



U.N.E.D

MÁSTER EN INGENIERÍA DE SISTEMAS Y CONTROL

Proyecto de Fin de Máster

**EL CÁNCER:
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN NATUROTERAPÉUTICOS.
UN ESTUDIO EN DINÁMICA DE SISTEMAS**

Estudiante: Ángel Torres Aragón

Director: Dr. Fernando Morilla García
Codirector: Dr. Sebastián Dormido Canto

Curso Académico: 2019 – 2020
Convocatoria de Defensa: Junio

Dpto. de Informática y Automática
E.T.S de Ingeniería Informática

U.N.E.D



U.N.E.D

MÁSTER EN INGENIERÍA DE SISTEMAS Y CONTROL

Proyecto de Fin de Máster

**EL CÁNCER:
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN NATUROTERAPÉUTICOS.
UN ESTUDIO EN DINÁMICA DE SISTEMAS**

Estudiante: Ángel Torres Aragón

Director: Dr. Fernando Morilla García
Codirector: Dr. Sebastián Dormido Canto

Tipo de Proyecto Específico Propuesto por el Alumno

Dpto. de Informática y Automática
E.T.S de Ingeniería Informática

U.N.E.D



Hoja de Calificaciones



Autorización

Autorizamos a la Universidad Complutense y a la UNED a difundir y utilizar con fines académicos, no comerciales y mencionando expresamente a sus autores, tanto la memoria de este Trabajo Fin de Máster, como el código, la documentación y/o el prototipo desarrollado.

Firmado:

Firma del alumno

ABSTRACT

Unfortunately, cancer is one of the diseases with more high mortality rate since a lot of years ago. At present, this disease is responsible for 20 % of deaths worldwide, and this percentage is even increasing in a worrying way. All these facts, undoubtedly, set in the first line of the world's scientific research all efforts aimed at preventing and treating this disease.

Chemotherapy, certainly is one of the most known and applied treatments against cancer, but it has got serious side effects involving remarkable damages on healthy cells.

Between 20th century's last decades and 21st century's early ones have appeared interesting scientific investigations into cancer treatment and prevention through naturopathy. The biological trials carried out on living organisms by means of such natural medicines have opened new hopes for cancer patients. In this context, the present project is introducing two mathematical models. The first one represents organism's oxidative charge, immune memory lymphocytes and **natural prevention** multiple relationship. The second one accounts for the cancerous tumour, immune system and **natural treatment** multiple dynamics; it's about analysing the model *Kirschner-Panetta* response when incorporating a natural treatment. In addition, several simulations of the two models are offered.

Keywords: natural prevention cancer, natural treatment cancer, stable points, optimal control.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	4
Lista de Tablas.....	4
Objetivos y Metodología del Proyecto.....	5
Estructura de la Memoria.....	8
1. <u>El Sistema Inmunitario</u>	9
1.1 <i>La Activación de los Linfocitos T</i>	11
1.2 <i>Expansión, Contracción y Memoria Inmunitarias</i>	13
1.3 <i>Las Citoquinas</i>	15
1.4 <i>La Interleuquina IL-2</i>	16
2. <u>Radicales Libres y Antioxidantes</u>	17
2.1 <i>La Amenaza Oxidante</i>	18
2.1.1 <i>Las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)</i>	19
2.2 <i>ROS / RNS, Cáncer y Trastornos Celulares Degenerativos</i>	22
2.3 <i>El Sistema Antioxidante</i>	23
2.3.1 <i>Antioxidantes Enzimáticos</i>	23
2.3.2 <i>Antioxidantes No Enzimáticos</i>	25
3. <u>Prevención del Cáncer. Modelización Matemática</u>	28
3.1 <i>Modelo Naturo-Preventivo</i>	30
3.1.1 <i>Presentación del Modelo</i>	30
3.1.2 <i>Dinámica del Modelo</i>	35
3.1.3 <i>Análisis de Control Óptimo</i>	40
3.1.4 <i>Simulaciones Numéricas de Control Óptimo y Tratamiento Unidad</i>	42
4. <u>Tratamiento del Cáncer. Modelización Matemática</u>	49
4.1 <i>Modelo Naturo-IL2</i>	49
4.1.1 <i>Presentación del Modelo</i>	50
4.1.2 <i>Dinámica del Modelo</i>	55
4.1.3 <i>Análisis de Control Óptimo</i>	61

4.1.4 Simulaciones Numéricas de Control Óptimo y Tratamiento Unidad.....	64
5. <u>Conclusiones</u>	70
Anexo I.....	73
Anexo II.....	74
Anexo III.....	80
Bibliografía.....	88

Lista de Figuras

nº Pg.

- *Figura 1.* Receptores TLR de las células del sistema inmunitario innato.....10
- *Figura 2.* La sinapsis inmunológica.....12
- *Figura 3.* Rasgos diferenciadores de la primera y segunda respuestas inmunológicas.....14
- *Figura 4.* El Sistema Glutación.....24
- *Figura 5.* Control óptimo del tratamiento naturopreventivo con tiempo final fijo (60 días).....44
- *Figura 6.* Control óptimo del tratamiento naturopreventivo con tiempo final indeterminado....46
- *Figura 7.* Evolución del tratamiento preventivo unidad continuado durante 100 días.....47
- *Figura 8.* Control óptimo del tratamiento naturoterapéutico con tiempo final fijo (100 días)... 66
- *Figura 9.* Control óptimo del tratamiento naturoterapéutico con tiempo final indeterminado....67
- *Figura 10.* Evolución temporal del tratamiento natural unidad continuado durante 10 días.....69
- *Figura 11.* Matriz jacobiana del sistema de ecuaciones (2) – (6).....73

Lista de Tablas

nº Pg.

- *Tabla 1.* Descripción y valores de los parámetros del modelo Naturo-Preventivo.....33-34
- *Tabla 2.* Descripción y valores de los parámetros del modelo Naturo-IL2.....53

OBJETIVOS Y METODOLOGÍA DEL PROYECTO

El cáncer, desgraciadamente, y desde ya hace años, se encuentra entre las primeras posiciones del ranking de enfermedades de mayor incidencia en los índices de mortalidad humana. En la actualidad esta enfermedad es responsable del 20 por ciento de las muertes, y dicho porcentaje sigue aumentando de forma preocupante. Además, su incidencia mortal en las personas se duplica cada 5 años a partir de los 25 años. Estos hechos sitúan, sin duda alguna, en primera línea de investigación, todos los esfuerzos dirigidos a la **prevención** y el **tratamiento** del cáncer.

Entre los tratamientos más conocidos y de más amplia aplicación contra el cáncer se encuentra la quimioterapia. El principal problema de este tratamiento son sus graves efectos secundarios, que producen notables daños en muchas células sanas del organismo.

Entre las últimas décadas del siglo XX y las primeras del siglo XXI han aparecido interesantes investigaciones científicas sobre tratamiento y prevención del cáncer mediante naturoterapia. Las pruebas llevadas a cabo en organismos vivos con tales tratamientos naturales han abierto nuevas esperanzas para tratar y prevenir esta grave enfermedad. En este contexto de lucha contra el cáncer a partir de terapias naturales, se concretan de la siguiente manera los objetivos del presente proyecto:

- Documentar brevemente el funcionamiento del sistema inmunitario del organismo ante el acecho de peligrosos agentes extraños.
- Describir de manera breve la importancia de la amenaza oxidante de los radicales libres en nuestro organismo y la respuesta antioxidante de éste.
- Proponer la naturoterapia como tratamiento, especialmente contra el cáncer.

- Presentar un nuevo modelo que describa matemáticamente la dinámica entre la carga oxidativa del organismo, los linfocitos de memoria y un **tratamiento natural preventivo** contra el cáncer. Además, optimizaremos el nuevo modelo y presentaremos diversas simulaciones de su comportamiento.
- Ampliar un primer estudio realizado por *Ángel Torres Aragó* en la presentación de su Proyecto Final de Grado en la UNED (curso 2016-17), que consistió en modelizar la terapéutica del cáncer mediante tratamientos antitumorales naturales. El objetivo de esta ampliación será estudiar el comportamiento del conocido modelo *Kirschner–Panetta* al incorporar en dicho modelo una **terapéutica antitumoral natural**. También optimizaremos el modelo modificado y presentaremos diversas simulaciones de su comportamiento.

La idoneidad de la metodología aplicada y el soporte matemático de la Teoría de Control del *Principio del Mínimo de Pontryagin*, que fundamenta los análisis de los modelos desarrollados en el presente proyecto, han sido contrastados con los siguientes autores y trabajos:

- **Lisette Depillis, Weiqing Gu, Katherine Renee Fister, Anand Murugan.** *Chemotherapy for tumors: An analysis of the dynamics and a study of quadratic and linear optimal controls.* Mathematical Biosciences. 2007.
- **Matías Gonzalo Delgadino.** *Teoría de Control aplicada a tratamientos de quimioterapia.* Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 2011.
- **Xuezhong Wang.** *Solving optimal control problems with MATLAB - Indirect methods.* ISE. Dept., NCSU, Raleigh, NC 27695.
- **Ángel Torres Aragó.** *Quimioterapia versus naturoterapia: Tratamientos contra el cáncer. Un estudio en dinámica de sistemas.* Proyecto Final de Grado en Ingeniería informática. UNED. 2016-2017.

Las herramientas de software que se han utilizado para realizar las simulaciones han sido *MATLAB_R2017b*.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA DEL PROYECTO

Los contenidos que constituyen la memoria del presente proyecto se han distribuido en 5 partes.

La primera parte contiene cuatro secciones. Una primera sección que, tras haber sido presentada la composición básica del sistema inmunitario, describe el proceso de activación de los **linfocitos T**. En la segunda sección se explica en qué consisten la **expansión**, la **contracción** y la **memoria inmunitarias**. La tercera sección presenta el papel fundamental de las **citoquinas** en el sistema inmunitario. La cuarta sección se dedica al papel destacado de la citoquina **Interleuquin IL-2**.

La segunda parte contiene tres secciones. La primera sección explica qué entendemos por **amenaza oxidante** en el organismo, y por **especies reactivas** del **oxígeno (ROS)** y del **nitrógeno (RNS)**. La segunda sección describe la relación entre **ROS / RNS**, el cáncer y los trastornos celulares degenerativos. La tercera sección presenta el **sistema antioxidante** como mecanismo de defensa del propio organismo frente al constante ataque de las especies reactivas del oxígeno (**ROS**) y del nitrógeno (**RNS**).

La tercera parte presenta un nuevo modelo, denominado **Naturo-Preventivo**, que vertebra la relación entre la carga oxidativa del organismo, los linfocitos de memoria y un tratamiento natural preventivo contra el cáncer. Se estudian también la dinámica y la optimización del nuevo modelo. Finalmente se presentan diversas simulaciones.

La cuarta parte describe una modificación del modelo *Kirschner–Panetta* que resulta de incorporar en dicho modelo un tratamiento antitumoral natural. También se estudian la dinámica y la optimización de la nueva modelización, y se presentan diversas simulaciones.

La quinta parte contiene las conclusiones del proyecto.

Finalmente, la memoria se completa con tres anexos y la bibliografía.

1. EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario de nuestro organismo tiene una gran capacidad para detectar y eliminar todo lo que no reconoce como propio. Precisamente la finalidad de las células inmunitarias es neutralizar los agentes extraños que suponen un peligro para la integridad del organismo. Con este importante cometido, el sistema inmunitario se compone de dos importantes subsistemas: el sistema **inmunológico innato** o **humoral**, que constituye el primer nivel defensivo del organismo; y el sistema **inmunológico adaptativo** o **celular**, que se erige en el segundo nivel defensivo.

Las células del sistema **inmunológico innato**, diversificadas principalmente en macrófagos y células dendríticas, recorren continuamente los tejidos del cuerpo fagocitando materiales de desecho y microorganismos extraños ubicados en los espacios extracelulares del organismo. Estas células son las primeras en reaccionar cuando algún agente infeccioso irrumpe en el interior del cuerpo.

Las células del sistema inmunológico innato disponen de **receptores TLR** (*toll like receptors*), proteínas de membrana celular que identifican estructuras presentes en la superficie de la mayoría de bacterias y virus (*Figura 1*). Se trata de lipopolisacáridos, lipoproteínas, cadenas de ARN, etc., moléculas que solamente se encuentran en los microorganismos ajenos al propio organismo.

Además, existen diversas configuraciones de receptores TLR¹, como, por ejemplo, TLR-2, que reconoce polipéptidos bacterianos, mientras que TLR-3 y TLR-9 reconocen ácidos nucleicos virales y bacterianos, respectivamente. Ciertamente, el tipo de receptor TLR activado tras una amenaza detectada, permite a la célula inmunitaria reconocer el tipo de microorganismo al que se está enfrentando.

La primera reacción de las células del sistema inmunitario innato tras la detección del organismo invasor, es la secreción de proteínas denominadas **citoquinas**, cuyo objetivo es difundir señales de peligro, de manera que, en un estrecho intervalo de tiempo, numerosas células inmunitarias, a través del torrente sanguíneo, sean transportadas hacia el foco de la infección con la finalidad de engrosar la acción

¹ Chandran, S. S.; Verhoeven, D.; Teijaro, J. R.; Fenton, M. J. and Farber, D. L.(2009). *TLR2 engagement on dendritic cells promotes high frequency effector and memory CD4 T cell responses*. *Journal of Immunology*, 183(12):7832-41

destrucciona sobre los agentes invasores por parte del sistema inmunitario innato; lo cual permite que la mayoría de las infecciones sean neutralizadas en este primer nivel defensivo constituido por el sistema innato.

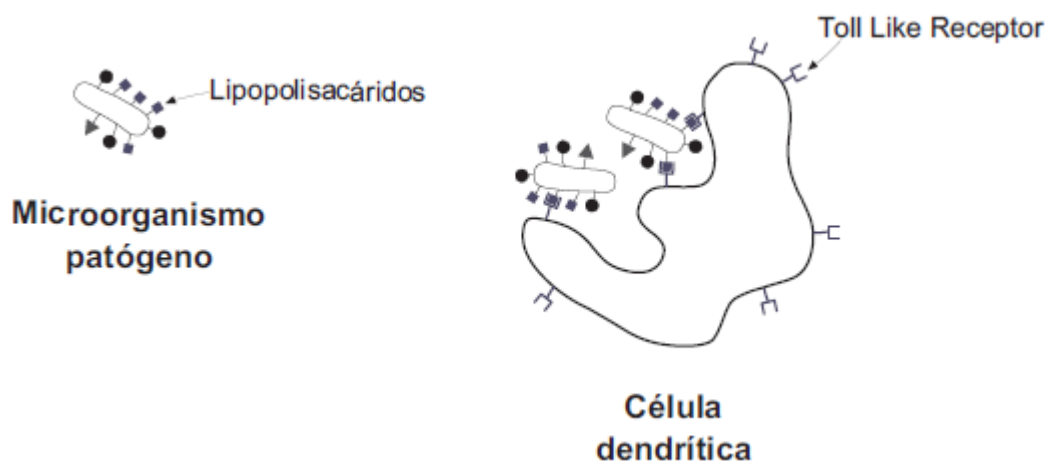


Figura 1. Las células del sistema inmunitario innato disponen de receptores TLR que les permiten identificar estructuras presentes en la mayoría de organismos patógenos. La activación de un TLR implica la fagocitosis del organismo invasor por parte de la célula dendrítica ².

Sin embargo, en algunas ocasiones el microorganismo invasor consigue escapar al control del sistema innato. En este caso se pone en marcha la respuesta defensiva del sistema **inmunológico adaptativo o celular**, organizada por las **células T**. Las células T, también denominadas **timocitos** o **linfocitos T**, lideran la respuesta del sistema inmunológico adaptativo, regulando la actividad de los otros componentes del sistema y eliminando las células infectadas que suponen una amenaza para el organismo.

Los linfocitos T se clasifican en células **T-helper** y en células **T-killer**. Las células **T-helper**, también denominadas $CD4^+$, segregan citoquinas que reclutan y activan otras células del sistema inmune. El entorno de citoquinas creado por las células **T-helper** depende de tipo de microorganismo invasor, bien sea una bacteria, un virus

² **Clemente Fernández Arias.** *Modelización Matemática del Ciclo Celular en Linfocitos T. Implicaciones para la Respuesta Inmunológica.* Proyecto Fin de Máster en Investigación Matemática. Facultad de Ciencias Matemáticas. Universidad Complutense de Madrid, 2010-2011.

o un microorganismo multicelular. De esta manera se incrementa la eficacia de la respuesta inmune, pues permite adaptarla a cada tipo específico de amenaza.

Las células *T-killer*, también denominadas $CD8^+$, son capaces de diferenciar entre células sanas y células enfermas del organismo, induciendo la apoptosis o muerte programada de estas últimas. Así es como se consigue eliminar los agentes patógenos intracelulares que han escapado al control del primer nivel defensivo del organismo (sistema inmunitario innato).

1.1 La Activación de los Linfocitos T

Los linfocitos *T* inicialmente se generan en la médula ósea y completan su proceso de maduración en el timo. Cuando las células *T* abandonan el timo se encuentran todavía en un estado inactivo (***naive***) y circulan por los órganos linfoides transportados por los sistemas linfático y sanguíneo. En los órganos linfoides, especialmente en los ganglios linfáticos, los linfocitos interactúan con células dendríticas procedentes del foco de infección tras haber fagocitado células del agente infeccioso. Durante el proceso de fagocitosis, las proteínas del microorganismo que ha provocado la respuesta inmunitaria son fragmentadas en péptidos de pocos aminoácidos de longitud. Estos péptidos, denominados **antígenos**, se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (***MHC***), que se encuentra en la superficie de la membrana de las células dendríticas³.

Mediante proteínas de membrana denominadas ***TCR*** (*Receptor de Célula T*), cuya estructura es complementaria a los denominados ***APCs*** (complejos *MHC-péptido*), las células *T* reconocen los antígenos que se encuentran adheridos al ***MHC***.

Cuando un complejo *MHC-péptido* en la membrana de una célula dendrítica encaja perfectamente en el receptor *TCR* de un linfocito *naive*, las dos células permanecen unidas durante cierto tiempo, que en determinados casos puede llegar a ser de varias horas⁴, formando lo que se conoce como **sinapsis inmunológica**. De este

³ Megan K.L. MacLeod, John W. Kappler and Philippa Marrack, *Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-Assignment*. 2010 Blackwell Publishing Ltd, Immunology, 130, 10–15.

⁴ Giandomenica Iezzi, Klaus Karjalainen, and Antonio Lanzavecchia, *The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naïve and Effector T Cells*. *Immunity*, Vol. 8, 89–95, January, 1998.

modo es como el linfocito *T* se activa, transformándose en una célula *effector*. En este estado ya será capaz de movilizar otras células inmunitarias, secretar citoquinas para organizar la respuesta inmunológica y desplazarse al foco de la infección para combatir al agente patológico. Concretamente, el destino de los linfocitos activados depende fundamentalmente del tipo de antígeno reconocido y de la sinapsis acaecida (*Figura 2*).

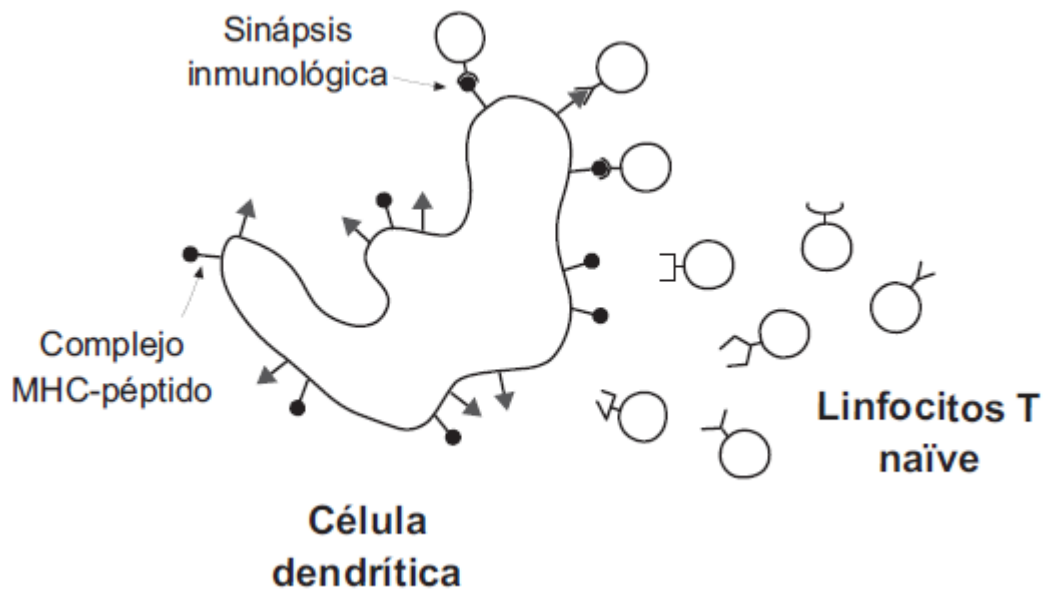


Figura 2. La sinapsis inmunológica acaece cuando la estructura del TCR de un linfocito *T* reconoce un péptido presentado por el MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de una célula dendrítica ².

La respuesta de los linfocitos o células *T* es diferente de la respuesta de las células del sistema innato. Cualquier célula del sistema innato puede reconocer a cualquier microorganismo patógeno mediante sus receptores *TLR* y fagocitarlo directamente o bien unirse a él liberando enzimas antimicrobianos que lo destruyen. Sin embargo, los linfocitos *T* solamente interaccionan con células del propio organismo, bien para activarlas, o bien para destruirlas si se trata de células infectadas por el organismo invasor, evitando así la propagación de la enfermedad. Además, la respuesta de los linfocitos *T* es mucho más específica, puesto que un linfocito sólo

se activa si su *TCR* reconoce un péptido concreto del microorganismo invasor; lo cual incrementa enormemente su eficacia.

1.2 Expansión, Contracción y Memoria Inmunitarias

Ciertamente, los organismos patógenos invasores en poco tiempo pueden llegar a multiplicarse en cantidades ingentemente elevadas. Para contrarrestar esta expansión, los linfocitos activados también empiezan a dividirse a velocidades similares (***expansión inmunitaria***). Sobre la base de un número total estimado de 3×10^{11} células *CD8⁺* en nuestro organismo humano, $1,2 \times 10^{11}$ (40 %) pueden llegar a activarse de manera específica tras la invasión patógena ⁵. Lo cual supone entre 16 y 20 divisiones de cada célula *CD8⁺* (células *T-killer*).

En la mayor parte de los casos, la expansión inmunitaria acaba eliminando el microorganismo patógeno. Una vez desaparecida la infección, la mayoría (aproximadamente un 90 %) de las células *CD8⁺ effector* morirán por apoptosis celular ⁶. La razón de esta muerte extensiva por apoptosis de tantas células *effector* (***contracción inmunitaria***) es la necesidad de restablecer el equilibrio homeostático de las constantes vitales del organismo tras desaparecer la amenaza patógena.

Los linfocitos T que sobreviven tras la contracción inmunitaria se convertirán en **linfocitos de memoria**, los cuales, dentro de un reducido espacio de tiempo, irán perdiendo la agresividad de sus predecesores linfocitos *effector* y adquirirán unos rasgos característicos que les convierte en vigilantes defensivos y les prepara para ulteriores invasiones del microorganismo patógeno recientemente eliminado. Entre los rasgos más relevantes de los linfocitos de memoria cabe destacar los siguientes: su habilidad para reactivarse rápidamente ante una nueva aparición de los antígenos desaparecidos; una frecuencia multiplicativa más elevada que sus

⁵ Joseph D. Miller, Robbert G. van der Most, Rama S. Akondy, John T. Glidewell, Sophia Albott and al.

“Human Effector and Memory *CD8⁺ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines*”. *Immunity* 28, 710–722, May 2008.

⁶ Louise M. D. Cruz, Mark P. Rubinstein, and Ananda W. Goldrath. “Surviving the crash: transitioning from effector to memory *CD8⁺ T cell*”. *Semin Immunol.* 2009 April; 21(2): 92–98.

predecesores; una amplia distribución por todos los tejidos del organismo y su habilidad para sobrevivir y renovarse durante largos periodos de tiempo en ausencia de elementos patógenos ⁷. La respuesta inmunológica de los linfocitos de memoria se conoce como **respuesta secundaria**, para diferenciarla de la primera respuesta inmunológica (**respuesta primaria**) (Figura 3).

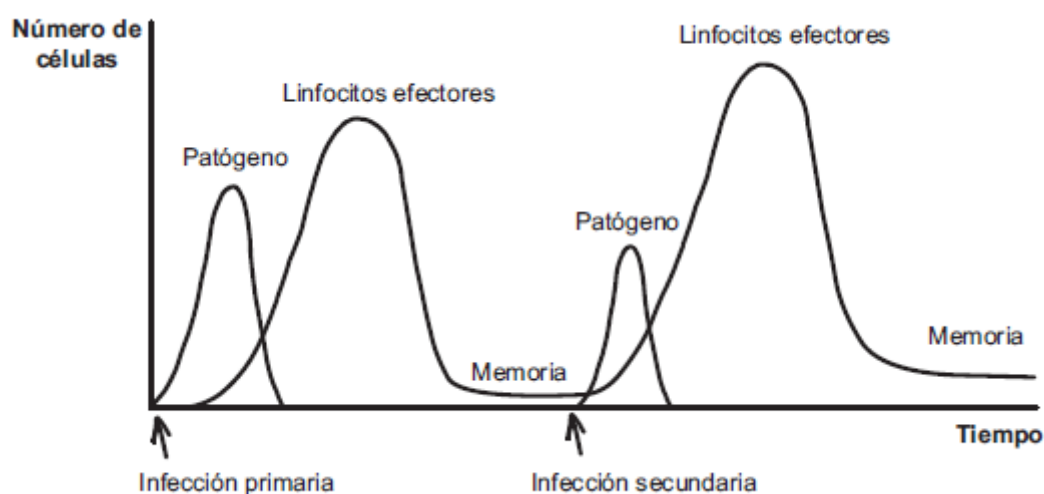


Figura 3. Rasgos diferenciadores de la primera y segunda respuestas inmunológicas ².

Ciertamente existe un proceso generador y a la vez diferenciador entre el 90 % - 95 % de células $CD8^+$ *effector*, que mueren por apoptosis celular durante la contracción inmunitaria, y el 5 % - 10 % restante que sobreviven para convertirse en linfocitos de memoria. El origen de este proceso cabe situarlo en el punto de la sinapsis inmunológica, donde se produce la activación de los linfocitos *naive*. Estas células *naive* se dividen tras establecerse la sinapsis inmunológica con una célula dendrítica. Dicha sinapsis origina una polarización del linfocito *naive*, de modo que la célula hija más alejada del punto de contacto *TCR-antígeno* adquirirá características típicas de las células de memoria, mientras que la célula hija más próxima adquirirá rasgos característicos de las células *effector*.

⁷ Matthew A. Williams, Eugene V. Ravkov, and Michael J. Bevan. "Rapid Culling of the $CD4^+$ T Cell Repertoire in the Transition from Effector to Memory". *Immunity* 28, 533–545, April 2008.

Se trata, pues, de una división celular asimétrica que genera dos fenotipos distintos de células inmunes ⁸. Si bien ambas células hijas pueden adquirir rasgos característicos de células efector, sin embargo, solamente las células resistentes a la apoptosis de la contracción inmunitaria sobreviven como linfocitos de memoria.

1.3 Las Citoquinas

El término **citoquina** (*cytokine*) deriva etimológicamente de una combinación de dos palabras griegas: “*cyto*”, que significa célula, y “*kinos*”, que significa movimiento⁹. Las citoquinas básicamente son las moléculas que actúan como señales de comunicación que utiliza el sistema inmunológico para activar las células inmunes y desplazarlas hacia el lugar de la agresión patógena, bien sea inflamación, infección o disfunción tumoral. Sin duda debemos reconocer que las citoquinas intervienen prácticamente en todos los procesos biológicos del cuerpo humano. Si bien la tipología de las citoquinas es muy diversa, cabe destacar ciertos tipos de citoquinas más conocidos, como son, por ejemplo, las interleuquinas (*IL*), los interferones (*IFN*) y los factores de necrosis tumoral (*TNF*).

Recordando brevemente un poco de historia, cabe destacar que no fue hasta el año 1974 cuando **Cohen and al.** propusieron el término citoquina (*cytokine*) para denominar tales insignes moléculas. Sin embargo, en 1957 ya se había descubierto la primera citoquina, el *Interferon-1*, por aquel entonces referidas todavía como *factores solubles*. En el año 1970, **Igal Gery and Byron Waksman** empezaron a estudiar los *factores solubles* como reguladores de las funciones de los linfocitos T, y dieron la primera descripción de *factor activador de linfocitos T*, y, más tarde, de *factor de multiplicación de células T*.

⁸ **Carmen Gerlach, Jeroen W.J. van Heijst, Erwin Swart and al.** “One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation”. J. Exp. Med. Vol. 207 No. 6 1235-1246.

⁹ **Roshene.R, Asha Ramesh.** “Cytokines”. J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 9(5), 2017, 719-721.

1.4 La Interleuquina IL-2

La Interleuquina *IL-2* y su receptor *IL-2R* se cuentan entre las primeras citoquinas que se descubrieron entre los años 1983 – 1984. Sin embargo, la importante y a la vez compleja funcionalidad de la *IL-2* y de su receptor en la regulación de la respuesta inmune, está todavía emergiendo en nuestros días.

La *IL-2* fue descrita inicialmente como un factor de proliferación de linfocitos T, tras la comprobación que mejoraba muy significativamente la proliferación de células *T in vitro*¹⁰. Se evidenció que la expansión *in vivo* de células *T* durante la respuesta inmune primaria contra infecciones víricas se incrementa con la acción de la *IL-2*. Al respecto se comparó la reacción de linfocitos *IL-2R⁻*, desprovistos del receptor *IL-2R*, y de linfocitos *IL-2R⁺*, equipados con este receptor. El resultado de la comparativa indicó que la proliferación de las células *IL-2R⁺* era una quinta parte mayor que la proliferación de las células *IL-2R⁻*.

Una segunda experimentación se propuso cuantificar el efecto de la *IL-2* en la generación y funcionalidad de los linfocitos de memoria y la respuesta secundaria del sistema inmune. A tal efecto se midió la reacción de linfocitos *IL-2R⁻* y de linfocitos *IL-2R⁺* ante una segunda infección vírica después de 45 días de haber sufrido la primera infección. La enorme expansión sufrida por las células *IL-2R⁺* contrastó con la prácticamente nula proliferación de las células *IL-2R⁻*. Concretamente se evidenció una diferencia de 30 a 40 veces entre las frecuencias de expansión de ambos tipos de linfocitos T¹¹. Lo cual demuestra la influencia crucial de la citoquina *IL-2* en la respuesta secundaria del sistema inmune. De manera que las células *effector* generadas en ausencia de la acción de la citoquina *IL-2* se transformarían en linfocitos de memoria ineficaces.

¹⁰ **Martin F. Bachmann, Annette Oxenius.** “*Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again*”. EMBO reports (2007) 8, 1142–1148.

¹¹ **Martin F. Bachmann, Petra Wolint, Senta Walton, Katrin Schwarz and Annette Oxenius.** “*Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections*”. Eur. J. Immunol. 2007. 37: 1502–1512.

2. RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

Hace millones de años, sencillos organismos unicelulares acuáticos empezaron a verter en su medio de *habitat* un nuevo agente tóxico. En un contexto de adaptabilidad evolutiva, otros organismos encontraron formas de utilizar dicho agente en provecho propio. Así fue como muchos organismos desarrollaron la habilidad de usar el agente tóxico para optimizar procesos de extracción de energía de sus productos alimenticios. Con el transcurso del tiempo, los beneficios del citado agente permitió la emergencia de nuevas especies, cuya existencia dependía completamente de aquella inicialmente pobre práctica de aprovechamiento de los desechos de sus ascendientes primitivos.

El agente tóxico en cuestión fue el **oxígeno**, que era producido como producto metabólico de desperdicio por aquellos primigenios organismos acuáticos. Posteriores especies de plantas terrestres imitaron a sus ascendientes acuáticos y, mediante la función clorofílica, empezaron a contribuir significativamente en el incremento medioambiental del nivel de oxígeno.

El gran impulso que posibilitó el desarrollo de la vida animal multicelular, fue en parte consecuencia del importante arsenal de energía celular que podía ser extraído de las sustancias alimenticias, mediante reducción enzimática del oxígeno.

Pero no olvidemos que, al iniciar este apartado, hemos presentado el oxígeno como un producto de desperdicio tóxico; de manera que, aunque las especies de animales más evolucionadas no pueden vivir sin él, el oxígeno sigue siendo un agente extremadamente peligroso con el que hay que convivir. Este dilema es el que en el ámbito científico se ha denominado la “*La Paradoja del Oxígeno*”^{12, 13}. A este respecto pensemos que las reacciones de oxidación convierten el hierro en herrumbre, vuelven agria y cortan la leche y hacen rancios el aceite y la carne. De manera parecida, nuestro propio organismo también se estropearía de forma rápida si no dispusiéramos de numerosas defensas antioxidantes que minimizan el proceso oxidativo.

¹² **Kelvin J. A. Davies.** “*Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems*” IUBMB Life, 50: 279–289, 2000.

¹³ **Davies, K. J. A., and Ursini, F.** (1995) “*The Oxygen Paradox*”. CLEUP University Press, ISBN 88-7178-374-3, Padova, Italy.

2.1 La Amenaza Oxidante

Las causas de las propiedades tóxicas del oxígeno habían sido bastante confusas hasta que **Gerschman** y **compañeros**¹⁴, en el año 1954, publicaron su teoría de los radicales libres sobre la toxicidad del oxígeno, en la que argumentaban que la toxicidad del oxígeno se debía a formas parcialmente reducidas del oxígeno. Dos años más tarde (1956), **D. Harman**¹⁵, siguiendo el campo de investigación abierto por *Gerschman*, presentó un trabajo relacionando la reciente teoría de los radicales libres con el proceso de envejecimiento de los organismos vivos. En el año 1969 se inició una segunda época en la investigación sobre los radicales libres, cuando **McCord** y **Fridovich**¹⁶ descubrieron la enzima antioxidante *superóxido dismutasa* (*SOD*), que confirmaba la importancia de los radicales libres en los sistemas vivos. Desde entonces, posteriores investigaciones que alcanzan hasta nuestros días han ido acumulando nuevas pruebas de que los sistemas vivos no sólo se han adaptado para coexistir con los radicales libres, sino que también han desarrollado mecanismos que les permiten un uso ventajoso de los radicales libres en sus funciones fisiológicas.

Las llamadas **especies reactivas del oxígeno (ROS)** y **especies reactivas del nitrógeno (RNS)**, son principalmente productos del metabolismo normal de la célula, aunque las **ROS** también pueden proceder de fuentes exteriores como, por ejemplo, las radiaciones ultravioleta, el ozono o los elementos contaminantes medioambientales. Bajo el concepto denominado con el término **ROS** se incluyen los radicales libres y también los oxidantes no radicales

Los **radicales libres** se definen como las moléculas o los fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desaparejados en orbitales atómicos o moleculares. Concretamente estos electrones desaparejados son los que confieren a los radicales libres la alta reactividad que poseen. Una notación comúnmente

¹⁴ **Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W.O.** (1954). “*Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in Common*”. *Science*, 119, 623–626.

¹⁵ **Harman, D.** (1956). “*Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry*”. *J. Gerontol.*, 11, 298–300.

¹⁶ **McCord, J. M., & Fridovich, I.** (1969). “*Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte Hemocuprein*”. *J. Biol. Chem.*, 244, 6049–6055.

aceptada es representar los radicales libres por su correspondiente fórmula química con un punto como superíndice.

Por otra parte, las ROS y las RNS pueden aparecer como elementos perjudiciales o beneficiosos, pues, paradójicamente, pueden actuar de manera dañina o bien beneficiosa en los sistemas vivos ¹⁷. En las células animales, aproximadamente un 10% de ROS y RNS es producido de manera controlada y tiene como objetivo cumplir funciones fisiológicas importantes como, por ejemplo, señalización y comunicación celulares, control del flujo sanguíneo o bien regulación del sistema inmuno-defensivo del organismo. Por otra parte, los efectos perjudiciales de ROS y RNS, causantes de potenciales daños biológicos, se denominan **carga oxidativa** y **carga nitrosativa** respectivamente; y aparecen cuando una sobreproducción de ROS/RNS coexiste con una marcada deficiencia de elementos antioxidantes. En este caso, el exceso de ROS/RNS puede dañar los lípidos, las proteínas o el DNA celulares, inhibiendo sus respectivas funciones normales. Por este motivo, las cargas oxidativa y nitrosativa están implicadas en patologías de enfermedades tan graves como el cáncer, la diabetes, la arterioesclerosis, el alzhéimer o el parkinson. Esta es la razón por la que la **homeostasis reducto-oxidativa**, que expresa el delicado equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de ROS/RNS, sea un aspecto fundamental en el desarrollo y supervivencia de los organismos vivos.

2.1.1 Las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)

Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

El radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el producto mono-reducido del oxígeno molecular (O_2). Este radical libre, que se genera por procesos metabólicos en los sistemas vivos o bien por radiación ultravioleta del oxígeno molecular, es considerado el ROS más elemental, y como tal puede posteriormente interactuar

¹⁷ **Marian Valko ,Dieter Leibfritz, Jan Moncola, Mark T.D. Cronin, Milan Mazura and Joshua Telser.** “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 44–84.

con otras moléculas, bien sea directamente o bien mediante enzimas o procesos catalizados metálicamente, para generar especies ROS derivadas¹⁸.

La mayor parte de la producción del radical superóxido se genera dentro de las mitocondrias celulares¹⁹. En las células de los organismos vivos más evolucionados, la energía se produce en las mitocondrias celulares en forma de *ATP*, mediante la cadena de transporte de electrones (*ETC*). Aproximadamente un 80% de todo el oxígeno usado por las células se consume en la *ETC*. Durante este proceso de transducción de energía, una pequeña cantidad de electrones consigue desviarse prematuramente del proceso para generar radicales superóxido, en lugar de contribuir a la reducción del oxígeno a agua. Según mediciones realizadas a nivel celular, solamente entre un 1% y un 3% de todos los electrones de la cadena de transporte escapan del proceso transductor de energía, generando radicales superóxido. Sin embargo se trata de una cantidad significativa de radicales superóxido generados, dado que dichos radicales se encuentran implicados en una serie de enfermedades graves que sufren los organismos vivos.

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es un radical libre, pero juega un papel destacado como compuesto intermediario en la producción de radicales libres muy reactivos²⁰. Dado su carácter eléctricamente neutro, penetra hábilmente a través de las membranas biológicas, difundiéndose muy fácilmente entre las células. El H_2O_2 es producido en varios eventos intracelulares, particularmente durante el transporte oxidativo normal en las mitocondrias.

¹⁸ Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. D. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress". *Curr. Med. Chem.*, 12, 1161–1208.

¹⁹ Cadenas E. & Davies, K. J. A. (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 222–230.

²⁰ Nordberg J. & Arner E. S. J. (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system". *Free Radic Biol Med*, 31(11), 1287-1312.

Radical Hidroxilo (OH^\bullet)

El radical hidroxilo (OH^\bullet) es la forma neutra del ión hidróxido. Debido a su fuerte reactividad con biomoléculas, este radical probablemente es capaz de hacer más daño a los sistemas biológicos que cualquier otro ROS²¹. De hecho reacciona con casi todas las moléculas de organismos vivos que se encuentran relativamente cerca de él, puesto que no puede desplazarse a una distancia significativa desde el lugar donde se genera.

La simple exposición de los organismos vivos a radiaciones ultravioleta causa la rotura de los enlaces $O-H$ de la molécula del agua, generando el radical hidroxilo:



Cuando el radical OH^\bullet se genera cerca del ADN celular, ataca fácilmente a la desoxiribosa y a las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas de este ácido nucleico. De hecho, se han catalogado por lo menos trece productos generados por ataque del OH^\bullet sobre las bases nitrogenadas del ADN. Puesto que estos productos son característicos de dicho ataque, los laboratorios se sirven de ellos como medida del grado de daño sufrido por el ADN celular. Se ha comprobado que el ADN de células tumorales cancerosas posee cantidades más elevadas de estos productos OH^\bullet -derivados que las cantidades que poseen tejidos no cancerosos²².

El radical OH^\bullet también se encuentra implicado en el daño que sufren los lípidos en los procesos de peroxidación.

²¹ **Halliwell, B.** (1987). "Oxidants and human disease: some new concepts". FASEB J, 1, 358-3649.

²² **Barry Halliwell, Ph.D.** "Free Radicals and Antioxidants: A Personal View". Nutrition Reviews, Vol. 52, No. 8 August 1994: (1)253-265.

2.2 ROS / RNS, Cáncer y Trastornos Celulares Degenerativos

Se ha verificado que las cargas oxidativa (*ROS*) y nitrosativa (*RNS*) han estado implicadas en enfermedades cancerosas y en trastornos celulares degenerativos neurológicos, cardiovasculares, diabéticos, artríticos, de envejecimiento y otros ²³. De hecho, en enfermos con problemas de arterioesclerosis, se han observado procesos oxidantes en lípidos de paredes vasculares sanguíneas ²⁴. También se ha confirmado una producción excesiva de radicales libres en tejidos con artritis reumatoide ²⁵. Han aparecido pruebas de daños oxidativos en enfermedades neurodegenerativas ²⁶. Además, es ampliamente aceptado que el envejecimiento de los tejidos vivos está provocado básicamente por daños en el ADN, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas, causados por la acción de radicales libres ²⁷.

En tejidos vivos, las **especies reactivas del oxígeno (ROS)** inducen un desequilibrio reducto-oxidante que ha sido detectado en células cancerosas comparadas con células normales. Lo cual relaciona el desequilibrio reducto-oxidante con la estimulación cancerígena. Una modificación continuada del material genético producida por daños oxidativos en las células, razonablemente conducirá a mutaciones en los genes, que muy probablemente iniciarán procesos cancerosos. Ciertamente, las mutaciones en el ADN celular resultan ser el primer paso en la carcinogénesis; y, de hecho, se han encontrado lesiones oxidativas en el ADN de células tumorales. Éstas son las razones que implican las **lesiones oxidativas del ADN celular** en la etiología del cáncer. Este daño en el ADN puede concretarse de diversas formas: rotura simple o doble de las hebras del ADN, modificaciones de la desoxiribosa o de las bases nitrogenadas purínicas y piridimínicas, o bien enlaces cruzados en el ADN molecular.

²³ **Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A.** (2006). *"Biomarkers of oxidative damage in human disease"*. Clin. Chem., 52, 601–623.

²⁴ **Lusis AJ, Navab M.** *"Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall"*. Biochem Pharmacol 1993;46:2119-26

²⁵ **Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE.** *"Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?"* J Lab Clin Med 1992;119:598-620

²⁶ **Halliwell B.** *"Reactive oxygen species and the central nervous system"*. J Neurochem 1992;59:1609-23

A parte de las lesiones oxidativas del ADN celular, también se ha comprobado la implicación de los procesos de **peroxidación de lípidos** en mecanismos cancerígenos.

2.3 El Sistema Antioxidante

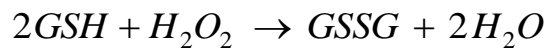
Frente al constante ataque de las especies reactivas del oxígeno (*ROS*) y del nitrógeno (*RNS*), los organismos vivos han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa para prevenir y reparar daños y disfunciones provocados por las cargas oxidativas y nitrosativas. Estos mecanismos de defensa, que colectivamente reciben el nombre de **Sistema Antioxidante**, pueden clasificarse básicamente como:

1. Antioxidantes enzimáticos.
2. Antioxidantes no enzimáticos.

2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos

Sin duda alguna, en las células de los mamíferos, las enzimas más importantes en su función neutralizante del H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) son las **Glutación Peroxidasas**. Estas enzimas utilizan el poder reductor del *glutación (GSH)* para neutralizar el peróxido de hidrógeno. En la reducción de una molécula de peróxido de hidrógeno, dos moléculas de *GSH* se oxidan para formar *GSSG*, un compuesto con un puente disulfuroso. Otra enzima de la misma familia, la **Glutación Reductasa**, utiliza la enzima *NADPH* para regenerar dos moléculas de *GSH* a partir de una molécula de *GSSG*; permitiendo, de esta manera, la continua acción neutralizante de la *Glutación Peroxidasa*²² (Figura 4).

GLUTATIÓN PEROXIDASA



GLUTATIÓN REDUCTASA

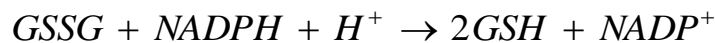


Figura 4. El Sistema Glutación

A continuación, describimos las singulares propiedades antioxidantes del *Glutación* (*GSH*):

El **Glutación** (**GSH**) es un tripéptido (ácido glutámico – cisteína – glicina). Se encuentra abundantemente en el citoplasma, en el núcleo y en las mitocondrias de la célula, siendo el principal antioxidante en todos estos compartimentos celulares. Se le considera probablemente como el antioxidante más activo en los sistemas biológicos ²⁷. Las principales funciones protectoras del *GSH* contra la carga oxidativa son las siguientes ²⁸ :

- I. Como hemos visto en el párrafo anterior, el *GSH* es el sustrato de importantes reacciones catalizadas por varias enzimas antioxidantes, como son la *glutación peroxidasa* y la *glutación reductasa*.
- II. El *GSH* participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática.

²⁷ Surai, P.F. (2002). "Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction". Nottingham University Press, Nottingham, UK.

²⁸ Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes". J. Nutr. Biochem., 16, 577–586.

- III. Es especialmente efectivo neutralizando directamente el tan destructivo radical hidroxilo (OH^\bullet) ²⁹.
- IV. El *GSH* puede regenerar importantes antioxidantes como son las vitaminas *C* y *E* a sus formas activas.

Tan importantes son las funciones del *GSH* en la vida celular que la mayoría de las células contienen reservas en exceso de *GSH* ³⁰.

2.3.2 Antioxidantes No Enzimáticos

Nuestras células también utilizan una serie de importantes compuestos antioxidantes que reaccionan directamente con los agentes oxidantes, obteniendo, de esta manera, su desactivación. Entre tales compuestos antioxidantes destacaremos los *Flavonoides*.

Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales que se encuentran en fuentes de origen vegetal, existiendo más de 4000 variedades. Su nombre se deriva del latín “*flavus*” (amarillo) y muchos de estos compuestos son los que producen la coloración de flores, yemas o de las hojas en otoño. La principal acción preventivo-protectora de los flavonoides en las células vegetales y animales consiste en la reducción de la carga oxidante. Esta importante acción es conducida básicamente a través de tres mecanismos distintos ³¹:

- i. Acción directamente antioxidante sobre las especies reactivas del oxígeno (*ROS*) y las especies reactivas del nitrógeno (*RNS*).

²⁹ **Béla Fiser, Balázs Jójá, Imre G. Csizmadia, Béla Viskolcz.** “*Glutathione – Hydroxyl Radical Interaction: A Theoretical Study on Radical Recognition Process*”. PLOS ONE. September 2013 | Volume 8 | Issue 9 | e73652.

³⁰ **Shen, D., Dalton, T. P., Nebert, D. W., & Shertzer, H. G.** (2005). “*Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen Production*”. J. Biol. Chem., 280, 25305–25312.

³¹ **Kumiko Ishige, David Schubert and Yutaka Sagara.** “*Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms*”. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 30, No. 4, pp. 433–446, 2001.

- ii. Incremento de los niveles orgánicos del destacado antioxidante endógeno *Glutación (GSH)*.
- iii. Prevención del influjo letal sobre la célula del ión Ca^{+2} , provocado por niveles elevados de *ROS* y *RNS*.

Estos tres mecanismos reductores de la carga oxidante del organismo configuran a los flavonoides como compuestos muy importantes en la prevención y la protección frente a enfermedades graves neurodegenerativas, arterioesclerosis, inflamaciones, hipertensión, etc...

Además de la función **preventivo-protectora** de los flavonoides sobre las células orgánicas, tal como acabamos de describir en el párrafo anterior; los flavonoides destacan por su carácter **terapéutico** en procesos cancerosos. Las propiedades anticancerígenas de estos compuestos se basan en la habilidad que muestran induciendo la apoptosis de las células tumorales malignas.

La **Quercetina** es un flavonoide de la clase de los flavonoles que merece ser destacado por su abundante presencia en nuestra dieta occidental y por sus relevantes propiedades protectoras y terapéuticas en organismos vivos.

Entre los flavonoides, la *quercetina* es el que presenta la mayor potencia antioxidante frente a las *ROS* y a las *RNS* ³².

Por otra parte, *Myhrstad, Carlsen* y otros, en una experimentación llevada a cabo sobre células *COS-1*, comprobaron que un tratamiento con $25 \mu M$ de *quercetina* consiguió incrementar el nivel del *glutación (GSH)* celular en un 51 % ³³.

Así es como los efectos protectores de la *quercetina* contra la carga oxidativa del organismo, se traducen en efectos beneficiosos sobre el corazón y los pulmones, reduciendo de esta manera riesgos de padecer asma, enfermedades coronario-arteriales y procesos tumorales.

³² **Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A.** “Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical”. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 585, 325–337.

³³ **Mari C. W. Myhrstad, Harald Carlsen and al.** “Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter”. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 32, No. 5, pp. 386–393, 2002.

Mouria, Gukovskaya y otros, en una investigación “*in vivo*” sobre el potencial terapéutico de la *quercetina* en los procesos cancerígenos, confirmaron los siguientes resultados relevantes ³⁴:

- Un porcentaje de apoptosis en células tumorales que sobrepasó el 30 %.
- El tratamiento con quercetina evitó lesiones cancerosas metastásicas. Concretamente, en los animales de control de referencia, el número medio de órganos afectados por metástasis fue de 4,4; mientras que en los animales tratados con *quercetina* fue solamente de 0,6.
- La apoptosis celular (muerte celular) únicamente apareció en los tejidos tumorales y no en los tejidos normales. Lo cual garantiza que la acción citotóxica de los flavonoides es selectiva.

³⁴ **Michelle Mouria , Anna S. Gukovskaya and alt.** “*Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis*”. Int. J. Cancer: 98, 761–769 (2002).

3. PREVENCIÓN DEL CÁNCER. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA

En la actualidad el cáncer es responsable del 20 por ciento de las muertes, y sigue aumentando de forma preocupante, quizás también porque las personas ahora vivimos más; lo cual hace más probable contraer este tipo de enfermedades. Además, la incidencia de mortalidad se duplica cada 5 años a partir de los 25 años de edad; aunque algunos casos, como el cáncer de próstata, colon y estómago, se desarrollan con más facilidad entre los 60 y los 80 años ⁵⁵. Estos hechos sitúan sin duda en primera línea de investigación todos los esfuerzos dirigidos a la prevención del cáncer.

En esta sección del proyecto, nuestra investigación se concreta en la presentación de un modelo matemático sobre la prevención del cáncer por tratamiento natural. Los elementos vertebrados del modelo serán dos factores clave en la prevención del cáncer:

- Los **linfocitos de memoria** que sobreviven en los organismos vivos tras la contracción inmunitaria.
- Las **cargas oxidativa (ROS)** y **nitrosativa (RNS)** del organismo, que inducen en éste desequilibrios homeostáticos.

Como hemos visto en el apartado 1.2 del presente proyecto, los linfocitos T que sobreviven tras la contracción inmunitaria, se convierten en **linfocitos de memoria**, cuyos rasgos más característicos son su habilidad para reactivarse rápidamente ante una nueva aparición de los antígenos desaparecidos, una frecuencia multiplicativa mucho más elevada que sus predecesores y una amplia distribución por todos los tejidos del organismo. Se trata de la **respuesta secundaria** del organismo frente a posibles nuevos rebrotes de la enfermedad.

Por otra parte, tal como hemos comentado en el apartado 2.2, las **cargas oxidativa (ROS)** y **nitrosativa (RNS)** del organismo inducen un desequilibrio reductor-oxidante que ha sido detectado en células cancerosas comparadas con células normales. La modificación continuada del material genético por las cargas oxidativas, produce lesiones del ADN celular que pueden iniciar procesos cancerosos. Además de las lesiones oxidativas del ADN celular, también se ha

comprobado la implicación de los procesos de peroxidación de lípidos en mecanismos cancerígenos.

Los dos elementos vertebrados del modelo que acabamos de describir en las líneas anteriores, se explicitan en tres elementos que contribuyen decisivamente en el comportamiento del modelo: la citoquina **Interleuquin IL2**, el tripéptido antioxidante **Glutación (GSH)** y el flavonoide **Quercetina**.

En el apartado 1.4 del proyecto destacamos la influencia crucial de la **Interleuquin IL-2** en la respuesta secundaria del sistema inmune. Concretamente vimos la enorme expansión sufrida por los linfocitos de memoria bajo la acción de esta citoquina, de manera que las células *effector* generadas en ausencia de **Interleuquin IL-2** se transformarían en linfocitos de memoria ineficaces. A este respecto debemos referir que una importante investigación llevada a cabo por *Da-Silva, Almeida y otros*, ha mostrado cómo un tratamiento oral con extracto de *Kalanchoe*, planta medicinal, incrementa entre un 15 % y un 150 % la cantidad de la citoquina *IL2* en un organismo vivo, dependiendo de su estado infeccioso⁴⁵.

Por otra parte, en el subapartado 2.3.1, presentamos el tripéptido **Glutación (GSH)** como el antioxidante más activo en los sistemas biológicos. Se trata del sustrato básico de importantes reacciones catalizadas por varias enzimas antioxidantes como son la *glutación peroxidasa* y la *glutación reductasa*.

Finalmente recordemos que, en el subapartado 2.3.2, aparecía la **Quercetina** como el flavonoide de mayor potencia antioxidante frente a las *ROS* y a las *RNS*. Concretamente referimos, en el subapartado 2.3.2, que un tratamiento con $25 \mu\text{M}$ de *quercetina*, consiguió incrementar el nivel del *glutación (GSH)* celular en un 50 % aproximadamente. Además, destacamos la acción directamente antioxidante de la *quercetina* sobre las especies reactivas del oxígeno (*ROS*) y las especies reactivas del nitrógeno (*RNS*). Cabe resaltar en este punto que el análisis fitoquímico, descrito en el Anexo II de esta memoria, presenta la *quercetina* como un importante flavonoide de las plantas *Kalanchoe*.

3.1 Modelo Naturo - Preventivo

Brevemente enunciamos los tres hechos que han inspirado la elaboración de este modelo matemático sobre la prevención del cáncer por tratamiento natural, y que acabamos de referir en las anteriores líneas introductorias a esta sección 5:

- 1) La acción de la *quercetina*, flavonoide de las *Kalanchoe*, como potenciadora de la actividad antioxidante del *glutación (GSH)*.
- 2) La acción directamente antioxidante de la *quercetina*.
- 3) La ingestión oral de extracto de *Kalanchoe* que produce un incremento en la producción de la citoquina *Interleuquin IL-2* por parte del sistema inmunológico⁴⁵.

3.1.1 Presentación del Modelo

Designaremos de la siguiente manera las diversas poblaciones de moléculas y de células que configuran la dinámica del presente modelo que hemos denominado *Naturo-Preventivo*:

- $O(t)$, población de moléculas con carga oxidativa (*ROS*).
- $G(t)$, población de moléculas del tripéptido *glutación (GSH)*.
- $M(t)$, población de linfocitos de memoria.
- $I_L(t)$, población de moléculas *Interleuquin IL-2*.
- $R(t)$, concentración de compuestos naturopreventivos.

El sistema de ecuaciones diferenciales que describe la dinámica de este modelo se define de la siguiente manera:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dO}{dt} = \alpha - \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) OG - A_T RO \\ \frac{dG}{dt} = \frac{\lambda R (1 + \lambda)}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} G - \frac{\lambda R \varphi}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} G^2 \\ \frac{dM}{dt} = \frac{\rho I_L (1 + \rho)}{\eta_3 + (1 + \rho) I_L} M - \frac{\rho I_L \theta}{\eta_3 + (1 + \rho) I_L} M^2 \\ \frac{dI_L}{dt} = \frac{h R (1 + h)}{\eta_4 + (1 + h) R} I_L - \frac{h R}{\eta_4 + (1 + h) R} I_L^2 \\ \frac{dR}{dt} = -\gamma R + V_R(t) \end{array} \right.$$

Por lo que se refiere a la primera ecuación, su primer término, α , es el parámetro que expresa la carga oxidativa que es producto del metabolismo normal diario de la población celular. Su segundo término, $\left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) OG$, expresa la acción antioxidante del *glutación* (GSH). Se representa como una suma de dos términos, que modelan la acción antioxidante normal del *glutación* celular y el incremento de esta acción antioxidante debido al tratamiento naturopreventivo, respectivamente. La acción directamente antioxidante del tratamiento natural aparece representada en el tercer término $A_T RO$.

El primer término de la segunda ecuación, $\frac{\lambda R (1 + \lambda)}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} G$, expresa el incremento del nivel del *glutación* (GSH) celular debido al tratamiento naturopreventivo. El segundo término, $\frac{\lambda R \varphi}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} G^2$, describe el elemento regulador del metabolismo celular, que equilibra el aumento de la cantidad del *glutación*.

El primer término de la tercera ecuación, $\frac{\rho I_L (1 + \rho)}{\eta_3 + (1 + \rho) I_L} M$, modela la activación del crecimiento poblacional de los linfocitos de memoria causada por la

concentración de la citoquina *Interleuquin IL-2*. El segundo término, $\frac{\rho I_L \theta}{\eta_3 + (1 + \rho) I_L} M^2$, describe el elemento regulador del metabolismo celular, que equilibra el crecimiento de la población de linfocitos de memoria.

El primer término de la cuarta ecuación, $\frac{h R (1 + h)}{\eta_4 + (1 + h) R} I_L$, presenta la generación de moléculas *Interleuquin IL-2* estimulada por la acción del tratamiento naturopreventivo. El segundo término, $\frac{h R}{\eta_4 + (1 + h) R} I_L^2$, expresa el proceso natural degenerativo que regula el incremento de la cantidad de moléculas *Interleuquin IL-2*.

En la quinta ecuación, la concentración de compuestos naturopreventivos requiere de una fuente de abastecimiento externa, $V_R(t)$, que representa el tratamiento. La cantidad de compuestos naturopreventivos también se degrada proporcionalmente a su concentración, según indica el término γR .

Para completar este análisis inicial del modelo, debemos referir la definición de los valores para sus parámetros. La descripción de los parámetros del modelo, junto con los valores de cada uno de ellos, se detallan en la *Tabla 1*, que incluye también la referencia o fuente científica de cada valor.

El siguiente paso en nuestro estudio será definir un nuevo escalado, con la finalidad de adimensionalizar el modelo. Esta adimensionalización del modelo es necesaria para evitar cambios muy grandes y muy diferentes de algunas variables del modelo respecto de los cambios de otras variables, en cortos intervalos de tiempo.

Designaremos como O_0, G_0, M_0 y I_{L_0} los valores iniciales correspondientes al número de moléculas con carga oxidativa, al número de moléculas del tripéptido *glutación*, al número de linfocitos de memoria y al número de moléculas *Interleuquin IL-2*, respectivamente. Trabajaremos con los siguientes valores iniciales: $O_0 = G_0 = M_0 = I_{L_0} = 1,5 \times 10^8$.

	Unidades	Descripción	Valor	
α	$\text{moléculas} \cdot \text{día}^{-1}$	Tasa de carga oxidativa diaria	$7,5 \times 10^6$	ref ³⁵
β	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$	Tasa antioxidante normal del <i>glutación</i>	2×10^{-10}	ref ³⁶
δ	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$	Tasa de incremento de la acción antioxidante del <i>glutación</i> por el tratamiento natural	$0,8 \times 10^{-8}$	ref ³⁶
η_1		Coefficiente reductor de la acción antioxidante del <i>glutación</i> por el tratamiento natural	31	ref ³⁶
A_T	día^{-1}	Tasa de acción directamente antioxidante	0,019	ref ³⁷
φ	$\text{moléculas}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$	Coefficiente adimensionador del nivel de <i>glutación</i>	$6,6666 \times 10^{-9}$	ref ³³
λ	día^{-1}	Tasa de incremento del nivel de <i>glutación</i> por tratamiento natural	0,50	ref ³³
η_2	día^{-1}	Coefficiente reductor del incremento del nivel de <i>glutación</i> por tratamiento natural	27	ref ³³
η_4	día^{-1}	Coefficiente reductor del incremento de citoquinas por tratamiento natural	30	ref ⁴⁵
h	día^{-1}	Tasa de incremento de citoquinas por tratamiento natural	0,7425	ref ⁴⁵
ρ	día^{-1}	Tasa de incremento linfocitos de memoria acumulados por efecto de las citoquinas	0,1245	ref ⁴⁷
η_3	$\text{moléculas} \cdot \text{día}^{-1}$	Coefficiente reductor de la acumulación de linfocitos de memoria por efecto de las citoquinas	$1,77 \times 10^7$	ref ⁴⁷
θ	$\text{células}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$	Coefficiente adimensionador de la población de linfocitos	$6,6666 \times 10^{-9}$	ref ⁴⁷

³⁵ **Borut Poljšak and Polona Jamnik.** *Methodology for Oxidative State Detection in Biological Systems*. In: Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects. Chapter 12. © 2009 Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-60876-101-2

³⁶ **Hidetaka Nagata, Susumu Takekoshi and al.** “Antioxidative Action of Flavonoids, Quercetin and Catechin, Mediated by the Activation of Glutathione Peroxidase”. Tokai JExp Clin Med., Vol. 24, No. 1, pp,1-11, 1999

³⁷ **Dengke Bao, Jingkai Wang, Xiaobin Pang and Hongliang Liu.** “Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells”. Molecules 2017, 22, 1122;doi:10.3390/molecules22071122

μ	$moleculas^{-1} \cdot día^{-1}$	Coficiente adimensionalizador de la cantidad de citoquinas	$6,6666 \times 10^{-9}$	ref ⁴⁵
γ	$día^{-1}$	Tasa de degradación de compuestos naturopreventivos	$9,0 \times 10^{-1}$	ref ⁴⁹

Tabla 1

Con el nuevo escalado, las nuevas variables y los parámetros adimensionalizados se configuran de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
x &= \frac{O}{O_0} , \quad y = \frac{G}{G_0} , \quad w = \frac{M}{M_0} , \quad z = \frac{I_L}{I_{L_0}} , \quad \bar{\alpha} = \frac{\alpha}{O_0} , \quad \bar{\beta} = \beta G_0 , \\
\bar{\delta} &= \delta G_0 , \quad \bar{\eta}_1 = \eta_1 , \quad \bar{A}_T = A_T , \quad \bar{\varphi} = \varphi G_0 , \quad \bar{\lambda} = \lambda , \quad \bar{\eta}_2 = \eta_2 , \\
\bar{\rho} &= \rho , \quad \bar{\eta}_3 = \frac{\eta_3}{I_{L_0}} , \quad \bar{\theta} = \theta M_0 , \quad \bar{h} = h , \quad \bar{\eta}_4 = \eta_4 , \quad \bar{\mu} = \mu I_{L_0} , \\
\bar{\gamma} &= \gamma , \quad \text{con} \quad 0 \leq V_R(t) \leq 1
\end{aligned}$$

Teniendo en cuenta los valores de los parámetros de la *Tabla 1* y las condiciones iniciales $O_0 = G_0 = M_0 = I_{L_0} = 1,5 \times 10^8$, los valores numéricos de los parámetros del modelo adimensionalizado son los siguientes:

$$\begin{aligned}
\bar{\alpha} &= 0,05 , \quad \bar{\beta} = 0,03 , \quad \bar{\delta} = 1,20 , \quad \bar{\eta}_1 = 31 , \quad \bar{A}_T = 0,019 , \\
\bar{\varphi} &= 1 , \quad \bar{\lambda} = 0,50 , \quad \bar{\eta}_2 = 27 , \quad \bar{\rho} = 0,1245 , \quad \bar{\eta}_3 = 0,118 , \\
\bar{\theta} &= 1 , \quad \bar{h} = 0,7425 , \quad \bar{\eta}_4 = 30 , \quad \bar{\mu} = 1 , \quad \bar{\gamma} = 9,0 \times 10^{-1} \quad (1)
\end{aligned}$$

Por motivos de simplicidad, en la expresión del modelo adimensionalizado omitiremos la raya encima de cada uno de los símbolos de los nuevos parámetros. Teniendo en cuenta esta consideración y con el nuevo escalado, el modelo adimensionalizado puede expresarse de la siguiente manera:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = \alpha - \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) x y - A_T R x \end{array} \right. \quad (2)$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\lambda R (1 + \lambda)}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} y - \frac{\lambda R \varphi}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} y^2 \quad (3)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dw}{dt} = \frac{\rho z (1 + \rho)}{\eta_3 + (1 + \rho) z} w - \frac{\rho z \theta}{\eta_3 + (1 + \rho) z} w^2 \end{array} \right. \quad (4)$$

$$\frac{dz}{dt} = \frac{h R (1 + h)}{\eta_4 + (1 + h) R} z - \frac{h R}{\eta_4 + (1 + h) R} z^2 \quad (5)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR}{dt} = -\gamma R + V_R(t) \end{array} \right. \quad (6)$$

3.1.2 Dinámica del Modelo

La finalidad del estudio de la dinámica del modelo es identificar sus puntos de equilibrio y determinar sus características de estabilidad.

Para determinar los puntos de equilibrio del modelo, en los que se anulan las derivadas respecto al tiempo de las cinco variables del modelo, primeramente, resolveremos el sistema homogéneo que resulta de igualar a cero las ecuaciones (2) – (6) del modelo:

Suponiendo el tratamiento $V_R(t)$ constante en el tiempo, con valor $V_R(t) = V_R$,

entonces, de la ecuación (6), igualada a cero, obtenemos $R = \frac{V_R}{\gamma}$.

La ecuación (5), igualada a cero, admite dos soluciones: $z = 0$ o bien $z = 1 + h$.

A su vez, la ecuación (4), igualada a cero, admite tres posibles soluciones:

$w = 0$, $z = 0$ o bien $w = 1 + \rho$.

La ecuación (3) igualada a cero también admite dos posibles soluciones:

$y = 0$ o bien $y = 1 + \lambda$.

Por lo que se refiere a la primera ecuación (2), igualada a cero, también admite dos posibles soluciones dependiendo del valor dado a la variable y :

Si $y = 0$, entonces la variable x debe tomar el valor $x_0 = \frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}$ (7)

Si $y = 1 + \lambda$, entonces la variable x debe tomar el valor:

$$x_{1+\lambda} = \frac{\alpha \gamma (\eta_1 \gamma + V_R)}{(1 + \lambda) [\beta \gamma (\eta_1 \gamma + V_R) + \delta \gamma V_R] + A_T V_R (\eta_1 \gamma + V_R)} \quad (8)$$

Agrupando todos estos resultados, resultan los siguientes puntos de equilibrio del sistema:

$$q_1 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, w, 0, \frac{V_R}{\gamma} \right) \quad \text{siendo } w \in [0, +\infty),$$

$$q_2 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, w, 0, \frac{V_R}{\gamma} \right), \quad \text{donde el valor } x_{1+\lambda} \text{ corresponde a la expresión (8),}$$

$$q_3 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, 0, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right), \quad q_4 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 0, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right)$$

$$q_5 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, 1 + \rho, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right), \quad q_6 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 1 + \rho, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) \quad (9)$$

Para determinar la posible estabilidad de estos puntos de equilibrio, será necesario encontrar los valores propios de la matriz jacobiana del sistema asociada con cada uno de estos puntos. La *Figura 11* del *Anexo I* corresponde a la matriz jacobiana del sistema de ecuaciones (2) – (6). Puesto que, como podemos observar, se trata de una matriz escalonada, sus cinco valores propios, e_1, e_2, e_3, e_4, e_5 , se corresponden con los valores de la diagonal principal:

$$e_1 = -y \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) - A_T R \quad ; \quad e_2 = \frac{\lambda R}{\eta_2 + (1 + \lambda)R} (1 + \lambda - 2\varphi y) ;$$

$$e_3 = \frac{\rho z}{\eta_3 + (1 + \rho)z} (1 + \rho - 2\theta w) \quad ; \quad e_4 = \frac{hR}{\eta_4 + (1 + h)R} (1 + h - 2\mu z) ;$$

$$e_5 = -\gamma \quad (10)$$

A continuación, estudiamos los dos casos más relevantes del modelo: la dinámica del modelo sin tratamiento ($V_R = 0$) y la dinámica del modelo con tratamiento unidad ($V_R = 1$).

a) Dinámica del modelo sin tratamiento ($V_R = 0$)

En ausencia de tratamiento ($V_R = 0$), la expresión (7), $x_0 = \frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}$, no está definida. Además, la expresión (8) se reduce a $x_{1+\lambda} = \frac{\alpha}{(1+\lambda)\beta}$. Con lo cual, los puntos de equilibrio se reducen a los siguientes puntos:

$$q_2 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, w, 0, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (1.1111, 1.50, w, 0, 0) \quad , w \in [0, +\infty)$$

$$q_4 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 0, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (1.1111, 1.50, 0, 1.7425, 0)$$

$$q_6 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 1 + \rho, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (1.1111, 1.50, 1.1245, 1.7425, 0)$$

Para determinar la estabilidad de estos puntos de equilibrio debemos calcular los valores propios de la matriz jacobiana para cada uno de estos puntos. Recordemos que las expresiones (10) corresponden a los cinco valores propios.

Por lo que se refiere a los puntos de equilibrio $q_2 = (1.1111, 1.50, w, 0, 0)$, $w \in [0, +\infty)$, dado que su coordenada z es cero, entonces para todos ellos el

valor propio $e_3 = \frac{\rho z}{\eta_3 + (1 + \rho)z} (1 + \rho - 2\theta w)$ es cero. Por lo cual, todos estos

puntos de equilibrio del sistema no son estables.

Respecto del punto de equilibrio $q_4 = (1.1111, 1.50, 0, 1.7425, 0)$, dado que su coordenada R es cero, entonces sus dos valores propios

$$e_2 = \frac{\lambda R}{\eta_2 + (1 + \lambda)R} (1 + \lambda - 2\varphi y) \quad y \quad e_4 = \frac{hR}{\eta_4 + (1 + h)R} (1 + h - 2\mu z) \quad \text{son cero.}$$

Por lo cual este punto de equilibrio no es estable.

Finalmente, el punto de equilibrio $q_6 = (1.1111, 1.50, 1.1245, 1.7425, 0)$ tampoco es estable puesto que, dado el valor cero de su coordenada R , también resultan ser cero sus dos valores propios e_2 y e_4 de las expresiones (10).

Concluimos, pues, que el modelo del sistema sin tratamiento ($V_R = 0$) no posee ningún punto de equilibrio estable.

b) Dinámica del modelo con tratamiento unidad ($V_R = 1$)

Considerando, en este caso, un tratamiento unidad ($V_R = 1$), en la nueva dinámica del sistema aparecen seis situaciones de equilibrio que se corresponden con las expresiones (9). Si sustituimos en estas expresiones los valores de los parámetros de nuestro modelo y el tratamiento $V_R = 1$, obtenemos los siguientes puntos de equilibrio:

$$q_1 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, w, 0, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (2.3684, 0, w, 0, 10/9) \quad , \quad w \in [0, +\infty)$$

$$q_2 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, w, 0, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (0.3894, 1.50, w, 0, 10/9) \quad , \quad w \in [0, +\infty)$$

$$q_3 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, 0, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (2.3684, 0, 0, 1.7425, 10/9)$$

$$q_4 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 0, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (0.3894, 1.50, 0, 1.7425, 10/9)$$

$$q_5 = \left(\frac{\gamma \alpha}{A_T V_R}, 0, 1 + \rho, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (2.3684, 0, 1.1245, 1.7425, 10/9)$$

$$q_6 = \left(x_{1+\lambda}, 1 + \lambda, 1 + \rho, 1 + h, \frac{V_R}{\gamma} \right) = (0.3894, 1.50, 1.1245, 1.7425, 10/9)$$

Para determinar la estabilidad de estos puntos de equilibrio debemos calcular los valores propios de la matriz jacobiana para cada uno de ellos. Sustituyendo en las expresiones (10) los valores de los parámetros del modelo y las coordenadas de cada uno de estos puntos de equilibrio, obtenemos los siguientes análisis de estabilidad:

Por lo que se refiere a los puntos $q_1 = (2.3684, 0, w, 0, 10/9)$ y $q_2 = (0.3894, 1.50, w, 0, 10/9)$, $w \in [0, +\infty)$, dado que su coordenada z es

cero, entonces para todos ellos el valor propio $e_3 = \frac{\rho z}{\eta_3 + (1 + \rho)z} (1 + \rho - 2\theta w)$

es cero. Por lo cual, todos estos puntos de equilibrio del sistema no son estables.

En el punto de equilibrio $q_3 = (2.3684, 0, 0, 1.7425, 10/9)$, obtenemos los siguientes valores propios: $e_1 = -0.0211$, $e_2 = 0.0291$, $e_3 = 0.1174$, $e_4 = -0.0450$ y $e_5 = -0.9000$. Puesto que aparecen valores no negativos entre sus cinco valores propios, no es un punto de equilibrio estable.

En el punto de equilibrio $q_4 = (0.3894, 1.50, 0, 1.7425, 10/9)$, obtenemos los siguientes valores propios: $e_1 = -0.1284$, $e_2 = -0.0291$, $e_3 = 0.1174$, $e_4 = -0.0450$ y $e_5 = -0.9000$. Puesto que aparecen valores no negativos entre sus cinco valores propios, no es un punto de equilibrio estable.

En el punto de equilibrio $q_5 = (2.3684, 0, 1.1245, 1.7425, 10/9)$, obtenemos los siguientes valores propios: $e_1 = -0.0211$, $e_2 = 0.0291$, $e_3 = -0.1174$,

$e_4 = -0.0450$ y $e_5 = -0.9000$. Puesto que aparecen valores no negativos entre sus cinco valores propios, tampoco es un punto de equilibrio estable.

En el punto de equilibrio $q_6 = (0.3894, 1.50, 1.1245, 1.7425, 10/9)$, obtenemos los siguientes valores propios: $e_1 = -0.1284$, $e_2 = -0.0291$, $e_3 = -0.1174$, $e_4 = -0.0450$ y $e_5 = -0.9000$. Puesto que todos los valores propios asociados a este punto son negativos, concluimos que q_6 es un **punto de equilibrio estable**.

Así pues, en la dinámica del sistema con tratamiento unidad ($V_R = 1$), aparece un **único punto de equilibrio estable**: $q_6 = (0.3894, 1.50, 1.1245, 1.7425, 10/9)$.

3.1.3 Análisis de Control Óptimo.

Tal como hemos referido en el inicio de esta sección 3, los niveles altos de cargas oxidativas en el organismo modifican el material genético, produciendo lesiones del ADN celular que pueden iniciar procesos cancerosos. Por lo cual, en una modelización matemática del tratamiento preventivo de enfermedades cancerosas a través de medios naturales, uno de los objetivos prioritarios del planteamiento de un problema de control óptimo será reducir máximamente la carga oxidativa (ROS) del organismo. Pero también resultará conveniente minimizar las dosis de tratamiento natural que deben de aplicarse para alcanzar la efectividad deseada. El conocimiento de tales dosis mínimas permitirá economizar el tratamiento, manteniendo su efectividad. Por todo ello, en este apartado, diseñaremos un problema de control óptimo que consiguiendo mayores reducciones de carga oxidativa (ROS), al mismo tiempo establezca mínimas dosis de tratamiento natural.

La variable de control sobre la que actuaremos será $V_R(t)$, que mide la cantidad de tratamiento natural administrado, en función del tiempo.

El objetivo del análisis de control óptimo será minimizar la siguiente función objetivo:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} (x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)) dt \quad (11)$$

sujeta a las ecuaciones (2) – (6), del modelo adimensionalizado,

donde $x(t)$ representa la cantidad de carga oxidativa; y el parámetro ε corresponde a la ponderación que queremos dar en la función objetivo a la minimización del tratamiento natural administrado.

Aplicamos de nuevo el *Principio del Mínimo de Pontryagin*⁵¹, que se concreta de la siguiente manera:

Si el control óptimo V_R^* , minimiza la función objetivo:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} (x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)) dt$$

entonces existe un vector de coestado $\vec{k}(t) = (k_1(t), k_2(t), k_3(t), k_4(t), k_5(t))$,

tal que: $\frac{dk_i}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial x_i}$, siendo x_i para $i = 1,2,3,4,5$, las cinco variables de estado

del modelo, y siendo $H(\vec{k}(t), \vec{x}(t), V_R)$, el hamiltoniano del problema, que referido a las ecuaciones (2) – (6) del modelo y a la función objetivo, se especifica de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} H(\vec{k}(t), \vec{x}(t), V_R(t)) = & [x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)] + k_1 \left[\alpha - \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) x y - A_T R x \right] + \\ & + k_2 \left[\frac{\lambda R (1 + \lambda)}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} y - \frac{\lambda R \varphi}{\eta_2 + (1 + \lambda) R} y^2 \right] + k_3 \left[\frac{\rho z (1 + \rho)}{\eta_3 + (1 + \rho) z} w - \frac{\rho z \theta}{\eta_3 + (1 + \rho) z} w^2 \right] + \\ & + k_4 \left[\frac{h R (1 + h)}{\eta_4 + (1 + h) R} z - \frac{h R}{\eta_4 + (1 + h) R} z^2 \right] + k_5 (-\gamma R + V_R(t)) \end{aligned}$$

y, además, verifica que: $\forall t, 0 \leq t \leq t_f$ y $\forall V_R \in U$,

$$H(\vec{k}(t), \vec{x}(t), V_R) \geq H(\vec{k}(t), \vec{x}(t), V_R^*).$$

A continuación, explicitamos las derivadas de las funciones de coestado, $\frac{dk_i}{dt}$,

$i = 1, 2, 3, 4, 5$:

$$\frac{dk_1}{dt} = k_1 \left[y \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) + A_T R \right] - 1$$

$$\frac{dk_2}{dt} = k_1 \left[x \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) \right] - k_2 \left[\frac{\lambda R}{\eta_2 + (1 + \lambda)R} (1 + \lambda - 2\varphi y) \right]$$

$$\frac{dk_3}{dt} = -k_3 \left[\frac{\rho z}{\eta_3 + (1 + \rho)z} (1 + \rho - 2\theta w) \right]$$

$$\frac{dk_4}{dt} = -k_3 \left[\frac{w \rho \eta_3}{[\eta_3 + (1 + \rho)z]^2} (1 + \rho - w\theta) \right] - k_4 \left[\frac{h R}{\eta_4 + (1 + h)R} (1 + h - 2\mu z) \right]$$

$$\begin{aligned} \frac{dk_5}{dt} = & k_1 \left[\frac{\delta \eta_1 x y}{(\eta_1 + R)^2} + A_T x \right] - k_2 \left[\frac{y \lambda \eta_2}{[\eta_2 + (1 + \lambda)R]^2} (1 + \lambda - y\varphi) \right] - \\ & - k_4 \left[\frac{z h \eta_4}{[\eta_4 + (1 + h)R]^2} (1 + h - z\mu) \right] + k_5 \gamma \end{aligned}$$

Puesto que el hamiltoniano se minimiza, con relación al control V_R , en el control óptimo V_R^* , tenemos que:

$$\frac{\partial H}{\partial V_R}(V_R^*) = \varepsilon V_R^* + k_5 = 0, \text{ lo cual implica que } V_R^* = -\frac{k_5}{\varepsilon}.$$

3.1.4 Simulaciones Numéricas de Control Óptimo y de Tratamiento Unidad

Hemos llevado a cabo tres simulaciones numéricas del modelo *Naturo-Preventivo*, dos de las cuales han sido de control óptimo. La primera ha sido una simulación de control óptimo con tiempo final fijo (*fix final time*) de 60 días. La segunda simulación ha sido también de control óptimo, pero con tiempo final indeterminado (*free final*

time). La tercera ha simulado la evolución temporal del modelo con un tratamiento unidad continuado.

A) Simulación de Control Óptimo con tiempo final fijo (fix time) de 60 días

Hemos usado el operador *bvp5c* del software *MATLAB_R2017b* para encontrar numéricamente el control óptimo, minimizando la función objetivo (11), con un valor

del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{6.88}$ y un tiempo final de 60 días:

$$J(V_R) = \int_0^{60} (x(t) + \frac{1}{13.76} V_R^2(t)) dt$$

Observemos que el valor del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{6.88}$, pretende priorizar la reducción de la carga oxidativa ($x(t)$) respecto a la economía de la posible cantidad de tratamiento preventivo administrado ($V_R(t)$), puesto que no se trata de un tratamiento tóxico.

La *Figura 5* muestra el resultado de esta primera simulación a tiempo final fijo. Cabe destacar en primer lugar, en esta figura, que, hacia la mitad del periodo de tratamiento, día 30, se alcanza una reducción del 84 % de la carga oxidativa, aproximadamente. La cantidad de tratamiento administrado empieza con una dosis de 3 unidades aproximadamente y va descendiendo progresivamente, produciéndose un ligero incremento a los treinta y cinco días desde el inicio del tratamiento. En este punto debemos precisar que, en todo el presente análisis del modelo *Naturo-Preventivo*, entendemos por tratamiento unidad la ingestión de 30 gramos al día de hojas de *Kalanchoe*. A este respecto cabe referir que la investigación clínica realizada hasta la fecha indica que las hojas de las *Kalanchoe* no son tóxicas en dosis de hasta 5 gramos diarios por quilo de peso corporal. Lo cual equivale a unos 350 gramos para una persona de 70 kg.; lo que, a su vez, representa una cantidad de 4 a 10 veces superior a la recomendada. Ciertamente, no debemos olvidar que, hasta los tratamientos clínicamente más beneficiosos, pueden resultar perjudiciales cuando se abusa de ellos.

Además, es importante observar, en esta misma figura, que las poblaciones de moléculas glutatión, de células de memoria y de moléculas *interleuquin IL2*, tienden a estabilizarse alrededor del 1.5, del 1.13 y del 1.74 aproximadamente.

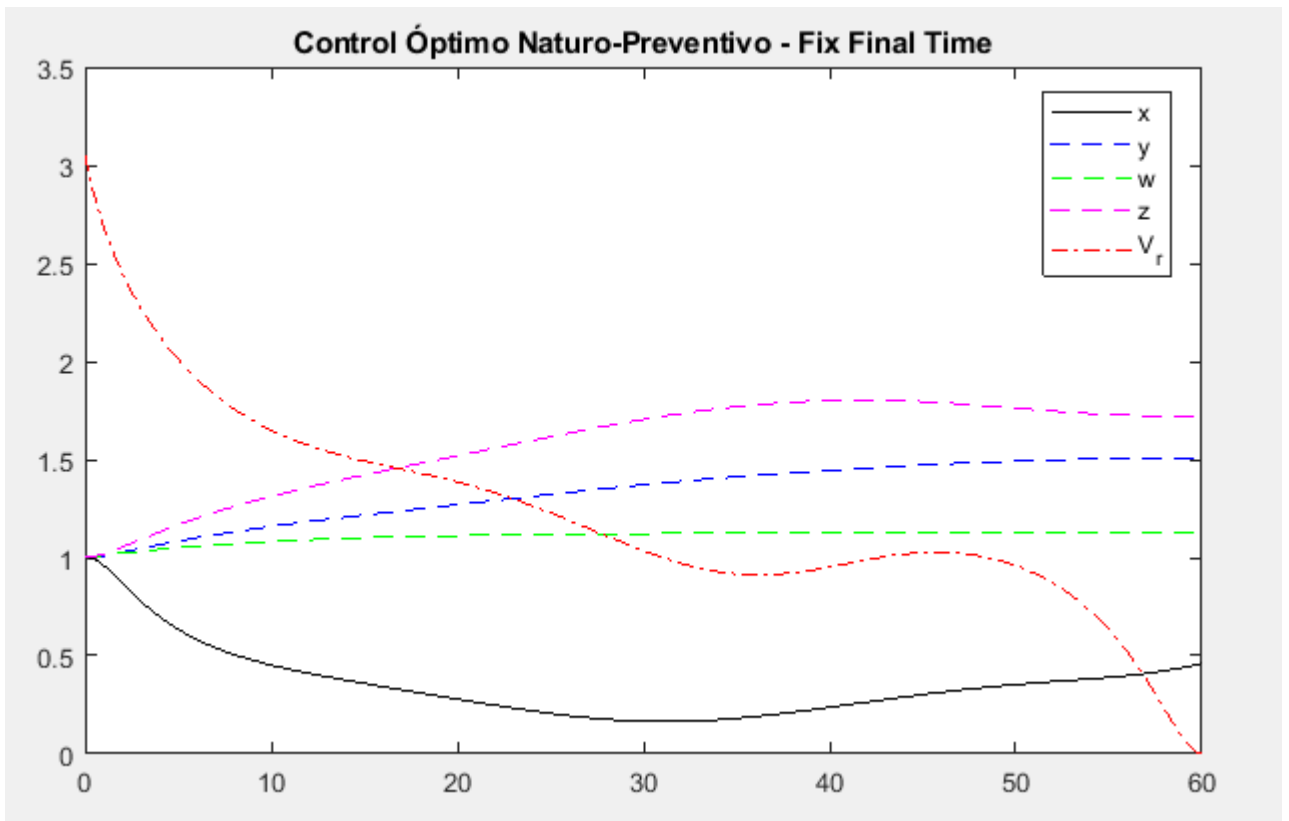


Figura 5. Control óptimo del tratamiento naturopreventivo con tiempo final fijo (60 días). Trayectorias de las correspondientes poblaciones de carga oxidativa (x), de moléculas glutatión (y), de linfocitos de memoria (w), de moléculas interleuquin IL2 (z) y de la variable de control, tratamiento V_r , con relación al tiempo medido en días.

B) Simulación de Control Óptimo con tiempo final indeterminado (free final time)

La segunda simulación se ha realizado con tiempo final indeterminado (*free final time*). En este nuevo contexto, el tiempo final t_f del tratamiento se convierte en una variable, de la cual dependerá la solución del problema de control óptimo.

Hemos usado el operador *bvp4c* del software *MATLAB_R2017b* para encontrar numéricamente el control óptimo, minimizando la función objetivo (11), con un valor

del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{2.10094}$:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} (x(t) + \frac{1}{4.20188} V_R^2(t)) dt$$

La condición para determinar el tiempo final t_f del tratamiento se ha concretado como $x(t_f) + V_R^2(t_f) = 0$. Lo cual es equivalente a $x(t_f) = V_R^2(t_f) = 0$.

La *Figura 6* muestra el resultado de esta simulación a tiempo final indeterminado. Observemos, en esta *Figura 6*, que a los 7 días de tratamiento preventivo se consigue reducir a cero la carga oxidativa juntamente con la dosis de tratamiento necesario. Respecto a la dosificación del tratamiento, en esta misma figura podemos observar que se inicia con un valor de 0,4 unidades aproximadamente y va ascendiendo hasta aproximadamente la mitad del segundo día de tratamiento, en el que alcanza su máximo valor de 2 unidades. Seguidamente, la cantidad de tratamiento administrado desciende progresivamente hasta reducirse a cero.

Por otra parte, las poblaciones de moléculas glutatión, de linfocitos de memoria y de moléculas *interleuquin IL2* se incrementan de forma suave y progresiva.

Destacamos, en esta segunda simulación, la doble función del tratamiento preventivo aplicado: la reducción directa de la carga oxidativa y la reducción indirecta de esta misma carga a través del incremento progresivo de la cantidad del glutatión celular. Ciertamente en el gráfico aparece de forma clara el papel importante que tiene el aumento de glutatión celular en la reducción de la carga

oxidativa. Además, el mismo tratamiento también produce un incremento de la cantidad de la *interleuquin IL2* a nivel celular, que produce el respectivo aumento de la población de linfocitos de memoria.

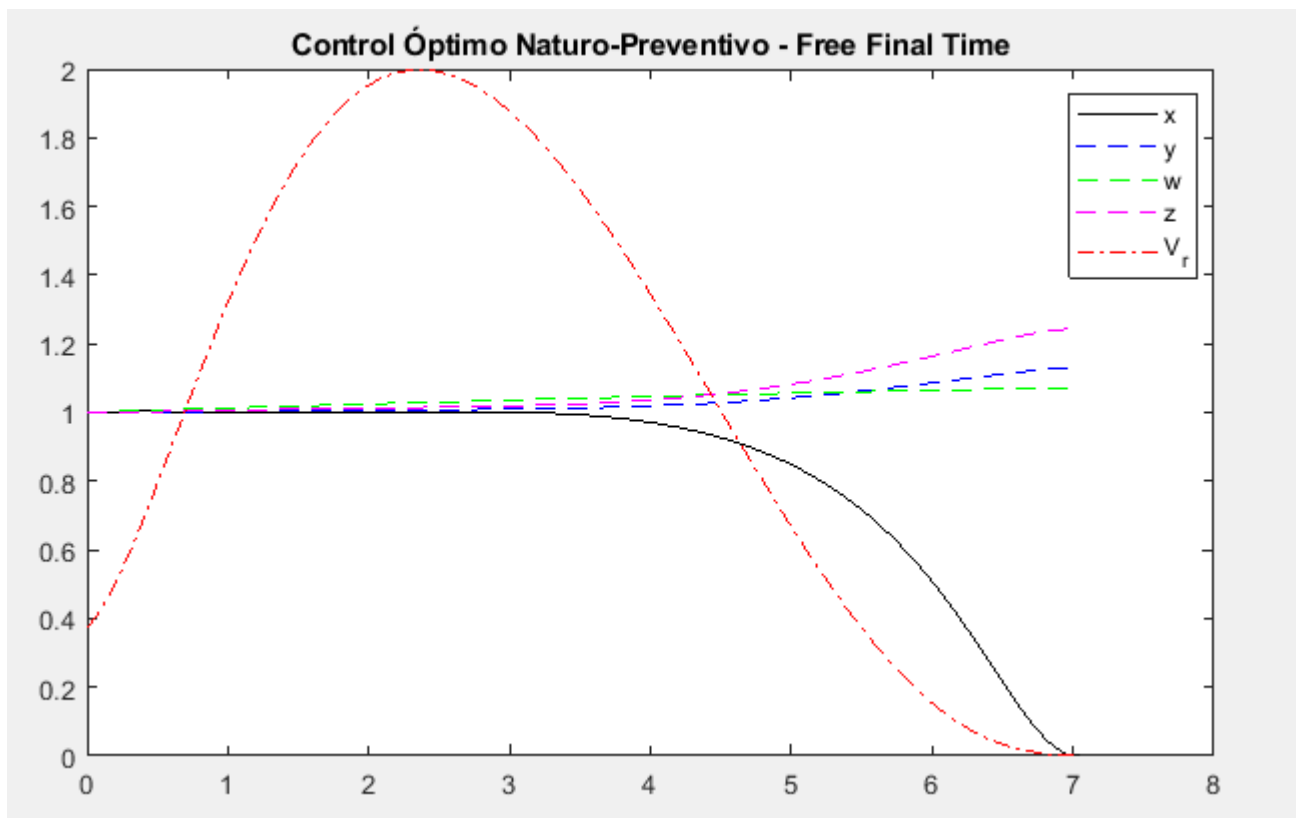


Figura 6. Control óptimo del tratamiento naturopreventivo con tiempo final indeterminado. Trayectorias de las correspondientes poblaciones de carga oxidativa (x), de moléculas glutatión (y), de linfocitos de memoria (w), de moléculas interleuquin IL2 (z) y de la variable de control, tratamiento V_r , con relación al tiempo medido en días.

C) Simulación del modelo con un tratamiento unidad continuado de 100 días

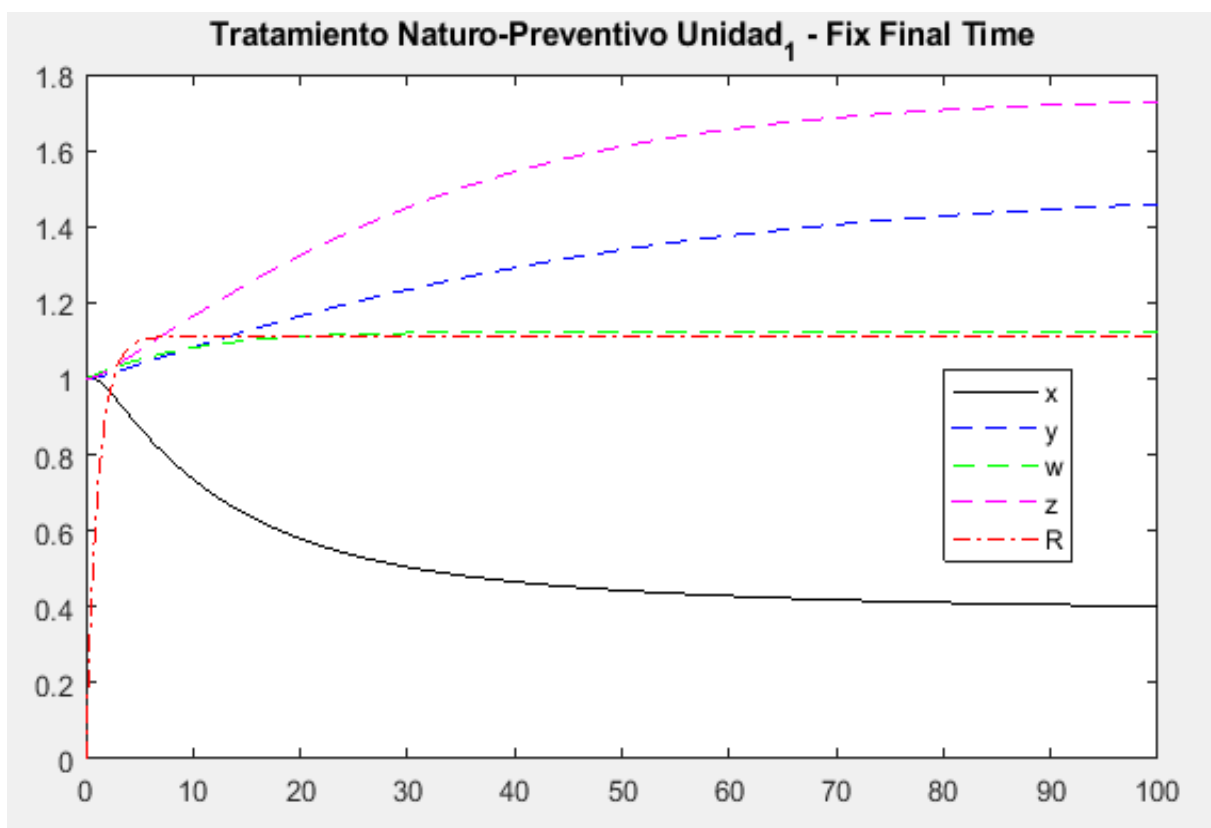


Figura 7. Evolución temporal del tratamiento preventivo unidad continuado durante 100 días. Trayectorias de las correspondientes poblaciones de carga oxidativa (x), de moléculas glutatión (y), de linfocitos de memoria (w), de moléculas interleuquin IL2 (z) y de la variable cantidad-tratamiento (R), con relación al tiempo medido en días.

En esta tercera simulación se ha observado la evolución del sistema con un tratamiento unidad continuado durante 100 días.

Hemos usado el operador *bvp5c* del software *MATLAB_R2017b* para simular esta evolución del sistema.

La *Figura 7* muestra el resultado de esta simulación. Observemos, en primer lugar, que, aproximadamente, a los primeros 30 días de tratamiento se produce una reducción de la mitad de la carga oxidativa (50 %). A partir de este momento, dicha reducción va suavizándose paulativamente hasta alcanzar la estabilidad en el 60 %

de reducción a los 100 días de tratamiento. Recordemos a este respecto, y confirmando este resultado, que en el apartado de esta sección en que hemos estudiado la dinámica de este modelo con tratamiento unidad ($V_R = 1$), hemos obtenido un **único punto de equilibrio estable** con una carga oxidativa del 0.3894 .

Por otra parte, en esta misma figura se destaca el claro incremento de las poblaciones de moléculas del glutatión celular, de los linfocitos de memoria y de las moléculas *interleuquin IL2*.

Respecto a la evolución de la cantidad-tratamiento, su estabilización alrededor del 1,111 es característica de un tratamiento unidad continuado.

4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA

En 1994 *Kuznetsov* y *Taylor*, inspirados en las ideas de *Lotka-Volterra*³⁸ sobre la supervivencia entre poblaciones de seres vivos, presentaron una modelización matemática del proceso canceroso que explicaba la respuesta del sistema inmunológico frente al crecimiento descontrolado de células tumorales³⁹.

En 1998, *Kirschner* y *Panetta*⁴⁰ introdujeron en el modelo Kuznetsov-Taylor una tercera población de moléculas *effector* llamadas **citoquinas**. Las citoquinas, tal como hemos visto en las secciones 1.3 y 1.4, son proteínas que actúan de puente entre la inmunidad innata o natural y la inmunidad adaptativa o específica. Son producidas principalmente por las T-células (linfocitos). La principal citoquina, responsable de la activación de los linfocitos, de su crecimiento y de su diferenciación, es la denominada **Interleukin-2 (IL-2)**. La *IL-2* potencia el crecimiento de las mismas células que la producen (linfocitos), y al mismo tiempo, también actúa sobre los linfocitos situados en su vecindad.

4.1 Modelo Naturo - IL-2

En este apartado presentamos una modelización matemática del proceso canceroso, que hemos denominado *Naturo-IL_2*. La idea de este nuevo modelo es incorporar un tratamiento del cáncer por naturoterapia en el modelo *Kirschner – Panetta* y estudiar su comportamiento. Dos hallazgos científicos muy importantes de los últimos años con relación a las plantas medicinales *Kalanchoe*, han inspirado la elaboración de este modelo:

³⁸ **Alexei Tsygvintsev, Simeone Marino** and **Denise E. Kirschner**, “A Mathematical Model of Gene Therapy for the Treatment of Cancer”. 2012. UMPA, ENS de Lyon, 46, all’ee d’Italie.

³⁹ **Vladimir A. Kuznetsov** and **Iliya A. Makalkin, Mark A. Taylor** and **Alan S. Perelson**, “Nonlinear Dynamics of Immunogenic Tumors: Parameter Estimation and Global Bifurcation Analysis”. Bulletin of Mathematical Biology, Vol. 56, No. 2, pp. 295 – 321, 1994. Elsevier Science Ltd.

⁴⁰ **Denise Kirschner** and **John Carl Panetta**, “Modeling immunotherapy of the tumor – immuneInteraction” Journal of Mathematical Biology. (1998) 37: 235 – 252.

- 1) La acción citotóxica directa y selectiva sobre las células cancerosas de varios compuestos químicos de las *Kalanchoe* (ver Anexo II), entre los que destacan los llamados *bufadienolides* ^{41, 77, 42} y los *polifenoles* ^{43, 44}.
- 2) La ingestión oral de extractos de *Kalanchoe* produce un incremento en la producción de la citoquina *Interleuquin IL-2* por parte del sistema inmunológico⁴⁵.

4.1.1 Presentación del Modelo

En este modelo *Naturo-IL_2* designaremos las dos poblaciones de células tumorales y *effector*, la población de moléculas *Interleuquin IL-2* y la concentración de compuestos naturoterápicos de la siguiente manera:

- $T(t)$, población de células tumorales.
- $N(t)$, población de células *effector*.
- $I_L(t)$, población de moléculas *Interleuquin IL-2*.
- $R(t)$, concentración de compuestos naturoterápicos.

El sistema de ecuaciones diferenciales que describe la dinámica de este modelo se define de la siguiente manera:

-
- ⁴¹ **Joanna Kolodziejczyk-Czepas and Anna Stochmal.** “*Bufadienolides of Kalanchoe species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use*”. *Phytochem Rev* (2017) 16:1155–1171.
- ⁴² **Zhenlong Yu, Wei Guo, Xiaochi Ma and al.** “*Gamabufotalin, a bufadienolide compound from toad venom, suppresses COX-2 expression through targeting IKK β /NF- κ B signaling pathway in lung cancer cells*”. *Molecular Cancer* 2014, 13:203.
- ⁴³ **Michelle Mouria, Anna S. Gukovskaya, Yoon Jung and al.** “*Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis*”. *Int. J. Cancer*: 98, 761–769 (2002).
- ⁴⁴ **Oluseye A. Ogunbayo, Robert M. Harris, Rosemary H. Waring and al.** “*Inhibition of the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca21-ATPase by Flavonoids: A Quantitative Structure-activity Relationship Study*”. *IUBMB Life*, 60(12): 853–858, December 2008.
- ⁴⁵ **Da-Silva, S.A.G.; Almeida, A.P.; Costa, S.S. and Rossi-Bergmann, B.** “*Aqueous extract of Kalanchoe Pinnata plant up-regulates Th1 cytokines in normal and Leishmania-infected mice*”. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. II, Nov. 1999.*

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dT}{dt} = r_2 T(1-bT) - \frac{aNT}{g_2 + T} - K_T R T \\ \frac{dN}{dt} = c T - \mu_2 N + \frac{p_1 N I_L}{g_1 + I_L} \\ \frac{dI_L}{dt} = (1+h R) \frac{p_2 NT}{g_3 + T} - \mu_3 I_L \\ \frac{dR}{dt} = -\gamma R + V_R(t) \end{array} \right.$$

Por lo que se refiere a la primera ecuación, su primer término, $r_2 T(1-bT)$, indica el crecimiento logístico de la población de células tumorales, independientemente de la respuesta inmunológica del organismo. Su segundo término, $\frac{aNT}{g_2 + T}$, representa la fuerza de la respuesta del sistema inmune que provoca la destrucción de células tumorales. Aparece modelado bajo la forma Michaelis-Menten⁴⁶, para indicar la limitación de esta respuesta. La eliminación de células tumorales causada por el tratamiento naturoterápico aparece representada en el término $K_T R T$.

El primer término de la segunda ecuación, $c T$, modela la estimulación del sistema inmune que provoca el mismo tumor generando nuevas células *effector*. El parámetro c identifica la llamada *antigenicidad* del tumor. Puesto que el tumor se origina a partir de células sanas del paciente, entonces, el parámetro c viene a representar en qué medida las células tumorales son ajenas (invasoras) al mismo paciente. El segundo término, $\mu_2 N$, describe la muerte natural a la que también están sometidas las células *effector*. El tercer término, $\frac{p_1 N I_L}{g_1 + I_L}$, modela la activación del crecimiento poblacional de células *effector* causada por la concentración de la citoquina *Interleuquin IL-2*. Observemos que este término

⁴⁶ Michaelis, L., and Menten, M. (1913) *Die kinetik der invertinwirkung*, Biochemistry Zeitung 49, 333-369.

presenta también la forma Michaelis-Menten, que indica el efecto saturador de la respuesta inmunológica a las citoquinas.

El primer término de la tercera ecuación, $(1 + h R) \frac{p_2 NT}{g_3 + T}$, presenta la generación de moléculas *Interleuquin IL-2*, estimulada por la interacción entre células *effector*, células tumorales y tratamiento naturoterápico. El segundo término, $\mu_3 I_L$, expresa el proceso natural degenerativo que afecta a las citoquinas.

En la cuarta ecuación, la concentración de compuestos naturoterápicos requiere de una fuente de abastecimiento externa, $V_R(t)$, que representa el tratamiento. La cantidad de compuestos naturoterápicos también se degrada proporcionalmente a su concentración, según indica el término γR .

Para completar este análisis inicial del modelo, debemos referir la definición de los valores para sus parámetros. Puesto que los parámetros correspondientes a las dos primeras ecuaciones, a excepción del parámetro K_T , son similares a los utilizados en los modelos *Kuznetsov-Taylor*³⁹ y *DeBoer-Hogeweg*⁴⁷, hemos utilizado los mismos valores de estos modelos. Por lo que se refiere a los valores de los parámetros de la tercera ecuación, se han utilizado valores indicados por investigaciones biológicas⁴⁵ y médicas⁴⁸ al respecto. Para los valores de los parámetros de la cuarta ecuación y de K_T se han considerado estudios anteriormente citados^{55,77} y otro estudio del ámbito biológico⁴⁹.

La descripción de los parámetros del modelo, junto con los valores de cada uno de ellos, se detallan en la *Tabla 2*, que incluye también la referencia o fuente científica de cada valor.

⁴⁷ R. J. DeBoer, Pauline Hogeweg, Hub F. J. Dullens, Roel A. DeWeger and WillemDenOtter, "Macrophage T Lymphocyte interactions in the anti-tumor immune response: A mathematical model". The Journal of Immunology, 134(4): 2748D2758, April 1985.

⁴⁸ S. A. Rosenberg and M. T. Lotze. "Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes". Annual Review of Immunology, 4: 681D709, 1986.

⁴⁹ P. Calabresi and P.S. Schein, editors. *Medical Oncology: Basic Principles and Clinical Management of Cancer*. McGraw-Hill, New York, second edition, 1993.

	Unidades	Descripción	Valor	
r_2	$día^{-1}$	Tasa de crecimiento del tumor	0,18	ref ³⁹
b	$células^{-1}$	$1/b$ es la carga tumoral máxima	$1,0 \times 10^{-9}$	ref ³⁹
a	$día^{-1}$	Fracción máxima de masa tumoral eliminada por las células <i>effector</i>	1	ref ⁴⁷
g_2	$células$	Coefficiente reductor de la masa tumoral eliminada por las células <i>effector</i>	$1,0 \times 10^5$	ref ⁴⁷
K_T	$día^{-1}$	Fracción de masa tumoral eliminada por naturoterapia	0,85	ref ⁷⁷
c	$día^{-1}$	Coefficiente de antigenicidad	0,025	ref ⁴⁰
μ_2	$día^{-1}$	Tasa de muerte natural de células <i>effector</i>	0,03	ref ³⁹
p_1	$día^{-1}$	Fracción máxima de células <i>effector</i> acumuladas por efecto de las citoquinas	0,1245	ref ⁴⁷
g_1	$moléculas$	Coefficiente reductor de la acumulación de células <i>effector</i> causada por las citoquinas	$2,0 \times 10^7$	ref ⁴⁷
h		Porcentaje de incremento de citoquinas por naturoterapia	0,7425	ref ⁴⁵
p_2	$día^{-1}$	Fracción máxima de citoquinas acumuladas por interacción tumoral con células <i>effector</i>	5	ref ⁴⁸
g_3	$células$	Coefficiente reductor de la acumulación de citoquinas por interacción tumoral con células <i>effector</i>	$1,0 \times 10^3$	ref ⁴⁸
μ_3	$día^{-1}$	Tasa de degradación de citoquinas	10	ref ⁴⁸
γ	$día^{-1}$	Tasa de degradación de compuestos naturoterápicos	$9,0 \times 10^{-1}$	ref ⁴⁹

Tabla 2

El siguiente paso en nuestro estudio será definir un nuevo escalado, con la finalidad de adimensionalizar el modelo. Esta adimensionalización del modelo es necesaria puesto que algunas variables del modelo experimentan cambios muy grandes y muy diferentes respecto de los cambios de otras variables en cortos intervalos de tiempo.

Designaremos como T_0 , N_0 y I_{L_0} los valores iniciales correspondientes al número de células tumorales, al número de células *effector* y al número de moléculas *Interleuquin IL-2*, respectivamente. Tal como se sugiere en experimentos realizados en ref³⁹, trabajaremos con los siguientes valores iniciales: $T_0 = N_0 = I_{L_0} = 10^6$.

Con el nuevo escalado, las nuevas variables y los parámetros adimensionalizados se configuran de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 x &= \frac{T}{T_0} \quad , \quad y = \frac{N}{N_0} \quad , \quad z = \frac{I_L}{I_{L_0}} \quad , \quad \bar{r}_2 = r_2 \quad , \quad \bar{b} = b T_0 \quad , \quad \bar{a} = \frac{a N_0}{T_0} \\
 \bar{g}_2 &= \frac{g_2}{T_0} \quad , \quad \bar{c} = \frac{c T_0}{N_0} \quad , \quad \bar{\mu}_2 = \mu_2 \quad , \quad \bar{p}_1 = p_1 \quad , \quad \bar{g}_1 = \frac{g_1}{I_{L_0}} \\
 \bar{p}_2 &= \frac{p_2 N_0}{I_{L_0}} \quad , \quad \bar{g}_3 = \frac{g_3}{T_0} \quad , \quad \bar{\mu}_3 = \mu_3 \quad , \quad \bar{K}_T = K_T \quad , \quad \bar{h} = h \\
 \bar{\gamma} &= \gamma \quad , \quad \text{con} \quad 0 \leq V_R(t) \leq 1
 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta los valores de los parámetros de la *Tabla 2* y las condiciones iniciales $T_0 = N_0 = I_{L_0} = 10^6$, los valores numéricos de los parámetros del modelo adimensionalizado son los siguientes:

$$\begin{aligned}
 \bar{r}_2 &= 0,18 \quad , \quad \bar{b} = 1,0 \times 10^{-3} \quad , \quad \bar{a} = 1 \quad , \quad \bar{g}_2 = 1,0 \times 10^{-1} \quad , \quad \bar{c} = 0,025 \quad , \\
 \bar{\mu}_2 &= 0,03 \quad , \quad \bar{p}_1 = 0,1245 \quad , \quad \bar{g}_1 = 2,0 \times 10 \quad , \quad \bar{p}_2 = 5 \quad , \quad \bar{g}_3 = 1,0 \times 10^{-3} \quad , \\
 \bar{\mu}_3 &= 10 \quad , \quad \bar{K}_T = 0,85 \quad , \quad \bar{h} = 0,7425 \quad , \quad \bar{\gamma} = 9,0 \times 10^{-1}
 \end{aligned}$$

Por motivos de simplicidad, en la expresión del modelo adimensionalizado omitiremos la raya encima de cada uno de los símbolos de los nuevos parámetros. Teniendo en cuenta esta consideración y con el nuevo escalado, el modelo adimensionalizado puede expresarse de la siguiente manera:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = r_2 x(1-bx) - \frac{a y x}{g_2 + x} - K_T R x \end{array} \right. \quad (12)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dy}{dt} = c x - \mu_2 y + \frac{p_1 y z}{g_1 + z} \end{array} \right. \quad (13)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dz}{dt} = (1+hR) \frac{p_2 y x}{g_3 + x} - \mu_3 z \end{array} \right. \quad (14)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dR}{dt} = -\gamma R + V_R(t) \end{array} \right. \quad (15)$$

4.1.2 Dinámica del Modelo

La finalidad del estudio de la dinámica del modelo es identificar sus puntos de equilibrio y determinar sus características de estabilidad.

En el desarrollo de este estudio, distinguiremos dos casos: Dinámica del modelo con masa tumoral nula ($x=0$), y dinámica del modelo con masa tumoral no nula ($x \neq 0$).

Para facilitar el cálculo de los puntos de equilibrio del modelo, en los que se anulan las derivadas respecto al tiempo de las cuatro variables del modelo, primeramente, resolveremos el sistema homogéneo que resulta de igualar a cero las ecuaciones (12) – (15) del modelo:

Suponiendo el tratamiento $V_R(t)$ constante en el tiempo, con valor $V_R(t) = V_R$,

entonces, de la ecuación (15) igualada a cero, obtenemos $R = \frac{V_R}{\gamma}$.

Resolviendo respecto a la variable y y la primera ecuación del modelo, igualada a cero, tenemos:

$$y = \frac{(g_2 + x)[r_2 x(1 - bx) - K_T R x]}{a x} = \frac{(g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T R]}{a} \quad (16)$$

Resolviendo respecto a la variable z la tercera ecuación del modelo, igualada a

cero, obtenemos:
$$z = \frac{p_2 y x (1 + hR)}{\mu_3 (g_3 + x)},$$

donde, sustituyendo la variable y por la expresión (16), podemos escribir como:

$$z = \frac{p_2 x (1 + hR)(g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T R]}{a \mu_3 (g_3 + x)} \quad (17)$$

Sustituyendo, ahora, las expresiones (16) y (17) en la segunda ecuación del modelo, igualada a cero, tenemos:

$$c x - \mu_2 \frac{(g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T R]}{a} + \frac{p_1}{a} \cdot \frac{(1 + hR) p_2 x (g_2 + x)^2 [r_2(1 - bx) - K_T R]^2}{g_1 a \mu_3 (g_3 + x) + (1 + hR) p_2 x (g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T R]} = 0$$

que es equivalente a la siguiente igualdad:

$$c a^2 \mu_3 g_1 x (g_3 + x) + a(g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T R] [c p_2 x^2 (1 + hR) - g_1 \mu_2 \mu_3 (g_3 + x)] + p_2 x (1 + hR)(g_2 + x)^2 [r_2(1 - bx) - K_T R]^2 (p_1 - \mu_2) = 0 \quad (18)$$

a) **Dinámica del modelo con masa tumoral nula** ($x=0$)

Ciertamente interesa analizar el posible equilibrio en el punto $x=0$, puesto que su estabilidad supondría la completa eliminación de la masa tumoral.

Como hemos visto en este apartado, suponiendo el tratamiento $V_R(t)$ constante en el tiempo, con valor $V_R(t)=V_R$, entonces, de la ecuación (15) igualada a cero,

$$\text{obtenemos } R = \frac{V_R}{\gamma}.$$

Puesto que estamos considerando el caso $x=0$, la primera ecuación del modelo ya queda igualada a cero. Respecto a la tercera ecuación igualada a cero, sustituyendo el valor 0 de la variable x , obtenemos $z=0$.

Considerando, ahora, la segunda ecuación del modelo, igualada a cero, con los valores $x=0$ y $z=0$, resulta que $y=0$.

De esta manera hemos encontrado los primeros puntos de equilibrio del modelo, que podemos representar de la siguiente manera: $\left(0, 0, 0, \frac{V_R}{\gamma}\right)$.

A continuación, calculamos la matriz jacobiana del sistema, para determinar la posible estabilidad de estos puntos:

$$\begin{pmatrix} -2r_2bx + r_2 - \frac{ag_2y}{(g_2+x)^2} - K_T R & -\frac{ax}{g_2+x} & 0 & -K_T x \\ c & -\mu_2 + \frac{p_1z}{g_1+z} & \frac{p_1g_1y}{(g_1+z)^2} & 0 \\ \frac{p_2g_3y(1+hR)}{(g_3+x)^2} & \frac{p_2x(1+hR)}{g_3+x} & -\mu_3 & \frac{p_2hxy}{g_3+x} \\ 0 & 0 & 0 & -\gamma \end{pmatrix} \quad (19)$$

Esta matriz, evaluada en el punto $\left(0, 0, 0, \frac{V_R}{\gamma}\right)$, se reduce a:

$$\begin{pmatrix} r_2 - K_T R & 0 & 0 & 0 \\ c & -\mu_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\mu_3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\gamma \end{pmatrix}$$

Observemos que los valores propios $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4$ de esta matriz son:

$$\lambda_1 = r_2 - K_T R ; \quad \lambda_2 = -\mu_2 ; \quad \lambda_3 = -\mu_3 ; \quad \lambda_4 = -\gamma$$

Puesto que todos los parámetros del modelo son positivos, entonces los valores propios λ_2, λ_3 y λ_4 son necesariamente negativos. De lo cual podemos deducir

que el punto $\left(0, 0, 0, \frac{V_R}{\gamma}\right)$ será un punto de equilibrio estable siempre que el

valor propio λ_1 sea también negativo; es decir, siempre que $r_2 - K_T R < 0$ (20)

En el caso $V_R = 0$, en ausencia de tratamiento naturoterápico, el punto de equilibrio con $x = 0$ está caracterizado por $(x = 0, y = 0, z = 0, R = 0)$.

En este punto de equilibrio, dados los valores de los parámetros del modelo, no se verifica la desigualdad (20), pues el valor obtenido, en este punto, para el valor propio λ_1 es: $\lambda_1 = 0,18 - 0,85 \cdot 0 = 0,18$.

Así pues, en ausencia de tratamiento, el punto con masa tumoral cero ($x = 0$) no es un punto de equilibrio estable.

En el caso $V_R = 1$, que implica un tratamiento naturoterápico unidad continuado, el punto de equilibrio con $x = 0$ está caracterizado por

$$\left(x = 0, y = 0, z = 0, R = \frac{1}{\gamma}\right) = \left(x = 0, y = 0, z = 0, R = \frac{10}{9}\right).$$

En este nuevo punto de equilibrio se verifica la desigualdad (20), pues se obtiene

un valor propio $\lambda_1 = 0,18 - 0,85 \cdot \frac{10}{9} = 0,18 - 0,9444 = -0,7644$. Se trata, por

tanto, de un punto de **equilibrio estable** con masa tumoral nula. Lo que a su vez confirma el carácter preventivo del tratamiento naturoterápico, administrado anteriormente a la aparición de las primeras células cancerosas.

b) Dinámica del modelo con masa tumoral no nula ($x \neq 0$)

En este caso diferenciaremos dos escenarios distintos: masa tumoral no nula ($x \neq 0$) sin tratamiento ($V_R = 0$), y masa tumoral no nula ($x \neq 0$) con tratamiento unidad continuado ($V_R = 1$).

1) Masa tumoral no nula sin tratamiento ($x \neq 0$, $V_R = 0$)

Así, pues, suponiendo $V_R = 0$, es decir, en ausencia de tratamiento, de (15) se puede concluir que $R = \frac{V_R}{\gamma} = 0$.

Sustituyendo el valor de la variable R por cero en la ecuación (18), obtenemos el siguiente polinomio de quinto grado respecto de la variable x , cuyas soluciones identificarán a los posibles puntos de equilibrio del sistema:

$$ca^2 \mu_3 g_1 x (g_3 + x) + a(g_2 + x) r_2 (1 - bx) \left[c p_2 x^2 - g_1 \mu_2 \mu_3 (g_3 + x) \right] + p_2 x (g_2 + x)^2 \left[r_2 (1 - bx) \right]^2 (p_1 - \mu_2) = 0 \quad (21)$$

Mediante el software *MATLAB_R2017b* hemos resuelto la ecuación (21), obteniendo las siguientes raíces del polinomio:

$$x_1 = -89.71168 \quad ; \quad x_2 = -0.00100 \quad ; \quad x_3 = 0.02746$$

$$x_4 = 1224.57496 \quad ; \quad x_5 = 2334.63395$$

Las soluciones x_1 y x_2 implicarían poblaciones tumorales negativas, sin significación biológica. Para cada una de las otras tres soluciones x_3 , x_4 y x_5 hemos calculado las correspondientes coordenadas y y z , mediante las

expresiones (16) y (17), respectivamente, y hemos obtenido los siguientes puntos de equilibrio:

$$(x_3, y_3, z_3) = (0.02746, 0.02294, 0.01106)$$

$$(x_4, y_4, z_4) = (1224.57496, -49.50564, -24.75280)$$

$$(x_5, y_5, z_5) = (2334.63395, -560.88273, -280.44124)$$

Observemos que los puntos (x_4, y_4, z_4) y (x_5, y_5, z_5) tampoco poseen significación biológica, puesto que los dos supondrían poblaciones negativas de células *effector* y de moléculas *Interleuquin IL-2*.

Respecto al punto de equilibrio (x_3, y_3, z_3) , con la ayuda del software *MATLAB_R2017b*, hemos calculado los valores propios de su matriz jacobiana (19), obteniendo los cuatro valores propios siguientes:

$$\lambda_1 = -0.9 \quad ; \quad \lambda_2 = -10.00006 \quad ; \quad \lambda_3 = 0.00446 - 0.06488i \quad ;$$

$$\lambda_4 = 0.00446 + 0.06488i$$

Puesto que aparecen valores propios con su parte real no negativa, concluimos que el punto $(x_3, y_3, z_3) = (0.02746, 0.02294, 0.01106)$ es un punto de equilibrio no estable.

2) Masa tumoral no nula con tratamiento unidad ($x \neq 0$, $V_R = 1$)

Así, pues, suponiendo $V_R = 1$, es decir, con tratamiento unidad, de (15) se puede

concluir que $R = \frac{V_R}{\gamma} = \frac{1}{\gamma}$.

Sustituyendo el valor de la variable R por $\frac{1}{\gamma}$ en la ecuación (18), obtenemos el siguiente polinomio de quinto grado respecto de la variable x , cuyas soluciones identificarán a los posibles nuevos puntos de equilibrio del sistema:

$$c a^2 \mu_3 g_1 x (g_3 + x) + \\ + a(g_2 + x)[r_2(1 - bx) - K_T / \gamma] [c p_2 x^2 (1 + h/\gamma) - g_1 \mu_2 \mu_3 (g_3 + x)] +$$

$$+ p_2 x(1+h/\gamma)(g_2+x)^2 [r_2(1-bx) - K_T/\gamma]^2 (p_1 - \mu_2) = 0 \quad (22)$$

Mediante el software *MATLAB_R2017b* hemos resuelto la ecuación (22), obteniendo las siguientes raíces del polinomio:

$$x_1 = -4274.70299 \quad ; \quad x_2 = -2719.83166 \quad ; \quad x_3 = -29.71978$$

$$x_4 = -0.04803 \quad ; \quad x_5 = -0.00098$$

Observemos que estas cinco soluciones, x_1, x_2, x_3, x_4 y x_5 , implicarían poblaciones tumorales negativas, sin significación biológica. Concluimos, pues, que, con tratamiento unidad, no existen puntos de equilibrio con masa tumoral no nula. Cabe remarcar, en este momento, que este resultado destaca la importancia del punto de **equilibrio estable** con masa tumoral cero y tratamiento unidad, encontrado en el apartado *a* del presente epígrafe 4.1.2; pues supone que el sistema con tratamiento naturoterapéutico unidad no se estabiliza hasta conseguir limpiar completamente el tumor (masa tumoral cero).

4.1.3 Análisis de Control Óptimo.

En una modelización matemática del tratamiento de un tumor a través de medios naturales antitumorales, el objetivo prioritario del planteamiento de un problema de control óptimo será ciertamente conseguir la efectividad del tratamiento; esto es, reducir máximamente la masa tumoral. Pero también interesará encontrar cotas mínimas de las dosis del tratamiento natural que deben de aplicarse para alcanzar la efectividad deseada. El conocimiento de tales dosis mínimas resulta interesante porque permite economizar el tratamiento, manteniendo su efectividad. Por todo ello, en este apartado, diseñaremos un problema de control óptimo que, consiguiendo mayores reducciones de masa tumoral, al mismo tiempo establezca mínimas dosis de tratamiento natural.

La variable de control sobre la que actuaremos será $V_R(t)$, que mide la cantidad de tratamiento natural administrado, en función del tiempo.

El objetivo del análisis de control óptimo será minimizar la siguiente función objetivo:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} (x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)) dt \quad (23)$$

sujeta a las ecuaciones (12) – (15), del modelo adimensionalizado,

donde $x(t)$ representa la cantidad de masa tumoral; y el parámetro ε corresponde a la ponderación que queremos dar en la función objetivo a la minimización del tratamiento natural administrado.

La existencia de un control óptimo V_R^* , tal que $\min_{V_R(t)} J(V_R) = J(V_R^*)$, está asegurada por el cumplimiento de las cuatro condiciones enunciadas en ref ⁵⁰, y que detallamos a continuación, sin explicitar la demostración:

- 1) El dominio en el que se verifican las ecuaciones de estado del modelo con las condiciones iniciales del modelo y la variable de control $V_R(t)$, no es vacío.
- 2) El conjunto:
 $U = \{ \text{Funciones continuas a trozos } V_R(t) / 0 \leq V_R(t) \leq 1 \quad \forall t \in [0, t_f] \}$, de funciones de control admisibles, es cerrado y convexo.
- 3) Todos los miembros de la derecha de las ecuaciones de estado del modelo son continuos, están acotados superiormente por una suma de la variable de control y cada estado, y puede ser escrito como una función lineal de V_R con coeficientes que dependen del tiempo y del estado.
- 4) El integrando de $J(V_R)$ es convexo sobre U , y está acotado inferiormente por $-c_2 + c_1 V_R^2$, con $c_1 > 0$.

⁵⁰ **Wendell H. Fleming** and **Raymond W. Rishel**. “*Deterministic and Stochastic Optimal Control*”. Springer- Verlag, 1975.

Asegurada la existencia del control óptimo, V_R^* , para nuestro modelo, su caracterización está configurada por el *Principio del Mínimo de Pontryagin*⁵¹, que se concreta de la siguiente manera:

Si el control óptimo V_R^* , minimiza la función objetivo:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} (x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)) dt$$

entonces existe un vector de coestado $\vec{w}(t) = (w_1(t), w_2(t), w_3(t), w_4(t))$, tal

que: $\frac{dw_i}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial x_i}$, siendo x_i para $i=1,2,3,4$, las cuatro variables de estado del

modelo, y siendo $H(\vec{w}(t), \vec{x}(t), V_R)$, el hamiltoniano del problema; que referido a las ecuaciones (12) – (15) del modelo y a la función objetivo, se especifica como:

$$H(\vec{w}(t), \vec{x}(t), V_R(t)) = [x(t) + \frac{\varepsilon}{2} V_R^2(t)] + w_1 [r_2 x(1-bx) - \frac{a y x}{g_2 + x} - K_T R x] + w_2 (c x - \mu_2 y + \frac{p_1 y z}{g_1 + z}) + w_3 [(1+hR) \frac{p_2 y x}{g_3 + x} - \mu_3 z] + w_4 [-\gamma R + V_R(t)]$$

y, además, cumple que: $\forall t, 0 \leq t \leq t_f$ y $\forall V_R \in U$,

$$H(\vec{w}(t), \vec{x}(t), V_R) \geq H(\vec{w}(t), \vec{x}(t), V_R^*).$$

A continuación, explicitamos las derivadas de las funciones de coestado, $\frac{dw_i}{dt}$,

$i=1,2,3,4$:

$$\frac{dw_1}{dt} = w_1 (2r_2 b x - r_2 + \frac{a g_2 y}{(g_2 + x)^2} + K_T R) - w_2 c - w_3 \frac{p_2 g_3 y (1+hR)}{(g_3 + x)^2} - 1$$

⁵¹ L.S. Pontryagin, V.G. Boltyanskii, R.V. Gamkrelidze, and Mishchenko. "The Mathematical Theory of Optimal Processes". Gordon and Breach, 1962.

$$\frac{dw_2}{dt} = w_1 \frac{ax}{g_2 + x} + w_2 \left(\mu_2 - \frac{p_1 z}{g_1 + z} \right) - w_3 \frac{p_2 x(1 + hR)}{g_3 + x}$$

$$\frac{dw_3}{dt} = -w_2 \frac{p_1 g_1 y}{(g_1 + z)^2} + w_3 \mu_3$$

$$\frac{dw_4}{dt} = w_1 K_T x - w_3 \frac{p_2 h x y}{g_3 + x} + w_4 \gamma$$

Puesto que el hamiltoniano se minimiza, con relación al control V_R , en el control óptimo V_R^* , tenemos que:

$$\frac{\partial H}{\partial V_R}(V_R^*) = \varepsilon V_R^* + w_4 = 0 \quad , \text{ lo cual implica que } V_R^* = -\frac{w_4}{\varepsilon}$$

4.1.4 Simulaciones Numéricas de Control Óptimo y de Tratamiento Unidad

Hemos llevado a cabo tres simulaciones numéricas del modelo *Naturo-IL_2*, dos de las cuales han sido de control óptimo. La primera ha sido una simulación de control óptimo con tiempo final fijo (*fix final time*) de 100 días. La segunda simulación ha sido también de control óptimo, pero con tiempo final indeterminado (*free final time*). La tercera ha simulado la evolución temporal del modelo con tratamiento unidad continuado.

A) Simulación de Control Óptimo con tiempo final fijo (*fix final time*) de 100 días

Hemos usado el operador *bvp5c* del software *MATLAB_R2017b* para encontrar numéricamente el control óptimo, minimizando la función objetivo (23), con un valor

del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{8.1}$ y un tiempo final de 100 días:

$$J(V_R) = \int_0^{100} \left(x(t) + \frac{1}{16.2} V_R^2(t) \right) dt \quad (24)$$

Observemos que el valor del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{8.1}$, pretende priorizar la reducción de la masa tumoral ($x(t)$) respecto a la economía de la posible cantidad de tratamiento natural administrado ($V_R(t)$), dada la no toxicidad de este tratamiento.

La *Figura 8* muestra el resultado de esta primera simulación a tiempo final fijo. Cabe destacar, en esta figura, cómo el control óptimo de la función objetivo (24) requiere empezar el tratamiento aplicando puntualmente una dosificación máxima de $V_R = 2$, pero que en un periodo de dos días debe disminuir a $V_R = 0.25$. Este elevado tratamiento inicial con compuestos naturales reducirá rápidamente a casi cero el volumen de la masa tumoral.

Pasado este tratamiento inicial más intenso, y puesto que la población de células *effector* y el volumen de moléculas *interleuquin IL2* descienden progresivamente, a partir de los diez días, para mantener la masa tumoral por debajo de la octava parte de su volumen inicial, se hace necesario incrementar paulatinamente el tratamiento hasta un máximo de $V_R = 1$.

B) Simulación de Control Óptimo con tiempo final indeterminado (free final time)

La segunda simulación se ha realizado con tiempo final indeterminado (*free final time*). Así pues, en este nuevo contexto, el tiempo final t_f del tratamiento se convierte en una variable, de la cual dependerá la solución del problema de control óptimo.

Hemos usado el operador *bvp4c* del software *MATLAB_R2017b* para encontrar numéricamente el control óptimo, minimizando la función objetivo (23), con un valor

del parámetro $\varepsilon = \frac{1}{1.51}$:

$$J(V_R) = \int_0^{t_f} \left(x(t) + \frac{1}{3.02} V_R^2(t) \right) dt$$

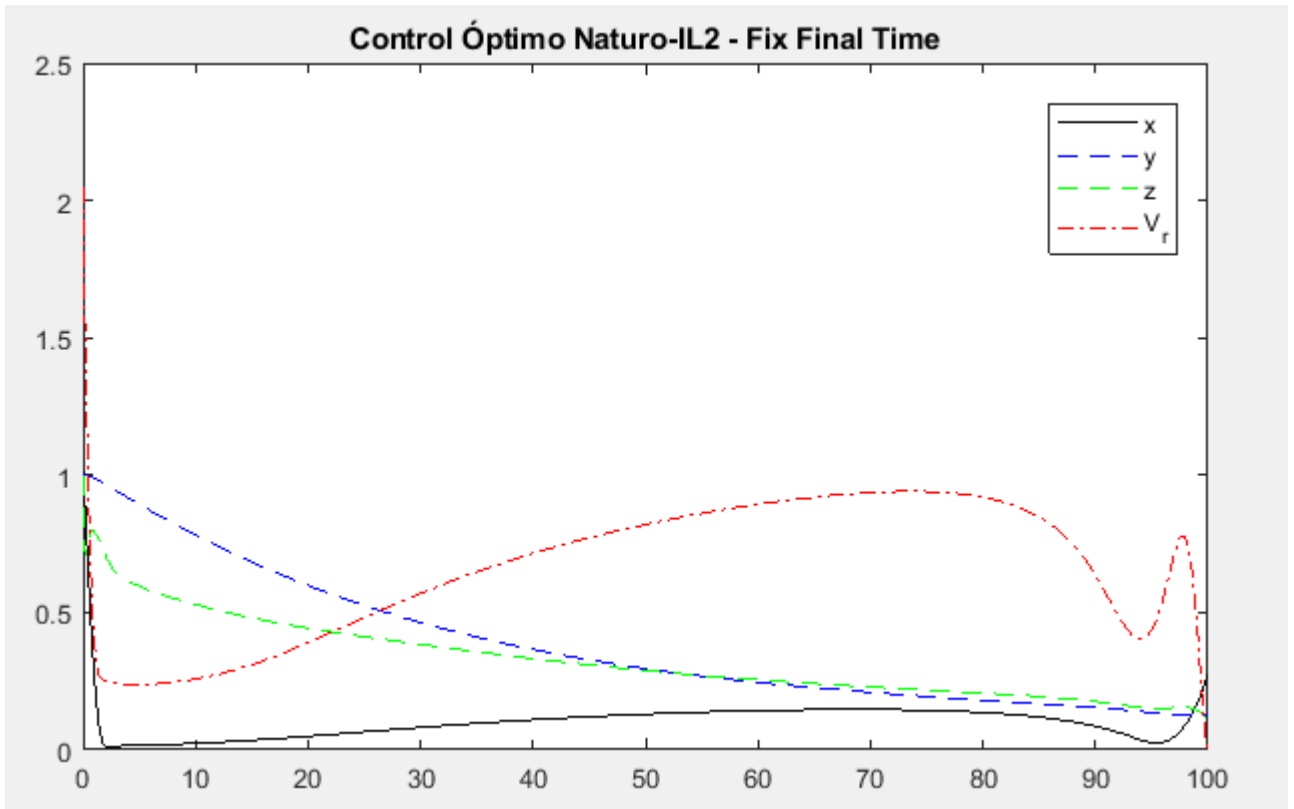


Figura 8. Control óptimo del tratamiento naturoterapéutico con tiempo final fijo (100 días). Trayectorias de las correspondientes poblaciones de células cancerígenas (x), de células efectoras (y), de moléculas de interleuquin IL2 (z) y de la variable de control, tratamiento V_r , con relación al tiempo medido en días.

La condición para determinar el tiempo final t_f del tratamiento se ha concretado

$$\text{de la siguiente manera: } x(t_f) + V_R^2(t_f) = 0 \quad (25).$$

Puesto que $x(t_f) \geq 0$, dado que $x(t_f)$ representa la población de células tumorales, entonces la condición (25) es equivalente a: $x(t_f) = V_R^2(t_f) = 0$. Lo cual significa que deben reducirse a cero la masa tumoral y el tratamiento aplicado.

La *Figura 9* muestra el resultado de esta simulación a tiempo final indeterminado. Observemos que en un periodo de aproximadamente dos días se consigue reducir a cero la masa tumoral y el tratamiento aplicado. La población de células efectoras apenas disminuye durante este periodo de dos días; lo que significa el importante

papel de la población de estas células en la rápida reducción a cero de la masa tumoral. Ciertamente, cabe destacar también la función de la población de moléculas *interleuquin IL2*, pues son un importante factor de mantenimiento de la población de células *effector*. A su vez, la cantidad de tratamiento natural aplicado es soporte de la población de moléculas *interleuquin IL2*. Este tratamiento, a partir de un valor $V_R = 0.53$, desciende progresivamente hasta reducirse a cero.

Esta simulación muestra ciertamente uno de los rasgos más importantes del presente modelo: la posibilidad de reducir a cero la masa tumoral con una moderada dosificación de tratamiento naturoterapéutico.

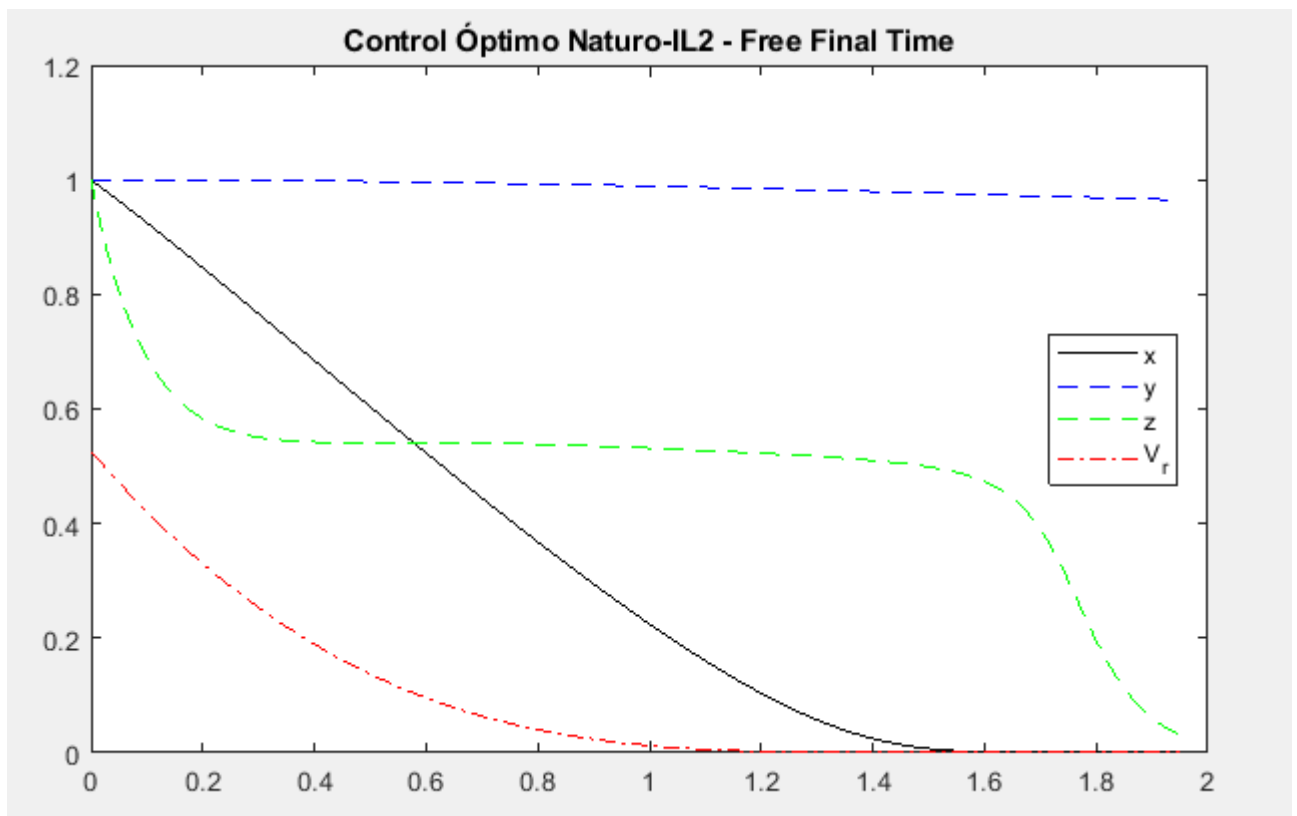


Figura 9. Control óptimo del tratamiento naturoterapéutico con tiempo final indeterminado. Trayectorias de las correspondientes poblaciones de células cancerígenas (x), de células *effector* (y), de moléculas interleuquin IL2 (z) y de la variable de control, tratamiento V_r , con relación al tiempo medido en días.

C) Simulación del modelo con un tratamiento unidad continuado durante 10 días

En esta tercera simulación se ha observado la evolución del sistema con un tratamiento unidad continuado durante 10 días. En este punto debemos precisar que, tal como detallamos en la sección anterior, entendemos por tratamiento unidad la ingestión de 30 gramos al día de hojas de *Kalanchoe*.

Hemos usado el operador *bvp5c* del software *MATLAB_R2017b* para simular la presente evolución del sistema.

La *Figura 10* muestra el resultado de esta simulación. Ciertamente, lo más destacable de este resultado es que la conjunción del tratamiento unidad continuado junto con el influjo de la población de células *effector*, que solamente sufre un pequeño descenso en este periodo de tiempo, consiguen reducir a cero la masa tumoral en aproximadamente día y medio. A su vez, la población de moléculas *interleuquin IL2* no experimenta un descenso tan rápido como la masa tumoral, pues, aparte de tener el soporte de las células tumorales, se encuentra también sostenida por la población de células *effector* y por la intensidad del tratamiento aplicado.

Subrayemos finalmente que esta tercera simulación se enmarca en un contexto muy distinto al de las dos primeras simulaciones, pues, en lugar de buscar el control óptimo del tratamiento aplicado a lo largo del tiempo, simplemente mantiene en la unidad dicho tratamiento, sin variación alguna, y examina el consiguiente comportamiento del modelo.

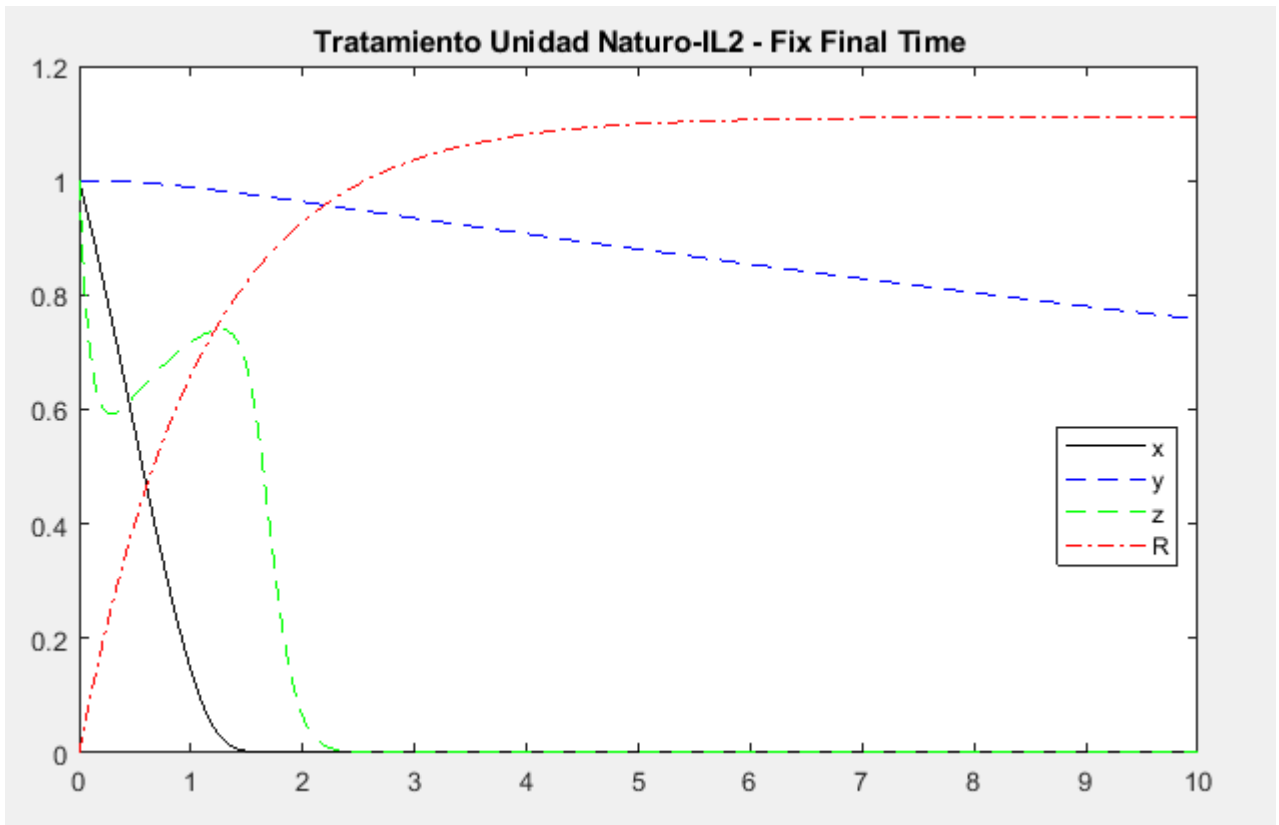


Figura 10. Evolución temporal del tratamiento natural unidad continuado durante 10 días. Trayectorias de las correspondientes poblaciones de células cancerígenas (x), de células effector (y), de moléculas interleuquin IL2 (z) y de la variable cantidad-tratamiento (R), con relación al tiempo medido en días.

5. CONCLUSIONES

Como conclusión del proyecto, dedicamos esta sección a ofrecer una breve síntesis de sus resultados más destacados:

- 1) En primer lugar hemos presentado las dos componentes del sistema inmunológico: el sistema **inmunológico innato** o **humoral**, que constituye el primer nivel defensivo del organismo; y el sistema **inmunológico adaptativo** o **celular**, que se erige en el segundo nivel defensivo. Los linfocitos T que sobreviven tras la contracción inmunitaria se convierten en **linfocitos de memoria**, con unos rasgos distintivos que les caracterizan como vigilantes defensivos y les preparan para ulteriores rebrotes del agente patógeno recientemente eliminado.

Hemos presentado las **citoquinas** como las moléculas que actúan como señales de comunicación que utiliza el sistema inmunológico para activar las células inmunes y desplazarlas hacia el lugar de la agresión patógena, bien sea inflamación, infección o disfunción tumoral. De entre las citoquinas hemos destacado la influencia crucial de la citoquina **Interleuquin IL-2** en la respuesta secundaria del sistema inmune.

- 2) Hemos documentado la denominada "*Paradoja del Oxígeno*". El **oxígeno**, un agente ciertamente tan necesario en el origen y el mantenimiento de la vida de los organismos pluricelulares, pero que, paradójicamente, conlleva peligrosas reacciones de oxidación que estropearían de forma rápida nuestro organismo si no dispusiéramos de numerosas defensas antioxidantes que minimizan el proceso oxidativo. A este respecto, las **cargas oxidativa (ROS)** y **nitrosativa (RNS)** del organismo inducen un desequilibrio reducto-oxidante que ha sido detectado en células cancerosas comparadas con células normales. La modificación continuada del material genético por las cargas oxidativas, produce lesiones del ADN celular que pueden iniciar procesos cancerosos. El tripéptido **Glutación (GSH)** aparece como el antioxidante más activo en los sistemas biológicos. Se trata del sustrato básico de importantes reacciones

catalizadas por varias enzimas antioxidantes como son la *glutación peroxidasa* y la *glutación reductasa*.

Hemos destacado la importancia de la **Quercetina** como el flavonoide de mayor potencia antioxidante frente a las ROS y a las RNS.

- 3) En el Anexo II documentamos la información relevante en relación a las plantas medicinales, llamadas **Kalanchoe**, con destacadas propiedades antitumorales y antioxidantes. Importantes estudios científicos han atribuido dichas propiedades a componentes químicos de estas plantas como son los denominados **bufadienolides** y el flavonoide **quercetina**.
- 4) El primer objetivo importante del proyecto ha sido la presentación de un modelo matemático sobre la prevención del cáncer por tratamientos naturales, que hemos denominado modelo **Naturo-Preventivo**. Los elementos vertebrados de este modelo son los **linfocitos de memoria** que sobreviven en los organismos vivos tras la contracción inmunitaria, y las **cargas oxidativa (ROS)** y **nitrosativa (RNS)** del organismo, que inducen importantes desequilibrios en él.

En la dinámica del sistema con tratamiento unidad ($V_R = 1$), aparece un **único punto de equilibrio estable** con una carga oxidativa $O = 0,3894$.

Se han llevado a cabo tres simulaciones numéricas del modelo *Naturo-Preventivo*, dos de las cuales han sido de control óptimo. La primera ha sido una simulación de control óptimo con tiempo final fijo (*fix final time*) de 60 días. La segunda simulación ha sido también de control óptimo, pero con tiempo final indeterminado (*free final time*). La tercera ha simulado la evolución temporal del modelo con un tratamiento unidad continuado. Es de destacar, en la simulación de control óptimo con tiempo final indeterminado, el papel preponderante del tratamiento preventivo aplicado, como lo muestra el hecho de que, a pesar de ser aplicado a un sistema con un alto grado de envenenamiento oxidativo, consigue reducir a cero la carga oxidativa en un periodo de 7 días.

5) Un segundo objetivo del presente proyecto ha sido la presentación de una modelización matemática del proceso canceroso, que hemos denominado **Naturo-IL_2**. La idea de este nuevo modelo ha sido incorporar un tratamiento del cáncer naturoterapéutico en el modelo *Kirschner – Panetta* y estudiar su comportamiento.

El único punto de **equilibrio estable** del modelo, con masa tumoral nula y tratamiento naturoterapéutico unidad, asegura que el sistema no se estabiliza hasta conseguir limpiar completamente el tumor (masa tumoral cero), lo cual es indicio del carácter preventivo del tratamiento natural.

Se han llevado a cabo tres simulaciones numéricas del modelo *Naturo-IL_2*, dos de las cuales han sido de control óptimo. La primera ha sido una simulación de control óptimo con tiempo final fijo (*fix final time*) de 100 días. La segunda también ha sido de control óptimo, pero con tiempo final indeterminado (*free final time*). La tercera ha simulado la evolución temporal del modelo con un tratamiento unidad continuado. Sin duda cabe destacar que la simulación de control óptimo con tiempo final indeterminado muestra cómo en un relativamente corto periodo de tiempo se reducen a cero la masa tumoral y el tratamiento aplicado.

Finalmente, quisiera terminar esta sección de conclusiones del proyecto abriendo nuevas líneas de futura investigación. Ciertamente, y en la línea del estudio llevado a cabo en el presente proyecto, resultaría interesante analizar el posible potencial preventivo y antitumoral de otras tres plantas, cuyo poder antioxidante ha sido probado por recientes estudios:

*Indigofera cassioides*⁵², *Euphorbia hirta* L⁵³, *Schotia latifolia* Jacq⁵⁴

⁵² **R Senthil Kumar1, B Raj Kapoor, P Perumal.** “Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. Using various *in vitro* assay models”. 2012 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.

⁵³ **Abu Arra Basma1, Zuraini Zakaria1, Lacimanan Yoga Latha, Sreenivasan Sasidharan.** “Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L”. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine (2011)386-390

⁵⁴ **Mbaebie BO, Edeoga HO, Afolayan AJ.** “Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq”. Asian Pac J Trop Biomed 2012; 2(2): 118-124.

ANEXO I

$$\begin{pmatrix}
 -y \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) - A_T R & -x \left(\beta + \frac{\delta R}{\eta_1 + R} \right) & 0 & 0 & -\frac{\delta \eta_1 x y}{(\eta_1 + R)^2} - A_T x \\
 0 & \frac{\lambda R}{\eta_2 + (1 + \lambda)R} (1 + \lambda - 2\varphi y) & 0 & 0 & \frac{y \lambda \eta_2}{[\eta_2 + (1 + \lambda)R]^2} (1 + \lambda - y\varphi) \\
 0 & 0 & \frac{\rho z}{\eta_3 + (1 + \rho)z} (1 + \rho - 2\theta w) & \frac{w \rho \eta_3}{[\eta_3 + (1 + \rho)z]^2} (1 + \rho - w\theta) & 0 \\
 0 & 0 & 0 & \frac{h R}{\eta_4 + (1 + h)R} (1 + h - 2\mu z) & \frac{z h \eta_4}{[\eta_4 + (1 + h)R]^2} (1 + h - z\mu) \\
 0 & 0 & 0 & 0 & -\gamma
 \end{pmatrix}$$

Figura 11. Matriz jacobiana del sistema de ecuaciones (2) – (6).

ANEXO II

FUENTES DE TRATAMIENTO NATURAL

Durante siglos las plantas han sido fuentes muy ricas de agentes terapéuticos y base fundamental para la elaboración de una gran cantidad de fármacos.

Actualmente, y a pesar de los grandes avances realizados en el campo de la síntesis orgánica de compuestos farmacéuticos, todavía el 75 % de los fármacos homologados por todo el mundo se derivan de fuentes naturales ⁷⁷. Así es como aparece la importancia de las especies naturales en la curación de multitud de enfermedades.

Ciertamente, ante la complejidad y virulencia del cáncer, se presenta como un reto difícil encontrar una planta medicinal que de manera eficaz consiga controlar tan graves disfunciones provocadas por esta enfermedad. El objetivo de las líneas que siguen será mostrar y analizar cómo unas plantas medicinales llamadas *Kalanchoe* afrontan tal imponente desafío.

Las Kalanchoe. Origen y Características

Probablemente el nombre de estas plantas⁵⁵ se deriva de la transcripción del chino “*Kalan Chauhuy*”, que significa “que cae y crece”, aludiendo a las plántulas que produce.

Este género de plantas, que fue descrito y catalogado por primera vez por el botánico Michael Adanson en 1763, cuenta con ciento veinticinco especies tropicales, y forma parte de la gran familia de las Crasuláceas.

⁵⁵ **Adolfo Pérez**, *Kalanchoe, una Alternativa Natural a la Quimioterapia*. 2ª edición, 2015. Ediciones Obelisco. ISBN: 978-84-9777-886-2

El hábitat natural de las *Kalanchoe* se extiende desde el sur del desierto del Sahara hasta el sur de África, incluyendo Madagascar y algunas zonas asiáticas. Las tres siguientes especies son las que poseen comprobados atributos medicinales:

- *Kalanchoe Pinnata*: También se la conoce como planta de Goethe, por Johann Wolfgang Goethe, que además de ser escritor, también fue naturista y muy buen conocedor de esta planta.
- *Kalanchoe Daigremontiana*: También recibe los nombres de “aranto”, “madre de miles”, o “*kalanchoe mejicana*”. De las tres especies, posiblemente sea la de proliferación más invasiva.
- *Kalanchoe Gastonis-Bonnieri*: Su nombre se debe al botánico francés Gaston Bonnier. Esta planta tiene las hojas más grandes que las dos especies anteriores.

Análisis Fitoquímico

En el análisis fitoquímico ⁵⁶ de las *kalanchoe* medicinales, destacaremos una serie de elementos químicos llamados *bufadienolides*, que son muy activos y han despertado un gran interés entre los científicos. Los *bufadienolides* han puesto de manifiesto en la investigación clínica, que poseen destacados efectos antitumorales en el cáncer; y, además, efectos antibacterianos.

Concretando más el análisis fitoquímico de estas plantas, podemos encontrar en ellas los siguientes compuestos:

- ✓ Ácido siríngico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido protocatéquico, ácido cinámico, astragalín, friedelina, fosfoenolpiruvato, lutedin, rutin, epigalocatequina ⁵⁷.

⁵⁶ **Quazi Majaz A., A.U. Tatiya and al.** “The miracle plant (*Kalanchoe Pinnata*): a phytochemical and pharmacological review”. IJRAP, 2011; 2(5), pp. 1478 – 1482.

⁵⁷ **Anooj Kamboj, Ajay Kumar.** “*Bryophyllum pinnatum*: Phytochemical and Pharmacological Profile: A Review”. Pharmacognosy Reviews, 2009; 3(6), pp. 364- 374.

- ✓ Tres flavonoides muy poco usuales: quercetina⁵⁸, kaempherol y glucopiradinosida, que destacan por su actividad contra la leishmaniosis cutánea.
- ✓ Bryophyllol, bryophollone y bryophollenone. Oleano, taraxasterol y arnyrin acetato. Amirina y sus acetatos ⁵⁹.
- ✓ Dos bufadienolides que destacan por su actividad insecticida ⁶⁰: Bryophyllin A y bryophyllin C.
- ✓ Cinco bufadienolides destacados por su actividad antitumoral ⁶¹: Bryophyllin A, bryophyllin C, bryophollone, bersaldegenin y daigremotianin.
- ✓ Sitosterol, bryophyllol, bryophynol, bryotoxin A, bryotoxin B, campesterol, clionasterol, codisterol, isofucosterol, peposterol, desmosterol, estigmasterol, clerosterol, epiclerosterol y dihidrobrasicasterol ⁵⁷.

Análisis Farmacológico

La investigación clínica realizada hasta ahora ha destacado las siguientes propiedades farmacológicas de las Kalanchoe:

- 1) Actividad Antimicrobiana: La planta ha mostrado una importante actividad antimicrobiana contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, etc... ⁶². Además, también ha destacado su fuerte actividad antihelmíntica y fungicida⁶³.

⁵⁸ Michelle F. Muzitano, Luzineide W. Tinoco and al. "The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*". *Phytochemistry*, 2006; 67, pp. 2071 – 2077.

⁵⁹ Salimuzzaman Siddiqui, Shaheen Faizi and al. "Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum pinnatum*". *Phytochemistry*, 1989; 28(9), pp. 2433 – 2438.

⁶⁰ Unang Supratman, Tomoyuki Fujita and al. "New Insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C from *Kalanchoe pinnata*". *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2000; 64(6): pp. 1310 – 1312.

⁶¹ Unang Supratman, Tomoyuki Fujita and al. "Anti-tumour promoting activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. Daigremontiana x tubriflora*". *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001; 65(4): pp. 947 – 949.

⁶² Okwu DE, Nnamdi FU. "Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity". *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2011; 3(2): pp. 1 – 10.

⁶³ Veitch NC, Grayer RJ. *Natural Product Reports*, 2007; 21: pp. 539 – 573.

- 2) Actividad Antiulcerosa: La hoja de *K. pinnatum* inhibió el desarrollo de una variedad de úlceras agudas, inducidas en el estómago y el duodeno de ratones y cerditos guineanos ⁶⁴.
- 3) Efecto Inmune-modulador: La investigación ha mostrado un efecto inmune-modulador de las hojas de la planta, disminuyendo la capacidad de proliferación desmesurada del sistema inmunológico en respuesta a determinados antígenos⁶⁵.
- 4) Actividad Antioxidante: Investigaciones al respecto han concluido que los extractos de las hojas de la planta producen una muy importante y destacada eliminación de radicales libres ^{66,67}, cuya carga fisiológica en el organismo provoca un desequilibrio homeostático entre oxidantes y antioxidantes.
- 5) Actividad Antidiabética: El extracto acuoso del *Bryophyllum pinnatum* produjo significativas reducciones en los niveles de glucosa de la sangre de los ratones con diabetes inducida ⁶⁸.
- 6) Actividad Nefroprotectora: Se ha observado que el extracto de la planta impide la acumulación de células inflamatorias que ocasionan la necrosis de las células renales ⁶⁹, además de ejercer un significativo efecto diurético, controlando los niveles de creatinina en la orina y de urea en la sangre ⁷⁰.

⁶⁴ **Siddhartha Pal** and **A.K. Nag Chaudhuri**, “Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals”. *Journal of Ethnopharmacology*, 1991; 33: pp. 97-102.

⁶⁵ **Rossi-Bergmann B.**, **Costa SS.** and **al.** “Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe Pinnata* in mice”. *Phytotherapia*, 1994; 8 : pp. 399-402.

⁶⁶ **Halliwell B.**, **Gutteridge JMC.** “Free radical in Biology and Medicine, Nitric oxide scavenging by curcuminoids”. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 1997; 49: pp. 105-107.

⁶⁷ **Morales Al.**, **Sánchez CV.** and **al.** “Effect of quercetina on metallothionein, nitric acid synthases and cyclorosygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; 210: pp. 128-135.

⁶⁸ **John Ojewole AO.** “Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* leaf aqueous extract”. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 99: pp. 13-19.

⁶⁹ **Harlalka GV.**, **Patil CR.** “Protective effect of *Kalanchoe pinnata* on Gentamicine induced nephrotoxicity in rats”. *Indian Journal of Pharmacology* 2007; 39(4): pp. 201-205.

⁷⁰ **Patil R.**, **Bhargava K.** and **al.** “Diuretic and anti urolthiatic activity of hydroalcoholic extracts of leaves of *Kalanchoe Pinnata*”. *Journal of Pharmaceutical Research* 2008; 7(2): pp. 87-91.

- 7) Actividad Neurosedativa y relajante muscular: Se ha probado que los extractos acuosos de la planta producen una profunda disminución en la actividad neurológica sin crear dependencia ⁷¹.
- 8) Actividad antihipertensiva: Los extractos acuoso y metabólico de las hojas de *Bryophyllum pinnatum* produjeron disminuciones de la presión arterial en ratones afectados de hipertensión ⁷².
- 9) Actividad hepatoprotectora: Varios estudios han confirmado que el extracto etanólico del jugo de las hojas del *B. pinnatum* produce una protección hepática muy significativa ^{73, 74}.
- 10) Actividad anti-leishmaniosis: La *leishmaniosis* es una enfermedad tropical que se manifiesta con afecciones en la piel y en las membranas mucosas, acompañadas de fiebre y graves daños en el hígado. Una investigación ⁷⁵ demostró que el extracto acuoso de la *kalanchoe* protegió a ratones afectados por esta enfermedad.
- 11) Actividad anticancerígena: En este epígrafe presentamos las importantes propiedades antitumorales de las *kalanchoe* mediante una breve historia de las investigaciones más destacadas realizadas en este campo:
En 1988, una investigación pionera ⁷⁶, confirmó la importante actividad citotóxica del bufadienolide *Bryophyllin A*, extraído de la *Kalanchoe*, frente a las células cancerígenas del *A-549 carcinoma de pulmón humano* y frente a las células malignas del *HCT-8 cáncer de colon*.

⁷¹ Salahdeen HM., Yemitan OK. "Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*". *Fitoterapia*, 2005; 76(2): pp. 187-193.

⁷² John Ojewole AO. "Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract". *American Journal of Hypertension* 2002; vol.15, no. 4, part 2.

⁷³ Molander DW, Wroblewski F, La Due JS. "Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase, an index of hepato-cellular integrity". *Clinical Research Proceedings* 1955; 3: pp 20-24

⁷⁴ Yadav NP, Dixit VK, "Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata*". *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 86: pp. 197-202.

⁷⁵ SAG Da-Silva, SS Costa and al. "Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis". *Acta Tropica*, 1995; 60: pp. 201-210

⁷⁶ Yamagishi T., Yan X.Z. and al. "Structure and stereochemistry of bufadienolide A, a novel potent cytotoxic bufadienolide orthoacetate from *Bryophyllum pinnatum*". *Chem. Pharm. Bull.*, 1988; 36: pp. 1615-1617.

En el año 2001, un estudio llevado a cabo por Supratman y otros⁶¹, después de aislar cinco bufadienolides de las hojas de las *Kalanchoe Pinnata* y *Daigremontiana*, confirmó el carácter inhibidor de estos compuestos frente a la activación del virus *Epstein-Barr* en las células *Raji* cancerosas.

En 2012 aparece otro estudio realizado por Mahata y otros⁷⁷, que evidenció la capacidad del extracto de la planta para inducir la apoptosis (muerte celular) de las células cervicales humanas cancerosas.

El mismo año 2012, otra investigación liderada por Yin y otros⁷⁸, desveló la potencia antitumoral de nuevos *bufadienolides* como el *bufalin*, que tiene la capacidad de diferenciar las células sanas de las cancerosas e inducir la apoptosis únicamente de las cancerosas. De esta manera se evidenció que estos nuevos *bufadienolides* provocaron la apoptosis de las células malignas del *cáncer de mama*, de las células tumorales de un *cáncer de próstata* y de las células malignas de otros tres tipos de cáncer: el *carcinoma hepatocelular*, la *leucemia* y el *cáncer gástrico*.

⁷⁷ **Sutapa Mahata, Saurabh Maru and al.** “Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells”. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012; 12: 15.

⁷⁸ **Pei-Hao Yin, Xuan Liu and al.** “Anti-tumor Activity and Apoptosis-regulation Mechanisms of Bufalin in Various Cancers: New Hope for Cancer Patients”. Asian Pacific Journal of. Cancer Prevention, 2012; 13(11): pp. 5339-5343.

ANEXO III

Este anexo presenta la transcripción de los seis scripts en código MATLAB, correspondientes a las seis simulaciones realizadas en las secciones 3 y 4 del presente proyecto.

A) Script Control Óptimo Naturo-Preventivo “Fix Final Time”

```
% Script Control Óptimo Naturo-Preventivo “Fix Final Time”

% Estimación inicial para la solución

solinit = bvpinit(linspace(0,60,1000),[1.1 1 1 1 1 0 0 0 0 0]);

% Cálculo de la solución del problema de control óptimo
figure;
options = bvpset('RelTol',1e-3);
sol = bvp5c(@p_BVP_ode,@p_BVP_bc,solinit,options);

t = sol.x ;
y = sol.y ;

% Cálculo del control óptimo V_r
V_r = -6.88*y(10,:);
% Graficar la solución del problema
plot(t,y(1,:), 'k-',t,y(2,:), 'b--',t,y(3,:), 'g--',t,y(4,:), 'm--',t,V_r(1,:), 'r-.')
legend('x', 'y', 'w', 'z', 'V_r', 'Location', 'Best')
title('Control Óptimo Naturo-Preventivo - Fix Final Time')

function dydt = p_BVP_ode(t,y)
% Definición de los parámetros del problema
alpha = 0.05;
beta = 0.03;
delta = 1.2;
eta_1 = 31;
A_t = 0.019;
phi = 1;
lambda = 0.50;
eta_2 = 27;
ro = 0.1245;
eta_3 = 0.118;
theta = 1;
h = 0.7425;
eta_4 = 30;
mu = 1;
gamma = 9.0e-1;

% Definición del control óptimo
V_r = -6.88*y(10);
```

```

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = [alpha-(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5)))*y(1)*y(2)-A_t*y(5)*y(1)
        lambda*y(5)*y(2)*(1+lambda-phi*y(2))/(eta_2+(1+lambda)*y(5))
        ro*y(4)*y(3)*(1+ro-theta*y(3))/(eta_3+(1+ro)*y(4))
        h*y(5)*y(4)*(1+h-mu*y(4))/(eta_4+(1+h)*y(5))
        -gamma*y(5)+V_r
        y(6)*(y(2)*(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5)))+A_t*y(5))-1
        y(6)*(y(1)*(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5))))-...
        y(7)*(lambda*y(5)*(1+lambda-2*phi*y(2))/(eta_2+(1+lambda)*y(5)))
        -y(8)*(ro*y(4)*(1+ro-2*theta*y(3))/(eta_3+(1+ro)*y(4)))
        -y(8)*(y(3)*ro*eta_3*(1+ro-y(3)*theta)/(eta_3+(1+ro)*y(4))^2)-...
        y(9)*(h*y(5)*(1+h-2*mu*y(4))/(eta_4+(1+h)*y(5)))
        y(6)*(delta*eta_1*y(1)*y(2)/(eta_1+y(5))^2+A_t*y(1))-...
        y(7)*(y(2)*lambda*eta_2*(1+lambda-
        y(2)*phi)/(eta_2+(1+lambda)*y(5))^2)-...
        y(9)*(y(4)*h*eta_4*(1+h-
        y(4)*mu)/(eta_4+(1+h)*y(5))^2)+y(10)*gamma];

```

```
end
```

```

function res = p_BVP_bc(ya,yb)
% Condiciones en los extremos

```

```

res = [ ya(1)-1
        ya(2)-1
        ya(3)-1
        ya(4)-1
        ya(5)-0
        yb(6)-0
        yb(7)-0
        yb(8)-0
        yb(9)-0
        yb(10)-0 ];

```

```
end
```

B) Script Control Óptimo Naturo-Preventivo "Free Final Time"

```

% Script Control Óptimo Naturo-Preventivo "Free Final Time"
% Estimación inicial para la solución

solinit = bvpinit( linspace(0,1,400),[1.4 1.1 1.1 1.1 1 1.1 1 1.1 1.1
1],16 );

% Calcula la solución del problema de control óptimo
figure;
options = bvpset('RelTol',1e-3);
sol = bvp4c( @p_BVP_Fode, @p_BVP_Fbc, solinit, options);

y = sol.y ;
t = sol.parameters*sol.x ;

% Cálculo del control óptimo V_r
V_r = -2.10094*y(10,:) ;

```

```

% Explicita el tiempo final y grafica la solución del problema
fprintf('El valor del parametro es %7.3f.\n', sol.parameters)
plot(t,y(1,:), 'k-', t,y(2,:), 'b--', t,y(3,:), 'g--', t,y(4,:), 'm--',
t,V_r(1,:), 'r-.')
legend('x', 'y', 'w', 'z', 'V_r', 'Location', 'Best')
title('Control Óptimo Naturo-Preventivo - Free Final Time')

function dydt = p_BVP_Fode(t,y,T)

% Definición de los parámetros del problema
alpha = 0.05;
beta = 0.03;
delta = 1.2;
eta_1 = 31;
A_t = 0.019;
phi = 1;
lambda = 0.50;
eta_2 = 27;
ro = 0.1245;
eta_3 = 0.118;
theta = 1;
h = 0.7425;
eta_4 = 30;
mu = 1;
gamma = 9.0e-1;

% Definición del control óptimo
V_r = -2.10094*y(10);

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = T*[alpha-(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5)))*y(1)*y(2)-A_t*y(5)*y(1)
lambda*y(5)*y(2)*(1+lambda-phi*y(2))/(eta_2+(1+lambda)*y(5))
ro*y(4)*y(3)*(1+ro-theta*y(3))/(eta_3+(1+ro)*y(4))
h*y(5)*y(4)*(1+h-mu*y(4))/(eta_4+(1+h)*y(5))
-gamma*y(5)+V_r
y(6)*(y(2)*(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5)))+A_t*y(5))-1
y(6)*(y(1)*(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5))))-...
y(7)*(lambda*y(5)*(1+lambda-2*phi*y(2))/(eta_2+(1+lambda)*y(5)))
-y(8)*(ro*y(4)*(1+ro-2*theta*y(3))/(eta_3+(1+ro)*y(4)))
-y(8)*(y(3)*ro*eta_3*(1+ro-y(3)*theta)/(eta_3+(1+ro)*y(4))^2)-...
y(9)*(h*y(5)*(1+h-2*mu*y(4))/(eta_4+(1+h)*y(5)))
y(6)*(delta*eta_1*y(1)*y(2)/(eta_1+y(5))^2+A_t*y(1))-...
y(7)*(y(2)*lambda*eta_2*(1+lambda-
y(2)*phi)/(eta_2+(1+lambda)*y(5))^2)-...
y(9)*(y(4)*h*eta_4*(1+h-
y(4)*mu)/(eta_4+(1+h)*y(5))^2)+y(10)*gamma];

end

function res = p_BVP_Fbc(ya,yb,T)
% Condiciones en los extremos
V_r = -2.10094*yb(10);

res = [ ya(1)-1
ya(2)-1
ya(3)-1
ya(4)-1
ya(5)-0
yb(6)-0

```

```

        yb(7)-0
        yb(8)-0
        yb(9)-0
        yb(10)-0
        yb(1)+V_r^2-0];
end

```

C) Script Tratamiento Unidad Naturo-Preventivo "Fix Final Time"

```

% Script Tratamiento Unidad Naturo-Preventivo "Fix Final Time"
% Estimación inicial para la solución

solinit = bvpinit(linspace(0,100,500),[0 1 1 1 1 ]);

% Cálculo de la solución del problema
figure;
options = bvpset('RelTol',1e-3);
sol = bvp5c(@p_BVP_SSode,@p_BVP_SSbc,solinit,options);

t = sol.x ;
y = sol.y ;

% Graficar la solución del problema
plot(t,y(1,:), 'k-',t,y(2,:), 'b--',t,y(3,:), 'g--',t,y(4,:), 'm--',t,y(5,:), 'r-.')
legend('x', 'y', 'w', 'z', 'R')
title('Tratamiento Naturo-Preventivo Unidad_1 - Fix Final Time')

function dydt = p_BVP_SSode(t,y)
% Definición de los parámetros del problema

alpha = 0.05;
beta = 0.03;
delta = 1.2;
eta_1 = 31;
A_t = 0.019;
phi = 1;
lambda = 0.50;
eta_2 = 27;
ro = 0.1245;
eta_3 = 0.118;
theta = 1;
h = 0.7425;
eta_4 = 30;
mu = 1;
gamma = 9.0e-1;

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = [alpha-(beta+delta*y(5)/(eta_1+y(5)))*y(1)*y(2)-A_t*y(5)*y(1)
        lambda*y(5)*y(2)*(1+lambda-phi*y(2))/(eta_2+(1+lambda)*y(5))
        ro*y(4)*y(3)*(1+ro-theta*y(3))/(eta_3+(1+ro)*y(4))
        h*y(5)*y(4)*(1+h-mu*y(4))/(eta_4+(1+h)*y(5))
        -gamma*y(5)+1 ];
end

```

```

function res = p_BVP_SSbc(ya,yb)
% Condiciones en los extremos

res = [ ya(1)-1
        ya(2)-1
        ya(3)-1
        ya(4)-1
        ya(5)-0 ];
end

```

D) Script Control Óptimo Naturo-IL2 "Fix Final Time"

```

% Script Control Óptimo Naturo-IL2 "Fix Final Time"

% Estimación inicial para la solución
solinit = bvpinit(linspace(0,100,1000),[1.1 1 1 1 0 0 0 0]);

% Cálculo de la solución del problema de control óptimo
figure;
options = bvpset('RelTol',1e-3);
sol = bvp5c(@w_BVP_ode,@w_BVP_bc,solinit,options);

t = sol.x ;
y = sol.y ;

% Cálculo del control óptimo V_r
V_r = -8.1*y(8,:);

% Graficar la solución del problema
plot(t,y(1,:), 'k-',t,y(2,:), 'b--',t,y(3,:), 'g--',t,V_r(1,:), 'r-.')
legend('x', 'y', 'z', 'V_r', 'Location', 'Best')
title('Control Óptimo Naturo-IL2 - Fix Final Time')

function dydt = w_BVP_ode(t,y)
% Definición de los parámetros del problema

r_2 = 0.18;
b = 1.0e-3;
a = 1;
g_2 = 1.0e-1;
K_t = 0.85;
c = 0.025;
mu_2 = 0.03;
p_1 = 0.1245;
g_1 = 2.0e1;
h = 0.7425;
p_2 = 5;
g_3 = 1.0e-3;
mu_3 = 10;
gamma = 9.0e-1;

% Definición del control óptimo
V_r = -8.1*y(8);

```

```

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = [r_2*y(1)*(1-b*y(1))-(a*y(1)*y(2))/(g_2+y(1))-K_t*y(4)*y(1)
        c*y(1)-mu_2*y(2)+(p_1*y(2)*y(3))/(g_1+y(3))
        (1+h*y(4))*(p_2*y(2)*y(1))/(g_3+y(1))-mu_3*y(3)
        -gamma*y(4)+V_r
        y(5)*(2*r_2*b*y(1)+(a*g_2*y(2))/(g_2+y(1))^2+K_t*y(4)-r_2)-...
        y(6)*c-y(7)*(p_2*g_3*y(2)*(1+h*y(4)))/(g_3+y(1))^2-1
        y(5)*(a*y(1))/(g_2+y(1))+y(6)*(mu_2-(p_1*y(3))/(g_1+y(3)))-...
        y(7)*(p_2*y(1)*(1+h*y(4)))/(g_3+y(1))
        -y(6)*(p_1*g_1*y(2))/(g_1+y(3))^2+y(7)*mu_3
        y(5)*K_t*y(1)-y(7)*(p_2*h*y(1)*y(2))/(g_3+y(1))+y(8)*gamma];

end

function res = w_BVP_bc(ya,yb)
% Condiciones en los extremos

res = [ ya(1)-1
        ya(2)-1
        ya(3)-1
        ya(4)-0
        yb(5)-0
        yb(6)-0
        yb(7)-0
        yb(8)-0 ];

end

```

E) Script Control Óptimo Naturo-IL2 “Free Final Time”

```

% Script Control Óptimo Naturo-IL2 “Free Final Time”

% Estimación inicial para la solución

solinit = bvpinit(linspace(0,1,400),[1.32;1.1;1.1;1.1;1.1;1.4;1;1.1],16);

% Calcula la solución del problema de control óptimo
figure;
options = bvpset('RelTol',1e-3);
sol = bvp4c(@w_BVP_Fode,@w_BVP_Fbc,solinit,options);

y = sol.y ;
t = sol.parameters*sol.x ;

% Cálculo del control óptimo V_r
V_r = -1.51*y(8,:) ;

% Explicita el tiempo final y grafica la solución del problema
fprintf('El valor del parametro es %7.3f.\n', sol.parameters)
plot(t,y(1,:), 'k-',t,y(2,:), 'b--',t,y(3,:), 'g--',t,V_r(1,:), 'r-.')
legend('x','y','z','V_r','Location','Best')
title('Control Óptimo Naturo-IL2 - Free Final Time')

function dydt = w_BVP_Fode(t,y,T)
% Definición de los parámetros del problema

r_2 = 0.18;
b = 1.0e-3;
a = 1;

```

```

g_2 = 1.0e-1;
K_t = 0.85;
c = 0.025;
mu_2 = 0.03;
p_1 = 0.1245;
g_1 = 2.0e1;
h = 0.7425;
p_2 = 5;
g_3 = 1.0e-3;
mu_3 = 10;
gamma = 9.0e-1;

% Definición del control óptimo
V_r = -1.51*y(8);

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = T*[r_2*y(1)*(1-b*y(1))-(a*y(1)*y(2))/(g_2+y(1))-K_t*y(4)*y(1)
c*y(1)-mu_2*y(2)+(p_1*y(2)*y(3))/(g_1+y(3))
(1+h*y(4))*(p_2*y(2)*y(1))/(g_3+y(1))-mu_3*y(3)
-gamma*y(4)+V_r
y(5)*(2*r_2*b*y(1)+(a*g_2*y(2))/(g_2+y(1))^2+K_t*y(4)-r_2)-...
y(6)*c-y(7)*(p_2*g_3*y(2)*(1+h*y(4)))/(g_3+y(1))^2-1
y(5)*(a*y(1))/(g_2+y(1))+y(6)*(mu_2-(p_1*y(3))/(g_1+y(3)))-...
y(7)*(p_2*y(1)*(1+h*y(4)))/(g_3+y(1))
-y(6)*(p_1*g_1*y(2))/(g_1+y(3))^2+y(7)*mu_3
y(5)*K_t*y(1)-y(7)*(p_2*h*y(1)*y(2))/(g_3+y(1))+y(8)*gamma];

end

function res = w_BVP_Fbc(ya, yb, T)
% Condiciones en los extremos

V_r = -1.51*yb(8);

res = [ ya(1)-1
ya(2)-1
ya(3)-1
ya(4)-0
yb(5)-0
yb(6)-0
yb(7)-0
yb(8)-0
yb(1)+V_r^2-0];

end

```

F) Script Tratamiento Unidad Naturo-IL2 “Fix Final Time”

```

% Script Tratamiento Unidad Naturo-IL2 “Fix Final Time”

% Estimación inicial para la solución
solinit = bvpinit(linspace(0,10,500), ...
[0 1 0 0]);

% Cálculo de la solución del problema de control óptimo
figure;

```

```

options = bvpset('RelTol',1e-3);

sol = bvp5c(@w_BVP_SSode,@w_BVP_SSbc,solinit,options);

t = sol.x ;
y = sol.y ;

% Graficar la solución del problema
plot(t,y(1,:), 'k-',t,y(2,:), 'b--',t,y(3,:), 'g--',t,y(4,:), 'r-.')
legend('x', 'y', 'z', 'R', 'Location', 'Best')
title('Tratamiento Unidad Naturo-IL2 - Fix Final Time')

function dydt = w_BVP_SSode(t,y)
% Definición de los parámetros del problema

r_2 = 0.18;
b = 1.0e-3;
a = 1;
g_2 = 1.0e-1;
K_t = 0.85;
c = 0.025;
mu_2 = 0.03;
p_1 = 0.1245;
g_1 = 2.0e1;
h = 0.7425;
p_2 = 5;
g_3 = 1.0e-3;
mu_3 = 10;
gamma = 9.0e-1;

% Ecuaciones de los estados y los coestados
dydt = [r_2*y(1)*(1-b*y(1))-(a*y(1)*y(2))/(g_2+y(1))-K_t*y(4)*y(1)
        c*y(1)-mu_2*y(2)+(p_1*y(2)*y(3))/(g_1+y(3))
        (1+h*y(4))*(p_2*y(2)*y(1))/(g_3+y(1))-mu_3*y(3)
        -gamma*y(4)+1];

end

function res = w_BVP_SSbc(ya,yb)
% Condiciones en los extremos

res = [ ya(1)-1
        ya(2)-1
        ya(3)-1
        ya(4)-0 ];

end

```

BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Chandran, S. S.; Verhoeven, D.; Teijaro, J. R.; Fenton, M. J. and Farber, D. L.**(2009). “*TLR2 engagement on dendritic cells promotes high frequency effector and memory CD4 T cell responses*”. *Journal of Immunology*, 183(12):7832-41.
- [2] **Clemente Fernández Arias.** *Modelización Matemática del Ciclo Celular en Linfocitos T. Implicaciones para la Respuesta Inmunológica.* Proyecto Fin de Máster en Investigación Matemática. Facultad de Ciencias Matemáticas. Universidad Complutense de Madrid , 2010-2011.
- [3] **Megan K.L. MacLeod, John W.Kappler and Philippa Marrack,** “*Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment*”. 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 130, 10–15.
- [4] **Giandomenica Iezzi, Klaus Karjalainen, and Antonio Lanzavecchia,** “*The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naïve and Effector T Cells*”. *Immunity*, Vol. 8, 89–95, January, 1998.
- [5] **Joseph D. Miller, Robbert G. van der Most, Rama S. Akondy, John T. Glidewell, Sophia Albott and al.** “*Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines*”. *Immunity* 28, 710–722, May 2008.
- [6] **Louise M. D. Cruz, Mark P. Rubinstein, and Ananda W. Goldrath.** “*Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell*”. *Semin. Immunol.* 2009 April; 21(2): 92–98.
- [7] **Matthew A. Williams, Eugene V. Ravkov, and Michael J. Bevan.** “*Rapid Culling of the CD4+ T Cell Repertoire in the Transition from Effector to Memory*”. *Immunity* 28, 533–545, April 2008.
- [8] **Carmen Gerlach, Jeroen W.J. van Heijst, Erwin Swart and al.** “*One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation*”. *J. Exp. Med.* Vol. 207 No. 6 1235-1246.
- [9] **Roshene.R, Asha Ramesh.** “*Cytokines*”. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9(5), 2017, 719-721.
- [10] **Martin F. Bachmann, Annette Oxenius.** “*Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again*”. *EMBO reports* (2007) 8, 1142–1148.
- [11] **Martin F. Bachmann, Petra Wolint, Senta Walton, Katrin Schwarz and Annette Oxenius.** “*Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections*”. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 1502–1512.
- [12] **Kelvin J. A. Davies.** “*Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems*”. *IUBMB Life*, 50: 279–289, 2000.

- [13] **Davies, K. J. A., and Ursini, F.** (1995) *“The Oxygen Paradox”*. CLEUP University Press, ISBN 88-7178-374-3, Padova, Italy.
- [14] **Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W.O.** (1954). *“Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in Common”*. Science, 119, 623–626.
- [15] **Harman, D.** (1956). *“Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry”*. J. Gerontol., 11, 298–300.
- [16] **McCord, J. M., & Fridovich, I.** (1969). *“Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte Hemocuprein”*. J. Biol. Chem., 244, 6049–6055.
- [17] **Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncola, Mark T.D. Cronin, Milan Mazura and Joshua Telser.** *“Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 44–84.
- [18] **Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. T. D.** (2005). *“Metals, toxicity and oxidative stress”*. Curr. Med. Chem., 12, 1161–1208.
- [19] **Cadenas E. & Davies, K. J. A.** (2000). *“Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging”*. Free Radic. Biol. Med., 29, 222–230.
- [20] **Nordberg J. & Arner E. S. J.** (2001). *“Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”*. Free Radic Biol Med, 31(11), 1287-1312.
- [21] **Halliwell, B.** (1987). *“Oxidants and human disease: some new concepts”*. FASEB J, 1, 358-3649.
- [22] **Barry Halliwell, Ph.D.** *“Free Radicals and Antioxidants: A Personal View”*. Nutrition Reviews, Vol. 52, No. 8 August 1994: (1)253-265.
- [23] **Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A.** (2006). *“Biomarkers of oxidative damage in human disease”*. Clin. Chem., 52, 601–623.
- [24] **Lusis AJ, Navab M.** *“Lipoprotein oxidation and gene expression in the artery wall”*. Biochem Pharmacol 1993;46:2119-26.
- [25] **Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE.** *“Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?”*. J. Lab. Clin. Med. 1992;119:598-620.

- [26] **Halliwell B.** “*Reactive oxygen species and the central nervous system*”. J. Neurochem 1992;59:1609-23.
- [27] **Surai, P.F.** (2002). “*Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*”. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- [28] **Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C.** (2005). “*Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes*”. J. Nutr. Biochem., 16, 577–586.
- [29] **Béla Fiser, Balázs Jójá, Imre G. Csizmadia, Béla Viskolcz.** “*Glutathione – Hydroxyl Radical Interaction: A Theoretical Study on Radical Recognition Process*”. PLOS ONE. September 2013 | Volume 8 | Issue 9 | e73652.
- [30] **Shen, D., Dalton, T. P., Nebert, D. W., & Shertzer, H. G.** (2005). “*Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen Production*”. J. Biol. Chem., 280, 25305–25312.
- [31] **Kumiko Ishige, David Schubert and Yutaka Sagara.** “*Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms*”. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 30, No. 4, pp. 433–446, 2001.
- [32] **Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A.** “*Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical*”. Eur. J. Pharmacol. 2008, 585, 325–337.
- [33] **Mari C. W. Myhrstad, Harald Carlsen and al.** “*Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter*”. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 32, No. 5, pp. 386–393, 2002.
- [34] **Michelle Mouria , Anna S. Gukovskaya and alt.** “*Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis*”. Int. J. Cancer: 98, 761–769 (2002).
- [35] **Borut Poljšak and Polona Jamnik.** *Methodology for Oxidative State Detection in Biological Systems* . In: Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects. Chapter 12. © 2009 Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-60876-101-2.
- [36] **Hidetaka Nagata, Susumu Takekoshi and al.** “*Antioxidative Action of Flavonoids, Quercetin and Catechin, Mediated by the Activation of Glutathione Peroxidase*”. Tokai JExp Clin Med., Vol. 24, No. 1, pp,1-11, 1999.
- [37] **Dengke Bao, Jingkai Wang, Xiaobin Pang and Hongliang Liu.** “*Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells*”. Molecules 2017, 22, 1122; doi:10.3390/molecules 22071122.

- [38] **Alexei Tsygvintsev, Simeone Marino and Denise E. Kirschner**, “*A Mathematical Model of Gene Therapy for the Treatment of Cancer*”. 2012. UMPA, ENS de Lyon, 46, all’ee d’Italie.
- [39] **Vladimir A. Kuznetsov and Iliya A. Makalkin, Mark A. Taylor and Alan S. Perelson**, “*Nonlinear Dynamics of Immunogenic Tumors: Parameter Estimation and Global Bifurcation Analysis*”. Bulletin of Mathematical Biology, Vol. 56, No. 2, pp. 295 – 321, 1994. Elsevier Science Ltd.
- [40] **Denise Kirschner and John Carl Panetta**, “*Modeling immunotherapy of the tumor – immuneInteraction*” Journal of Mathematical Biology. (1998) 37: 235 – 252.
- [41] **Joanna Kolodziejczyk-Czepas and Anna Stochmal**. “*Bufadienolides of Kalanchoe species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use*”. Phytochem Rev (2017) 16:1155–1171.
- [42] **Zhenlong Yu, Wei Guo, Xiaochi Ma and al.** “*Gamabufotalin, a bufadienolide compound from toad venom, suppresses COX-2 expression through targeting IKK β /NF- κ B signaling pathway in lung cancer cells*”. Molecular Cancer 2014, 13:203.
- [43] **Michelle Mouria, Anna S. Gukovskaya , Yoon Jung and al.** “*Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis*”. Int. J. Cancer: 98, 761–769 (2002).
- [44] **Oluseye A. Ogunbayo, Robert M. Harris, Rosemary H. Waring and al.** “*Inhibition of the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca21-ATPase by Flavonoids: A Quantitative Structure activity Relationship Study*”. IUBMB Life, 60(12): 853–858, December 2008.
- [45] **Da-Silva, S.A.G.; Almeida, A.P.; Costa, S.S. and Rossi-Bergmann, B.** “*Aqueous extract of Kalanchoe Pinnata plant up-regulates Th1 cytokines in normal and Leishmania-infected mice*”. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. II, Nov. 1999.
- [46] **Michaelis, L.,and Menten, M. (1913)** *Die kinetik der invertinwirkung*, Biochemistry Zeitung 49, 333-369.
- [47] **R. J. DeBoer, Pauline Hogeweg, Hub F. J. Dullens, Roel A. DeWeger and WillemDenOtter**, “*Macrophage T Lymphocyte interactions in the anti-tumor immune response: A mathematical model*”. The Journal of Immunology, 134(4): 2748D2758, April 1985.
- [48] **S. A. Rosenberg and M. T. Lotze**. “*Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes*”. Annual Review of Immunology, 4: 681D709, 1986.

- [49] **P. Calabresi and P.S. Schein**, editors. *“Medical Oncology: Basic Principles and Clinical Management of Cancer”*. McGraw-Hill, New York, second edition, 1993.
- [50] **Wendell H. Fleming and Raymond W. Rishel**. *“Deterministic and Stochastic Optimal Control”*. Springer-Verlag, 1975.
- [51] **L.S. Pontryagin, V.G. Boltyanskii, R.V. Gamkrelidze, and Mishchenko**. *“The Mathematical Theory of Optimal Processes”*. Gordon and Breach, 1962.
- [52] **R Senthil Kumar¹, B Raj Kapoor, P Perumal**. *“Antioxidant activities of Indigofera cassioides Rottl. Ex. DC. using various in vitro assay models”*. 2012 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.
- [53] **Abu Arra Basma¹, Zuraini Zakaria¹, Lacimanan Yoga Latha, Sreenivasan Sasidharan**. *“Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of Euphorbia hirta L”*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicin (2011)386-390.
- [54] **Mbaebie BO, Edeoga HO, Afolayan AJ**. *“Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of Schotia latifolia Jacq”*. Asian Pac J Trop Biomed 2012; 2(2): 118-124.
- [55] **Adolfo Pérez**, *Kalanchoe, una Alternativa Natural a la Quimioterapia*. 2^a edición, 2015. Ediciones Obelisco. ISBN: 978-84-9777-886-2.
- [56] **Quazi Majaz A., A.U. Tatiya and al.** *“The miracle plant (Kalanchoe Pinnata): a phytochemical and pharmacological review”*. IJRAP, 2011; 2(5), pp. 1478 – 1482.
- [57] **Anooj Kamboj, Ajay Kumar**. *“Bryophyllum pinnatum: Phytochemical and Pharmacological Profile: A Review”*. Pharmacognosy Reviews, 2009; 3(6), pp. 364-374.
- [58] **Michelle F. Muzitano, Luzineide W. Tinoco and al.** *“The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from Kalanchoe pinnata”*. Phytochemistry, 2006; 67, pp. 2071 – 2077.
- [59] **Salimuzzaman Siddiqui, Shaheen Faizi and al.** *“Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of Bryophyllum pinnatum”*. Phytochemistry, 1989; 28(9), pp. 2433 – 2438.
- [60] **Unang Supratman, Tomoyuki Fujita and al.** *“New Insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C from Kalanchoe pinnata”*. Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2000; 64(6): pp. 1310 – 1312.
- [61] **Unang Supratman, Tomoyuki Fujita and al.** *“Anti-tumour promoting activity of Bufadienolides from Kalanchoe pinnata and K. Daigremontiana x tubriflora”*. Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2001; 65(4): pp. 947 – 949.
- [62] **Okwu DE, Nnamdi FU**. *“Two novel flavonoids from Bryophyllum pinnatum and their antimicrobial activity”*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2011; 3(2): pp. 1 – 10.

- [63] **Veitch NC., Grayer RJ.** Natural Product Reports, 2007; 21: pp. 539 – 573.
- [64] **Siddhartha Pal and A.K. Nag Chaudhuri,** “*Studies on the anti-ulcer activity of a Bryophyllum pinnatum leaf extract in experimental animals*”. Journal of Ethnopharmacology, 1991; 33: pp. 97-102.
- [65] **Rossi-Bergmann B., Costa SS. and al.** “*Immunosuppressive effect of the aqueous extract of Kalanchoe Pinnata in mice*”. Phytoterapia, 1994; 8 : pp. 399-402.
- [66] **Halliwell B., Gutteridge JMC.** “*Free radical in Biology and Medicine, Nitric oxide scavenging by curcuminoids*”. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1997; 49: pp. 105-107.
- [67] **Morales Al., Sánchez CV. and al.** “*Effect of quercetina on metallothionein, nitric acid synthases and cyclorosenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats*”. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2006; 210: pp. 128-135.
- [68] **John Ojewole AO.** “*Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of Bryophyllum pinnatum leaf aqueous extract*”. Journal of Ethnopharmacology 2005; 99: pp. 13-19.
- [69] **Harlalka GV., Patil CR.** “*Protective effect of Kalanchoe pinnata on Gentamicine induced nephrotoxicity in rats*”. Indian Journal of Pharmacology 2007; 39(4): pp. 201-205.
- [70] **Patil R., Bhargava K. and al.** “*Diuretic and anti urolithiatic activity of hydroalcoholic extracts of leaves of Kalanchoe Pinnata*”. Journal of Pharmaceutical Research 2008; 7(2): pp. 87-91.
- [71] **Salahdeen HM., Yemitan OK.** “*Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of Bryophyllum pinnatum*”. Fitoterapia, 2005; 76(2): pp. 187-193.
- [72] **John Ojewole AO.** “*Antihypertensive properties of Bryophyllum pinnatum leaf extract*”. American Journal of Hypertension 2002; vol.15, no. 4, part 2.
- [73] **Molander DW, Wroblewski F, La Due JS.** “*Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase, an index of hepato-cellular integrity*”. Clinical Research Proceedings 1955; 3: pp 20-24.
- [74] **Yadav NP, Dixit VK,** “*Hepatoprotective activity of leaves of Kalanchoe pinnata*”. Journal of Ethnopharmacology 2003, 86: pp. 197-202.
- [75] **SAG Da-Silva, SS Costa and al.** “*Therapeutic effect of oral Kalanchoe pinnata leaf extract in murine leishmaniasis*”. Acta Tropica, 1995; 60: pp. 201-210.

- [76] **Yamagishi T., Yan X.Z. and al.** “*Structure and stereochemistry of bufadienolide A, a novel potent cytotoxic bufadienolide orthoacetate from Bryophyllum pinnatum*”. Chem. Pharm. Bull., 1988; 36: pp. 1615-1617.
- [77] **Sutapa Mahata, Saurabh Maru and al.** “*Anticancer property of Bryophyllum pinnata (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells*”. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012; 12: 15.
- [78] **Pei-Hao Yin, Xuan Liu and al.** “*Anti-tumor Activity and Apoptosis-regulation Mechanisms of Bufalin in Various Cancers: New Hope for Cancer Patients*”. Asian Pacific Journal of. Cancer Prevention, 2012; 13(11): pp. 5339-5343.