

UNA CONTRIBUCION
AL ESTUDIO CINETICO
DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS

R. Varón Castellanos, F. García Cánovas,
I. González Roldán, J. Tudela Serrano
A. M. Vázquez Molini y M. LL. Amo Saus

*Ramón Varón Castellanos es doctor en Ciencias Químicas,
catedrático de Escuelas Universitarias.
Centro de Trabajo: E.U. Politécnica de Albacete.*

Resumen

Se propone un procedimiento práctico para obtener una solución particular correspondiente a un sistema homogéneo de ecuaciones diferenciales, ordinarias, lineales, de primer orden y con coeficientes constantes. Este procedimiento puede aplicarse a estudios relativos a la cinética de la fase de transición de sistemas enzimáticos y otros modelos multicompartimentales.

Summary

A practical procedure in order to find a particular solution corresponding to a homogeneous system of differential, ordinary, linear, first order and with constant coefficients equations is proposed. This procedure can be applied to studies dealing with transient phase kinetic of enzyme systems and other multicompartment models.

1. INTRODUCCION

Los modelos multicompartimentales son aplicables a muchos aspectos de la Química, Biología, Bioquímica, Física y Farmacología (Hearon, 1963; Rescigno, 1964, Rescigno, 1965; Wagner, 1975; Nimmo, Bauermeister & Dale, 1981; Nguyen & Wood, 1982). Los estudios cinéticos de estos modelos requieren obtener una solución analítica particular de un sistema homogéneo de ecuaciones diferenciales, ordinarias, lineales, de primer orden y de coeficientes cons-

tantes. A partir de la solución analítica y utilizando los datos experimentales pueden determinarse los parámetros cinéticos.

La mayoría de las reacciones enzimáticas se estudian suponiendo condiciones iniciales que permiten considerar el correspondiente conjunto de especies enzimáticas como un modelo multicompartimental (Hearon, 1963; Hijazi & Laidler, 1974; Darvey, 1977; Gálvez & Varón, 1981). La solución analítica del correspondiente sistema de ecuaciones diferenciales lineales da la concentración de cada especie enzimática como una función del tiempo. A partir de aquí, la obtención de la concentración de un producto particular que se obtenga a partir de una o más especies enzimáticas se obtiene fácilmente mediante una integral inmediata.

Hasta ahora, todos los modelos enzimáticos, estudiados de una forma general, son tales que en la matriz correspondiente al sistema de ecuaciones diferenciales lineales se verifica que cada elemento de la diagonal principal es igual, en valor absoluto, a la suma de los otros términos de la misma columna. Además, se supone arbitrariamente que los valores propios de esta matriz que no sean nulos, son simples.

Hay muchos sistemas enzimáticos que evolucionan de acuerdo con un sistema de ecuaciones diferenciales lineales cuya matriz no tiene las propiedades anteriores con respecto a los elementos de la diagonal principal y, por lo tanto, no pueden aplicarse a estos sistemas enzimáticos las ecuaciones generales dadas en la literatura (Darvey, 1977; Gálvez & Varón, 1981). Ejemplos importantes de estos sistemas enzimáticos son las reacciones de activación de zimógenos (Varon et al., 1986) y aquéllos en los que la enzima libre está en exceso respecto de su sustrato (Hijazi & Laidler, 1972; Gálvez et al., 1983; Tudela et al., 1987; Varón et al., 1987).

El objetivo de este trabajo es proponer un procedimiento para la obtención de una solución particular de los anteriormente mencionados sistemas de ecuaciones diferenciales lineales, correspondientes a un sistema enzimático sin hacer restricciones ni con respecto a la naturaleza de su matriz ni con respecto a las multiplicidades de los valores propios de esta matriz. Este procedimiento es también aplicable a cualquier otro sistema multicompartimental.

2. NOTACION

En adelante utilizaremos la siguiente notación:

n : número de especies enzimáticas (en general, número de compartimientos).

x_i ($i=1,2,\dots,n$): una función del tiempo, t .

x_i^0 ($i=1,2,\dots,n$): valor de x_i para $t=0$.

$x_i^{(m)}$ = derivada m -ésima de x_i ($m=0,1,\dots$; $x_i^{(0)} = x_i$).

- X : matriz columna $n \times 1$ cuyo elemento i -ésimo es x_i .
 X^0 : matriz columna $n \times 1$ cuyo elemento i -ésimo es x_i^0 .
 $X^{(m)}$: matriz columna $n \times 1$ cuyo elemento i -ésimo es $x_i^{(m)}$.
 K : una matriz constante y cuadrada de orden n .
 K_{ji} : elemento de la matriz K de la i -ésima fila y de la j -ésima columna.

$$C_j = \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^n K_{i,j} \quad (1)$$

- I : matriz unidad de orden n .
 K^m : potencia m -ésima de K ($m=0,1,\dots$; $K^0 = I$).
 B_{oi} : matriz fila $1 \times n$ cuyos elementos son todos nulos excepto el i -ésimo, que es la unidad.
 $B_{ji} = B_{j-1,i}K$ ($j=1,2,\dots,n$).
 q : número de valores propios diferentes de la matriz K .
 $(h=1,2,\dots,q)$: un valor propio de la matriz K .
 r_h ($h=1,2,\dots,q$): multiplicidad de λ_h .
 $s_h = r_1 + r_2 + \dots + r_{h-1} + 1$ ($h=1,2,\dots,q$; $s_1 = 1$).
 A_{hp} : ($h=1,2,\dots,q$; $p=1,2,\dots, r_h-1$) una matriz columna $n \times 1$ cuyos elementos son función de t .

$$G_h(t) = \left(\sum_{p=0}^{r_h-1} A_{hp} t^p \right) e^{\lambda_h t} \quad (h=1,2,\dots,q) \quad (2)$$

- $G_h(t)^{(m)}$: derivada m -ésima de $G_h(t)$ ($m=0,1,\dots$; $G_h(t)^{(0)} = G_h(t)$)
 $G_h(t)^{(m)}(0)$: valor de $G_h(t)^{(m)}$ para $t=0$.
 D : determinante de orden n cuyo elemento de la i -ésima fila y de la $(s_h + p)$ -ésima columna ($h=1,2,\dots,q$; $p=0,1,\dots,r_h-1$) es

$$\binom{i-1}{p} \lambda_h^{i-p-1}$$

si $i < p + 1$, el elemento es 0. Por ejemplo, si λ_1, λ_2 y λ_3 son los valores propios de la matriz K , siendo sus multiplicidades r_1, r_2 y r_3 , respectivamente, entonces:

$$D = \begin{vmatrix} \binom{0}{0} & 0 & 0 & \binom{0}{0} & \binom{0}{0} & 0 \\ \binom{1}{0} \lambda_1 & \binom{1}{1} & 0 & \binom{1}{0} \lambda_2 & \binom{1}{0} \lambda_3 & \binom{1}{1} \\ \binom{2}{0} \lambda_1^2 & \binom{2}{1} \lambda_1 & \binom{2}{2} & \binom{2}{0} \lambda_2^2 & \binom{2}{0} \lambda_3^2 & \binom{2}{1} \lambda_3 \\ \binom{3}{0} \lambda_1^3 & \binom{3}{1} \lambda_1^2 & \binom{3}{2} \lambda_1 & \binom{3}{0} \lambda_2^3 & \binom{3}{0} \lambda_3^3 & \binom{3}{1} \lambda_3^2 \\ \binom{4}{0} \lambda_1^4 & \binom{4}{1} \lambda_1^3 & \binom{4}{2} \lambda_1^2 & \binom{4}{0} \lambda_2^4 & \binom{4}{0} \lambda_3^4 & \binom{4}{1} \lambda_3^3 \\ \binom{5}{0} \lambda_1^5 & \binom{5}{1} \lambda_1^4 & \binom{5}{2} \lambda_1^3 & \binom{5}{0} \lambda_2^5 & \binom{5}{0} \lambda_3^5 & \binom{5}{1} \lambda_3^4 \end{vmatrix} \quad (3)$$

Es decir:

$$D = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ \lambda_1 & 1 & 0 & \lambda_2 & \lambda_3 & 1 \\ \lambda_1^2 & 2\lambda_1 & 1 & \lambda_2^2 & \lambda_3^2 & 2\lambda_3 \\ \lambda_1^3 & 3\lambda_1^2 & 3\lambda_1 & \lambda_2^3 & \lambda_3^3 & 3\lambda_3^2 \\ \lambda_1^4 & 4\lambda_1^3 & 6\lambda_1^2 & \lambda_2^4 & \lambda_3^4 & 4\lambda_3^3 \\ \lambda_1^5 & 5\lambda_1^4 & 10\lambda_1^3 & \lambda_2^5 & \lambda_3^5 & 5\lambda_3^4 \end{vmatrix} \quad (4)$$

3. TEORIA

Sea el sistema homogéneo de ecuaciones diferenciales, ordinarias, lineales, de primer orden y de coeficientes constantes:

$$X^{(1)} = KX \quad (5)$$

El método de la transformada de Laplace nos permite escribir:

$$X = \sum_{h=1}^q G_h(t) \quad (h=1, 2, \dots, q) \quad (6)$$

Para encontrar la solución particular correspondiente a las condiciones iniciales dadas por X^0 procedemos como sigue. De la ecuación (5), resulta:

$$X^{(m)} = \sum_{h=1}^q G_h(t)^{(m)} \quad (m=0, 1, \dots; h=1, 2, \dots, q) \quad (7)$$

Si tenemos en cuenta que los elementos de la matriz K son constantes, es fácil verificar, por recurrencia, que

$$X^{(m)} = K^m X \quad (8)$$

y la ecuación (7) puede escribirse como:

$$K^m X = \sum_{h=1}^q G_h(t) X^{(m)} \quad (m=0, 1, \dots; h=1, 2, \dots, q) \quad (9)$$

Por otra parte, es fácil demostrar, utilizando álgebra elemental, que:

$$G_h(t) X^{(m)}(0) = \sum_{p=0}^m c_{m,p} A_{hp} \lambda_h^{m-p} \quad (10)$$

siendo

$$c_{m,p} = \begin{cases} p! \binom{m}{p} & \text{si } p \leq r_h - 1 \\ 0 & \text{si } p > r_h - 1 \end{cases} \quad (11)$$

Obviamente, si $m < r_h - 1$, el número de términos del segundo miembro de la ecuación (10) es $m + 1$ y si $m > r_h - 1$, este número es r_h .

Si ahora en la ecuación (9) m toma los valores $0, 1, \dots, n-1$, y para cada valor de m hacemos $t=0$, se obtiene, teniendo en cuenta la ecuación (10), un sistema no homogéneo de ecuaciones lineales, cuyas incógnitas son las matrices columnas $n \times 1$ A_{hp} ($h=1, 2, \dots, q; p=0, 1, \dots, r_h - 1$). Usando la regla de Cramer, la solución de este sistema es:

$$A_{hp} = \Delta_{s_{h,p}} X^{(0)} / \Delta \quad (h=1, 2, \dots, q; p=0, 1, \dots, r_h - 1) \quad (12)$$

Aquí Δ es el determinante de los coeficientes de las incógnitas del mencionado sistema y $\Delta_{s_{h,p}}$ es el determinante Δ , en el que la columna $(s_{h,p})$ -ésima ha sido sustituida por la columna

$$\begin{matrix} I \\ K \\ K^2 \\ \vdots \\ K^{n-1} \end{matrix} \quad (13)$$

Es inmediato demostrar que

$$\Delta = \left(\prod_{h=1}^q \prod_{j=0}^{r_h-1} j! \right) D \quad (14)$$

y que

$$\Delta_{s_h+p} = \frac{1}{p!} \left(\prod_{h=1}^q \prod_{j=0}^{r_h-1} j! \right) D_{s_h+p} \quad (15)$$

siendo D_{s_h+p} el determinante que resulta si en D la columna (s_h+p) -ésima es sustituida por la columna (13).

Las ecuaciones (14) y (15) permiten escribir la ecuación (11) como:

$$A_{hp} = \frac{D_{s_h+p}}{p! D} X^0 \quad (h=1, 2, \dots, p; p=0, 1, \dots, r_h-1) \quad (16)$$

Nótese que tanto Δ_{s_h+p} como D_{s_h+p} son matrices cuadradas de orden n .

La ecuación (16) posibilita calcular las matrices A_{hp} y, por tanto, la solución particular de la ecuación (5) correspondiente a las condiciones iniciales X^0 .

Para asegurar la validez del método es necesario probar que los determinantes como el D son no nulos. En el Apéndice demostramos que estos determinantes pueden expresarse como:

$$D = \prod_{\substack{u, v \\ u > v}}^q (\lambda_u - \lambda_v)^{r_u r_v} \quad (D=1 \text{ si } q=1) \quad (17)$$

y como $u \neq v$, está asegurado que $D \neq 0$. Por ejemplo, el determinante (4) es igual a $(\lambda_2 - \lambda_1)^2 (\lambda_3 - \lambda_1)^2 (\lambda_3 - \lambda_2)^2$.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En este trabajo proponemos un procedimiento alternativo para la determinación de soluciones particulares de un sistema homogéneo de ecuaciones diferenciales lineales, de primer orden y de coeficientes constantes, a partir de la matriz K del sistema, del determinante D y de las condiciones iniciales, sin hacer restricciones respecto a la naturaleza de la matriz K ni a las multiplicidades de sus valores propios.

Nosotros utilizamos el método de la transformada de Laplace para obtener la expresión general de la solución del sistema de ecuaciones diferenciales y, a partir de aquí, desarrollamos nuestro propio procedimiento para la determinación de las soluciones particulares.

Los resultados obtenidos son aplicables para resolver analíticamente cualquier sistema de ecuaciones diferenciales como el descrito y como la evolución con el tiempo de los modelos multicompartimentales viene descrita por sistemas de estas características (Hearon, 1963), creemos que este trabajo es útil para el tratamiento de estos modelos, en particular para las reacciones enzimáticas.

En aquellos casos en que no estemos interesados en obtener una solución particular completa del sistema (5), sino solamente en la obtención de la dependencia con t de x_i (el elemento i -ésimo de la matriz X ; $i=1,2,\dots,n$), la tarea puede simplificarse sustituyendo en la ecuación (16) las matrices cuadradas, $I, K, K^2, \dots, K^{n-1}$ por las matrices fila $B_{0i}, B_{1i}, B_{2i}, \dots, B_{n-1,i}$ definidas en la sección de notación, obteniendo de esta forma el elemento i -ésimo de las matrices columnas A_{hp} .

Darvey (1968 y 1977) ha dado fórmulas cinéticas explícitas para la fase de transición de una reacción enzimática general en la que todas las transformaciones entre especies enzimáticas son reversibles, teniendo por lo tanto la matriz K las siguientes propiedades:

$$K_{jj} \quad (j=1,2,\dots,n) < 0 \quad (18)$$

$$K_{js} > 0 \quad (i,j=1,2,\dots,n; j \neq i) \quad (19)$$

$$|K_{jj}| = C_j \quad (\text{para todo } j; j=1,2, \dots, n) \quad (20)$$

$$K \text{ es irreducible} \quad (21)$$

En estas condiciones K tiene un, y sólo un, valor propio nulo, siendo la parte real de todos los demás negativa. En estos estudios se considera también que los $n-1$ valores propios no nulos de K son simples. Posteriormente, Gálvez & Varón (1981) extendieron el tratamiento de Darvey para hacerlo aplicable a más reacciones enzimáticas, tales como reacciones enzimáticas con etapas de inactivación o de inhibición irreversible. En este último tratamiento, las propiedades (19) y (20) de la matriz K se mantienen, pero las propiedades (18) y (21) deben sustituirse por:

$$K_{jj} \quad (j=1,2,\dots,n) \leq 0 \quad (22)$$

$$K \text{ es reducible o irreducible} \quad (23)$$

En estas condiciones K tiene un valor propio nulo cuya multiplicidad, c , que se determina inequívocamente, puede ser mayor que uno. Los demás $n-c$ valores propios se suponen simples y tienen la parte real negativa.

Sin embargo, hay un gran número de reacciones enzimáticas,

tales como las reacciones de activación de zimógenos o aquéllas con exceso de enzima libre con respecto a su sustrato, para las cuales no se verifica la propiedad (20) para uno o más valores de j . A estas reacciones no pueden aplicarse las fórmulas explícitas generales deducidas por los autores anteriormente mencionados. La cinética de la fase de transición de tales reacciones debe estudiarse de una forma individualizada (Kaserra & Laidler, 1970; Hijazi & Laidler, 1972; Gálvez et al., 1983; Varón et al., 1986; Tudela et al., 1987).

El procedimiento práctico propuesto en este trabajo da fórmulas explícitas para obtener la concentración de las especies enzimáticas como una función del tiempo siempre que el sistema de ecuaciones diferenciales que describe su evolución sea lineal, sin restricciones respecto a la naturaleza de la matriz K ni respecto a las multiplicidades de sus valores propios. Los anteriormente mencionados estudios generales son casos particulares del realizado en este trabajo.

Casos Particulares.

La ecuación (15) puede transformarse en otras más sencillas para cada uno de los posibles casos particulares que surjan de la naturaleza de la matriz K y de las multiplicidades de sus valores propios. Por ejemplo, consideraremos el caso en que todos los valores propios de la matriz K sean simples. En este caso se verifica:

$$\left. \begin{aligned} q &= n \\ r_1 &= r_2 = \dots = r_n = 1 \\ s_h &= h \\ p &= 0 \text{ para todo valor de } h \end{aligned} \right\} \quad (24)$$

y las ecuaciones (5), (1) y (17) se transforman en:

$$X = \sum_{h=1}^n G_h(t) \quad (25)$$

$$G_h(t) = A_{ho} e^{\lambda_h t} \quad (26)$$

$$A_{ho} = \frac{D_h X^o}{D} \quad (h=1, 2, \dots, n) \quad (27)$$

siendo D el siguiente determinante de Vandermonde:

$$D = \begin{vmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ \lambda_1 & \lambda_2 & \dots & \lambda_n \\ \lambda_1^2 & \lambda_2^2 & \dots & \lambda_n^2 \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \lambda_1^{n-1} & \lambda_2^{n-1} & \dots & \lambda_n^{n-1} \end{vmatrix} \quad (28)$$

y, por lo tanto, D_h ($h=1,2,\dots,n$) es:

$$D_h = \begin{vmatrix} 1 & 1 & \dots & \overset{\text{h-ésima columna}}{I} & \dots & 1 \\ \lambda_1 & \lambda_2 & \dots & K & \dots & \lambda_n \\ \lambda_1^2 & \lambda_2^2 & \dots & K^2 & \dots & \lambda_n^2 \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots & \dots & \vdots \\ \lambda_1^{n-1} & \lambda_2^{n-1} & \dots & K^{n-1} & \dots & \lambda_n^{n-1} \end{vmatrix} \quad (h=1,2,\dots,n) \quad (29)$$

Si desarrollamos D y D_h , la ecuación (27) se transforma, después de simplificar, en

$$A_{no} = \frac{\prod_{\substack{i=1 \\ i \neq h}}^n (K - \lambda_i I)}{\prod_{\substack{i=1 \\ i \neq h}}^n (\lambda_i - \lambda_i)} X^0 \quad (30)$$

REFERENCIAS

- Darvey, I. G. *Transient phase kinetics of enzyme reactions*. J. theor. Biol. **19**, 215-231 (1968).
- Darvey, I. G. *Transient phase kinetics of enzyme reactions where more than one species of enzyme is present at the start of the reaction*. J. theor. Biol. **65**, 465-478 (1977).
- Galvéz J. & Varón, R. *Transient phase kinetics of enzyme reactions*. J. theor. Biol. **89**, 1-17 (1981).

Gálvez, J.; Varón, R.; García Cánovas, F. & García Carmona, F. *Cinética en fase de transición de un mecanismo de Michaelis-Menten con nucleófilo competidor*. *An. Quim.* **79**, 5-8 (1983).

Hearon, J. Z. *Theorems on linear systems*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **108**, 36-68 (1963).

Hijazi, N. H. & Laidler, K. J. *Non-steady-state kinetics for a double-intermediate enzyme mechanism: the case of high enzyme concentrations*. *Can. J. Chem.* **50**, 1440-1442 (1972).

Maguire, R. J.; Hijazi, N. H. & Laidler, K. J. *Transient-phase kinetics of oc-chymotrypsin and other enzyme systems*. *Biochim. Biophys. Acta.* **341**, 1-14 (1974).

Nguyen, V. V. & Wood, E. F. *Review and unification of linear identifiability concepts*, *SIAM Rev.* **24**, 35-51 (1982).

Nimmo, I. A.; Bauermeister, A & Dale, J. E. *Evaluation of the Jackknife technique for fitting multiexponential functions to biochemical data*. *Anal. Biochem.* **110**, 407-411 (1981).

Rescigno, A. *On some topological properties of the systems of compartments*. *Bull. Math. Biophysic.* **26**, 31-38 (1964).

Rescigno, A. *On some metric properties of the systems of compartments*. *Bull. Math. Biophysic.* **27**, 315-323 (1965).

Tudela, J.; García Cánovas, F.; Varón, R.; García Carmona, F.; Gálvez, J. & Lozano, J. A. *Transient-phase kinetics of enzyme inactivation induced by suicide substrates*. *Biochim. Biophys. Acta.* **912** 408-416 (1987).

Varón, R.; Román, A.; García Cánovas, F. & García Carmona, F. *Transient phase kinetics of activation of human plasminogen*. *Bull. Math. Biol.* **48**, 149-166 (1986).

Varón, R.; García Cánovas, F.; García Carmona, F.; Tudela, J.; García, M.; Vázquez, A. & Valero, E. *Kinetics of a general model for enzyme activation through a limited proteolysis*. *Math. Biosci.* **87**, 31-45 (1987).

Wagner, J. G. *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications. Chapter 7. Hamilton, III. (1975).

APENDICE

Sea $D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_n, r_n)$ el determinante D definido en la sección de notación donde hay r_1 columnas en las que λ_1 está involucrado, r_2 columnas en las que λ_2 está involucrado, ..., r_n columnas en las que λ_n está involucrado. Para demostrar la ecuación (17) procedemos como sigue:

1) Restamos de cada fila del determinante $D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_n, r_n)$ la precedente multiplicada por λ_1 , con lo que se anulan todos los elementos de la primera columna excepto el primero, que sigue siendo la unidad.

2) A continuación, desarrollamos el determinante resultante, utilizando los elementos de la primera columna y sus correspondientes adjuntos, resultando un determinante de orden $n-1$, cuyas primeras r_1-1 columnas coinciden con las r_1-1 primeras del determinante $D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_q, r_q)$ excluidos, naturalmente, sus últimos elementos.

3) Sacamos de cada (s_h-1) -ésima ($h=2,3,\dots,q$) columna de este nuevo determinante el factor común $\lambda_h - \lambda_1$, y resulta:

$$D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) = E \prod_{h=2}^q (\lambda_h - \lambda_1) \quad (A1)$$

donde E es un determinante de orden $n-1$ resultante de esta etapa.

4) A continuación, restamos de cada (s_h-1+p) -ésima ($h=2,3,\dots,q$, pero si $r_h = 1$, h debe tomar el siguiente valor posible; $p=1,2,\dots,r_h-1$) columna del determinante E la anterior y sacamos de cada nueva (s_h-1+p) -ésima ($h=2,3,\dots,q$; $p=1,2,\dots,r_h-1$) columna resultante el factor común $\lambda_h - \lambda_1$ y resulta:

$$E = D(\lambda_1, r_1-1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) \prod_{h=2}^q (\lambda_h - \lambda_1)^{r_h-1} \quad (A2)$$

y de las ecuaciones (A1) y (A2) se obtiene:

$$D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) = D(\lambda_1, r_1-1; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_q, r_q) \prod_{h=2}^q (\lambda_h - \lambda_1)^{r_h} \quad (A3)$$

5) Si repetimos las etapas 1), 2), 3) and 4) con $D(\lambda_1, r_1-1; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_q, r_q)$, se obtiene:

$$D(\lambda_1, r_1-1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) = D(\lambda_1, r_1-2; \lambda_2, r_2, \dots, \lambda_q, r_q) \prod_{h=2}^q (\lambda_h - \lambda_1)^{r_h} \quad (A4)$$

y así hasta un total de r_1 veces, de modo que resulta:

$$D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) = D(\lambda_2, r_2, \dots, \lambda_q, r_q) \left\{ \prod_{h=2}^q (\lambda_h - \lambda_1)^{r_h} \right\}^{r_1} \quad (A5)$$

6) Procediendo con el determinante $D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q)$ de idéntica manera que con el determinante inicial, se obtiene finalmente,

$$D(\lambda_1, r_1; \lambda_2, r_2; \dots; \lambda_q, r_q) = D(\lambda_q, r_q) \prod_{\substack{u, v \\ u > v}}^q (\lambda_u - \lambda_v)^{r_u r_v} \quad (A6)$$

El determinante $D(\lambda_q, r_q)$ es triangular inferior, siendo los elementos de su diagonal principal iguales a la unidad y, por lo tanto:

$$D(\lambda_q, r_q) = 1 \quad (A7)$$

con lo que la ecuación (A6) se transforma en la ecuación (17).