspasa la membrana no debería sobrepasar los 4000 [pmol] en el caso de los 20 [ $\mu M$ ], ya que esa es la cantidad total de hierro en el sistema. Mientras que en segundo caso, la velocidad inicial de absorción decrece drásticamente luego de los 20 [ $\mu M$ ] en lugar de aumentar y alcanzar una velocidad máxima y mantenerse en ese valor. Es decir, no es posible extrapolar los resultados del presente modelo a valores de tiempo y concentración fuera de los estudiados en la sección experimental, el cual es un rasgo típico de los modelos empíricos.

Es posible analizar un poco más el la capacidad de generalización observando los resultados de la Tabla 5.4, donde se declara que el error de generalización de este modelo es  $MSE_{jk} = 1.329$ , un valor menor a los dos modelos encontrados anteriormente. En particular, bastante menor al del modelo realizado solamente con el ajuste de parámetros, lo que indica que, tal como se planteó inicialmente, el cambio propuesto para la función de fitness efectivamente contrarresta el sobreajuste observado con el algoritmo anterior.

En la misma tabla, también se aprecia que los valores de los parámetros del modelo, son muy similares a los pseudo-parámetros, lo que indica que con este conjunto de parámetros es posible obtener el mejor rendimiento disponible con esta función. Además, el orden de magnitud de los intervalos de confianza es menor que el valor de los parámetros, lo que confirma la buena elección de los parámetros. Estas características también se presentaron en el modelo desarrollado sólo con el ajuste de parámetros, ya que es un atributo propio de esta etapa.

Con esta información disponible, es posible deducir que al agregar la etapa de ajuste de parámetros, se obtiene una mayor capacidad de representar los datos experimentales, y además, es posible eliminar la ambigüedad en la definición de los parámetros. Por otro lado, al imponer que la función objetivo sea la minimización del error de generalización, se gana en la capacidad de estimar nuevos datos observacionales, esto último sin perder en gran medida las propiedades de la etapa del ajuste de parámetros. En otras palabras, se obtienen de manera

general, las cualidades esperadas de ambas etapas.

El hecho de minimizar el error de generalización, no es sólo útil en el caso particular de este problema. Si no que la baja capacidad de generalización es uno de los rasgos típicos de los modelos empíricos. Por lo que el algoritmo planteado podría ser utilizado ampliamente en otros casos de modelación, en especial, si es necesario predecir datos que no son utilizados en la etapa de entrenamiento.

Sin embargo, es necesario considerar los costos de esta metodología. Es sabido que el método de programación genética funciona de buena manera, en particular cuando se posee muy poca o nada de información del fenómeno de estudio. Y además, no requiere tantos recursos como un modelo fenomenológico. Sin embargo, en casos como este, donde era necesario un modelo que pudiera representar distintos escenarios y que tuviera concordancia con la fenomenología del problema, se consideró necesario asumir los costos del desarrollo y ejecución del algoritmo final.

### 5.3. Modelo fenomenológico

En la presente sección se mostrará el desarrollo fenomenológico de los flujos de absorción apical. El objetivo de este modelo es, representar los flujos de absorción apical en los escenarios estudiados en la sección experimental, es decir, que pueda determinar la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical, esto acotado a un límite de los primeros 15 minutos de exposición. El modelo debe ser capaz de realizar esta tarea bajo distintos casos como: concentraciones apicales iniciales diferentes, distintas concentraciones iniciales del medio de transmembrana, y poder realizar una simulación de más de una exposición a hierro, tal como se realizó en el experimento de bloqueo mucosal.

A lo largo de esta sección, se mostrarán los pasos que fueron necesarios para alcanzar el modelo fenomenológico final, las estrategias que se utilizaron para construir diferentes modelos, que aunque no cumplieron con las expectativas, entregaron información valiosa para obtener el modelo final.

Dada la complejidad del sistema, se realizaron supuestos que permitieron simplificar el problema, rescatando los componentes y fenómenos más relevantes del sistema. La primera simplificación realizada es que la actividad de FPN puede despreciarse durante los primeros 15 minutos, esto se realizó en base a la información obtenida en la Figura 3.10, donde se muestra que a pesar de que las células han sido incubadas con hierro, es decir, la concentración inicial de hierro al interior de la célula es mayor a cero, la cantidad de hierro transportada al medio apical es muy baja. Además, en el caso de los experimentos desarrollados en este trabajo, en el tiempo  $t = 0$  [min] no existe hierro marcado en el medio de transmembrana, por lo que la actividad de FPN1 sería menor que lo observado en la Figura 3.10.

Otro supuesto importante se relaciona a la actividad de la ferrirreductasa Dcytb. Como se mencionó en la sección experimental, se utilizó Ácido Ascórbico en el medio apical de los ensayos, lo que trae como consecuencia que el hierro permanezca en forma de ion ferroso, por lo que la actividad de la ferrirreductasa también puede ser considerada despreciable.

Con estos supuestos el único componente que permanece en la membrana y que interactúa con el ion ferroso es la proteína DMT1, por lo que se planteó que el modelo de transporte correspondería a un modelo de la actividad de DMT1.

Dado que los ensayos de flujo se realizaron durante 15 minutos, se considera que los mecanismos de control transcripcional, traduccional y sistémico no influyen en el sistema.

Dado que el modelo fenomenológico debe ser lo suficientemente flexible para representar distintos escenarios, se decidió que se utilizaría un modelo de estados de la proteína DMT1, utilizando como un inicio el modelo cinético propuesto por [61], el cual se muestra en la Figura 3.12. Este modelo cuenta con dos vías principales, una de ellas comprende que el flujo de hierro hacia el interior de la célula, está acoplado al flujo de protones que ingresan. Mientras que la segunda vía, solo contabiliza el flujo de hierro, es decir, está desacoplada al flujo de protones.

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos de flujo desarrollados, se estableció un pH idéntico para los medios apical y basolateral para todos los casos, que sería igual a 7. Por lo que, no es posible considerar la concentración de protones como una variable, además, dado que la concentración de protones es muy baja en comparación a la concentración de hierro, la vía que acopla el flujo de hierro y protones fue eliminada del modelo. Con esta medida, permanece solamente la vía de flujo de hierro desacoplada al flujo de protones. Por lo que el modelo reducido consta de 4 estados con reacciones reversibles entre ellos.

El modelo propuesto con las modificaciones se puede observar en la Figura 5.12. El estado  $N_1$  corresponde al transportador vacío y orientado hacia el medio apical, el estado  $N_2$  representa el transportador unido a hierro y aún orientado hacia el medio apical. Luego, el estado  $N_3$  considera el transportador unido al ion ferroso pero orientado hacia el medio intracelular, y finalmente, el estado  $N_4$  representa el transportador que no está unido al metal y que está orientado al medio intracelular.

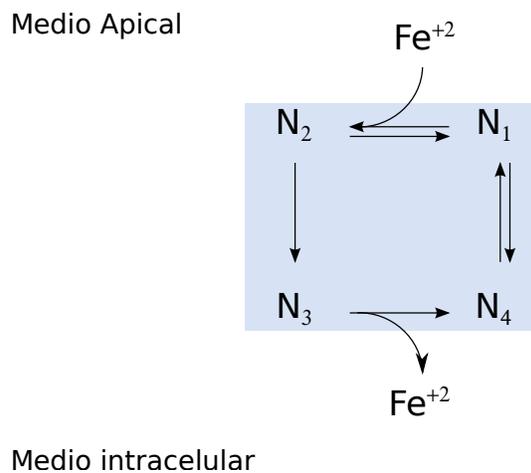


Figura 5.12: Modelo de estados de DMT1 derivado del modelo presentado en bibliografía [61].

Es necesario considerar que existen diferencias sustanciales entre las velocidades de las reacciones planteadas, en particular, el paso del hierro a través de la membrana, es decir, la reacción del estado  $N_2$  a  $N_3$ , la cual se produce debido a los cambios conformacionales de la proteína una vez que se une al hierro. Esta etapa suele ser muy rápida en proteínas transportadoras, por lo que se consideró irreversible.

Es necesario recordar que una vez que el hierro ingresa al citoplasma, puede ser capturado por proteínas chaperonas que lo transporten al medio basolateral o ferritina, o bien, puede unirse a quelatos y formar parte del LIP. Por lo que la concentración disponible en el medio contiguo a la cara apical, es muy baja como para volver a interactuar con la proteína transportadora. Por lo tanto, es posible considerar que el paso del estado  $N_3$  al estado  $N_4$  es irreversible.

Hasta el momento, el modelo ha supuesto implícitamente que la cantidad de DMT1 es constante en el tiempo. Sin embargo que esto no sucede realmente, debido a la endocitosis de

la proteína transportadora. Además, este fenómeno tiene efectos considerables en los flujos de absorción que se requiere analizar, en particular, produce las variaciones en la velocidad de absorción. Por otro lado, como se mostró en la sección de desarrollo del modelo empírico, los modelos creados incorporan componentes oscilatorios que corresponderían a las variaciones de DMT1 en el tiempo.

Para poder incorporar las variaciones de DMT1 en el tiempo, es necesario considerar el proceso de endocitosis de transportadores. Si bien es sabido que existe este proceso, no es posible saber qué factores desencadenan la endocitosis de DMT1. Además, la información respecto a la dinámica con que varía la cantidad de transportador en la membrana, se ve restringida a los resultados mostrados en la Figura 3.15. En dicha Figura, se observa el comportamiento oscilatorio de DMT1, sin embargo los intervalos de tiempo utilizados entre las muestras, son iguales o mayores a lo que tardan los ensayos de absorción realizados en este trabajo. Por este motivo, no es posible considerar la curva obtenida en la Figura B.1.

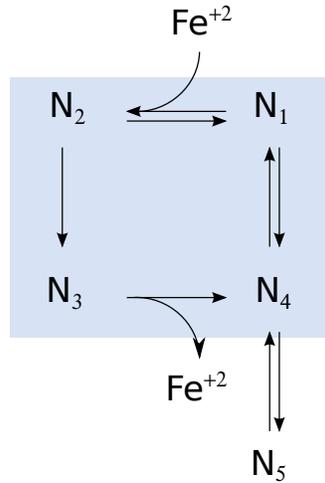
Bajo este escenario, se concluye que es necesario encontrar una forma de representar matemáticamente el fenómeno de endocitosis, aunque no se tenga certeza de la fenomenología del problema. Es decir, acoplar el modelo de estados de DMT1 propuesto en la Figura 5.12, con un set de ecuaciones que permitan representar su oscilación en el tiempo.

Para poder abordar este problema, se utilizó como base el modelo planteado en la Figura 5.12 y se plantearon 4 alternativas para representar la oscilación de DMT1 en el tiempo. A continuación se muestran los modelos planteados, su inspiración, sus principales resultados y conclusiones que permitieron construir el modelo final.

### 5.3.1. Modelo de rampa

En esta sección se detalla la primera aproximación al modelo fenomenológico, en este caso se agregó un nuevo estado de la proteína  $N_5$ , el cual representa la fracción de proteína endocitada, es decir que no está disponible en la membrana. Dado que la proteína tiene la posibilidad de endocitarse y luego fusionarse nuevamente a la membrana apical, se planteó que dicha reacción debe ser reversible. Además, se supuso que el transportador solamente puede endocitarse mientras está vacío y orientado hacia el medio intracelular. Este punto es una simplificación, ya que posible que la proteína sea endocitada en uno o más de los estados representados, sin embargo, agregar más reacciones de endocitosis agregaría más parámetros al modelo, de los cuales no se conoce ninguna restricción, por lo que agregar estos parámetros no producirían una mejor significativa en el modelo. Por lo que se optó por representar solamente la etapa de endocitosis desde el estado  $N_4$ , como la velocidad total de endocitosis. El modelo propuesto en este caso se puede representar esquemáticamente como el modelo de estados de la Figura 5.13.

Medio Apical



Medio intracelular

Figura 5.13: Diagrama de estados del modelo tipo rampa.

Como se definió que el estado  $N_5$  representa la cantidad de proteína endocitada, el problema de representar oscilaciones en la cantidad de membrana, se reduce a representar oscilaciones en el estado  $N_5$ . Para lograr esto, una de las representaciones matemáticas más simples, es forzar el cambio de las constantes de velocidad de la reacción  $N_4 \leftrightarrow N_5$  en el tiempo.

Para esto se definió el periodo de la onda como  $t^*$ , luego este tiempo se dividió en 4 segmentos. En el primer segmento se considera la constante de velocidad del paso de  $N_4$  a  $N_5$  ( $k_{45}$ ) es positiva, mientras se impone que la constante de la reacción opuesta  $k_{54}$  es igual a cero, de esta manera la cantidad de  $N_5$  aumenta. En el segundo segmento ambas constantes son igualadas a cero, por lo que la cantidad de  $N_5$  permanece constante. En el tercer segmento  $k_{54}$  es un valor positivo, mientras que se impone que  $k_{45}$  es igual a cero, de manera que disminuya  $N_5$ . Y en el cuarto segmento, nuevamente  $k_{45}$  y  $k_{54}$  son igualadas a cero. De esta manera se estimula una oscilación en la variable  $N_5$ , sin embargo, dado que se fuerza una discontinuidad en las velocidades entre los segmentos, la forma de la curva es similar a una rampa (Figura D.1 de Anexos).

Se realizó un ajuste de parámetros para las ecuaciones diferenciales derivadas de la Figura 5.13. Las ecuaciones y los parámetros obtenidos en el ajuste se pueden encontrar en la sección de D.1. Mientras que en la Figura 5.14 se puede observar la simulación de los flujos de hierro en el tiempo, a distintas concentraciones. En esta Figura se puede ver que efectivamente se presentan cambios considerables en las velocidades de absorción en el tiempo, además estos cambios se hacen más evidentes a medida que la concentración en el medio apical aumenta. Por otro lado, el coeficiente de determinación de esta simulación es  $R^2 = 0.849$ , por lo que se puede decir, que aunque la metodología utilizada para plantear la oscilación de DMT1 es simple, se logra representar adecuadamente los datos experimentales.

En la Figura 5.15 se puede observar la distribución de los estados del modelo planteado,

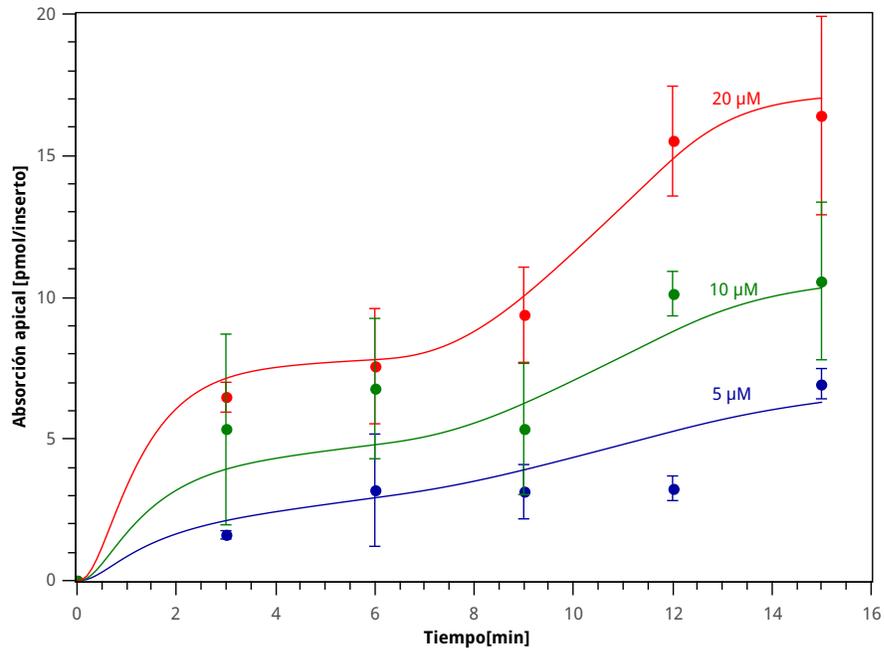


Figura 5.14: Simulación de la absorción apical con el modelo tipo rampa y su comparación con datos experimentales  $R^2 = 0.849$ .

en ella se observa que efectivamente el estado  $N_5$  posee un comportamiento similar a una rampa. Además, el estado  $N_4$  presenta cambios considerables en su distribución, mientras que los estados restantes permanecen en un muy bajo porcentaje a lo largo del tiempo.

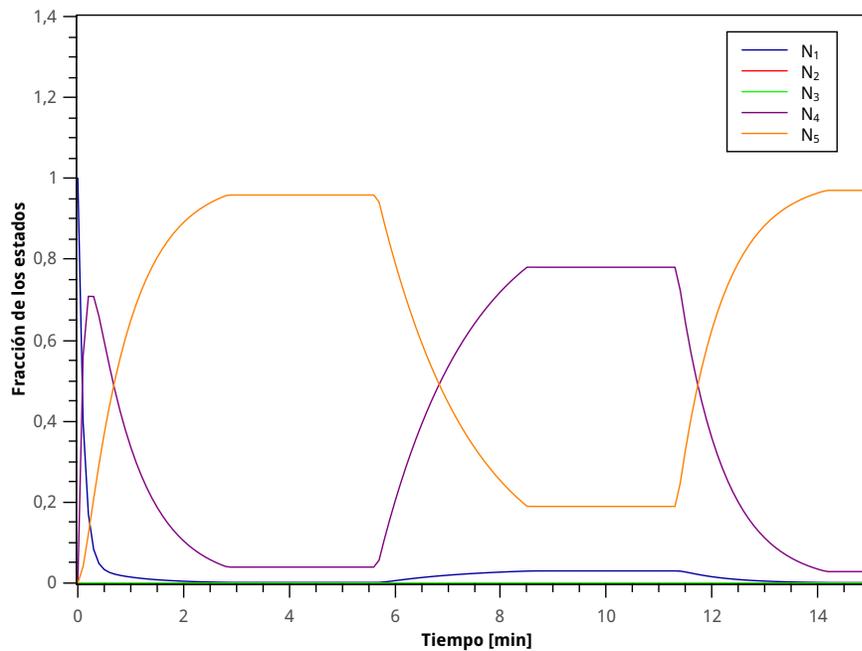


Figura 5.15: Distribución de los estados del modelo tipo rampa ( $20[\mu M]$ ).

En la Figura 5.16 se puede observar la distribución de la proteína presente en membrana y la proteína endocitada. Allí se puede notar que a pesar de que existe una cuantiosa

disminución de DMT1 en la membrana apical, siempre existe un remanente cercana al 5% del valor inicial.

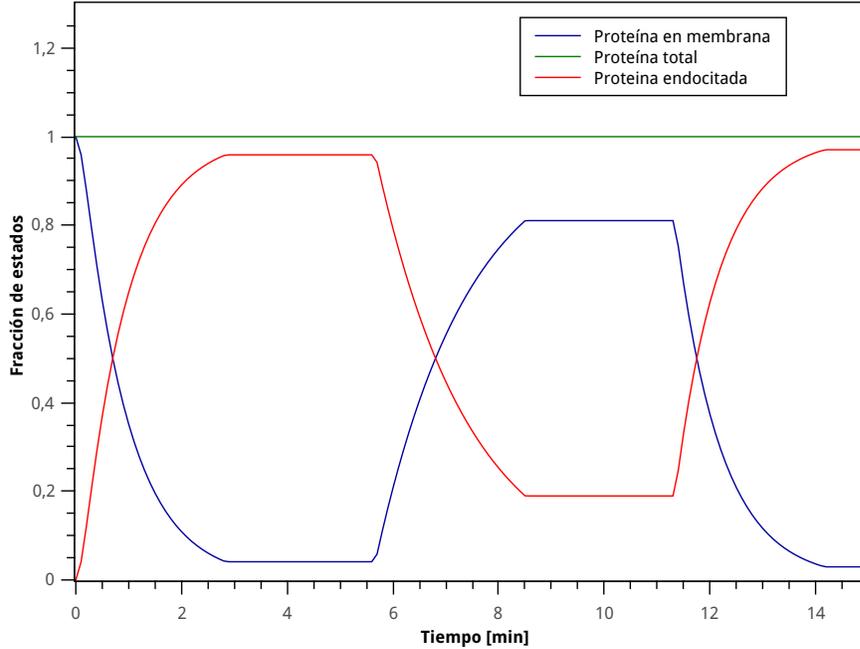


Figura 5.16: Conservación de la cantidad de proteína total del modelo tipo rampa.

En la misma Figura se observa que el periodo de la onda, el cual fue ajustado durante la optimización de parámetros, es cercano a los 11 minutos, un tiempo menor a los intervalos de muestreo utilizados en los ensayos de biotinilación de la Figura 3.15. Además, en la Figura 5.17 es posible comparar esos datos experimentales con la simulación del presente modelo. En ella es posible notar que el segundo dato experimental, correspondiente al tiempo  $t = 15[\text{min}]$  es igual al valor predicho por el modelo, sin embargo, la diferencia entre los punto experimentales y la curva predicha aumenta a lo largo del tiempo. Esta diferencia puede deberse a muchos factores asociados a la simplicidad del modelo utilizado, como por ejemplo, la restricciones de que el período de la onda es constante e igual para todas las concentraciones.

Es posible evidenciar dichas restricciones en la Figura 5.18, donde se muestra la cantidad de  $N_5$  para distintas concentraciones apicales en el tiempo. Asimismo, es posible notar que mientras mayor es la concentración apical inicial, la amplitud de la onda aumenta. Esto sugiere que la concentración de hierro en el medio intracelular, no solo desencadenaría la endocitosis de DMT1, si no que determinaría la cantidad de DMT1 que debe ser retirada de la membrana. Esto podría producirse por ejemplo, en el caso que el hierro fuera parte de una cadena de reacciones enzimáticas que se saturan solamente bajo altas concentraciones de hierro.

Un punto interesante de analizar, es que este tipo de modelo permite simular los experimentos del bloqueo mucosal. En la Figura 5.19 se observa la comparación entre los datos experimentales de dicho ensayo y su respectiva simulación. En ella se puede distinguir que, si bien el modelo predice una curva de forma similar, existe un desplazamiento en el tiempo. Este fenómeno, al igual que la Figura 5.17, puede deberse a la simplicidad del modelo

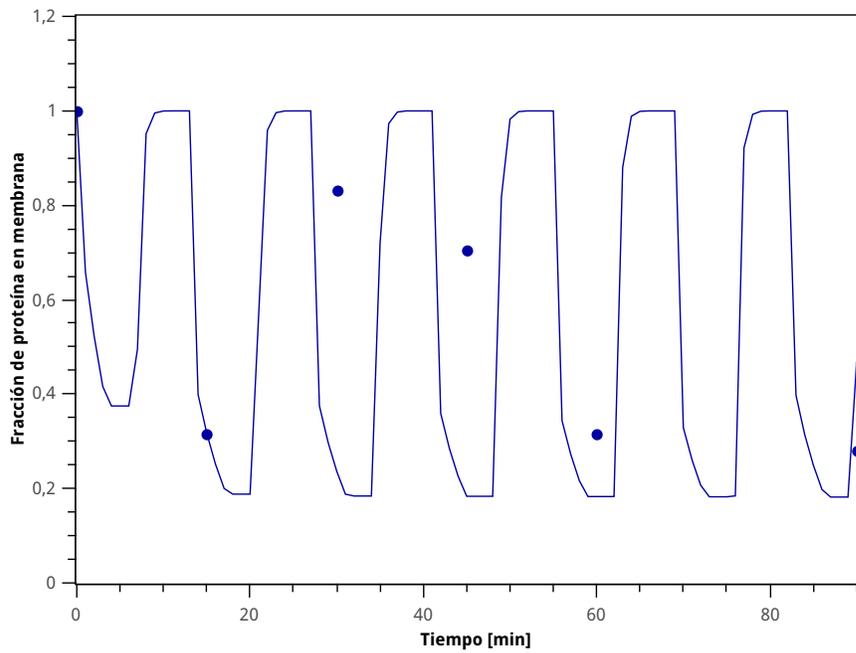


Figura 5.17: Simulación de la fracción de proteína en membrana en el tiempo del modelo tipo rampa. La línea continua corresponde a la simulación, mientras los círculos representan los datos obtenidos del ensayo de biotilación (Fig. B.1).

planteado.

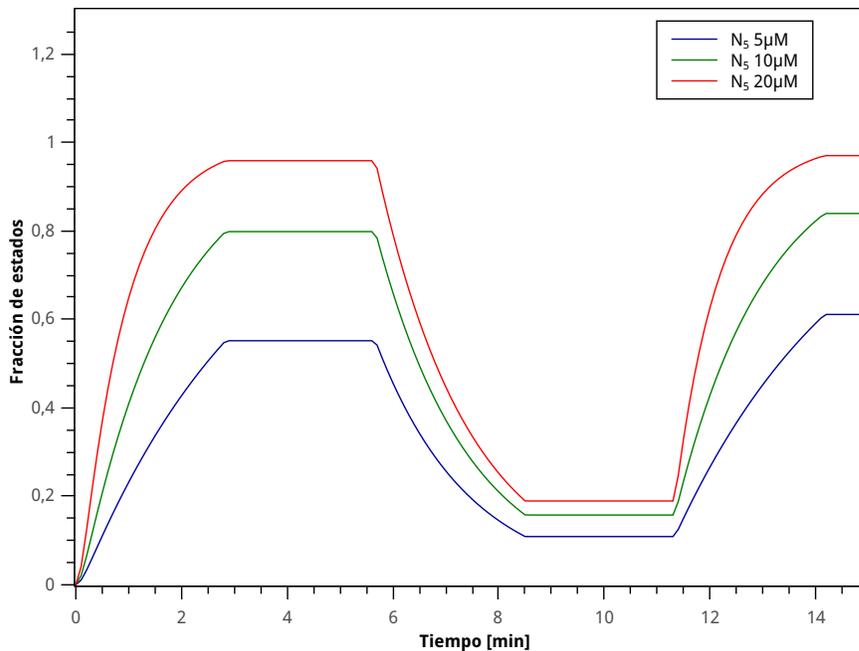


Figura 5.18: Fracción de proteína endocitada a distintas concentraciones según modelo tipo rampa.

A partir de los resultados obtenidos con este modelo, es posible aportar más antecedentes a la hipótesis acerca de que el movimiento de transportadores es la causa más probable

de los cambios de velocidad observados en los flujos. Asimismo, fue posible mostrar que a partir de un modelo simple, donde se fuerza al sistema a producir oscilaciones, es posible representar tanto los datos experimentales utilizados para el ajuste de parámetros, como los datos experimentales anexos al fenómeno principal. No obstante, este modelo, posee inconvenientes, ya que posee discontinuidades en la velocidad, y no plantea ninguna base biológica para este comportamiento

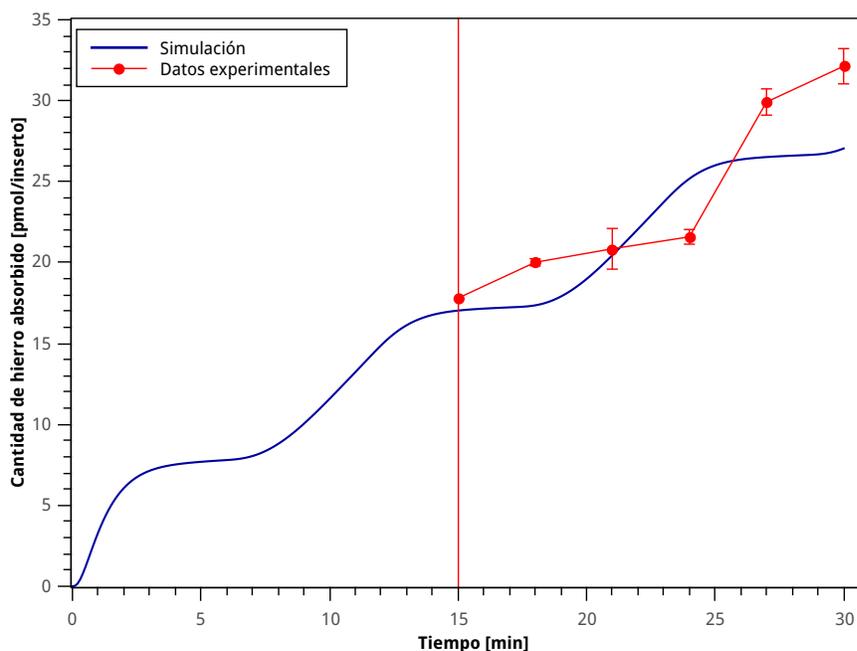


Figura 5.19: Simulación de resultados de experimentos de bloqueo según modelo tipo rampa.

Siguiendo estos lineamientos, a continuación se muestra un modelo planteado a partir de una base fenomenológica, sus principales características y resultados.

### 5.3.2. Modelo LIP (Labile Iron Pool)

En la presente sección se enseña una nueva alternativa para representar las oscilaciones de DMT1 en la membrana apical. En esta ocasión se plantea un modelo que incluye los fenómenos más relevantes para la absorción de hierro conocidos hasta el momento. Dado que no se conoce a ciencia cierta la dinámica de estos fenómenos, se realizaron nuevos supuestos y estimaciones para poder definir el modelo.

Para la definición de este modelo se planteó que existían tres fenómenos relevantes que se debían integrar:

1. Una vez que el hierro ingresa a la célula, éste interactúa con proteínas u otros componentes, en lugar de quedar libre en el citoplasma. Esto trae como consecuencia una disminución de la concentración de hierro en el medio intracelular contiguo a la

membrana. Esto se podría interpretar un ingreso de hierro a un compartimento, desde donde no puede volver a la membrana citoplasmática, pero está disponible para otras funciones celulares. Tal como lo haría al interactuar con el LIP.

2. Una vez que la proteína es endocitada, puede ser transportada hacia el extremo basolateral, o bien, fusionarse con otros endosomas presentes en el medio intracelular. En cualquiera de estos casos, debe existir un tiempo de retardo en el ciclaje de DMT1 a lo largo de la célula, de manera de transportar el endosoma a través de la célula.
3. La endocitosis de DMT1 está desencadenada por el transporte de hierro. Es decir, es necesario que la proteína interactúe con el metal para poder ser endocitada. Para poder representar esto y contabilizar adecuadamente la absorción de hierro, se impuso que la proteína solamente podía endocitarse una vez que se encuentra en el estado  $N_3$ , liberar inmediatamente el hierro al citoplasma y posteriormente volver a fusionarse con la membrana apical estando vacía.

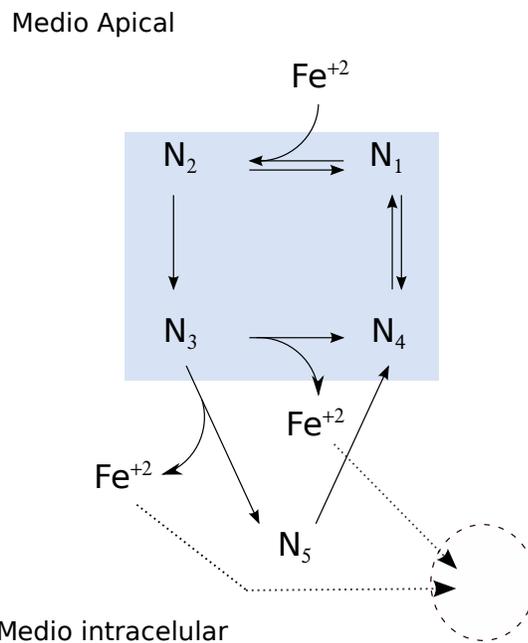


Figura 5.20: Diagrama de estados de modelo tipo LIP.

Se pueden simbolizar estos fenómenos en la Figura 5.20. En ella se puede ver la inclusión de un nuevo compartimento (figura punteada) y la interacción del estado endocitado con la proteína en membrana. Además, se planteó un tiempo de retardo  $\tau$  para la reacción entre el estado  $N_5$  y  $N_4$ , de manera de simular el tiempo que tarda en volver un endosoma a la cara apical. El detalle de las ecuaciones se presenta en la sección D.2 de Anexos.

Con este modelo se esperaba producir oscilaciones en la cantidad de hierro libre, en el medio contiguo a la célula, y que estos cambios de concentración indujeran una oscilación de la cantidad de DMT1. Específicamente, se esperaba que en los primeros minutos aumentara drásticamente la cantidad de hierro libre. Este aumento tendría como primera consecuencia, la disminución de DMT1 en la cara apical. Y segundo, el aumento de hierro en el compartimento, lo que a su vez disminuiría la cantidad de hierro libre. Una vez que la cantidad de hierro vuelve

a disminuir, los transportadores podrían volver a la membrana con un tiempo de retardo  $\tau$ . Una vez que DMT1 volviera a cantidad inicial en la membrana, el ciclo se repetiría.

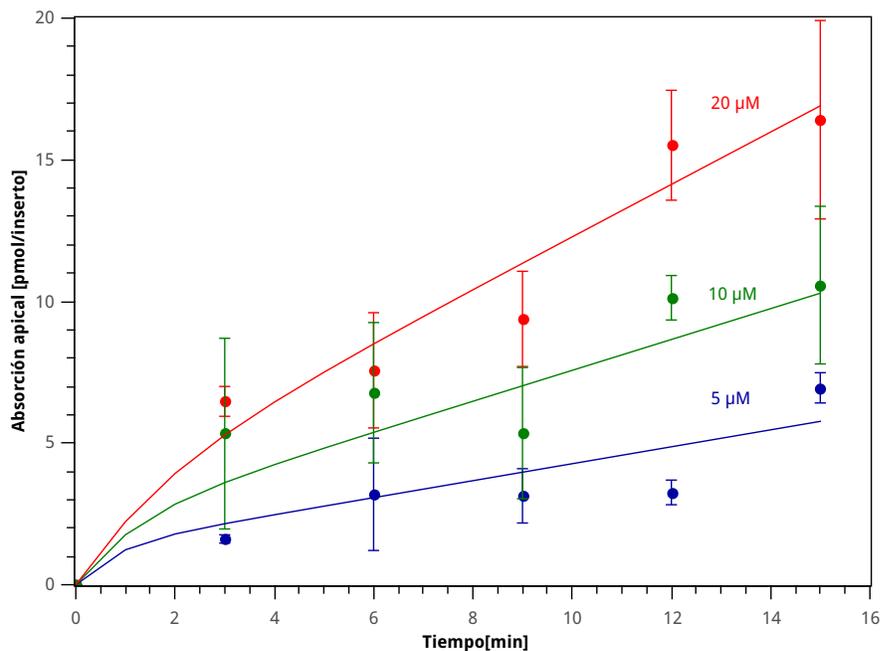


Figura 5.21: Simulación de la absorción apical con el modelo tipo LIP y su comparación con datos experimentales  $R^2 = 0.84$ .

La simulación de los datos experimentales de este modelo se puede ver en la Figura 5.21. En ella se aprecia que las curvas de absorción son similares a una curva de la primera ley Fick. Es decir, la velocidad de absorción disminuye a lo largo del tiempo, sin embargo, esto no logra representar los aumentos de velocidad que se observan a lo largo de los ensayos.

En la Figura 5.23 se puede observar la distribución de los estados del modelo planteado. En ella se puede ver claramente que se alcanza rápidamente un estado estacionario para las variables, además, el estado  $N_5$  no muestra cambios significativos a lo largo del tiempo. Por lo que no es posible utilizar este modelo para representar el fenómeno estudiado.

Para analizar por qué el modelo no presenta oscilaciones, se construyó la Figura 5.23, en donde se observa que el hierro ingresa al compartimento de manera casi lineal, mientras que el hierro libre aumenta hasta los 3 minutos, y luego, desciende muy lentamente a lo largo del tiempo. Es decir, existe un acercamiento a una oscilación en la concentración de hierro en los primeros minutos, sin embargo esta oscilación no presenta la amplitud, ni la permanencia en el tiempo necesaria para inducir una oscilación en la cantidad de DMT1.

Este modelo se simuló con distintas variaciones donde se incluían feedback positivos y negativos en algunas de las reacciones, sin embargo, en todos los casos se obtuvieron resultados similares a los presentados en las Figuras 5.21, 5.22 y 5.23. Es necesario considerar que este modelo presentaba una alta cantidad de supuestos, esto se debió a que se conoce muy poco acerca de los componentes, las interacciones y las fuerzas motrices involucradas en la endocitosis de DMT1. Por lo que es posible decir que, con los elementos e interacciones

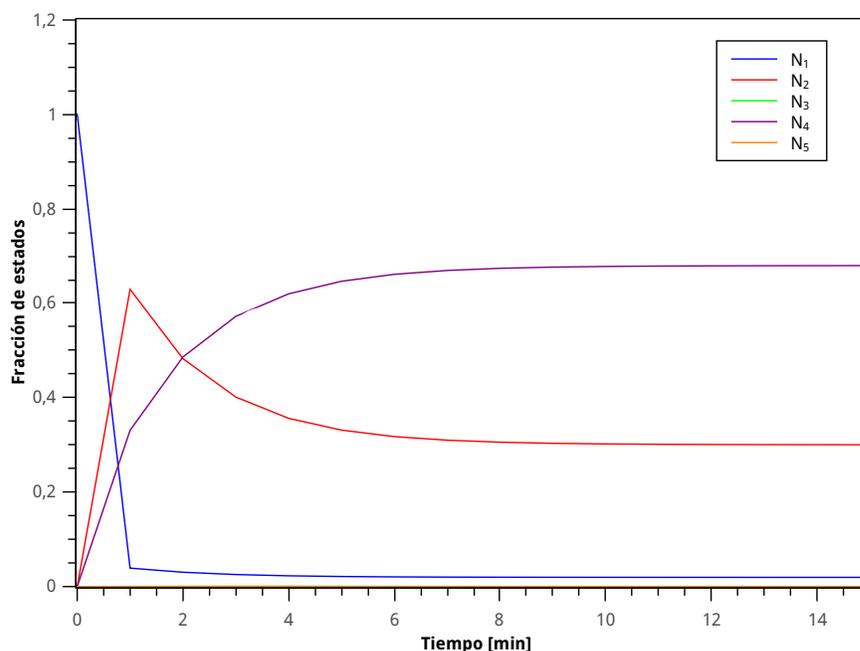


Figura 5.22: Distribución de estados del modelo tipo LIP ( $20[\mu M]$ ).

considerados en este modelo, no es posible establecer un modelo fenomenológico del sistema.

Basándose en este hecho, se decidió plantear nuevas alternativas para representar el sistema. Esta vez, las alternativas propuestas son en base a modelos químicos o biológicos simples que describen sistemas oscilatorios. En específico se plantearon dos modelos, el modelo de Lotka-Volterra y el modelo de Ball, los cuales son reconocidos por su simplicidad y efectividad. El desarrollo de estos modelos se presenta en las secciones siguientes.

### 5.3.3. Modelo Lotka-Volterra

En esta sección se presenta el desarrollo del modelo inspirado por las ecuaciones de Lotka-Volterra para representar oscilaciones. El modelo Lotka-Volterra, fue originalmente diseñado para representar los cambios en las distribuciones de poblaciones tipo predador y presa. Sin embargo, el modelo original no sigue las características de las reacciones químicas, por lo que se utilizó la adaptación de este modelo para reacciones.

La versión utilizada del modelo de Lotka-Volterra posee 4 componentes relacionados por reacciones irreversibles. Como se detalló en la sección 3.2.6, dos de estos componentes siguen manteniendo la lógica de la interacción presa-depredador. Es por esto que es necesario establecer cuáles son estos componentes en el sistema estudiado. La primera opción sería que el hierro fuese la presa, mientras el predador fuese la proteína endocitada, ya que es el metal el que desencadena la endocitosis. No obstante, no es posible establecer una reacción de transformación de hierro en la proteína endocitada. Además, para seguir el comportamiento presa-depredador, ambos componentes deben oscilar en el tiempo, y tal como se observa en

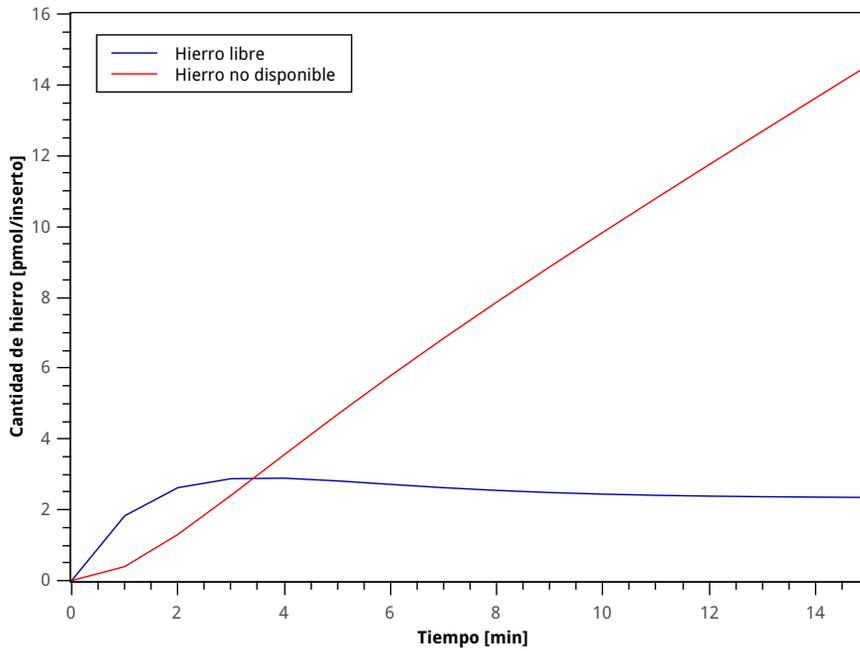


Figura 5.23: Distribución del hierro entre el medio contiguo a la cara apical (hierro libre) y el compartimento (hierro no disponible).

los datos experimentales, la curva de absorción es estrictamente creciente.

### Medio Apical

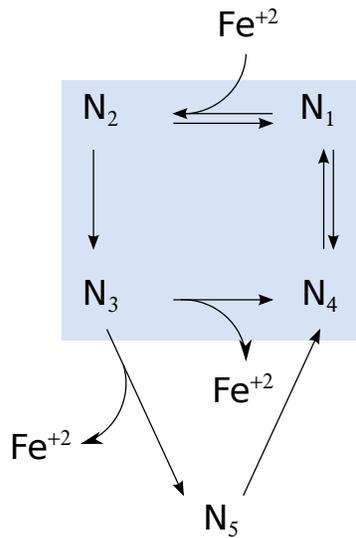


Figura 5.24: Diagrama de estados del modelo tipo Lotka-Volterra.

Dada esta situación, es posible establecer que el representante de la presa es uno de los estados presentes en la membrana, específicamente uno que interactúe con el hierro. Es por esto que el estado definido como presa es  $N_3$ , mientras que el depredador es representado por el estado  $N_5$ . De esta manera ambos oscilarían en el tiempo. La representación de estados de

este modelo se muestra en la Figura 5.24. Mientras que las ecuaciones diferenciales derivadas se presentan en la sección D.3.

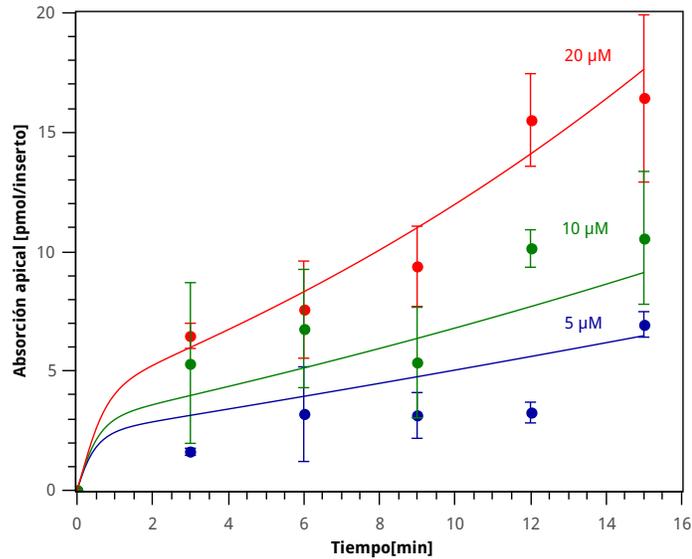


Figura 5.25: Simulación de la absorción apical con el modelo tipo Lotka-Volterra y su comparación con datos experimentales  $R^2 = 0.82$ .

La simulación de la absorción apical se muestra en la Figura 5.25, en ella se puede observar que, al igual que el modelo tipo LIP, la velocidad de absorción decrece permanentemente en el tiempo. Por lo que este modelo no es capaz de representar las características del fenómeno, aunque el coeficiente de determinación sea  $R^2 = 0.82$ . Asimismo, se muestra en la Figura 5.26 que los estados del modelo, alcanzan rápidamente un estado estacionario. De la misma manera,  $N_5$  permanece en una baja fracción de la proteína total a lo largo del ensayo.

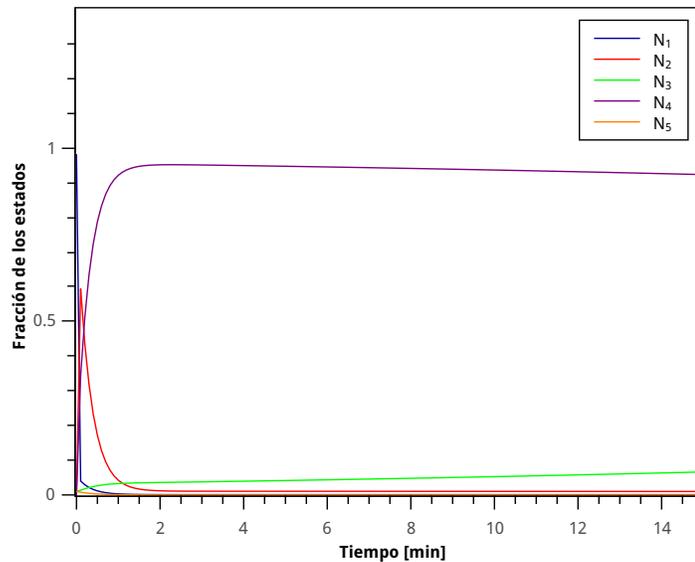


Figura 5.26: Distribución de estados del modelo Lotka-Volterra ( $20[\mu M]$ ).

Si se observa el diagrama de estados de la Figura 5.24, es posible notar que, si bien se

cumplen las características básicas de la cadena de reacciones de Lotka-Volterra, también existen interacciones entre los componentes que son propias del modelo. Como por ejemplo, el paso directo de  $N_3$  a  $N_4$ , la cual podría influir en el desempeño del modelo.

Por otro lado, es necesario considerar las condiciones iniciales determinadas, ya que en principio, se impuso que DMT1 en ese momento solo se encontraría disponible en el estado  $N_1$ . Sin embargo, para poder simular el presente modelo se planteó que un 1 % de la proteína se encontraría en el estado  $N_3$  y otro 1 % en el estado endocitado. De esta forma, se permite la variación de los estados  $N_3$  y  $N_5$ . Es posible que al aumentar las fracciones de estos estados en el momento inicial, se produzca una oscilación a lo largo del tiempo, sin embargo no existe ninguna información reportada acerca de una relación cuantitativa entre la proteína y la proteína en membrana.

### 5.3.4. Modelo auto-catalítico

En la siguiente sección se presenta el modelo fenomenológico final, su desempeño, las razones por las cuales se escogió este modelo, sus principales aciertos, las nuevas preguntas que se formulan a partir de él y una comparación con el modelo empírico construido.

Anteriormente, se mostró que no es posible representar las oscilaciones de la cantidad de DMT1 utilizando una orientación fenomenológica. Por lo que se probó un modelo biológico que representa oscilaciones naturalmente, y luego se incorporó al modelo principal de DMT1, sin embargo, este método no pudo alcanzar los objetivos esperados. En este nuevo modelo, se intenta una metodología muy similar a la utilizada en la construcción del modelo Lotka-Volterra. En este caso se espera que un modelo de reacciones auto-catalíticas permita capturar la fenomenología del problema.

El modelo catalítico utilizado, fue presentado originalmente por Ball [64] para representar reacciones químicas oscilatorias. Este consta de 3 compuestos, la cantidad mínima de componentes que debe contemplar un sistema oscilatorio, los cuales conforman un ciclo de reacciones auto-catalíticas, de allí el nombre del modelo. Este modelo ha sido categorizado como, uno de los modelos oscilatorios más simples y con significado identificable. Esta es la principal razón para su utilización.

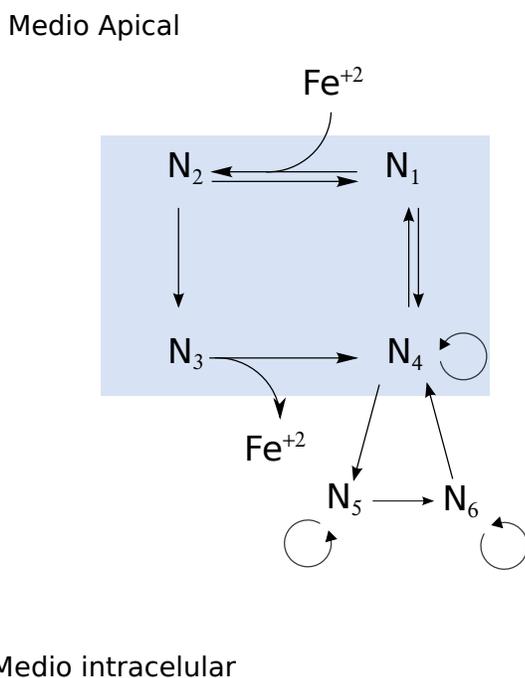


Figura 5.27: Diagrama de estados del modelo auto-catalítico.

En la Figura 5.27 se puede ver como se incluyeron estas reacciones en el modelo de DMT1. Para realizar esta tarea, se interfirió lo menos posible en la estructura de las reacciones auto-catalíticas. En especial fue necesario incorporar dos estados de proteína endocitada en lugar de uno, como se había realizado en los modelos anteriores. Una vez más, se utilizó el supuesto

de que la proteína solo puede endocitarse cuando está en el estado  $N_4$ . En este caso, se prefirió el estado  $N_4$  en lugar del estado  $N_3$ , ya que con este último estado la curva de absorción toma una forma diferente. Para evitar que el modelo presente oscilaciones aunque no exista hierro en el medio, se ponderó la velocidad de endocitosis, desde  $N_4$  a  $N_5$ , por la concentración de hierro en el medio apical.

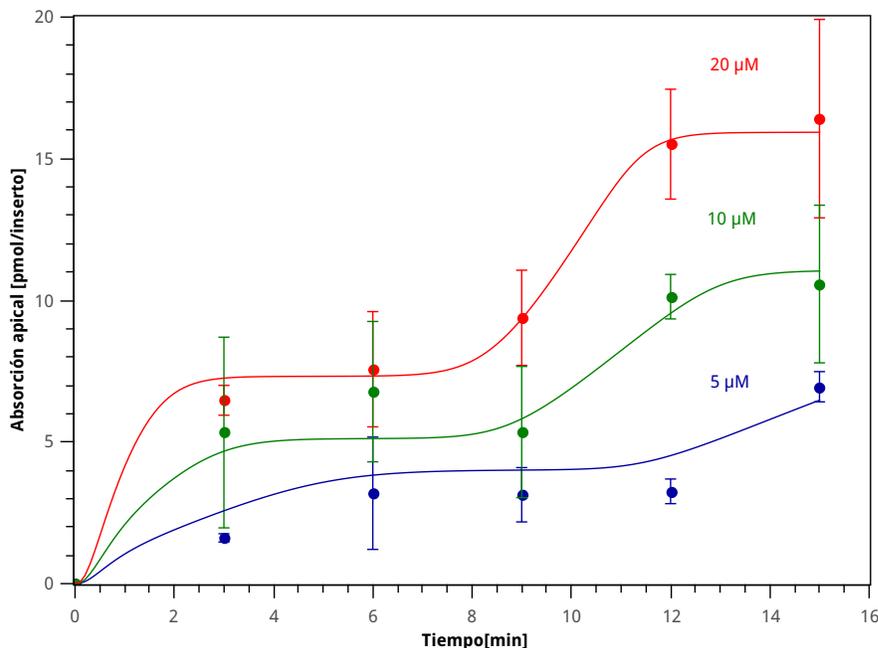


Figura 5.28: Simulación de la absorción apical del de modelo auto-catalítico y su comparación con datos experimentales  $R^2 = 0.878$ .

En la Figura 5.28 se presenta la simulación de la absorción apical, en ella es observable la variación de las velocidades de absorción a lo largo del tiempo. Además, es posible notar que estas variaciones son más evidentes a medida que aumenta la concentración apical. Para analizar más las características oscilatorias del modelo, se puede observar la Figura 5.29, donde se muestra la distribución de los estados del modelo a lo largo del tiempo. En ella se puede ver que, de manera similar al modelo auto-catalítico de Ball, las concentraciones de los estados  $N_4$ ,  $N_5$  y  $N_6$  alcanzan un peak consecutivamente, y no de manera coordinada. Es decir, es posible ver un aumento del estado  $N_4$  hasta ser el estado con mayor porcentaje de aparición, luego este disminuye, trayendo como consecuencia el aumento del estado  $N_5$ , el cual sufre una trayectoria similar, hasta producir el aumento de  $N_6$  y finalmente volver al estado  $N_4$  para completar el ciclo.

Es necesario notar que, para el caso de concentración apical  $20[\mu M]$ , en el mismo rango de tiempo en que vuelve a aumentar el estado  $N_4$ , es decir, entre los 7 y 11 minutos, se observa también un aumento del estado  $N_1$ . Esto conlleva un aumento en el transporte de hierro. Esta característica se puede observar, en el aumento de la velocidad de absorción entre los 8 y 12 minutos en la Figura 5.28.

Es interesante realizar una comparación entre la cantidad de proteína endocitada y la cantidad de proteína en membrana. De esta forma se puede discernir la distribución en el

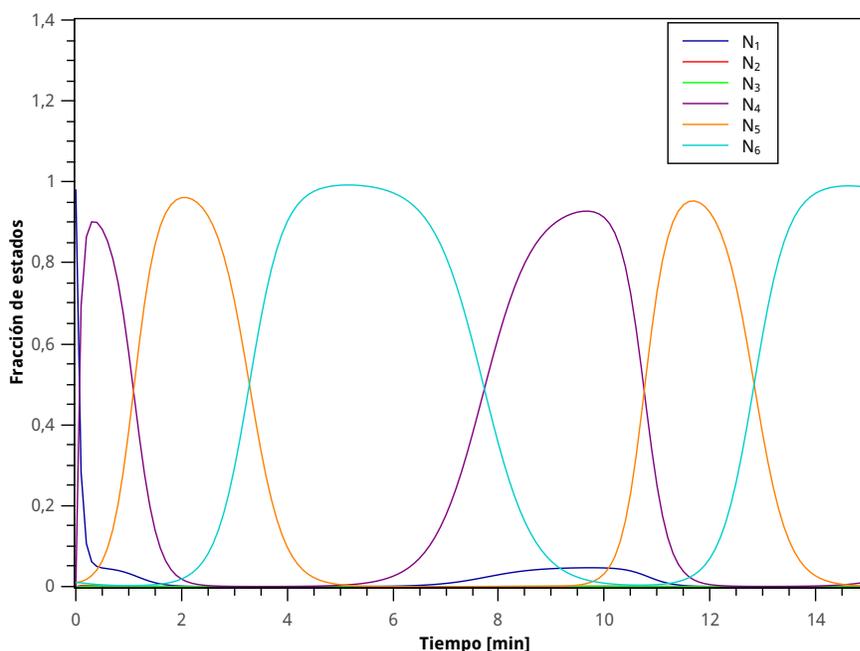


Figura 5.29: Distribución de los estados del modelo de rampa ( $20[\mu M]$ ).

tiempo de cada una de ellas, es posible visualizar este resultado en la Figura 5.30. Allí se observa que durante la simulación, más de la mitad del tiempo la proteína permanece endocitada.

Otra característica relevante de la Figura 5.30, es el hecho de que en el caso de  $20[\mu M]$ , la fracción de proteína endocitada varía rápidamente desde cero a uno. Es decir, la fracción de proteína pasa muy rápidamente de estar en la membrana a permanecer endocitada, es más, entre los 3 y 5 minutos la cantidad de proteína que permanece en membrana es prácticamente cero. Posteriormente, entre los 6 y 8 minutos, prácticamente todas las proteínas vuelven a estar en la membrana. Esto denota que este mecanismo está altamente controlado.

En la Figura 5.31 se puede observar la cantidad de proteína endocitada en el tiempo, al variar la concentración apical de hierro. En ella se observan dos cosas interesantes. Primero, que a pesar de variar la concentración de hierro, la amplitud de la oscilación es muy similar en todos los casos, esto denotaría que el mecanismo de endocitosis se desencadenaría con una baja concentración de hierro apical, y no necesariamente a altas concentraciones. Segundo, el periodo de la oscilación difiere según la concentración en el medio apical. Ya que, se observa que a menor concentración, mayor es el período de la oscilación, es decir, el proceso de salida de la proteína desde la membrana y su posterior regreso, se acelera al aumentar la concentración apical. Esto puede deberse a que la velocidad de endocitosis, específicamente la velocidad del paso desde el estado  $N_4$  al estado  $N_5$  está ponderada por la concentración de hierro en el medio apical. Esto aceleraría el proceso de endocitosis con la concentración. Sin embargo, para poder establecer una razón fenomenológica acerca de esta observación, sería necesario conocer los componentes que desencadenan el fenómeno.

En la Figura 5.32, se enseña la simulación de la cantidad de proteína que permanece

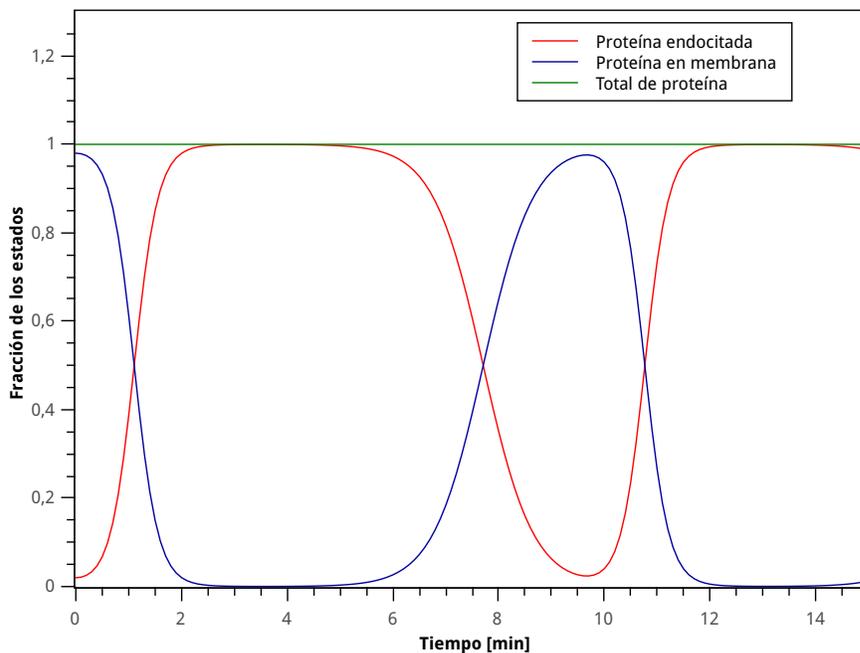


Figura 5.30: Conservación de cantidad de proteína del modelo auto-catalítico.

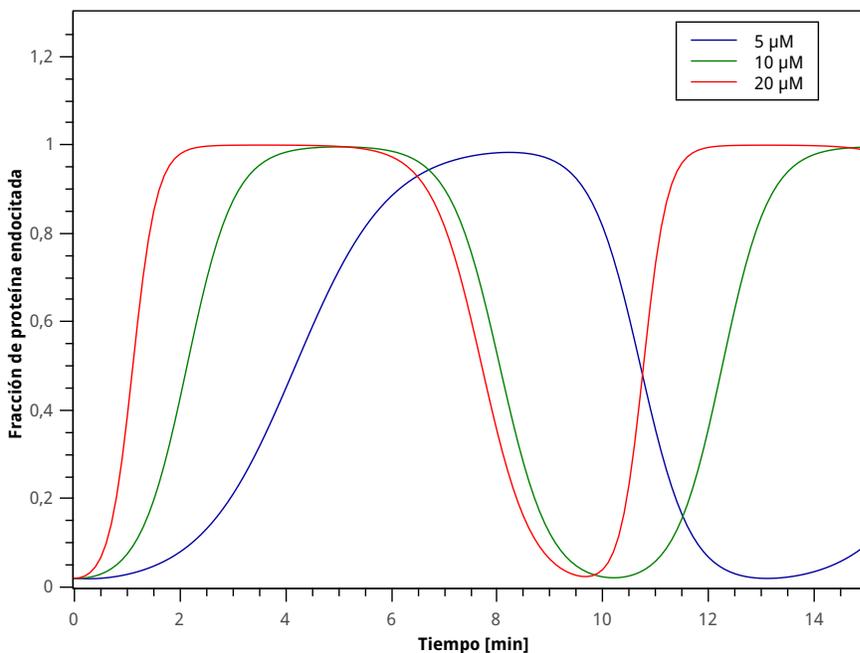


Figura 5.31: Proteína endocitada a distintas concentraciones según modelo auto-catalítico.

en la membrana a lo largo del tiempo. En esta ocasión, la simulación busca comparar los datos obtenidos experimentalmente en los ensayos de biotilación (Fig. 3.15), con los resultados determinados con el modelo. En la Figura es posible observar que la simulación no captura totalmente los datos experimentales. Es posible explicar estas discrepancias, debido a múltiples factores. Primero, como se ha mencionado anteriormente, los ensayos realizados con células Caco-2 presentan una variabilidad natural, lo que podría haber afectado tanto la

cantidad de DMT1 en membrana determinada, como el tiempo en que se endocita la proteína. Por otro lado, para ajustar los parámetros del presente modelo, se utilizaron solamente datos de los primeros 15 minutos, por lo que hay fenómenos que probablemente no puedan notarse durante ese tiempo, pero que sean relevantes en los minutos posteriores, como por ejemplo, que la amplitud o el período de la oscilación varíen en el tiempo.

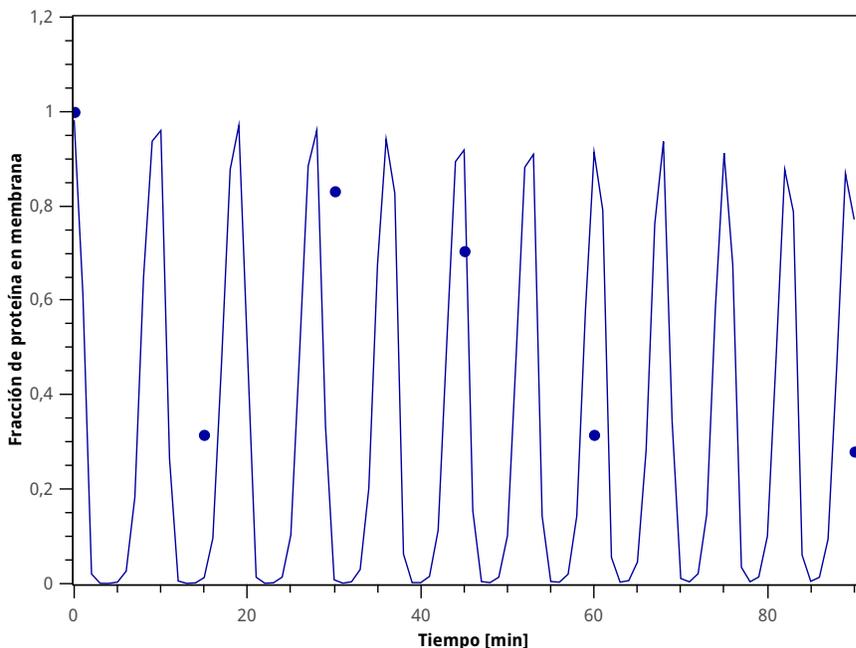


Figura 5.32: Simulación de la cantidad de proteína en membrana en el tiempo. Los círculos corresponden a los datos experimentales determinados en los ensayos de biotinilación de la Figura 3.15 y la curva corresponde a la simulación del modelo.

Una característica importante de analizar, es el hecho de que como se observa en la Figura 5.32, a lo largo del tiempo, existe una ligera disminución de la amplitud de la oscilación. Esto indicaría que a medida que transcurre el tiempo, una mayor cantidad de proteína que permanece endocitada, esto es interesante, ya que indicaría que a largo plazo la cantidad de proteína en membrana disminuye, sin volver al estado inicial. La disminución progresiva de DMT1 en la membrana concuerda con los mecanismos de control de tipo traduccional, los cuales actúan disminuyendo la traducción de DMT1 en un tiempo cercano a los 60-90 minutos. Otro factor a considerar es la concentración a la que se desencadena esta reacción, ya que si se gatilla a una baja concentración y la oscilación de DMT1 permanece por un largo tiempo en el sistema, indicaría que la endocitosis de DMT1 se efectuaría casi permanentemente en el sistema. Sin embargo, no es posible aseverar este tipo de conclusiones, debido a que no existen suficientes datos experimentales que confirmen estas hipótesis. Es por este mismo motivo, que se plantea la necesidad de indagar con mayor profundidad este fenómeno, de manera experimental.

Es posible realizar una comparación entre la curva de ajuste obtenida en base a los ensayos de biotinilación (Fig. B.1) y la simulación de la Figura 5.32. Entre las Figuras existe claramente una discrepancia entre las dinámicas planteadas, ya que tanto la amplitud como el período de la onda difieren enormemente. En el caso de la Figura B.1, se planteó una

curva solamente en base a los datos experimentales propuestos, mientras que la simulación del modelo, corresponde a una predicción de datos que no fueron utilizados para el ajuste del modelo, por lo que era esperable que existieran discrepancias. Sin embargo, el mayor factor que influye en estas diferencias son los intervalos de tiempo que fueron utilizados para analizar el fenómeno. En el caso de la Figura B.1, los intervalos son de entre 15 y 30 minutos, mientras que en el ensayo de absorción los intervalos son de 3 minutos, por lo que es posible observar detalladamente los cambios que ocurren en el sistema. Estos cambios no eran visibles en los ensayos de biotinilación, por lo que corresponden a una estimación gruesa del fenómeno de endocitosis, por lo tanto la curva ajustada a esos datos también lo es.

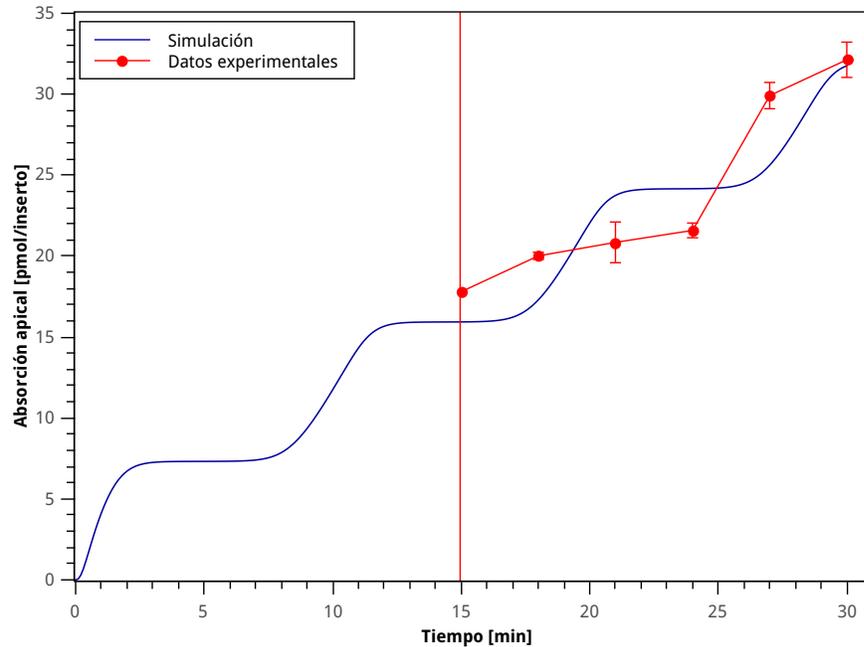


Figura 5.33: Simulación de resultados de experimentos de bloqueo.

Se realizó además la simulación del experimento de bloqueo mucosal. Los resultados se pueden observar en la Figura 5.33, en donde se observa que, de manera similar al primer modelo propuesto, la simulación presenta una forma similar a la curva experimental. Sin embargo, existe un desplazamiento temporal de la curva simulada. Esto puede indicar que la velocidad de endo y exocitosis determinadas en el modelo, están sobrestimadas. O bien, que el conjunto de parámetros escogidos está sobreajustado, y por tanto las predicciones realizadas para otros datos experimentales no tienen un buen desempeño. Este último punto se abordará en profundidad en el análisis estadístico de los parámetros.

Es necesario considerar que en el modelo, no se incluyó la actividad de FPN1. Este factor podría producir que al retirar el medio de cultivo y agregar uno nuevo, cierta cantidad de hierro sea expulsada de la célula hacia el medio apical, por lo que la determinación experimental realizada es un poco mayor a la real.

A pesar de que los datos no se ajustan adecuadamente de manera cuantitativa, es importante rescatar que el modelo es capaz de representar cualitativamente los datos experimentales que no fueron utilizados para ajustar el modelo. Esto indica que se capturan

las características generales del proceso aunque no se tiene el conocimiento total de los componentes ni las fuerzas motrices del fenómeno.

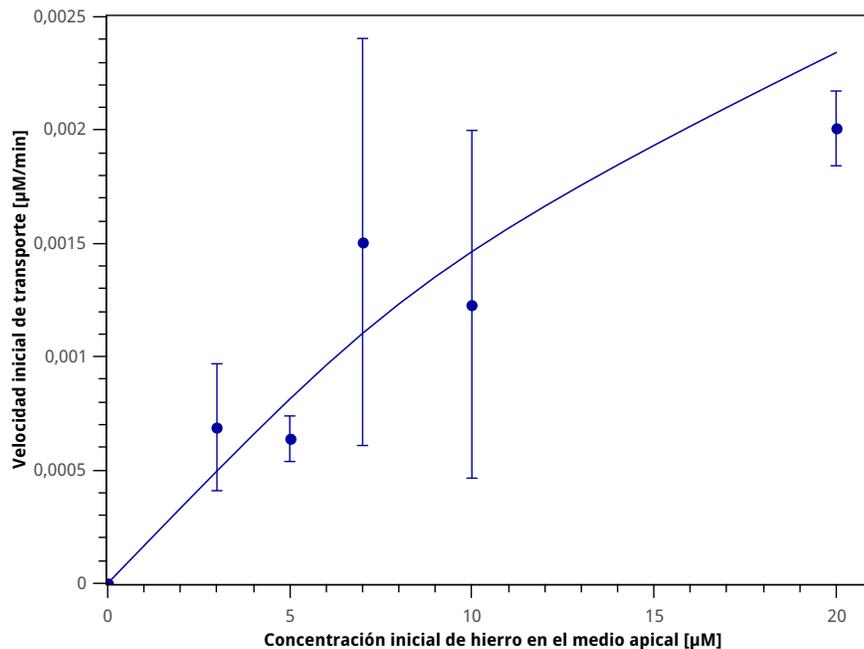


Figura 5.34: Simulación de las velocidades de absorción en los 3 primeros minutos.

En la Figura 5.34 se muestra la simulación de las velocidades de absorción iniciales. En ella se puede ver que la curva simulada presenta una forma similar a la curva típica de Michaelis-Menten y concuerda con los datos experimentales. El coeficiente de determinación entre la curva y los datos es de  $R^2 = 0.605$ , muy similar al valor obtenido con el modelo empírico.

Si bien el modelamiento realizado para el fenómeno de endocitosis, no tiene una inspiración en los componentes conocidos del sistema, es posible hacer establecer una similitud con los elementos conocidos del sistema. Como se dijo anteriormente, una vez que la proteína es retirada de la membrana, pasa a formar parte de un endosoma, esta vesícula es transportada a través de los microtúbulos hacia la cara basolateral debido a la actividad de la proteína kinesina. Luego el endosoma es liberado y puede permanecer en la membrana basolateral o unirse a la proteína motora dineína, de esta manera puede retornar a la cara apical. En el modelo planteado el estado  $N_5$  correspondería al endosoma unido a kinesina, mientras que el estado  $N_6$  correspondería al endosoma unido a dineína. Sin embargo, no es posible establecer una explicación para el tipo de reacción establecida entre estos estados, ya que no se conoce la naturaleza de las reacciones estudiadas.

Hasta ahora se ha analizado cualitativamente el desempeño del modelo. A continuación se detallarán los valores de las constantes de velocidad determinadas con el ajuste de parámetros y las características estadísticas del modelo seleccionado. En la Tabla 5.5 se muestran los parámetros obtenidos en el ajuste del modelo, los intervalos de confianza determinados con el método de Jackknife, el coeficiente de correlación y la estimación del error de generalización  $MSE_{jk}$ .

Tabla 5.5: Parámetros del modelo auto-catalítico y principales resultados de la validación de Jackknife.

Parámetro	Valor	Unidades	Pseudo-Valor	Intervalo de confianza
$k_{12}$	$1.549 \cdot 10^{-7}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	$1.49 \cdot 10^{-7}$	$\pm 3.36 \times 10^{-7}$
$k_{21}$	0.0128	$[min]^{-1}$	-0.99	$\pm 4.28$
$k_{23}$	1.4743	$[min]^{-1}$	1.74	$\pm 4.55$
$k_{34}$	1.487	$[min]^{-1}$	0.85	$\pm 5.51$
$k_{41}$	0.7071	$[min]^{-1}$	0.90	$\pm 2.36$
$k_{14}$	31.33	$[min]^{-1}$	47.41	$\pm 118$
$k_{45}$	2.9389	$[min \cdot \mu M]^{-1}$	4.55	$\pm 11.1$
$k_{56}$	0.2733	$[min]^{-1}$	0.33	$\pm 5.29$
$k_{64}$	3.0108	$[min]^{-1}$	2.62	$\pm 4.43$
$N_{prot}$	49998	$[\mu M]$	47328	$\pm 76983$
<b>Coefficiente de correlación</b>			$MSE_{jk}$	
0.9375			1.40	

Con la información planteada en la Tabla 5.5 es posible hacer un análisis de las velocidades de las reacciones del modelo. El primer punto a abordar, es las velocidades del ciclo que representa la actividad de la proteína mientras está en la membrana. Es posible ver que en el ciclo que permite el paso de hierro a través de la membrana, existe un paso que limita el transporte, este paso es la velocidad del paso  $N_1$  a  $N_2$ , cuya constante de velocidad  $k_{12}$  es de 7 órdenes de magnitud menor al resto de las constantes. Esto significaría que el paso limitante es la unión de la proteína con el sustrato, esto es razonable ya que se esperaba que las velocidades de traslación y separación del sustrato fueran más rápidas. Por otro lado, es necesario considerar que en este modelo no se incluyó la interacción de esta proteína con los protones, siendo que una de las hipótesis existentes es que dicha interacción aumenta la afinidad de la proteína por el hierro. Por lo que, es probable que si se incluyera esa interacción, esta velocidad aumentaría pero seguiría siendo la etapa limitante.

Las velocidad de las reacciones que continúan este ciclo, representadas por sus constantes  $k_{23}$ ,  $k_{34}$  y  $k_{41}$ , presentan valores muy similares, solamente la constante  $k_{41}$  es levemente menor. Es necesario recordar que las reacciones de traslación de la proteína son afectadas por el potencial de membrana de la célula, por lo que estas velocidades podrían variar considerablemente al modificar la composición del medio apical. En particular, podrían verse alterados por el pH de este medio, sin embargo para analizar correctamente este efecto sería necesario repetir los ensayos de flujo a distintos pH. Esto permitiría además, integrar la vía acoplada de protones que fue eliminada en este modelo.

Si bien la constante de velocidad  $k_{41}$  es similar a las de las otras reacciones del ciclo, la constante inversa  $k_{14}$  es mucho mayor a lo esperado, ya que como se dijo anteriormente, esta velocidad debería ser inhibida por el potencial de membrana. Para analizar este hecho, es necesario recordar que se utilizó el supuesto que indicaba que la proteína solo puede endocitarse cuando permanece en el estado  $N_4$ . Y debido a que prácticamente todas las proteínas en membrana se endocitan en un corto período de tiempo, el modelo fuerza el paso

del estado inicial de la proteína  $N_1$  al estado  $N_4$ . Por lo que es posible decir que el valor de esa constante es funcional a la estructura del modelo y no representa necesariamente el fenómeno biológico. Este fenómeno podría evitarse si se relajara dicho supuesto, y la proteína pudiera ser endocitada desde cualquier estado. Sin embargo, no existe información respecto a este fenómeno que indique bajo que condiciones se endocita DMT1, por ejemplo, si existe alguna preferencia por el complejo  $DMT1 - Fe^{+2}$  o por la proteína vacía. Por lo que relajar este supuesto, solamente aumentaría la complejidad del modelo, adicionando nuevos parámetros que determinar. Y dado que se tiene una pequeña cantidad de datos para ajustar el modelo, no traería una mejora sustancial al modelo.

Inicialmente se utilizó como un supuesto, que la velocidad del paso  $N_2$  a  $N_3$  podía considerarse irreversible, ya que paso suele ser rápido en ese sentido en comparación a la reacción inversa. En la Tabla 5.5 es posible ver que el valor de dicha velocidad  $k_{23}$  es del mismo orden de magnitud que la mayoría de las velocidades del ciclo. Por lo que podría no es posible concluir que la reacción sea efectivamente irreversible.

Un parámetro necesario para construir el modelo, es la cantidad de proteína existente en el cultivo, ya que todas las simulaciones muestran la distribución de las fracciones de la cantidad total de proteína. Este valor no se encuentra disponible en bibliografía para células Caco-2, por lo que fue necesario agregarlo como un parámetro más dentro del modelo. Ahora bien, el valor que se muestra en la Tabla 5.5 como  $N_{prot}$  indica la concentración de proteínas en el cultivo, considerando como volumen total, el volumen celular del cultivo (detalle en la sección A de Anexos). Si bien no se cuenta con un dato experimental, es posible hacer una estimación gruesa para verificar la magnitud de este valor. Para esto se utilizó como información el hecho de que la proteína DMT1+IRE pesa alrededor de 64 kDa [142], esto indica que el modelo predice una cantidad de 1907  $\mu g$  de DMT1, lo cual está muy alejado de la realidad ya que se estima que en cultivo existe una cantidad total de proteínas de 205  $\mu g$ . Por lo que sería muy conveniente contar con una medida de este parámetro y de este modo, quitar incertidumbre al modelo. Una consecuencia que acarrea este error, es la subestimación de las constantes de velocidad del modelo. Ya que estas fueron determinadas para una proteína y luego se multiplicó por la cantidad de proteína. No obstante, se espera que las diferencias comparativas entre las velocidades no varíe demasiado debido a este parámetro.

En la Tabla 5.5 también se entregan los pseudo-valores y los intervalos de confianza de los parámetros. Se aprecia que los pseudo-valores, están en el mismo orden de magnitud que los valores determinados, pero aún así difieren considerablemente. Se puede observar este fenómeno en la mayoría de los parámetros, lo que indica que el conjunto de parámetros determinado es cercano al conjunto del caso óptimo, pero no es el conjunto con el que se obtendría el mejor desempeño del modelo. Este fenómeno se observa en distintas magnitudes, incluso para el caso del parámetro  $k_{21}$  se presenta un valor negativo, esto no indica que el parámetro debería ser negativo, sino que el valor del parámetro determinado en el ajuste es menor al que debería presentarse en el caso óptimo.

La causa más probable de esta diferencia entre los parámetros y los pseudo-valores, es que en la búsqueda del mínimo global realizada en el ajuste de parámetros, el algoritmo de búsqueda se haya detenido en un mínimo local. Para evitar esta situación se utilizaron distintos conjuntos iniciales de parámetros, sin embargo, el conjunto final de parámetros en

todos los casos fue similar la presentado en la Tabla 5.5.

Luego de este análisis, es posible aseverar que el presente modelo es capaz de representar adecuadamente los datos experimentales. Además, da cuenta de las características más relevantes del fenómeno estudiado, entre ellas, permite analizar las variaciones de DMT1 en la membrana apical, sólo en base a las variables principales del fenómeno. Por otro lado, el modelo permite simular todos los escenarios experimentales planteados en la sección experimental, obteniendo representaciones cualitativas que concuerdan con lo esperado. Por estas razones se determinó que este modelo sería escogido como el modelo fenomenológico final.

Una vez que se ha definido es modelo, es necesario compararlo con el modelo empírico desarrollado anteriormente. El primer punto a considerar es la representación de los datos experimentales de absorción apical. En este caso, es necesario recordar que el coeficiente de determinación del modelo empírico es  $R^2 = 0.85$ , mientras el del modelo fenomenológico alcanza el  $R^2 = 0.867$ , por lo que sólo en términos de representación el modelo fenomenológico posee un mejor desempeño. No obstante, en la construcción del modelo empírico se utilizó como objetivo minimizar el error de generalización, por lo que era esperable que presente un  $R^2$  menor.

Ahora bien, el error de generalización que se obtiene con el modelo empírico es menor al obtenido con el modelo fenomenológico. Lo que es un indicador de que el modelo empírico posee una mayor capacidad de generalización. Este punto no es un fenómeno que ocurra comúnmente en las comparaciones entre ambos tipos de modelo, de hecho una de las debilidades de los modelos empíricos es su baja capacidad de generalización. Sin embargo, dada la relevancia que se le dio a este punto en la construcción del modelo empírico, se logró revertir esta situación.

Otro factor importante a considerar es la cantidad de parámetros que contiene cada modelo, ya que es sabido que a medida que se aumenta el número de parámetros de un modelo, mayor es su capacidad de representar los datos utilizados. En este caso, el modelo empírico consta de 6 parámetros, mientras que el modelo fenomenológico consta de 10 parámetros. Esto indica que el modelo fenomenológico, por sí mismo, podría representar una mayor gama de formas, por poseer menos grados de libertad o más parámetros que pueden ser ajustados. Lo que a su vez lo hace más propenso al fenómeno de sobreajuste.

A pesar de que el modelo empírico presente una mayor capacidad de generalización, el modelo fenomenológico es mucho más flexible, ya que permite simular una mayor cantidad de escenarios, como por ejemplo, los ensayos del bloqueo de la mucosa. Además, debido a que todos los términos del modelo fenomenológico poseen un significado identificable en el sistema, esto permite analizar en mayor detalle las características y componentes del sistema, plantear nuevas preguntas, proponer y diseñar nuevos ensayos experimentales que permitan entender de mejor manera el fenómeno global.

# Capítulo 6

## Conclusiones

Los niveles de hierro en el organismo son regulados gracias a diferentes mecanismos de control, los cuales presentan diferentes complejidades y actúan a escalas de tiempo distintas. A pesar de la importancia de este metal y la regulación de su homeostasis, no se contaba con la información necesaria para analizar los flujos de absorción de hierro y determinar cuáles eran los componentes y fenómenos más relevantes a nivel celular.

El objetivo de este trabajo fue analizar el transporte de hierro en células Caco-2 mediante métodos experimentales y modelación matemática. Para eso se consideró que los escenarios más relevantes para analizar eran: La absorción apical de hierro en el tiempo a diferentes concentraciones; la velocidades iniciales de absorción de hierro en base a la concentración apical; y la absorción apical luego de una segunda exposición al metal. Si bien el estudio de estos escenarios permitió la creación de dos modelos que explican los fenómenos más relevantes del proceso, todavía quedan condiciones en las que el sistema debe ser evaluado en mayor detalle, como por ejemplo, el bloqueo de la mucosa. Es por esto que la elección de estos escenarios sirvió como una aproximación al fenómeno total.

En el desarrollo experimental se obtuvo que los flujos de absorción presentan características altamente no lineales, influenciados por la variación de la proteína transportadora DMT1 en la membrana. Por otro lado, se obtuvieron velocidades de absorción respecto de la concentración similares a lo reportado en bibliografía. Además, se pudo observar que al exponer las células a un segundo pulso de hierro, la absorción es menor que en la primera exposición, y que en la segunda exposición también se presentan características no lineales. La información obtenida es muy relevante ya que este tipo de resultados no había sido reportado anteriormente y permite establecer las características más importantes de la absorción apical de hierro. Como por ejemplo, que la endocitosis de DMT1 afecta en gran medida la cantidad de hierro que ingresa a las células en los primeros minutos de exposición.

Para analizar matemáticamente los escenarios escogidos se desarrollaron 2 modelos, un modelo fenomenológico y uno empírico. Para desarrollar el modelo empírico se utilizó una versión del algoritmo de programación genética. El modelo obtenido con esta metodología, cumple con la mayoría de las restricciones biológicas del sistema, además, logra representar

adecuadamente los datos experimentales utilizados en la etapa de entrenamiento, y logra dar una estimación de datos que no fueron incluidos en la etapa de entrenamiento. Por otro lado, el modelo logra capturar características propias de la fenomenología del sistema, aunque en su construcción no se incorporó información del fenómeno a priori. El ejemplo más importante de esto, es la presencia de componentes oscilatorios en el modelo, aunque no se haya entregado información de estos rasgos. Esto revela a su vez, la relevancia de las variaciones de DMT1 en la membrana apical durante el tiempo estudiado.

Es importante destacar que las modificaciones planteadas al algoritmo de programación genética, ayudaron a mejorar el desempeño del modelo, en particular aumentó su capacidad de generalización. Esta característica es muy valiosa en un modelo empírico, por lo que se plantea como una buena metodología para desarrollar modelos que necesiten representar sistemas complejos, que no han sido altamente caracterizados, y que además, serán utilizados en distintos escenarios.

Se planteó un modelo fenomenológico del componente más importante en el transporte de hierro en la cara apical, la proteína DMT1. Para realizar esto, se utilizó información acerca de la actividad de la proteína, y además, fue necesario incluir la variación de esta proteína en la membrana. Como este último fenómeno no ha sido estudiado en detalle, se incorporó un modelo oscilatorio simple para representar esta situación. El modelo desarrollado puede representar los datos experimentales de flujo en forma cuantitativa, mientras que los datos experimentales de bloqueo mucosal y de biotinilación se pueden representar de manera cualitativa.

Gracias al modelo fenomenológico, se pudo determinar los componentes y subfenómenos más relevantes del sistema. Además, se formulan nuevas interrogantes, y se proponen nuevos ensayos experimentales que permitirían caracterizar mejor el sistema.

Debido a que los modelos construidos poseen diferentes características, es posible decir que su efectividad varía según el objetivo de la utilización del modelo. Además, la elección del desarrollo de cada uno de los modelos, varía según el objetivo del modelo y de la cantidad de recursos y tiempo disponible para su construcción. En el caso del modelo empírico, es necesario utilizar más recursos técnicos y computacionales, mientras que en el modelo fenomenológico se debe contar con más capital humano que desarrolle el modelo y una mayor cantidad de tiempo.

Es necesario destacar que, con el desarrollo de modelos matemáticos, es posible ahorrar tiempo y recursos en el ámbito experimental, ya que permite establecer prioridades en la información que se requiere y por tanto, mejorar la planificación y diseño de los ensayos experimentales.

Un punto relevante en este trabajo es la distribución del tiempo y recursos que fue necesario en cada etapa. En la sección experimental fue necesario utilizar una gran cantidad de tiempo, por la complejidad del diseño y ejecución los experimentos realizados. Sin embargo esta etapa es de vital importancia, ya que sin ella, sería imposible construir los modelos matemáticos. Por otro lado, realizar la sección experimental y la modelación del sistema, permitió diseñar los experimentos de manera de obtener todos los datos necesarios en la etapa de modelación,

ya que los objetivos de ambos estudios fueron armónicos. Lo cual significó un ahorro de tiempo en la sección de modelamiento.

Finalmente es importante destacar que los resultados y conclusiones de este trabajo pueden extenderse a distintos problemas de investigación. Por ejemplo, la metodología utilizada para el desarrollo del modelo empírico podría ser utilizada en escenarios similares. Por otro lado, los resultados de la sección experimental entregan valiosa información acerca del metabolismo del hierro en seres humanos, y además, el modelo fenomenológico permite definir las características más importantes del sistema y plantea nuevas preguntas acerca del fenómeno estudiado. Tanto las metodologías utilizadas en la parte experimental y del modelo fenomenológico podrían extenderse al estudio de otros nutrientes, en particular otros metales como por ejemplo, el calcio, el zinc o el cobre.

# Capítulo 7

## Recomendaciones

A partir de los modelos planteados y su respectivo análisis, se proponen las siguientes recomendaciones para continuar el estudio del transporte de hierro:

- Determinar experimentalmente el movimiento del transportador DMT1+IRE inducido por la exposición a hierro. Es necesario recalcar que para que los resultados sean comparables entre sí, la elección del tipo de hierro debería ser la misma que en este trabajo, es decir  $Fe^{+2}$  en medio suplementado con Ascorbato. Para poder llevar a cabo estos experimentos se podría utilizar la metodología planteada anteriormente en bibliografía [12].
- Medir la cantidad de DMT1 en la membrana apical inducida por la oferta de hierro [128]. En este caso, la información relevante que se desea obtener sería la variación de DMT1 en los primeros 15 minutos, a distintas concentraciones. De esta manera se podría determinar la forma de la oscilación de DMT1 y cómo cambia esta forma al modificar la oferta de hierro. En base a esto se podría modelar matemáticamente el comportamiento de estas curvas para establecer un análisis cuantitativo al respecto y determinar por ejemplo, el período y la amplitud de la oscilación.
- El modelamiento matemático permitió estimar que el período de la oscilación es cercano a los 12 minutos. Por lo que sería muy conveniente, determinar la cantidad de hierro que traspasa la cara apical en los primeros 20-25 minutos con intervalos de tiempo menores a los utilizados en este trabajo, por ejemplo 1.5 minutos. Con esta información se tendría una estimación de dos cosas, primero, si existe un cambio entre la primera y segunda oscilación, y cómo afectan estos cambios a los flujos de hierro en este periodo.
- Determinar la cantidad de hierro que traspasa la membrana apical a distintos pH. Con esta información sería posible analizar dos efectos importantes, primero, el efecto del pH en los flujos de hierro a través de la célula. Y segundo, la actividad de DMT1 y si es que esta variación de pH influye en la velocidad de endocitosis. Con esta información sería posible extender el modelo fenomenológico a distintas concentraciones de protones, es decir, agregar la vía acoplada a protones que fue retirada en este trabajo.
- Analizar detalladamente el fenómeno del bloqueo de la mucosa, en forma experimental. Este punto es muy relevante ya que no existen datos experimentales *in vitro*, por lo que

no es posible establecer qué factores son los que desencadenan este fenómeno. Para esto se propone realizar ensayos similares a los realizados en este trabajo, variando tanto el tiempo como las concentraciones en utilizadas en la primera y segunda exposición a hierro. Un experimento muy interesante sería utilizar concentraciones diferentes en la primera y segunda exposición. Por ejemplo,  $20 \mu M$  en el primer caso y  $10 \mu M$  en el segundo.

# Capítulo 8

## Participación en congresos

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en:

1. A.J. Colins, Z.P. Gerdtzen, M.T. Nuñez, J.C. Salgado, Experimental Determination and Mathematical Modeling of Iron Fluxes in Caco2 Cells, ISCB-LATIN America 2014 X-Meeting in Bioinformatics with BSB and SoiBio, Belo Horizonte, Brasil, Octubre 28 – 30, 2014. (Poster)
2. A.J. Colins, Z.P. Gerdtzen, M.T. Nuñez, J.C. Salgado, Experimental Determination and Mathematical Modeling of Iron Fluxes in Caco2 Cells, Encuentros Chile Global 2014, Santiago, Chile, Diciembre 15-17, 2014. (Poster)
3. A.J. Colins, Z.P. Gerdtzen, M.T. Nuñez, J.C. Salgado, Mathematical modeling of intestinal iron absorption using Genetic Programming, X IEEE Latin-American Summer School on Computational Intelligence , Santiago, Chile, Diciembre 15-18, 2014. (Poster)

# Bibliografía

- [1] BEINERT, H., KILEY, P.J. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. Current opinion in chemical biology, 3(2): 152–7, abr. 1999.
- [2] JOHNSON, D.C., DEAN, D.R., SMITH, A.D., JOHNSON, M.K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. Annual review of biochemistry, 74: 247–81, ene. 2005.
- [3] VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J., TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266(1/2): 37–56, nov. 2004.
- [4] VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. Current medicinal chemistry, 12(10): 1161–208, ene. 2005.
- [5] SHARP, P.A. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. International journal for vitamin and nutrition research., 80(4-5): 231–42, oct. 2010.
- [6] THEIL, E.C., CHEN, H., MIRANDA, C., JANSER, H., ELSENHANS, B., NÚÑEZ, M.T., PIZARRO, F., SCHÜMANN, K. Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments. The Journal of nutrition, 142(3): 478–83, mar. 2012.
- [7] SNOECK, V., GODDEERIS, B., COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. Microbes and Infection, 7: 997–1004, 2005.
- [8] FUQUA, B.K., VULPE, C.D., ANDERSON, G.J. Intestinal iron absorption. J Trace Elem Med Biol, 26(2-3): 115–9, jun. 2012.
- [9] MORGAN, E.H., OATES, P.S. Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Absorption. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 29(3): 384–399, nov. 2002.
- [10] WYMAN, S., SIMPSON, R.J., MCKIE, A.T., SHARP, P.A. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro. FEBS Letters, 582: 1901–1906, 2008.
- [11] GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U.V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M.F.,

- BORON, W.F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J.L., HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature, 388(July): 482–488, jul. 1997.
- [12] NÚÑEZ, M.T., TAPIA, V., ROJAS, A., AGUIRRE, P., GÓMEZ, F., NUALART, F. Iron supply determines apical/basolateral membrane distribution of intestinal iron transporters DMT1 and ferroportin 1. American journal of physiology. Cell physiology, 298(3): C477–85, mar. 2010.
- [13] BREUER, W., SHVARTSMAN, M., CABANTCHIK, Z.I. Intracellular labile iron. The international journal of biochemistry & cell biology, 40(3): 350–4, ene. 2008.
- [14] ANDERSON, G.J., VULPE, C.D. Mammalian iron transport. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 66(20): 3241–61, oct. 2009.
- [15] AISEN, P. Stoichiometric Iron to Human and Site Characteristics Transferrin \*. Journal of biological Chemistry, 253(6): 1930–1937, 1978.
- [16] SHARP, P., SRAI, S.K. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. World journal of gastroenterology : WJG, 13(35): 4716–4724, 2007.
- [17] NÚÑEZ, M.T. Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption - Uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis. BioFactors, 36: 88–97, 2010.
- [18] LINDER, M.C., MORIYA, M., WHON, A., KASSA, A., GILLEY, C. Vesicular transport of Fe and interaction with other metal ions in polarized Caco2 Cell monolayers. Biological Research, 39: 143–156, 2006.
- [19] NATOLI, M., LEONI, B.D., D'AGNANO, I., ZUCCO, F., FELSANI, A. Good Caco-2 cell culture practices. Toxicology in Vitro, 26(8): 1243–1246, 2012.
- [20] MACKENZIE, B., GARRICK, M.D. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 289: G981–G986, 2005.
- [21] YANG, X.S., ALGORITHMS, G. Nature-Inspired Optimization Algorithms. pág. 300, 2014.
- [22] FRIEDMAN, M. Principles and models of biological transport. 1986.
- [23] DU, L., HE, Y., LUO, Y. Crystal Structure and Enantiomer Selection by d -Alanil Carrier Protein Ligase DltA from Bacillus cereus †. Biochemistry, 47(44): 11473–11480, nov. 2008.
- [24] SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Day and Good Membranes and viruses in immunopathology, págs. 7–47,

1972.

- [25] VOET, D., VOET, J.G. Bioquímica. Ed. Médica Panamericana, 2006, 1756 págs.
- [26] PATIÑO, N.M. Farmacología medica / Medical Pharmacology. Ed. Médica Panamericana, 2008, 934 págs.
- [27] COOPER, G.M., HAUSMAN, R.E. The Cell: A Molecular Approach. ASM Press, 2004, 713 págs.
- [28] LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ... & DARNELL, J. Biología celular y molecular. Ed. Médica Panamericana, 2005, 973 págs.
- [29] BENDER, E.A. An Introduction to Mathematical Modeling. 2012.
- [30] MAN, N.V.M., PH, D. Mathematical Modeling and Simulation. 2010.
- [31] DRAPER, N.R., SMITH, H., POWNELL, E. Applied regression analysis, tomo 3. Wiley New York, 1966.
- [32] LIPPMAN, R.P., LIPPMAN, R.P. An Intrduction to Computing with Neural Nets. IEEE ASSP Magazine, págs. 4–22, 1987.
- [33] TAGLIARINI, G., CHRIST, J., PAGE, E. Optimization using neural networks. IEEE Transactions on Computers, 40(12): 1347–1358, 1991.
- [34] HOLLAND, J.H. Adaptation in natural and artificial systems: an introductory analysis with applications to biology, control, and artificial intelligence. University of Michigan Press, 1975, 183 págs.
- [35] MANSOUR, R.F. Using Genetic Algorithm for Identification of Diabetic Retinal Exudates in Digital Color Images. Journal of Intelligent Learning Systems and Applications, 04(03): 188–198, ago. 2012.
- [36] MCPHEE, N.F., POLI, R., LANGDON, W.B. A Field Guide to Genetic Programming. Lulu.com, 2008, 233 págs.
- [37] KOZA, J.R. Genetic Programming: On the Programming of Computers by Means of Natural Selection. 1992.
- [38] GESTAL, M., RIVERO, D., RABUÑAL, J.R.J., DORADO, J., PAZOS, A. Introducción a los algoritmos genéticos y la programación genética. Universidade da Coruña, 2010, 76 págs.
- [39] BURKE, E.K., KENDALL, G. (Eds.) Search Methodologies. Springer US, Boston, MA, 2005.

- [40] YU, T., RIOLO, R., WORZEL, B. Genetic Programming Theory and Practice III. 2006.
- [41] BRAGA, L.P.V., BRAGA, L.P.V., CARVAJAL, L.I.O.V.E.S.S.R., VALENCIA, L.I.O., CARVAJAL, S.S.R. Introducción a la Minería de Datos. Editora E-papers, 218 págs.
- [42] EFRON, B. The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. 1982, 103 págs.
- [43] ARAHAL, M.R., SORIA, M.B., DÍAZ, F.R. Técnicas de predicción con aplicaciones en ingeniería. Universidad de Sevilla, 2006, 340 págs.
- [44] OLSON, D.L., DELEN, D. Advanced Data Mining Techniques. Springer Science & Business Media, 2008, 192 págs.
- [45] SALKIND, N. Encyclopedia of Research Design, Volume 1. SAGE Publications, 2010, 1719 págs.
- [46] HEIKKINEN, A.T., KORJAMO, T., MÖNKKÖNEN, J. Modelling of drug disposition kinetics in vitro intestinal absorption cell models. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 106(3): 180–8, mar. 2010.
- [47] SUN, H., ZHANG, L., CHOW, E.C.Y., LIN, G., ZUO, Z., PANG, K.S. A catenary model to study transport and conjugation of baicalein, a bioactive flavonoid, in the Caco-2 cell monolayer: demonstration of substrate inhibition. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 326(1): 117–26, jul. 2008.
- [48] LEE, W., RYU, J., SPANGLER, R.A., JUNG, C.Y. Modulation of GLUT4 and GLUT1 Recycling by Insulin in Rat Adipocytes: Kinetic Analysis Based on the Involvement of Multiple Intracellular Compartments †. Biochemistry, 39(31): 9358–9366, ago. 2000.
- [49] FISHER, J., HENZINGER, T.A. Executable cell biology. Nature biotechnology, 25(11): 1239–49, nov. 2007.
- [50] LAM, T.N., HUNT, C.A. Mechanistic simulations explain paradoxical saquinavir metabolism during in vitro vectorial transport study. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 2008: 5462–5, ene. 2008.
- [51] WINKLE, L.V. Biomembrane transport. 1999.
- [52] VILLADSEN, J., NIELSEN, J., LIDÉN, G. Bioreaction Engineering Principles. Springer US, Boston, MA, 2011.
- [53] BRIGGS, G.E., HALDANE, J.B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. The Biochemical journal, 19(2): 338–9, ene. 1925.

- [54] PURICH, D.L., ALLISON, R.D. Handbook of Biochemical Kinetics: A Guide to Dynamic Processes in the Molecular Life Sciences. Academic Press, 1999, 788 págs.
- [55] SLEPCHENKO, B.M., BRONNER, F. Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry. American journal of physiology. Cell physiology, 281(1): C270–81, jul. 2001.
- [56] COVAL, M.L. Analysis of Hill Interaction Coefficients and the Invalidity of the Kwon and Brown Equation. J. Biol. Chem., 245(23): 6335–6336, dic. 1970.
- [57] HILL, T.L. Free energy transduction in biology: the steady-state kinetic and thermodynamic formalism. Academic Press, 1977, 229 págs.
- [58] DI CERA, E. Thrombin. Molecular aspects of medicine, 29(4): 203–54, ago. 2008.
- [59] PATEL, S.S., WONG, I., JOHNSON, K.A. Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant. Biochemistry, 30(2): 511–525, ene. 1991.
- [60] HILL, T.L. Free Energy Transduction in Biology. 1977.
- [61] MACKENZIE, B., UJWAL, M.L., CHANG, M.H.H., ROMERO, M.F., HEDIGER, M.A. Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H<sup>+</sup>-coupled Fe<sup>2+</sup> transport and uncoupled fluxes. Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 451(4): 544–558, ene. 2006.
- [62] HILGEMANN, D.W., COLLINS, A., MATSUOKA, S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. The Journal of general physiology, 100(6): 933–61, dic. 1992.
- [63] TSAI, T.Y.C., CHOI, Y.S., MA, W., POMERENING, J.R., TANG, C., FERRELL, J.E. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. Science (New York, N.Y.), 321(5885): 126–129, 2008.
- [64] BALL, P. Designing the Molecular World: Chemistry at the Frontier, tomo 7. Princeton University Press, 1996, 376 págs.
- [65] ANANTHASUBRAMANIAM, B., HERZEL, H. Positive Feedback Promotes Oscillations in Negative Feedback Loops. PloS one, 9(8): e104761, 2014.
- [66] BACAËR, N. A Short History of Mathematical Population Dynamics. Springer London, London, 2011.
- [67] BRAUER, F., CASTILLO-CHÁVEZ, C. Mathematical Models in Population Biology and Epidemiology. Springer Science & Business Media, 2001, 416 págs.
- [68] OF CHEMISTRY, I.R.E.H.R.P., MISSISSIPPI, J.A.P.P.O.C., OF SOUTHERN, B.U.

An Introduction to Nonlinear Chemical Dynamics : Oscillations, Waves, Patterns, and Chaos: Oscillations, Waves, Patterns, and Chaos. Oxford University Press, USA, 1998, 408 págs.

- [69] COLLINS, J.F., ANDERSON, G.J. Chapter 71. Molecular Mechanisms of Intestinal Iron Transport. First edit ed<sup>6n</sup>. Elsevier Inc., 2012, 1921–1948 págs.
- [70] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessing the Iron Status of population. Inf. téc., 2004.
- [71] ANDERSON, G., MCLAREN, G. Iron Physiology and Pathophysiology in Humans.
- [72] THEIL, E.C. Iron Homeostasis and Nutritional Iron Deficiency. Online, 2011.
- [73] HALLBERG, L., BJØ RN RASMUSSEN, E., HOWARD, L., ROSSANDER, L. Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. Scandinavian journal of gastroenterology, 14(7): 769–79, ene. 1979.
- [74] CONRAD, M.E., CROSBY, W.H. INTESTINAL MUCOSAL MECHANISMS CONTROLLING IRON ABSORPTION. Blood, 22(4): 406–15, oct. 1963.
- [75] MCKIE, A.T. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. Biochemical Society transactions, 36(Pt 6): 1239–41, dic. 2008.
- [76] UMBREIT, J.N., CONRAD, M.E., MOORE, E.G., DESAI, M.P., TURRENS, J. Paraferitin: a protein complex with ferriredutase activity is associated with iron absorption in rats. Biochemistry, 35(20): 6460–9, mayo 1996.
- [77] MA, Y., SPECIAN, R.D., YEH, K.Y., YEH, M., RODRIGUEZ-PARIS, J., GLASS, J. The transcytosis of divalent metal transporter 1 and apo-transferrin during iron uptake in intestinal epithelium. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 283: G965–G974, 2002.
- [78] DONOVAN, A., LIMA, C.A., PINKUS, J.L., PINKUS, G.S., ZON, L.I., ROBINE, S., ANDREWS, N.C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell metabolism, 1(3): 191–200, mar. 2005.
- [79] DE DOMENICO, I., WARD, D.M., DI PATTI, M.C.B., JEONG, S.Y., DAVID, S., MUSCI, G., KAPLAN, J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. The EMBO journal, 26(12): 2823–2831, 2007.
- [80] TANDY, S., MARK, W., AIME, L., MARTA, L.J. Nramp2 Expression Is Associated with pH-dependet Iron Uptake across the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells. The Journal of Biological Chemistry, 275(January 14): 1023–1029, 2000.

- [81] ALVAREZ-HERNANDEZ, X., NICHOLS, G.M., GLASS, J. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. Biochimica et biophysica acta, 1070: 205–8, 1991.
- [82] SHAWKI, A., KNIGHT, P.B., MALIKEN, B.D., NIESPODZANY, E.J., MACKENZIE, B. H<sup>+</sup>-Coupled Divalent Metal-Ion Transporter-1: Functional Properties, Physiological Roles and Therapeutics, tomo 70. Elsevier, 2012, 169–214 págs.
- [83] LEE, P.L., GELBART, T., WEST, C., HALLORAN, C., BEUTLER, E. The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. Blood cells, molecules & diseases, 24(2): 199–215, jun. 1998.
- [84] MACKENZIE, B., TAKANAGA, H., HUBERT, N., ROLFS, A., HEDIGER, M.A. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). The Biochemical journal, 403: 59–69, 2007.
- [85] HUBERT, N., HENTZE, M.W. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(19): 12345–50, sep. 2002.
- [86] KIMATA, Y., KIMATA, Y.I., SHIMIZU, Y., ABE, H., FARCASANU, I.C., TAKEUCHI, M., ROSE, M.D., KOHNO, K. Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins. Molecular biology of the cell, 14(December): 2559–2569, 2003.
- [87] ILLING, A.C., SHAWKI, A., CUNNINGHAM, C.L., MACKENZIE, B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. Journal of Biological Chemistry, 287: 30485–30496, 2012.
- [88] WORTHINGTON, M.T., BROWNE, L., BATTLE, E.H., LUO, R.Q. Functional properties of transfected human DMT1 iron transporter. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 279: G1265–G1273, 2000.
- [89] NEVO, Y. The Mutation F227I Increases the Coupling of Metal Ion Transport in DCT1\*. 279(51): 53056–53061, 2004.
- [90] ABBOUD, S., HAILE, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. The Journal of biological chemistry, 275(26): 19906–12, jun. 2000.
- [91] DONOVAN, A., BROWNLIE, A., ZHOU, Y., SHEPARD, J., PRATT, S.J., MOYNIHAN, J., PAW, B.H., DREJER, A., BARUT, B., ZAPATA, A., LAW, T.C., BRUGNARA, C., LUX, S.E., PINKUS, G.S., PINKUS, J.L., KINGSLEY, P.D., PALIS, J., FLEMING, M.D., ANDREWS, N.C., ZON, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a

conserved vertebrate iron exporter. Nature, 403(6771): 776–81, feb. 2000.

- [92] PIETRANGELO, A. Non-HFE hemochromatosis. Hepatology (Baltimore, Md.), 39(1): 21–9, ene. 2004.
- [93] ZHANG, D.L., HUGHES, R.M., OLLIVIERRE-WILSON, H., GHOSH, M.C., ROUAULT, T.A. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. Cell metabolism, 9(5): 461–73, mayo 2009.
- [94] FRAZER, D.M., VULPE, C.D., MCKIE, A.T., WILKINS, S.J., TRINDER, D., CLEGHORN, G.J., ANDERSON, G.J. Cloning and gastrointestinal expression of rat hephaestin: relationship to other iron transport proteins. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 281(4): G931–9, oct. 2001.
- [95] HARRISON, P.M., AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1275: 161–203, 1996.
- [96] MIYAZAKI, E., KATO, J., KOBUNE, M., OKUMURA, K., SASAKI, K., SHINTANI, N., AROSIO, P., NIITSU, Y. Denatured H-ferritin subunit is a major constituent of haemosiderin in the liver of patients with iron overload. Gut, 50(3): 413–9, mar. 2002.
- [97] SALGADO, J.C., OLIVERA-NAPPA, A., GERDTZEN, Z.P., TAPIA, V., THEIL, E.C., CONCA, C., NUÑEZ, M.T. Mathematical modeling of the dynamic storage of iron in ferritin. BMC systems biology, 4(1): 147, 2010.
- [98] KIDANE, T.Z., SAUBLE, E., LINDER, M.C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. American journal of physiology. Cell physiology, 291(3): C445–55, sep. 2006.
- [99] MORIYA, M., LINDER, M.C. Vesicular transport and apotransferrin in intestinal iron absorption, as shown in the Caco-2 cell model. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 290: G301–G309, 2006.
- [100] BAKER, E.N., LINDLEY, P.F. New perspectives on the structure and function of transferrins. Journal of Inorganic Biochemistry, 47(1): 147–160, ago. 1992.
- [101] BALI, P.K., AISEN, P. Receptor-induced switch in site-site cooperativity during iron release by transferrin. Biochemistry, 31(16): 3963–7, abr. 1992.
- [102] HUEBERS, H.A., FINCH, C.A. The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiol Rev, 67(2): 520–582, abr. 1987.

- [103] SKIKNE, B.S. Serum transferrin receptor. American Journal of Hematology, 83(August): 872–875, 2008.
- [104] FLEMING, M.D., ROMANO, M.A., SU, M.A., GARRICK, L.M., GARRICK, M.D., ANDREWS, N.C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(3): 1148–53, feb. 1998.
- [105] GRUENHEID, B.S., GAUTHIER, S., HACKAM, D.J., GRINSTEIN, S., GROS, P. The Iron Transport Protein NRAMP2 Is an Integral Membrane Glycoprotein That Colocalizes with Transferrin in Recycling Endosomes. 189(5), 1999.
- [106] KLAUSNER, R.D., ROUAULT, T.A., HARFORD, J.B. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. Cell, 72(1): 19–28, ene. 1993.
- [107] KAWABATA, H. Molecular Cloning of Transferrin Receptor. Journal of Biological Chemistry, 274(30): 20826–20832, 1999.
- [108] KAWABATA, H., GERMAIN, R.S., VUONG, P.T., NAKAMAKI, T., SAID, J.W., KOEFFLER, H.P. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. The Journal of biological chemistry, 275(22): 16618–25, jun. 2000.
- [109] ALVAREZ-HERNANDEZ, B.X., SMITH, M., GLASS, J. The Effect of Apotransferrin on Iron Release From Caco-2 Cells, an Intestinal Epithelial Cell Line. págs. 3974–3980, 1998.
- [110] NÚÑEZ, M.T., NÚÑEZ MILLACURA, C., BELTRÁN, M., TAPIA, V., ALVAREZ-HERNANDEZ, X. Apotransferrin and holotransferrin undergo different endocytic cycles in intestinal epithelia (Caco-2) cells. The Journal of biological chemistry, 272(31): 19425–8, ago. 1997.
- [111] YEH, K.Y., YEH, M., WATKINS, J.A., RODRIGUEZ-PARIS, J., GLASS, J. Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 279(5): G1070–9, nov. 2000.
- [112] NOLTA, K.V., RODRIGUEZ-PARIS, J.M., STECK, T.L. Analysis of successive endocytic compartments isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. Biochimica et biophysica acta, 1224(2): 237–46, nov. 1994.
- [113] RODRIGUEZ-PARIS, J.M., NOLTA, K.V., STECK, T.L. Characterization of lysosomes isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. Journal of Biological Chemistry, 268(12): 9110–9116, 1993.
- [114] GORBSKY, G., BORISY, G.G. Microtubule distribution in cultured cells and intact

tissues: improved immunolabeling resolution through the use of reversible embedment cytochemistry.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(October): 6889–6893, 1985.

- [115] MEADS, T., SCHROER, T.A. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. Cell motility and the cytoskeleton, 32(4): 273–88, ene. 1995.
- [116] KURAL, C., KIM, H., SYED, S., GOSHIMA, G., GELFAND, V.I., SELVIN, P.R. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? Science (New York, N.Y.), 308(April): 1469–1472, 2005.
- [117] MURRAY, J.W., BANANIS, E., WOLKOFF, A.W. Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process. Molecular biology of the cell, 11(February): 419–433, 2000.
- [118] NEMETH, E., GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. Annual review of nutrition, 26: 323–42, ene. 2006.
- [119] NICOLAS, G., CHAUVET, C., VIATTE, L., DANAN, J.L., BIGARD, X., DEVAUX, I., BEAUMONT, C., KAHN, A., VAULONT, S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. The Journal of clinical investigation, 110(7): 1037–44, oct. 2002.
- [120] HENTZE, M.W., KÜHN, L.C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(16): 8175–82, ago. 1996.
- [121] SCHÜMANN, K., MORET, R., KÜNZLE, H., KÜHN, L.C. Iron regulatory protein as an endogenous sensor of iron in rat intestinal mucosa. European Journal of Biochemistry, 260(2): 362–372, dic. 2001.
- [122] TANDARA, L., SALAMUN, I. Iron metabolism: current facts and future decisions | Biochemia Medica. Biochemia Medica, 22(3), 2012.
- [123] MUCKENTHALER, M.U., GALY, B., HENTZE, M.W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. Annual review of nutrition, 28: 197–213, 2008.
- [124] FRAZER, D.M., WILKINS, S.J., BECKER, E.M., MURPHY, T.L., VULPE, C.D., MCKIE, A.T., ANDERSON, G.J. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. Gut, 52: 340–346, 2003.
- [125] WANG, X., GARRICK, M.D., YANG, F., DAILEY, L.A., PIANTADOSI, C.A., GHIO, A.J. TNF, IFN-gamma, and endotoxin increase expression of DMT1 in bronchial

epithelial

cells. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 289(1): L24–33, jul. 2005.

- [126] AYDEMIR, F., JENKITKASEMWONG, S., GULEC, S., KNUTSON, M.D. Iron loading increases ferroportin heterogeneous nuclear RNA and mRNA levels in murine J774 macrophages. The Journal of nutrition, 139(3): 434–8, mar. 2009.
- [127] ZOLLER, H., THEURL, I., KOCH, R., KASER, A., WEISS, G. Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1. Blood cells, molecules & diseases, 29: 488–497, 2002.
- [128] ESPARZA, A., NUÑEZ, T., MART, E., JUNIO, N.E.Z., TULIO, M. “ Participación de las Especies Reactivas del Oxígeno en la Endocitosis del Transportador DMT1 Inducida por el Hierro durante el Proceso de Absorción Intestinal”. 2011.
- [129] GRANICK, S. Structure and Physiological Functions of Ferritin. Physiol Rev, 31(4): 489–511, oct. 1951.
- [130] GALY, B., FERRING-APPEL, D., BECKER, C., GRETZ, N., GRÖNE, H.J., SCHÜMANN, K., HENTZE, M.W. Iron regulatory proteins control a mucosal block to intestinal iron absorption. Cell Reports, 3: 844–857, 2013.
- [131] STEWART, W.B., YUILE, C.L., CLAIBORNE, H.A., SNOWMAN, R.T., WHIPPLE, G.H. Radioiron absorption in anemic dogs; fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract. The Journal of experimental medicine, 92(4): 375–82, oct. 1950.
- [132] ZWEIBAUM, A., PINTO, M., CHEVALIER, G., DUSSAULX, E., TRIADOU, N., LACROIX, B., HAFFEN, K., BRUN, J.L., ROUSSET, M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. Journal of cellular physiology, 122(1): 21–9, ene. 1985.
- [133] PAGEOT, L.P., PERREAULT, N., BASORA, N., FRANCOEUR, C., MAGNY, P., BEAULIEU, J.F. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. Microscopy research and technique, 49(4): 394–406, mayo 2000.
- [134] FREY, A., GIANNASCA, K.T., WELTZIN, R., GIANNASCA, P.J., REGGIO, H., LENCER, W.I., NEUTRA, M.R. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. The Journal of experimental medicine, 184(3): 1045–59, sep. 1996.
- [135] TUMA, P.L., HUBBARD, A.L. Transcytosis: crossing cellular barriers. Physiological reviews, 83:

871–932, 2003.

- [136] HIRT, R., HUGHSON, E. Assessment of cell polarity. En: Epithelial cell culture: a practical approach, págs. 37–66. Newcastle University, 1996.
- [137] HUEBERS, E., NELSON, N.J., HUEBERS, H.A., RASEY, J.S. Removal of transferrin from fetal bovine serum. The Journal of laboratory and clinical medicine, 110(6): 719–25, dic. 1987.
- [138] DAVIDOR, Y., SCHWEFEL, H.P., MÄNNER, R. (Eds.) Parallel Problem Solving from Nature — PPSN III, Lecture Notes in Computer Science, tomo 866. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1994.
- [139] MOREÉ, J. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. En: G.A. WATSON (Ed.) Numerical Analysis SE - 10, Lecture Notes in Mathematics, tomo 630, págs. 105–116. Springer Berlin Heidelberg, 1978.
- [140] TOPCHY, A., PUNCH, W. Faster genetic programming based on local gradient search of numeric leaf values. Proceedings of the Genetic and ..., (1997), 2001.
- [141] GAGNÉ, C., SCHOENAUER, M., PARIZEAU, M., TOMASSINI, M. Genetic Programming, Validation Sets, and Parsimony Pressure. 2006.
- [142] UNIPROT. SLC11A2 - Natural resistance-associated macrophage protein 2 - Homo sapiens (Human).
- [143] PIRES, A.L.G., DA SILVEIRA, T.R., DA SILVA, V.D. [Digital morphometric and stereologic analysis of small intestinal mucosa in well-nourished and malnourished children with persistent diarrhea]. Jornal de pediatria, 79(4): 329–36, ene.

# Anexos

# Anexo A

## Protocolos experimentales

### A.1. Preparación de Solución L-ácido ascórbico

1. Pesar la cantidad necesaria de L-ácido ascórbico y agregar un 30 % del volumen final de agua destilada
2. Preparar una solución 1M de Bicarbonato con un volumen equivalente al 20 % del volumen final de la solución de ascorbato.
3. Agregar la solución de bicarbonato hasta ajustar a pH 7, luego diluir con agua destilada hasta alcanzar el volumen final.
4. Filtrar con una pirinola.

### A.2. Condiciones de cultivo

Tabla A.1: Características del cultivo celular.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidad</b>
Diámetro inserto	12	[ <i>mm</i> ]
Área efectiva	0.6	[ <i>cm</i> <sup>2</sup> ]
Volumen medio apical	200	[ <i>μL</i> ]
Volumen medio basolateral	1000	[ <i>μL</i> ]
Cantidad de células	409,090	[ <i>cel/inserto</i> ]
Altura enterocitos [143]	29	[ <i>μm</i> ]
Diámetro enterocitos [143]	5	[ <i>μm</i> ]
Volumen de la monocapa	1.67	[ <i>μL</i> ]
Cantidad de proteína total	205,4	[ <i>μg</i> ]

## Anexo B

# Determinación experimental del los flujos de hierro

### B.1. Cuantificación de la internalización de DMT1

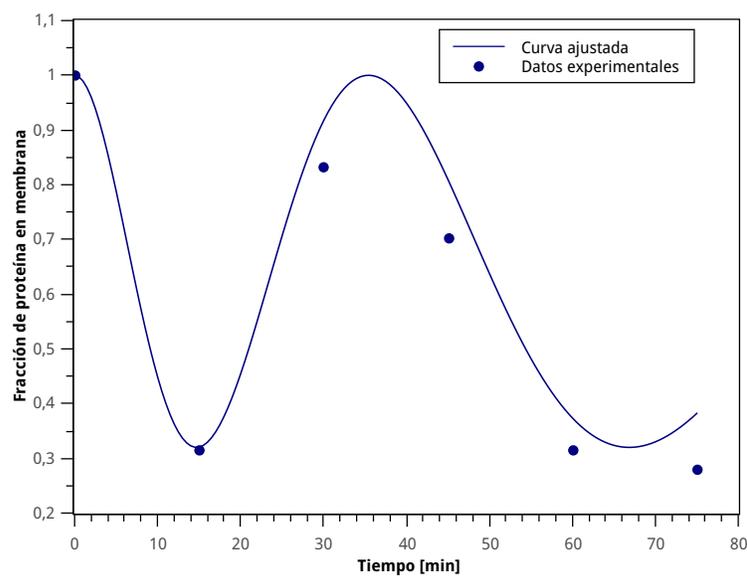


Figura B.1: Cuantificación de la internalización de DMT1 en base a la Figura 3.15.

## B.2. Verificación de la integridad de la monocapa

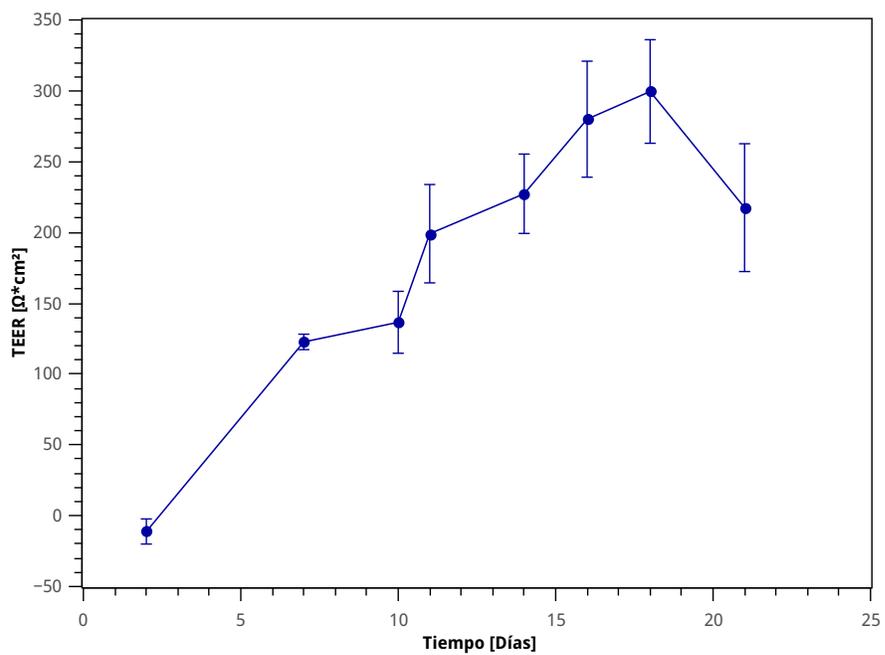


Figura B.2: Medición de la TEER en el periodo de cultivo.

### B.3. Velocidades iniciales de absorción

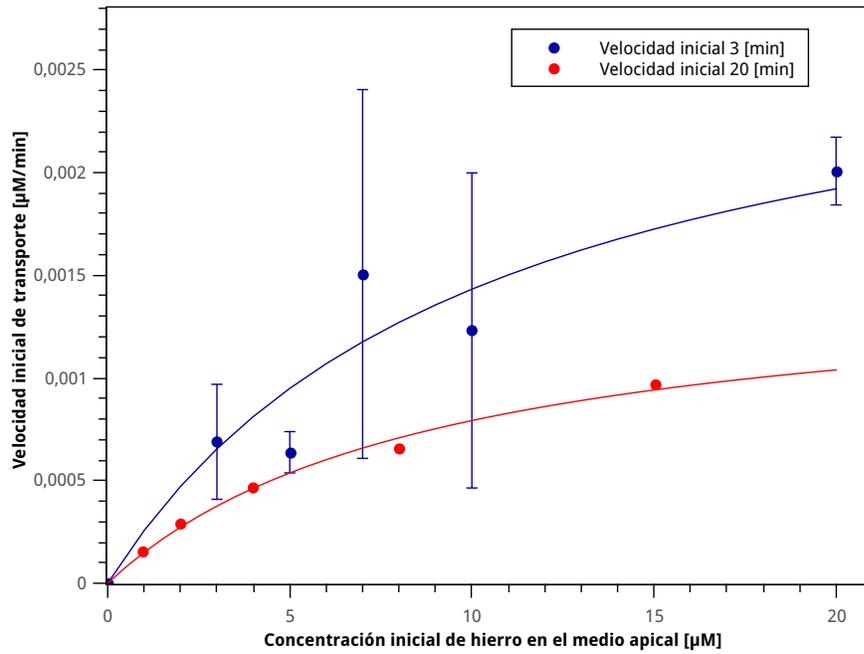


Figura B.3: Comparación de las velocidades iniciales de absorción [18].

### B.4. Bloqueo mucosal

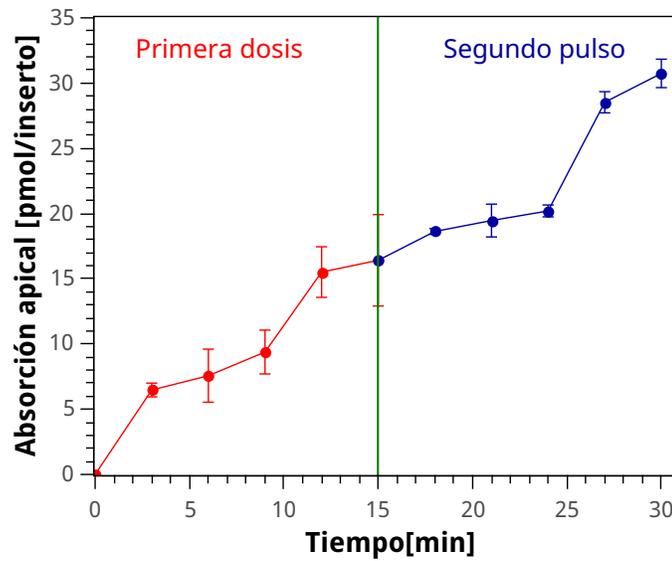


Figura B.4: Comparación de la absorción apical de hierro en la primera y segunda exposición a hierro.

# Anexo C

## Modelos empíricos

### C.1. Determinación de la cantidad de iteraciones en la etapa de ajuste de parámetros

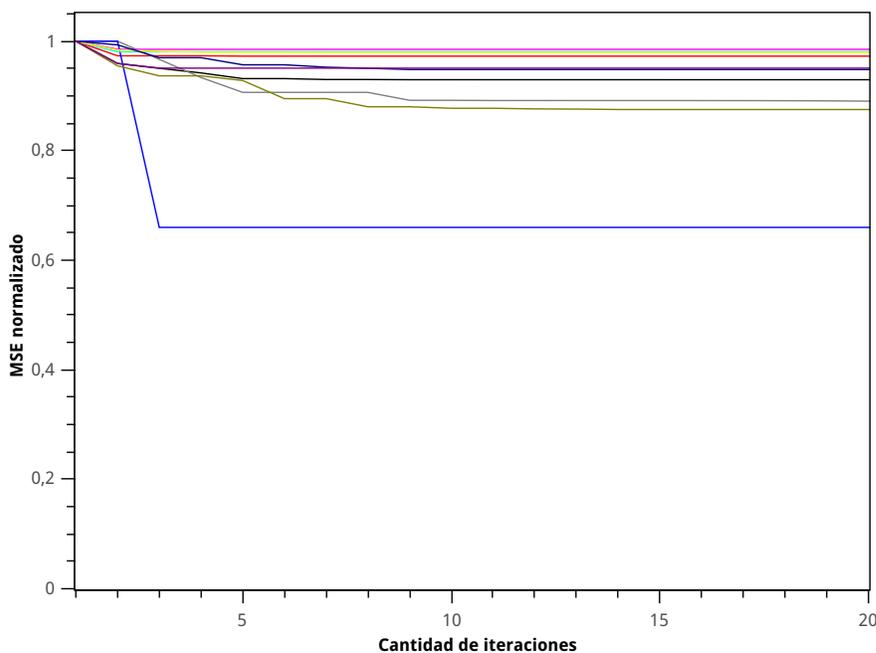


Figura C.1: Evaluación de la función objetivo obtenidas con distinto número de iteraciones. Total de 10 muestras.

Para determinar la mínima cantidad de iteraciones que debería utilizarse en el ajuste de parámetros, se generaron 10 modelos mediante el algoritmo de programación genética clásico, es decir, modelos cuyos parámetros no estaban ajustados. Luego, se ajustaron los parámetros de cada modelo utilizando diferentes límites de iteraciones y se observó el valor de la función objetivo (MSE) en cada caso. En la Figura C.1 se observa que en la mayoría de los casos, al utilizar

como límite máximo de iteraciones  $N = 10$ , se alcanza un valor muy cercano al mínimo, por lo que utilizar un límite mayor de iteraciones no produce una mejora sustancial en el cálculo.

## C.2. Evaluación del MSE al optimizar los parámetros con un mayor número de iteraciones

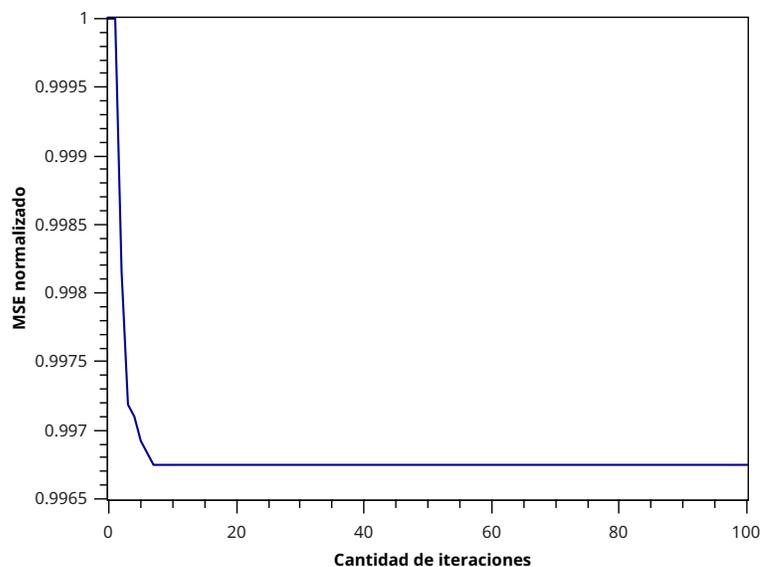


Figura C.2: Evaluación del MSE al optimizar los parámetros con un mayor número de iteraciones

## C.3. Determinación de la cantidad de iteraciones en la etapa de determinación de error de generalización

Para determinar la mínima cantidad de iteraciones que debería utilizarse para definir el  $MSE_{jk}$ , se generaron 10 modelos mediante el algoritmo de programación genética con ajuste de parámetros. Luego, se determinó el  $MSE_{jk}$  de cada modelo utilizando diferentes límites de iteraciones. En la Figura C.3 se observa que en la mayoría de los casos, al utilizar como límite máximo de iteraciones  $N = 10$ , se encuentra un valor muy similar al valor final. Es necesario notar que en cualquier caso, para este número de iteraciones el error es menor al 2%.

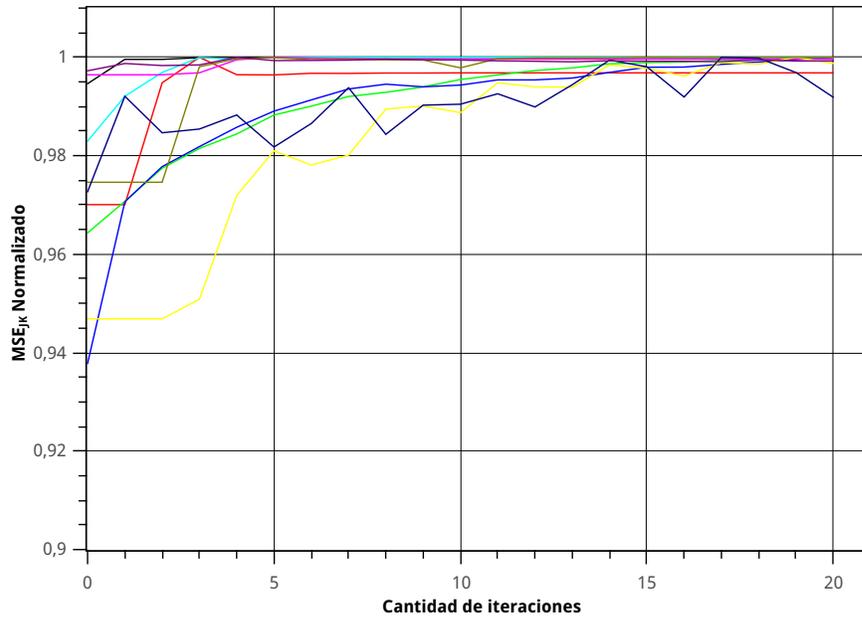


Figura C.3: Evaluación de la función objetivo obtenidas con distinto número de iteraciones. Total de 10 muestras.

## C.4. Análisis del modelo final

### C.4.1. Características del modelo

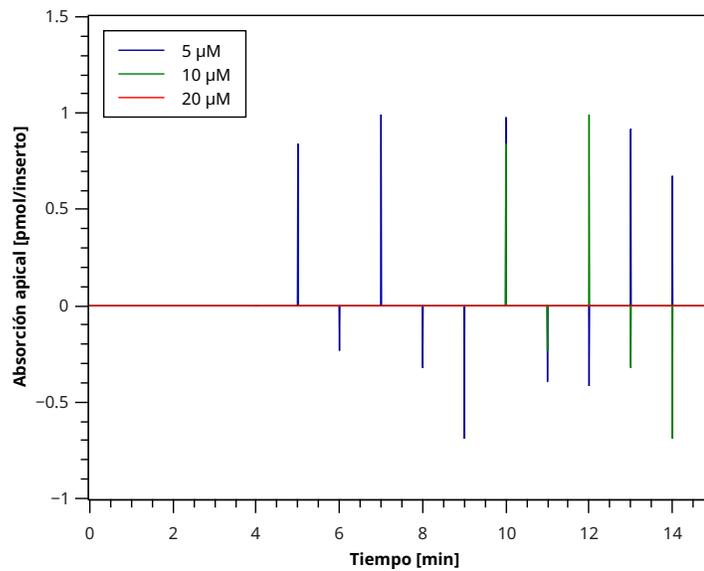


Figura C.4: Simulación de la sección oscilatoria del modelo

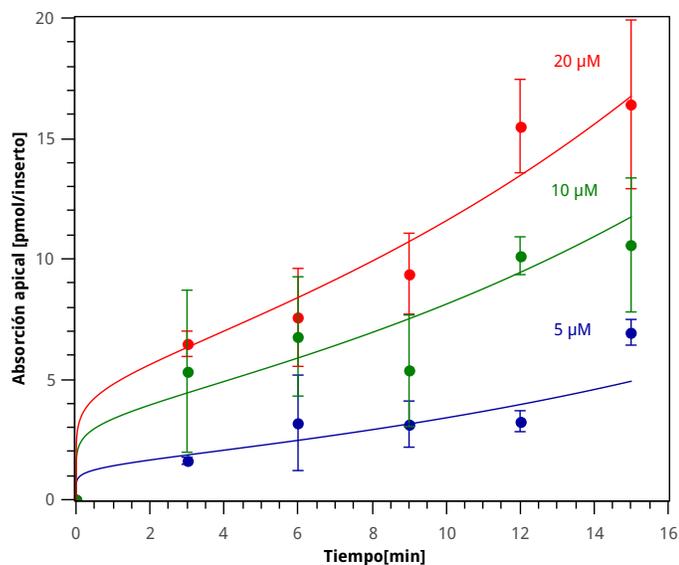


Figura C.5: Simulación del modelo empírico sin la sección oscilatoria ( $R^2 = 0.85$ )

### C.4.2. Velocidades iniciales respecto a la concentración

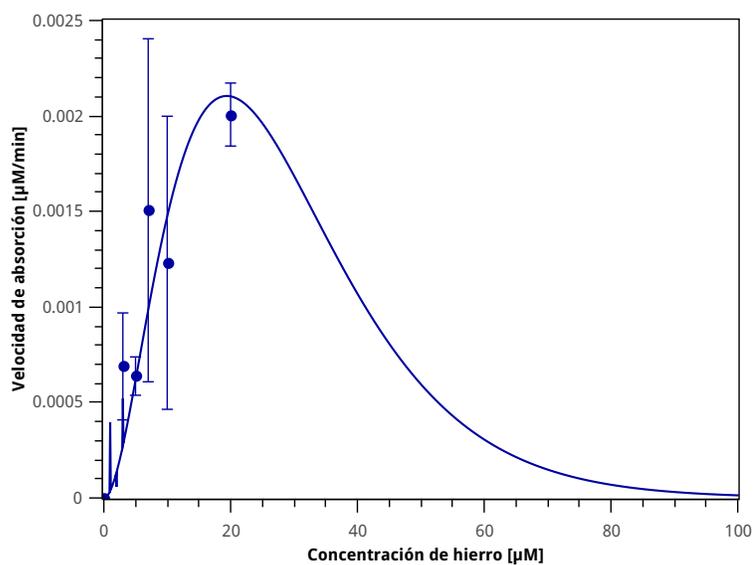


Figura C.6: Simulación de la velocidad inicial de absorción respecto a la concentración de hierro en el medio apical

### C.4.3. Absorción apical en el tiempo

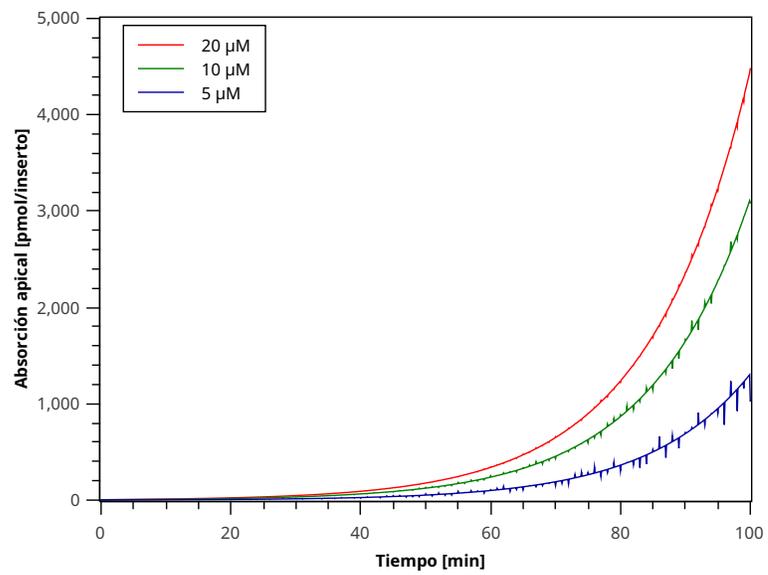


Figura C.7: Simulación de la absorción apical a distintas concentraciones en el tiempo

# Anexo D

## Modelos fenomenológicos

### D.1. Modelo de rampa

Tipo de rampa utilizada

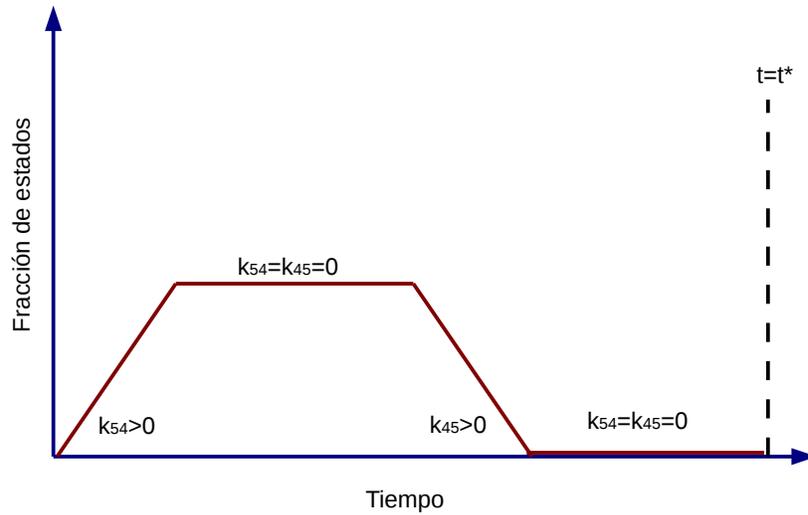


Figura D.1: Variación de proteína endocitada en el tiempo según el modelo tipo rampa.

Ecuaciones del modelo tipo rampa

$$\frac{dN_1}{dt} = k_{21}N_2 + k_{41}N_4 - k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{14}N_1 \quad (D.1)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{23}N_2 - k_{21}N_2 \quad (D.2)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{23}N_2 - k_{34}N_3 \quad (\text{D.3})$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_{34}N_3 + k_{54}N_5 + k_{14}N_1 - k_{45}N_4Fe_{out}^{+2} - k_{41}N_4 \quad (\text{D.4})$$

$$\frac{dN_5}{dt} = k_{45}N_4Fe_{out}^{+2} - k_{54}N_5 \quad (\text{D.5})$$

$$\frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} = N_{prot}k_{34}N_3 \quad (\text{D.6})$$

$$\frac{dFe_{out}^{+2}}{dt} = -\frac{V_{in}}{V_{out}} \frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} \quad (\text{D.7})$$

### Condiciones iniciales

Tabla D.1: Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo de rampa.

Variable	Valor	Unidad
$Fe_{in}$	0	$\mu M$
$Fe_{out}$	5,10 y 20	$\mu M$
$N_1$	1	-
$N_{2-5}$	0	-

### Parámetros determinados

Tabla D.2: Parámetros del modelo tipo rampa.

Parámetro	Valor	Unidades
$k_{12}$	$8.3127 \cdot 10^{-6}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
$k_{21}$	0.59	$[min]^{-1}$
$k_{23}$	0.72913	$[min]^{-1}$
$k_{34}$	3.2153	$[min]^{-1}$
$k_{41}$	0.36431	$[min]^{-1}$
$k_{14}$	9.443	$[min]^{-1}$
$k_{45}$	0.061203	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
$k_{54}$	0.57215	$[min]^{-1}$
$k_{t^*}$	11.337	$[min]$
$N_{prot}$	609.67	$[\mu M]$

## Distribución de los estados a distintas concentraciones

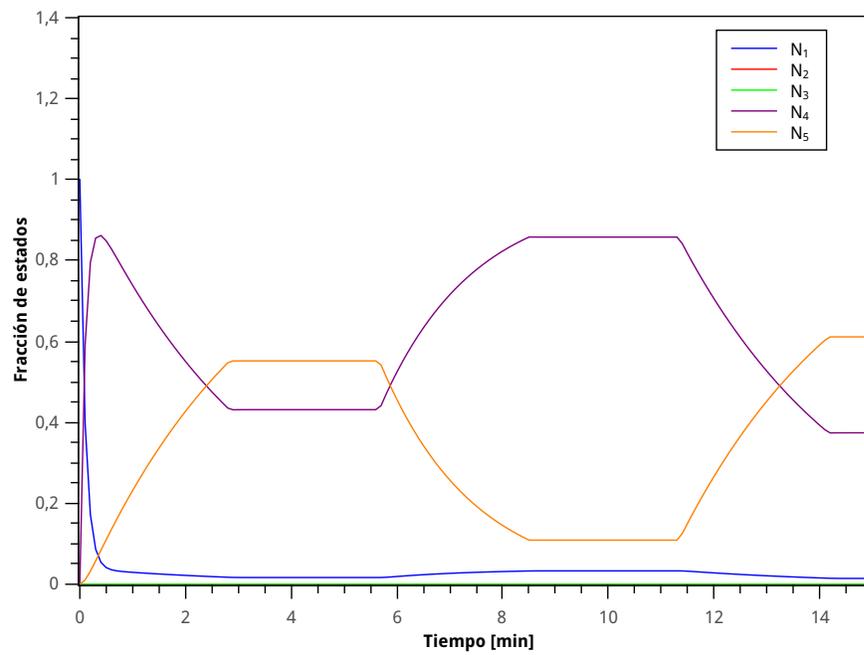


Figura D.2: Distribución de los estados del modelo de rampa  $5\mu M$ .

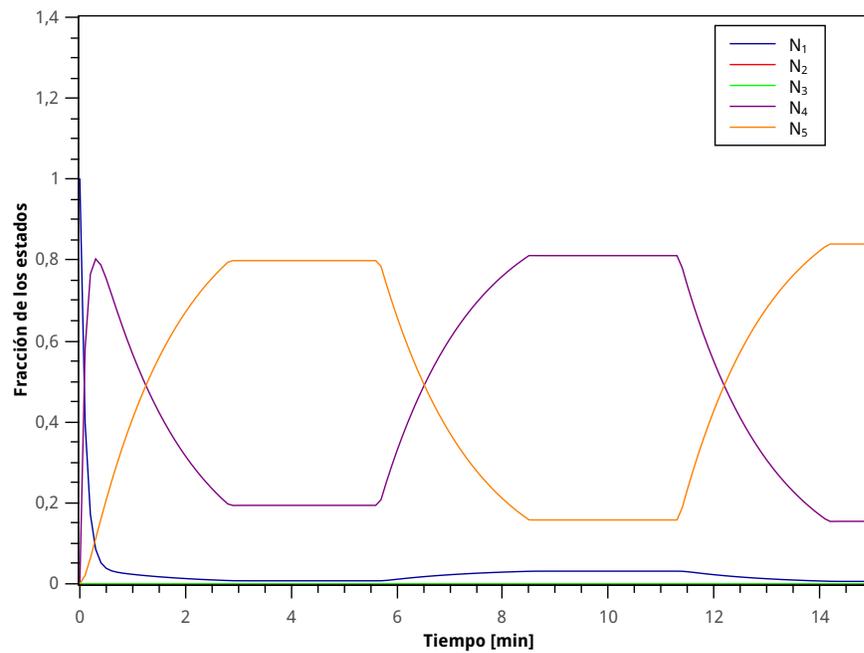


Figura D.3: Distribución de los estados del modelo de rampa  $10\mu M$ .

## D.2. Modelo LIP

### Ecuaciones del modelo tipo LIP

$$\frac{dN_1}{dt} = k_{21}N_2 + k_{41}N_4 - k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{14}N_1 \quad (D.8)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{23}N_2 - k_{21}N_2 \quad (D.9)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{23}N_2 - k_{34}N_3 - k_{35}N_3Fe_L^{+2} \quad (D.10)$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_{34}N_3 + k_{14}N_1 - k_{41}N_4 + k_{54}N_5Fe_L(t - \tau) \quad (D.11)$$

$$\frac{dN_5}{dt} = k_{35}N_3Fe_L^{+2} - k_{54}N_5Fe_L(t - \tau) \quad (D.12)$$

$$\frac{dFe_L}{dt} = N_{prot}(k_{35}N_3Fe_L^{+2} + k_{34}N_3) - k_vFe_L \quad (D.13)$$

$$\frac{dFe_{LIP}}{dt} = k_vFe_L \quad (D.14)$$

$$\frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} = N_{prot}(k_{35}N_3Fe_L^{+2} + k_{34}N_3) \quad (D.15)$$

$$\frac{dFe_{out}^{+2}}{dt} = -\frac{V_{in}}{V_{out}} \frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} \quad (D.16)$$

### Condiciones iniciales

Tabla D.3: Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo LIP.

Variable	Valor	Unidad
$Fe_{in}$	0	$\mu M$
$Fe_{out}$	5,10 y 20	$\mu M$
$Fe_L$	0	$\mu M$
$Fe_{LIP}$	0	$\mu M$
$N_1$	1	-
$N_{2-5}$	0	-

## Parámetros determinados

Tabla D.4: Parámetros del modelo tipo LIP.

Parámetro	Valor	Unidades
$k_{12}$	$6.7274 \cdot 10^{-6}$	$[min \cdot \mu M]^{-1}$
$k_{21}$	7.8524	$[min]^{-1}$
$k_{23}$	0.0023	$[min]^{-1}$
$k_{34}$	39.499	$[min]^{-1}$
$k_{41}$	0.1962	$[min]^{-1}$
$k_{14}$	7.4685	$[min]^{-1}$
$k_{35}$	11.458	$[min]^{-1}$
$k_{54}$	215.1	$[min]^{-1}$
$k_v$	0.0248	$[min]^{-1}$
$\tau$	1.7709	$[min]$
$N_{prot}$	1.2864	$[\mu M]$

### D.3. Modelo Lotka-Volterra

#### Ecuaciones del modelo Lotka-Volterra

$$\frac{dN_1}{dt} = k_{21}N_2 + k_{41}N_4 - k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{14}N_1 \quad (D.17)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{21}N_2 - k_{23}N_2N_3 \quad (D.18)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{23}N_2N_3 - k_{34}N_3 - k_{35}N_3N_5 \quad (D.19)$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_{34}N_3 + k_{14}N_1 - k_{41}N_4 + k_{54}N_5 \quad (D.20)$$

$$\frac{dN_5}{dt} = k_{35}N_3N_5 - k_{54}N_5 \quad (D.21)$$

$$\frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} = N_{prot}(k_{35}N_3N_5 + k_{34}N_3) \quad (D.22)$$

$$\frac{dFe_{out}^{+2}}{dt} = -\frac{V_{in}}{V_{out}} \frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} \quad (D.23)$$

#### Condiciones iniciales

Tabla D.5: Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo Lotka-Volterra.

Variable	Valor	Unidad
$Fe_{in}$	0	$\mu M$
$Fe_{out}$	5,10 y 20	$\mu M$
$N_1$	0.98	-
$N_{2,4}$	0	-
$N_{3,5}$	0.01	-

## Parámetros determinados

Tabla D.6: Parámetros del modelo Lotka-Volterra.

Parámetro	Valor	Unidades
$k_{12}$	$16.358 \cdot 10^{-6}$	$[\text{min} \cdot \mu M]^{-1}$
$k_{21}$	25.04	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{23}$	4.9098	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{34}$	0.0035	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{41}$	0.0443	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{14}$	48.941	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{35}$	9.1199	$[\text{min}]^{-1}$
$k_{54}$	2.6876	$[\text{min}]^{-1}$
$N_{prot}$	5.3331	$[\mu M]$

## D.4. Modelo autocatalítico

### Ecuaciones del modelo autocatalítico

$$\frac{dN_1}{dt} = k_{21}N_2 + k_{41}N_4 - k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{14}N_1 \quad (D.24)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{12}N_1Fe_{out}^{+2} - k_{23}N_2 - k_{21}N_2 \quad (D.25)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{23}N_2 - k_{34}N_3 \quad (D.26)$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_{34}N_3 + k_{14}N_1 - k_{41}N_4 + k_{64}N_4N_6 - k_{45}N_4N_5Fe_{out}^{+2} \quad (D.27)$$

$$\frac{dN_5}{dt} = k_{45}N_4N_5Fe_{out}^{+2} - k_{56}N_5N_6 \quad (D.28)$$

$$\frac{dN_6}{dt} = k_{56}N_5N_6 - k_{64}N_6N_4 \quad (D.29)$$

$$\frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} = N_{prot}k_{34}N_3 \quad (D.30)$$

$$\frac{dFe_{out}^{+2}}{dt} = -\frac{V_{in}}{V_{out}} \frac{dFe_{in}^{+2}}{dt} \quad (D.31)$$

### Condiciones iniciales

Tabla D.7: Condiciones iniciales utilizadas para el ajuste de parámetros del modelo autocatalítico.

Variable	Valor	Unidad
$Fe_{in}$	0	$\mu M$
$Fe_{out}$	5, 10 y 20	$\mu M$
$N_1$	0.98	-
$N_{2-4}$	0	-
$N_{5,6}$	0.01	-

## Distribución de los estados a distintas concentraciones

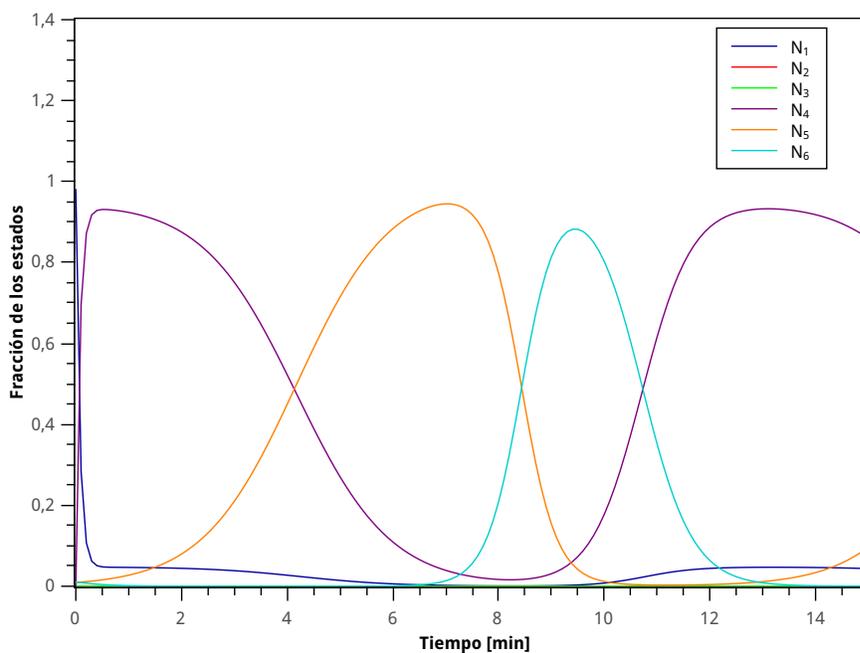


Figura D.4: Distribución de los estados del modelo autocatalítico  $5\mu M$ .

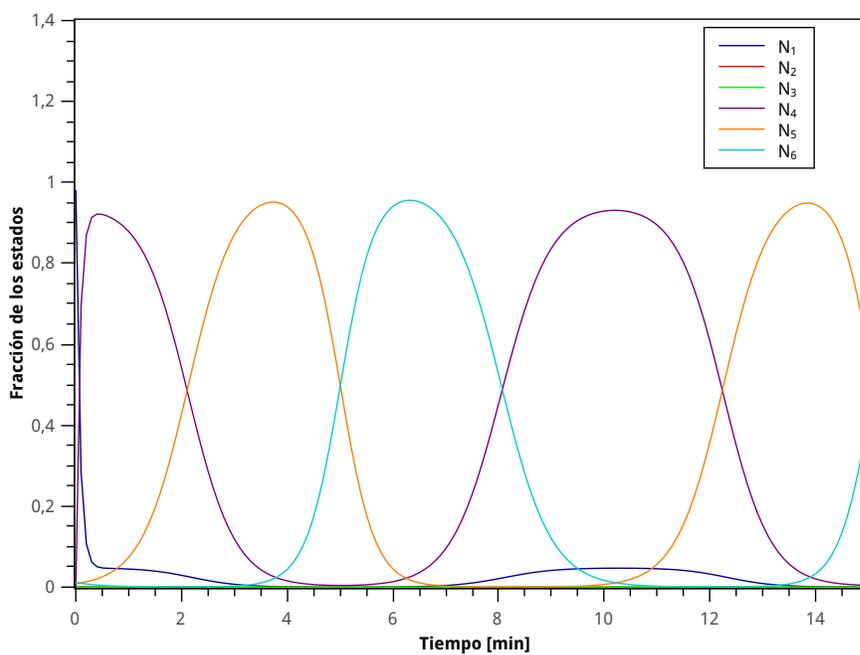


Figura D.5: Distribución de los estados del modelo autocatalítico  $10\mu M$ .