



**Università degli Studi di Pisa**  
**Facoltà di Ingegneria**  
**Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica**

Tesi di Laurea Specialistica

**Analisi della dinamica in-vitro della 3-Iodiotironamina  
(T<sub>1</sub>AM)  
utilizzando modellistica compartimentale**

Relatori:

Ing. Giovanni Vozzi

Ing. Amalia Gastaldelli

Prof. Riccardo Zucchi

Candidato:

Gianni Orsi

20 luglio 2010

Anno Accademico: 2009/2010

# Gianni Orsi – Riassunto Tesi

La 3-Iodotironamina ( $T_1AM$ ) è un composto endogeno, derivato della tiroide, ottenuto da una serie di deiodinazioni successive della Tiroxina. L'interesse per le iodotironamine si è acceso a partire dal 2004, in seguito alla dimostrazione che il composto  $T_1AM$  (3-iodotironamina) deve essere considerato come un ormone vero e proprio. Questa conclusione deriva dalle seguenti considerazioni:

- ✓  $T_1AM$  è un composto endogeno;
- ✓  $T_1AM$  interagisce con specifici recettori, detti TAARs (TraceAmine Associated Receptors), che sono totalmente distinti dai TAR ed appartengono alla classe dei recettori di membrana accoppiati a proteine G (GPCR = G Protein Coupled Receptors);
- ✓  $T_1AM$  produce effetti funzionali su diversi organi ed apparati, in particolare i principali effetti sono una riduzione della temperatura corporea, un aumento del metabolismo dei lipidi a spese di quello dei carboidrati, una modulazione della secrezione di insulina, una risposta cardiaca inotropica e cronotropica negativa (cioè una riduzione della contrattilità e della frequenza cardiaca).
- ✓ La sostanza viene degradata, da parte dell'azione in cascata di enzimi quali monoaminossidasi (MAO) e aldeide deidrogenasi, in acido 3-iodotiroacetico, chiamato comunemente  $TA_1$ . In particolare, però, i meccanismi che regolano la dinamica di assorbimento- conversione- rilascio della sostanza non sono stati ancora chiariti o semplicemente data una stima quantitativa, sia in-vivo che ex-vivo che in-vitro.

L'obiettivo di questa tesi era quello di caratterizzare la dinamica in-vitro della 3-Iodotironamina ( $T_1AM$ ) e del suo catabolita ( $TA_1$ ), tramite modelli matematici. I dati sperimentali da analizzare sono stati generati da esperimenti su colture cellulari statiche di cardiomioblasti murini della linea immortalizzata H9C2, effettuati su una finestra temporale di 1440 minuti. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando  $T_1AM$  in concentrazioni note, talvolta insieme anche ad altre sostanze, ad esempio inibitori della conversione o del trasporto ipotizzato. Il  $T_1AM$  è stato inoculato in una quantità iniziale nota, ed in seguito è stata monitorata l'evoluzione temporale di quattro quantità misurabili:

- $T_1AM$  nel mezzo di coltura
- $T_1AM$  nel lisato cellulare
- $TA_1$  nel lisato cellulare
- $TA_1$  nel mezzo di coltura

I dati sperimentali, ottenuti mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e MS (Mass Spectrometry) sono stati analizzati con metodi statistici della teoria della misura, in particolare combinando tutte le possibili fonti di errore al fine di ottenere un'incertezza standard che tenesse conto di tutti questi aspetti. Questa tipologia di analisi si è dimostrata essenziale per il resto del lavoro, in quanto ha permesso di discernere in maniera migliore la rilevanza (o peso) di ciascun punto sperimentale, permettendo fitting più accurati. Questa parte del lavoro è stata effettuata in ambiente Microsoft Excel. Le curve sono state in seguito sottoposte ad una procedura di fitting con funzioni matematiche elementari note (tipicamente serie di esponenziali), in modo da determinare i tempi caratteristici del fenomeno. In particolare ai fini dell'analisi del sistema, è stato possibile utilizzare l'input iniziale (assimilabile ad un impulso) per ricavare la risposta impulsiva del sistema. I target di questa procedura sono stati: la stima delle costanti di tempo caratteristiche del fenomeno e del numero minimo di "compartimenti" necessari a generare quella curva; il confronto fra i parametri ottenuti relativamente all'esperimento di "controllo" (con solo  $T_1AM$ ), e quelli di altri esperimenti (es. con inibitore della conversione enzimatica), per valutare l'effetto di altre sostanze sulla dinamica, e le eventuali correlazioni fisiologiche.

Questo approccio ha portato risultati interessanti, in quanto è stato possibile determinare le varie costanti di tempo per ogni esperimento (zeri e poli della funzione di trasferimento, correlabili ai rate globali di svuotamento dei "compartimenti"), utilizzando funzioni semplici e con un numero di parametri non elevato. Le varie funzioni testate sono state confrontate utilizzando criteri di parsimonia (Akaike e Bayesian Information Criterion), al fine di decidere quale utilizzare in maniera definitiva. I parametri ottenuti dalla procedura di fitting si sono rivelati affidabili (coefficienti di variazione bassi), anche se non sempre risulta agevole correlare le variazioni osservate in condizioni diverse con specifiche variabili di tipo biochimico o fisiologico.. Questa parte è stata realizzata con degli script in ambiente MATLAB, utilizzando funzioni provenienti principalmente dalle Toolbox: Control System, Curve Fitting e Symbolic Math. La stima parametrica è stata ottenuta minimizzando una funzione con il metodo della somma dei residui

quadrati pesati (SSWR – Sum Squares Weighted Residuals). Per i motivi sovraccitati la scelta è caduta su un modello di tipo compartimentale, in grado di fornire informazioni maggiori e più facilmente correlabili alle variabili fisiologiche. In particolare sono stati provati modelli di tipo lineare e modelli di tipo non lineare. I modelli di tipo lineare hanno presto mostrato i loro limiti, specialmente sulle correlazioni fisiologiche, anche se hanno aiutato nello screening per via della loro semplicità di analisi e di creazione. Il modello finale utilizzato è un modello non lineare basato su un'interazione recettore/ligando e successiva internalizzazione del complesso. Il T<sub>1</sub>AM così internalizzato viene poi in parte degradato con una serie di due reazioni enzimatiche, di cui la prima prossima all'equilibrio, ed in parte tende a fuoriuscire dalla cellula. Questo modello suggerisce che l'uptake di T<sub>1</sub>AM sia condizionato dal fenomeno fisiologico chiamato "sottoregolazione dei recettori". Il modello generato approssima ottimamente i dati sperimentali, seppure la matrice di correlazione e l'analisi dei residui indicano che esso potrebbe essere ancora semplificato in quanto vi sono dei parametri molto correlati fra loro. Il modello è stato implementato in ambiente SAAM II e MATLAB. Per il momento comunque è stata modellata con questo ultimo tipo di approccio solo la dinamica del T<sub>1</sub>AM, in quanto includere nel modello dinamico il TA<sub>1</sub> necessitava di troppi parametri incogniti, e quindi si perdeva la significatività.

Gli sviluppi naturali di questo lavoro sono: il design di esperimenti high-throughput per verificare le congetture sul trasporto e le altre ipotesi nate da questo lavoro di tesi; l'implementazione della dinamica del TA<sub>1</sub> nel modello compartimentale non lineare; la misura sperimentale dei parametri cinetici calcolati; la validazione del modello su dati provenienti da esperimenti non "di controllo", al fine di valutare se vi sono dei cambiamenti sostanza-specifici significativi nei parametri; la correlazione di questi dati in-vitro con quelli provenienti da organi perfusi o da esperimenti in-vivo e quindi l'estensione del modello su più scale, magari tramite leggi allometriche.