

# Un desajuste en biotecnología

R. Cubarsi<sup>a</sup>, E. Vázquez<sup>b</sup>, A. Villaverde<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Departament de Matemàtica Aplicada IV, Universitat Politècnica de Catalunya

<sup>b</sup>Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

## RESUMEN

Se modeliza la penetración de una versión modificada de la proteína verde fluorescente llamada GFP en el citoplasma y el núcleo de una célula de mamífero. El modelo matemático proporciona una primera aproximación al experimento, con una disminución progresiva de la tasa de fluorescencia a medida que la luminosidad total va aumentando hasta saturarse. Sin embargo, se detecta una desviación localizada del modelo propuesto, debida a un proceso que no se realiza de forma totalmente diferenciable. El fenómeno es explicable a partir de la irrupción brusca de GFP en el citoplasma y el núcleo por la debilitación o ruptura de sus membranas, y por la obstrucción del flujo de GFP por la membrana nuclear. El modelo matemático proporciona pues información relevante sobre la desviación del patrón que se ha adoptado.

## ABSTRACT

The penetration of a modified version of a green fluorescent protein called GFP in the cytoplasm and nucleus of a mammalian cell is modelled. The mathematical model provides a first approach to the experiment, with a progressive decreasing rate of fluorescence as the total luminosity increases until saturation. However, a local deviation from the proposed model is detected, due to a process that takes place in a non-differentiable way. The phenomenon is explained from the sudden entrance of GFP into the cytoplasm and nucleus by the weakening or rupture of their membranes, and from the obstruction of GFP flux by the nuclear membrane. Thus, the mathematical model provides relevant information on the deviation from the pattern that has been adopted.

## INTRODUCCIÓN

No sólo es útil la correcta modelización de un experimento, sino que, de un modelo que no se ajusta totalmente a los datos, también se pueden deducir resultados interesantes, precisamente porque nos proporciona información relevante sobre la desviación del patrón que se ha adoptado.

En todo experimento se selecciona un número finito de propiedades a observar y se obtienen datos para estas variables en diversas circunstancias, por ejemplo, para distintos tiempos. Construir un modelo matemático significa establecer la interrelación entre estas variables, determinar cuáles van a ser las constantes que caractericen al experimento y, a partir de ahí, establecer su dinámica. En el caso que se explica, el modelo es determinista y diferenciable, por lo que constituye un conocimiento específico de una asignatura de Ecuaciones Diferenciales. El mismo modelo es también aplicable a una gran variedad de problemas de distintos campos: ecología, química, economía, etc. El problema es sencillo, por lo que bastará utilizar herramientas de cálculo en una variable.

Para el caso estudiado, se puede dar una solución analítica, aunque es más cómodo usar software matemático para las representaciones gráficas y para los métodos de estimación de parámetros y errores. Si el modelo inicial, a posteriori, se quisiera ajustar más a los datos, sería también ineludible el uso de otras técnicas numéricas y, quizás, de simulación. Por tanto, en la modelización matemática converge una diversidad de técnicas.

## EXPERIMENTO

Se estudia cómo entra en una célula de mamífero, que posee un núcleo, una proteína verde fluorescente llamada GFP, que al llevar fusionado un péptido altamente catiónico, forma pequeñas partículas de 20 nm de diámetro. Dicha proteína se ha ingeniarizado [1] para penetrar células de mamífero y transportar genes u otros fármacos a su núcleo, con finalidades terapéuticas.

Las células de mamífero son más o menos esféricas, y cuando están en cultivo son un poco más planas, de forma que, para simplificar, supondremos que adoptan forma cilíndrica, con el núcleo centrado en el eje de simetría. Cuando se sumerge una célula en un medio que contiene esta proteína, se detecta la presencia de fluorescencia, primero en el citoplasma solamente, y después en el citoplasma y en el núcleo. La detección se hace a partir de secciones ópticas de la célula, de grosor constante y suficientemente pequeño, con un microscopio láser llamado confocal, pudiendo escoger el radio de la sección a fin de incluir sólo el núcleo, o bien citoplasma y núcleo conjuntamente. De las imágenes digitalizadas se obtienen distintas mediciones para cada sección y, sumando, para todo el volumen considerado. Por ejemplo, número de píxeles, luminosidad de cada píxel, área o volumen del total de píxeles, valores máximo, mínimo y medio de la luminosidad, densidad lumínica por unidad de superficie o de volumen, etc. Con los datos obtenidos para diferentes tiempos, se desea obtener un modelo dinámico para la penetración de la GFP en el citoplasma y en el núcleo.

La variable escogida para estudiar la evolución temporal de la GFP ha sido la fluorescencia absoluta  $\phi(t)$ , medida en unidades de fluorescencia, bien sea de toda la célula, del núcleo, o por diferencia, del citoplasma.

## MODELO

Consideremos, en primer lugar, la célula completa. La fluorescencia total  $\phi(t)$  (se omite en este caso el subíndice  $T$ ) en función del tiempo

es casi nula al principio del experimento, y luego es una cantidad siempre positiva y continuamente creciente, que tiende a estabilizarse. En principio, el experimento planteado debería estudiarse a partir de un modelo de difusión de acuerdo con la ley de Fick. Sin embargo, los agregados que se forman parecen tener un papel decisivo en como el flujo de GFP atraviesa las membranas celulares en su camino hacia el núcleo. En cambio, empíricamente se observa un comportamiento parecido al del modelo de dinámica de poblaciones con crecimiento limitado. Parece lógico, por tanto, tomar como referencia la ley logística, dada por la ecuación diferencial:

$$\frac{1}{\phi} \frac{d\phi}{dt} = p\phi + q; \quad q > 0, \quad p < 0 \quad (1)$$

con  $p$  y  $q$  constantes. Definiendo  $F(t) = \ln(\phi(t))$  la tasa de variación o aumento relativo de la fluorescencia viene dada por  $F'(t) = \frac{d \ln \phi}{dt}$ .

Al inicio, cuando  $\phi \ll 0$ ,  $F'$  vale  $q$ , que es la máxima tasa de fluorescencia. Después, la tasa  $F'$  baja progresivamente hasta anularse, cuando la fluorescencia se estabiliza. La máxima fluorescencia es  $L = -q/p$ . Estos son los dos únicos puntos de equilibrio del sistema:  $\phi = 0$ , inestable, y  $\phi = L$ , estable. A diferencia del modelo poblacional, no tiene sentido un valor  $\phi > L$ . Así pues, los parámetros del modelo son  $p$  y  $q$ , distintos para cada célula. La solución de la Eq. 1 es inmediata y su discusión se encuentra en muchos textos básicos de ecuaciones diferenciales [2].

## AJUSTE

Para determinar los parámetros del modelo a partir de un conjunto de  $m$  valores  $(t, \phi(t))$ ;  $t = t_1, \dots, t_m$ , se usará la expresión discretizada

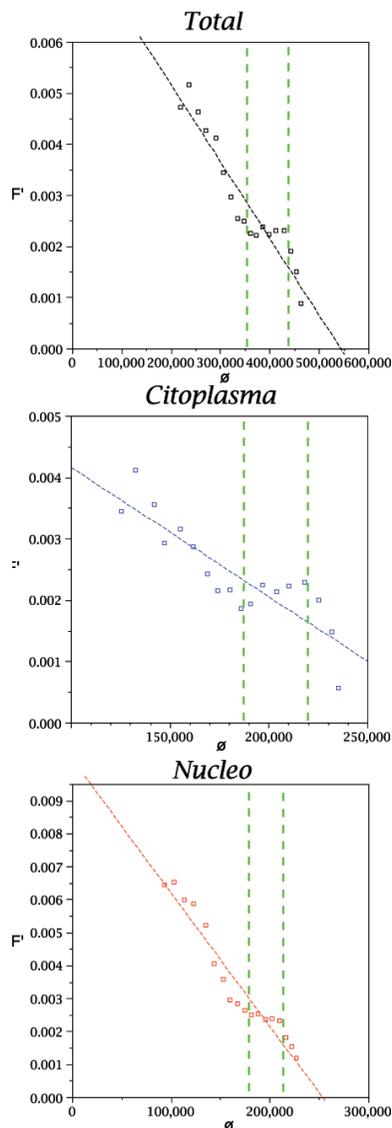
$$F'(t_i) = p\phi(t_i) + q \quad (2)$$

Para ello, es necesario hacer la estimación numérica de la derivada temporal  $F'(t)$ . Aunque en este caso las medidas temporales se han tomado a intervalos regulares, en otros casos no es así. Por lo tanto, para conseguir una mejor aproximación, hacemos una estimación de la derivada de la función  $F(t)$  en tres puntos. Así, en un tiempo intermedio  $t_i = t_2, \dots, t_{m-1}$  obtenemos [3]

$$F'(t_i) = \frac{(t_{i-1} - t_i)^2 F(t_{i+1}) - ((t_{i-1} - t_i)^2 - (t_{i+1} - t_i)^2) F(t_i) - (t_{i+1} - t_i)^2 F(t_{i-1})}{(t_{i+1} - t_i)(t_{i-1} - t_i)(t_{i-1} - t_{i+1})} \quad (3)$$

Una vez sustituida la Eq. 3 en la Eq. 2, el siguiente paso es resolver el sistema lineal sobredeterminado por el método de mínimos cuadrados, en los  $n = m - 2$  puntos donde se tiene calculada  $F'(t)$ . Escribimos dicho sistema en la forma matricial  $y = Gx$ , donde  $x = (p, q)^T$ .

Puesto que los datos iniciales son mediciones únicas y no llevan asociada una medida de error, se asignará a cada una de ellas un error experimental  $\sigma$ , tal que el error cuadrático medio del ajuste de regresión sea  $\sigma_y^2 = \frac{1}{n} |y - Gx|^2$ . Finalmente, la estimación de los errores de los parámetros se calcula, como es usual [4], a partir de la matriz de covarianzas de los errores experimentales,  $V_x = (G^T G)^{-1} \sigma_y^2$



**Figura 1:** Tasa de fluorescencia  $F'$  en función de la fluorescencia  $\phi$ , según la Eq. 1, para toda la célula (superior), citoplasma (centro) y núcleo (inferior). Los cuadrados corresponden a datos experimentales y la línea continua al ajuste de regresión. El modelo no explica la zona entre líneas verticales discontinuas.

El modelo propuesto sería básicamente aplicable a toda la célula y al núcleo, por encontrarse en situaciones parecidas: la proteína entra y la fluorescencia aumenta hasta llegar a la saturación. En cambio, el citoplasma podría no mostrar necesariamente una luminosidad creciente, pues su fluorescencia podría descender a medida que aumenta la del núcleo. Sin embargo, observamos que en muchos casos sí que es efectivamente posible usar el mismo modelo para aproximar los parámetros del citoplasma. En la Fig. 1 se muestran las rectas de regresión, de acuerdo con la Eq. 2.

## DESAJUSTE

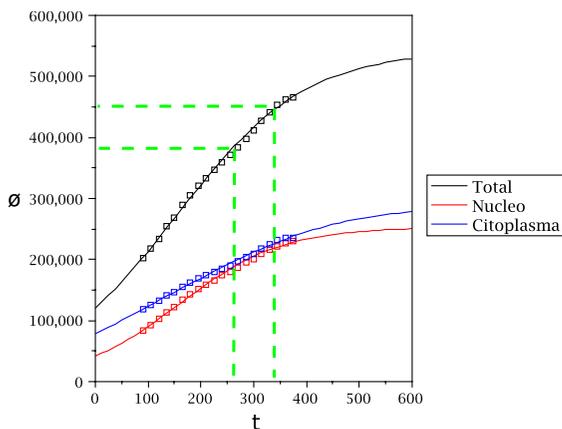
Aunque el modelo proporciona una primera aproximación al proceso estudiado, con una disminución progresiva de la tasa de fluorescencia a ritmo casi constante a medida que la luminosidad total va aumentando hasta saturarse, observamos, sin embargo, que los gráficos de la tasa de fluorescencia tienen una tendencia característica intercalada en la línea de regresión: en el recorrido descendente de la tasa de fluorescencia, hay un período de estabilidad del ritmo de fluorescencia, incluso con un ligero aumento de dicha tasa (Fig.1, entre las líneas verdes discontinuas). Ello podría ser debido a un proceso que no se realiza de forma totalmente diferenciable. Apuntamos las siguientes posibles causas:

(a) Irrupción brusca de la GFP en el citoplasma y en el núcleo, por debilitación o ruptura de sus membranas, lo cual produciría una tendencia a la estabilización, o aumento de la tasa de fluorescencia, en la parte posterior a la membrana.

(b) Obstrucción del paso de GFP por la membrana nuclear, lo cual produciría un aumento de la tasa de fluorescencia del citoplasma.

## CONCLUSIÓN

En la Fig. 2 se muestra la evolución temporal de la fluorescencia. Las curvas, para toda la célula (en negro) y para el núcleo (en rojo), son de tipo sigmoide, como corresponde a la solución de la Eq. 1. Para el citoplasma (en azul), obtenido como diferencia entre las anteriores, también se asemeja a una función sigmoide, aunque podría no ser así si los límites de fluorescencia entre el total y el núcleo fueran similares.



**Figura 2:** Evolución temporal de la fluorescencia, en negro para la célula completa, en rojo para el núcleo y en azul para el citoplasma. En todos los casos, los cuadrados corresponden a los datos experimentales, y las curvas, al modelo matemático.

A partir de las anteriores figuras podemos verificar si esta "anomalía" del modelo se produce, o no, simultáneamente en el citoplasma y en el núcleo. En la Fig. 1 marcamos las fluorescencias inicial y final de esta zona con la línea discontinua verde. Luego, en las curvas temporales de la Fig. 2, leemos los tiempos correspondientes a estas fluorescencias. Los límites de la región seleccionada son comunes para el núcleo, el citoplasma y la célula completa. La simultaneidad es muy evidente en el extremo de la derecha de la zona señalada, para todas las partes de la célula (Fig. 1). El inicio de la anomalía, en cambio, es el mismo para la célula completa y para el citoplasma, con un cambio brusco de comportamiento de la tasa de fluorescencia, pero se produce de forma mucho más suave en el núcleo.

En consecuencia, parece que la membrana nuclear retiene GFP en el citoplasma y, posteriormente, su ruptura reproduce una sobrefluorescencia similar en el núcleo. No obstante, mientras esto sucede en el núcleo, todavía hay un aumento de la tasa de fluorescencia en el citoplasma, en lugar de un descenso brusco, como sería lógico. Esto es posible explicarlo por una entrada súbita de GFP en el citoplasma, mayor que el flujo que sale hacia el núcleo. Es decir, por una ruptura o penetración súbita de la membrana del citoplasma.

La confirmación de esta hipótesis la proporciona el gráfico del comportamiento global de la célula (Fig. 1, Total), donde también se produce un sensible aumento de la tasa de fluorescencia durante este intervalo de tiempo.

Concluimos pues, que no sólo es útil la correcta modelización de un experimento, sino que, de un modelo que no se ajusta totalmente a los datos, también se pueden deducir resultados interesantes, precisamente porque nos proporciona información relevante sobre la desviación del patrón que se ha adoptado.

Vemos, también, que la modelización matemática es un buen pretexto para aplicar y revisar la mayor parte de los conocimientos adquiridos en otras asignaturas, en particular de matemáticas y, además, una forma eficaz de estimular el aprendizaje, dado que muestra la utilidad de lo que se estudia.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Vázquez et al., *Nanomedicine* (Lond), 5(2):259-68, 2010.
- [2] M.W. Hirsch, S. Smale, *Differential Equations, Dynamical Systems, and Linear Algebra*. Academic Press, New York, 1974.
- [3] D. Kincaid, W. Cheney, *Numerical Analysis*. Brooks/Cole Publishing, Belmont, CA, 1991.
- [4] R. Barlow, *Statistics, a guide to the use of statistical methods in the physical sciences*. John Wiley & Sons, Chichester, 1989.

## AUTORES



**Rafael Cubarsi** es profesor titular del Departamento de Matemática Aplicada IV de la UPC (<http://www-ma4.upc.edu/~rcubarsi>). Desarrolla su actividad docente en la Escuela Superior de Telecomunicaciones de Barcelona. Es licenciado en Ciencias Matemáticas y Ciencias Físicas, y doctor en Astronomía. Sus principales áreas de investigación son los modelos matemáticos aplicados a la Dinámica Galáctica y a la Biotecnología



**Esther Vázquez** es profesora asociada del Departamento de Genética y Microbiología de la UAB, donde desarrolla su actividad docente en el campo de la Virología. Es licenciada y doctora en Medicina y Cirugía. Sus principales áreas de investigación, dentro del campo de la Nanomedicina, son la terapia génica no vírica y la generación de biomateriales con aplicaciones en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.



**Antonio Villaverde** es doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Microbiología de la UAB, director de grupo del Instituto de Biotecnología y Biomedicina y del Centro de Investigación en Red en Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina del Instituto Carlos III. Ha publicado más de 150 trabajos de investigación en ámbitos de Biotecnología y de Biomedicina, y actualmente trabaja en el diseño de nanopartículas proteicas para terapia génica y celular. Es editor jefe de Microbial Cell Factories.

## NOTA INFORMATIVA:

El presente artículo forma parte de un estudio más general publicado recientemente en una de las revistas internacionales de más impacto en este área: *Biomaterials*.

Además, una de las fotografías del artículo ha sido seleccionada como una de las 12 mejores imágenes del año 2010 (link adjunto) :[http://www.elsevier.com/locate/S0021-9079\(10\)00000-0](http://www.elsevier.com/locate/S0021-9079(10)00000-0)

La referencia del artículo completo es:

Esther Vázquez, Rafael Cubarsi, Ugutz Unzueta, Mónica Roldán, Joan Domingo-Espín, Neus Ferrer-Miralles, Antonio Villaverde. Internalization and kinetics of nuclear migration of protein-only, arginine-rich nanoparticles. *Biomaterials*, 2010; 31 (35): 9333 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.065

Y la prensa generalista también se ha hecho eco de este estudio:

<http://www.europapress.es/salud/investigacion-00669/noticia-investigadores-espanoles-logran-introducir-material-genetico-nucleo-celulas-20110110145202.html>