



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**MODELACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES EN CÉLULAS MAMÍFERAS BAJO DIFERENTES CONDICIONES
DE CULTIVO**

Alumna: María Teresa Vargas

Profesores guía: Claudia Altamirano
Julio Berríos

2016

A mis padres, gracias por ayudarme a cumplir esta meta y decirles ¡misión cumplida!

También a mi hermano, con quien compartimos muchos buenos y malos momentos, y a mi abuela Rosa, quien estaría orgullosa de vivir este momento.

A mis profesores, Claudia Altamirano y Julio Berríos, les agradezco por todo su apoyo y constante guía.

Y para aquella persona que en uno de mis momentos más difíciles de este camino, me dijo un día que, en tiempos así, jamás olvidara el significado de la siguiente frase:

Takane no Hana

“Flower on a high peak”

RESUMEN

Desde hace más de 20 años la producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico ha cobrado cada vez mayor relevancia en la industria. Las células animales han destacado en este ámbito debido a su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales y glicosilaciones, ambos aspectos fundamentales ya que contribuyen a la actividad biológica deseada. No obstante, la generación de lactato en estos cultivos puede ser perjudicial y disminuir la productividad, ante lo cual se han buscado alternativas para su reducción, tales como el reemplazo de la glucosa por otras fuentes de carbono que posean una metabolización más lenta. El trabajo que aquí se presenta tuvo como finalidad establecer un modelo metabólico que reflejara el comportamiento de las células CHO en condiciones de co-metabolización de galactosa-lactato, determinando los cambios en los fluxes metabólicos en relación a condiciones de cultivo en glucosa y cómo estas variaciones se reflejaban en la producción y glicosilación del activador del plasminógeno tisular (tPA).

Para estos efectos, se realizó una recopilación de datos experimentales para cultivos con galactosa-lactato y glucosa, con el objetivo de establecer un modelo metabólico utilizando esta información, obteniéndose una red constituida por 71 reacciones y 76 metabolitos, en donde se consideró que el lactato ingresaba a la célula para ser metabolizado en la célula. Los fluxes intracelulares fueron calculados mediante una herramienta matemática denominada Análisis de Flujos Metabólicos (AFM), utilizando las velocidades específicas de producción/consumo de aminoácidos, galactosa y lactato, las cuales se calcularon a partir de los datos experimentales recopilados para este estudio.

Los resultados obtenidos muestran que el reemplazo de glucosa por galactosa-lactato produce una modificación del metabolismo celular, especialmente en la distribución de los fluxes intracelulares en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El análisis de flujos metabólicos mostró que para las condiciones de cultivo en galactosa-lactato el metabolismo de los aminoácidos contribuye en la síntesis de intermediarios necesarios en el TCA que poseen una alta demanda en la generación de macromoléculas importantes en la célula o en la síntesis de precursores de la glicosilación. Un incremento en la concentración de galactosa-lactato alimentada se tradujo en un aumento en la velocidad específica de consumo de dichos metabolitos y en una mayor producción específica y volumétrica de proteína recombinante, así como un mayor grado de sialización de tPA. Asimismo, se encontró una relación directa entre el metabolismo energético de la célula, el flux de la proteína y la razón ácido siálico: tPA para las condiciones estudiadas.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	OBJETIVOS	3
1.1.1.	Objetivo General	3
1.1.2.	Objetivos específicos.....	3
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.	CÉLULAS MAMÍFERAS.....	4
2.2.	METABOLISMO CELULAR	5
2.2.1.	Glicólisis en células mamíferas.....	7
2.3.	LACTATO Y AMONIO	8
2.3.1.	Efectos producidos en el cultivo de células mamíferas	8
2.3.2.	Alternativas para disminuir la concentración en el medio de lactato y amonio	8
2.4.	PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	13
2.4.1.	Glicosilación de las proteínas	14
2.4.2.	Características del activador tisular del plasminógeno (tPA).....	16
2.5.	ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS.....	16
2.5.1.	Ingeniería metabólica.....	16
2.5.2.	Generalidades del Análisis de Flujos Metabólicos	17
2.5.3.	Análisis matemático del AFM.....	20
2.5.4.	Criterios de clasificación de la red metabólica.....	22
2.5.5.	Cultivo continuo como herramienta para el AFM.....	23
3.	METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	27
3.1.	RECOPIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	27
3.1.1.	Viabilidad celular	28
3.1.2.	Velocidad específica de crecimiento en cultivo continuo.....	28
3.2.	ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO METABÓLICO.....	29
3.2.1.	Cálculo de la velocidad específica de consumo o producción de un metabolito	30
3.2.2.	Construcción del modelo estequiométrico.....	31
3.3.	CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES PARA LAS REACCIONES R_{67} Y R_{68}	44
3.4	IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO METABÓLICO EN EL SOFTWARE.....	47
	ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

4.1. RECOPIACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES PARA DISTINTAS RAZONES GAL/LAC EN CULTIVO CONTINUO.....	50
4.2. ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA CÉLULA	56
4.3. ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS.....	57
4.3.1. Análisis del metabolismo central de las células	58
4.3.2. Análisis del metabolismo energético	63
4.3.3. Análisis de la síntesis de macromoléculas.....	65
4.3.4. Análisis de los precursores de las glicosilaciones.....	66
4.3.5. Relación entre el metabolismo energético y las glicosilaciones	66
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS UTILIZADOS	72
5. CONCLUSIÓN	73
6. BIBLIOGRAFÍA.....	74
APÉNDICE 1: LISTA DE METABOLITOS DEL MODELO ESTEQUIOMÉTRICO.....	81
APÉNDICE 2: LISTADO DE REACCIONES DEL MODELO METABÓLICO	83
APÉNDICE 4: FLUXES CALCULADOS PARA GAL/LAC EN LA ALIMENTACIÓN	88
APÉNDICE 5: FLUXES CALCULADOS PARA GAL/LAC EN LA ALIMENTACIÓN (COMO % DEL FLUX DE HEXOSA)	91
APÉNDICE 6: PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE INTERMEDIARIOS DEL TCA EN EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS	94
APÉNDICE 7: EJEMPLO DE CÁLCULO: DISTRIBUCIÓN DEL FLUX DE GLUTAMATO EN LA CÉLULA.....	98

Índice de Tablas

Tabla 2.1: Ejemplos de r-proteínas comercializadas y sus características.....	13
Tabla 2.2: Comparación de glicanos en varios sistemas de expresión	15
Tabla 3.1: Composición porcentual en masa seca de macromoléculas en células mamíferas a diferentes condiciones de cultivo.....	45
Tabla 3.2: Composición estimada de aminoácidos de células CHO con distintas fuentes principales de carbono en cultivo continuo	46
Tabla 4.1: Comparación de parámetros de viabilidad y velocidad específica de crecimiento.	50
Tabla 4.2: Concentraciones y velocidades específicas de consumo/producción de lactato (q_{lac}) y hexosas (q_{hex}).	51
Tabla 4.3: Producción de tPA a diferentes condiciones de cultivo	52
Tabla 4.4: Contenido de ácido siálico (AS) en la superficie celular y en las glicosilaciones de tPA	53
Tabla 4.5: Concentración y velocidad específica de producción de amonio	55
Tabla 4.6: Valores obtenidos para los coeficientes de la ecuación R_{68}	57
Tabla 4.7: Comparación del error máximo porcentual obtenido para cada condición de cultivo por la fórmula empírica estimada en relación a la obtenida de forma experimental.	57
Tabla 4.8: Fluxes para algunas reacciones del metabolismo central a distinta condición de cultivo....	62
Tabla 4.9: Fluxes para algunas reacciones del metabolismo central en distintas condiciones de cultivo (expresados como % del flux de la hexosa)	63
Tabla 4.10: Fluxes calculados para el metabolismo energético, consumo de O_2 y producción de CO_2 (nmol/h· 10^6 cel)	64
Tabla 4.11: Cálculo del Cuociente respiratorio (CR).....	65
Tabla 4.12: Fluxes calculados para la síntesis de macromoléculas (nmol/h· 10^6 cel).....	65
Tabla 4.13: Fluxes calculados para las reacciones de glicosilación y síntesis de tPA(nmol/h· 10^6 cel)...	66
Tabla 4.14: Equivalentes de ATP utilizados en la síntesis de precursores de la glicosilación	68
Tabla 4.15: Flux de equivalentes de ATP utilizados en la síntesis de azúcares activados.....	68

Índice de Figuras

Figura 2.1: Metabolismo central del carbono	5
Figura 2.2: Procesos de metabolización de la glucosa en las células.....	6
Figura 2.3: Incorporación de la galactosa a la glucólisis en las células mamíferas (Vía de Leloir).....	10
Figura 2.4: Mecanismo propuesto de metabolización del lactato.....	12
Figura 3.1: Vista general de la interfaz de MetaFluxNet para AFM	30
Figura 3.2: Estructura de los nucleótidos de ADN y ARN	41
Figura 3.3: Estructura de un fosfolípido.....	42
Figura 4.1: Velocidades específicas de consumo/producción de aminoácidos con Glc y Gal/Lac.	55
Figura 4.2: Comparación de los porcentajes de flux de hexosa destinados por cada condición a síntesis de F6P y G3P.....	59
Figura 4.3: Comparación de los porcentajes de flux de hexosa destinados por las distintas condiciones a síntesis de R5P, UDP-Gal, UDP-Glc y Man6P.	59
Figura 4.4: Participación de las moléculas energéticas en la síntesis de los intermediarios de las glicosilaciones.....	67
Figura 4.5: Relación entre el flux de ATP de mantención y la producción de tPA, ácido siálico para el tPA y la razón AS:tPA para cultivos en presencia de glucosa.....	69
Figura 4.6: Relación entre el flux de ATP de mantención y la producción de tPA, ácido siálico para el tPA y la razón AS:tPA para cultivos en presencia de Gal- Lac y Glc	70

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la producción de proteínas recombinantes ha ido adquiriendo cada vez mayor importancia en la industria. No obstante, es en la década de 1970 cuando se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de ADN recombinante, a partir de lo cual ha sido posible modificar diversos tipos de células para que actúen como “reactores” biológicos, teniendo la capacidad de sintetizar biofármacos con aplicaciones terapéuticas basados en proteínas recombinantes (Drago & Sainz, 2006).

Por otro lado, a partir de la década de 1990 se pone en manifiesto ventajas importantes que ofrece el cultivo de células animales por sobre otros sistemas de producción, como lo son las bacterias y levaduras, para la producción de proteínas de interés farmacéutico (Dávila *et al.*, 2009). No obstante, muchas de estas proteínas necesitan de modificaciones post-traduccionales tales como glicosilaciones, puentes disulfuro y plegamientos; las células animales poseen la capacidad de procesar y secretar dichas proteínas maduras y funcionales, a diferencia de otros sistemas de expresión, como las bacterias, las cuales no son capaces de hacerlo (Chen *et al.*, 2001).

Actualmente, el 60% de las proteínas recombinantes son procedentes de células animales, debido a la gran calidad obtenida en su producción, las cuales son similares en su estructura molecular y en sus propiedades químicas a las de origen natural en seres humanos, lo cual constituye una característica fundamental para su elección como sistema de producción (Baldi *et al.*, 2009). Las células de ovario de hámster chino (CHO) constituyen el sistema estándar de expresión de proteínas recombinantes para aplicaciones terapéuticas (Jayapal *et al.*, 2007).

Sin embargo, a pesar del enorme potencial de las líneas establecidas de células animales, existen limitaciones tecnológicas inherentes a considerar: una baja velocidad específica de crecimiento, una baja concentración celular y un alto consumo de las fuentes principales de carbono y energía, usualmente glucosa y glutamina, y la generación de metabolitos indeseados que pueden afectar la vida media del cultivo (Schröder, 2008; Lim *et al.* 2010; Omasa *et al.* 2010; Sunley and Butler, 2010).

Estas células presentan un metabolismo deficiente debido a su incapacidad para oxidar glucosa completamente a CO_2 y H_2O , sólo dos moles de ATP son generados por molécula de glucosa en comparación a los 36 moles que producen otros tipos de células, siendo la mayor parte de la glucosa derivada a lactato. Para cubrir los requerimientos energéticos es que la célula debe consumir glutamina, la cual se oxida a través de glutaminólisis, produciendo amonio (Irani *et al.*, 1999). Tanto el lactato como el amonio causan efectos adversos en las células, reportándose que altas concentraciones de amonio disminuyen la tasa de crecimiento celular y limitan la densidad celular, mientras que la acumulación de lactato afecta negativamente la capacidad de amortiguación del medio, disminuyendo el pH del cultivo (Chen *et al.*, 2001). Por consiguiente, es deseable disminuir las concentraciones de estos metabolitos en el medio.

Considerando que el lactato formado proviene principalmente de la glucosa, se han buscado diversas estrategias abocadas a la limitación de la disponibilidad o que se produzca una metabolización más lenta de la fuente principal de carbono, disminuyendo así la producción de lactato. Dentro de este contexto, el reemplazo de la fuente por otras alternativas como galactosa, fructosa y manosa ha sido evaluado (Altamirano *et al.*, 2000). No obstante, el caso de la galactosa es especialmente atractivo, dado que ha sido posible evidenciar que no solamente se metaboliza de manera más lenta, sino que también es capaz de consumir lactato existente en el medio de cultivo.

Sin embargo, hasta el momento no se ha dilucidado el mecanismo por el cual el lactato consumido en presencia de galactosa es utilizado por las células, siendo un tema actual de especial interés a nivel de investigación de células CHO para su uso en la industria. Estudios recientes realizados por entidades como Genentech se han centrado en proponer mecanismos que pudiesen explicar este comportamiento (Luo *et al.*, 2011), lo cual reafirma la importancia de entender este comportamiento.

Dentro de este marco, en este trabajo se estudió el efecto producido por el reemplazo de glucosa por galactosa-lactato en la alimentación del cultivo en células CHO, en los fluxes intracelulares y en la síntesis del activador del plasminógeno tisular (tPA) recombinante, así como en su grado de sialización. Los objetivos que fueron planteados son los siguientes:

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

- Establecer un modelo metabólico que refleje el comportamiento de las células CHO en condiciones de co-metabolización de Galactosa-Lactato.

1.1.2. Objetivos específicos

2. Comparar el comportamiento metabólico de células CHO en cultivo continuo en presencia de glucosa y a distintas concentraciones de galactosa y lactato en la alimentación.
3. Evaluar los fluxes intracelulares a distintas concentraciones en la alimentación de galactosa/lactato con aquellos obtenidos en presencia de glucosa, en cultivo continuo de células CHO.
4. Evaluar un modelo metabólico, a partir de los datos experimentales obtenidos, que represente el comportamiento de células CHO en cultivo continuo, a diferentes concentraciones en la alimentación de galactosa y lactosa.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÉLULAS MAMÍFERAS

A pesar de la existencia de una variedad de sistemas alternativos de expresión, incluyendo aquellos que utilizan bacterias y animales transgénicos, las células mamíferas se han consolidado durante más de 25 años como el principal sistema de expresión para la producción comercial de proteínas terapéuticas dada su eficiencia en la realización de modificaciones post-traduccionales de las proteínas recombinantes, llamadas también r-proteínas (Butler & Durocher, 2009). Otras características importantes son la capacidad de mantener la información introducida de ADN recombinante que codifica para la proteína de interés (Barnes *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000), la mantención de altos niveles de expresión generación tras generación y la capacidad de crecer en medio definido (Hesse & Wagner, 2000).

Si bien las células CHO constituyen el sistema estándar de expresión de r-proteínas, es importante mencionar que otras líneas celulares como las pertenecientes a riñón de hámster bebé (BHK-21) y a mieloma murino de ratón (NS0) han recibido aprobación de igual manera para su uso en producción a escala comercial (Butler, 2005).

Es interesante señalar que las células CHO son consideradas un hospedero seguro para las proteínas de valor terapéutico las que, en la mayoría de los casos, son administradas mediante vía parenteral a pacientes humanos. Virus patogénicos humanos como el polio, el herpes, la hepatitis B, el VIH, el adenovirus y la influenza no se replican en estas células (Wagner, 1997a), lo cual sin duda alguna constituye una característica muy importante en términos de producción comercial de estas proteínas.

El activador tisular del plasminógeno (tPA) se convirtió en 1987 en la primera proteína terapéutica proveniente de una línea de células mamíferas “transformada”, en recibir aprobación para comercialización (Wagner, 1997a). Este hito sin duda alguna marcó un precedente, dado que abrió las puertas para una potencial producción de otras proteínas terapéuticas en células CHO.

No obstante, a pesar de que las células animales poseen importantes ventajas, también presentan limitaciones a tener en consideración al momento de realizar el cultivo, las cuales pueden no estar presentes en otros sistemas de producción como las bacterias y levaduras. Algunas de estas limitaciones son los largos tiempos de cultivo y la fragilidad de las células a los esfuerzos de cortes, ante lo cual los reactores utilizados requieren de diseños especiales en los sistemas de agitación y aireación, los cuales están en constante optimización (Dávila *et al.*, 2009). Otras limitaciones, relacionadas con el metabolismo, se señalan en la sección 2.2.

2.2. METABOLISMO CELULAR

El metabolismo central del carbono está constituido por tres vías metabólicas importantes para la célula, como lo son la glicólisis, la vía de las pentosas fosfatos (PPP) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Estas vías interactúan entre sí, como se muestra en la figura 2.1, metabolizando la mayor parte del carbono y obteniéndose precursores para biomasa y moléculas como NADH, NADPH y FADH₂.

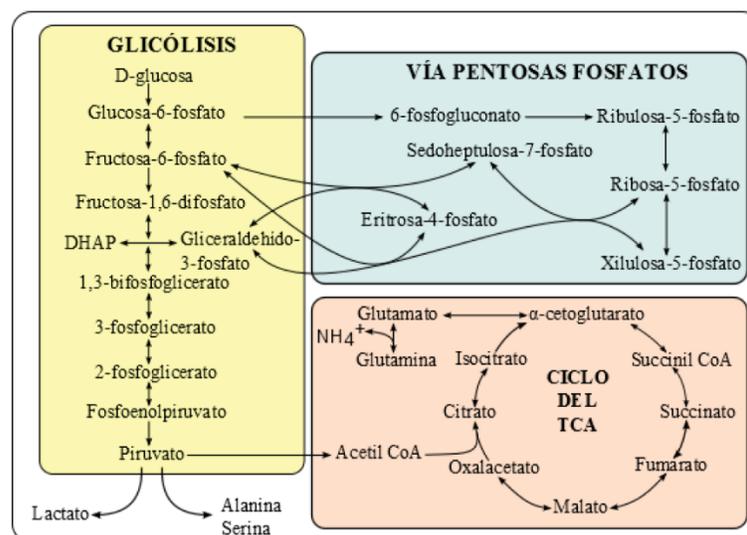


Figura 2.1: Metabolismo central del carbono (Baldecchi, 2013)

La glicólisis es la vía principal por la cual la glucosa es degradada mediante un grupo de reacciones catalizadas por diferentes enzimas en el citosol, distinguiéndose dos etapas principales en ella.

La primera está relacionada con la fosforilación de la glucosa (o la hexosa utilizada) a gliceraldehído-3-fosfato, consumiendo dos moléculas de ATP; mientras que en la segunda, común a todos los azúcares, ocurren etapas de óxido-reducción en donde el ADP es fosforilado a ATP, formándose cuatro moléculas de ATP. Adicionalmente, se generan dos moléculas de piruvato, las cuales pueden ser transformadas, tal como se muestra en la figura 2.2, a lactato (fermentación láctica) por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o en acetil CoA mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, el que luego ingresa al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, llamado también ciclo de Krebs (Baldecchi, 2013).

En la figura 2.2 es posible apreciar las principales rutas de destino del piruvato: hacia la fermentación láctica y hacia el ciclo de Krebs. La generación de lactato es un evento que puede traer consecuencias en la producción de las proteínas recombinantes en células CHO, lo cual se discute en la sección 2.3.

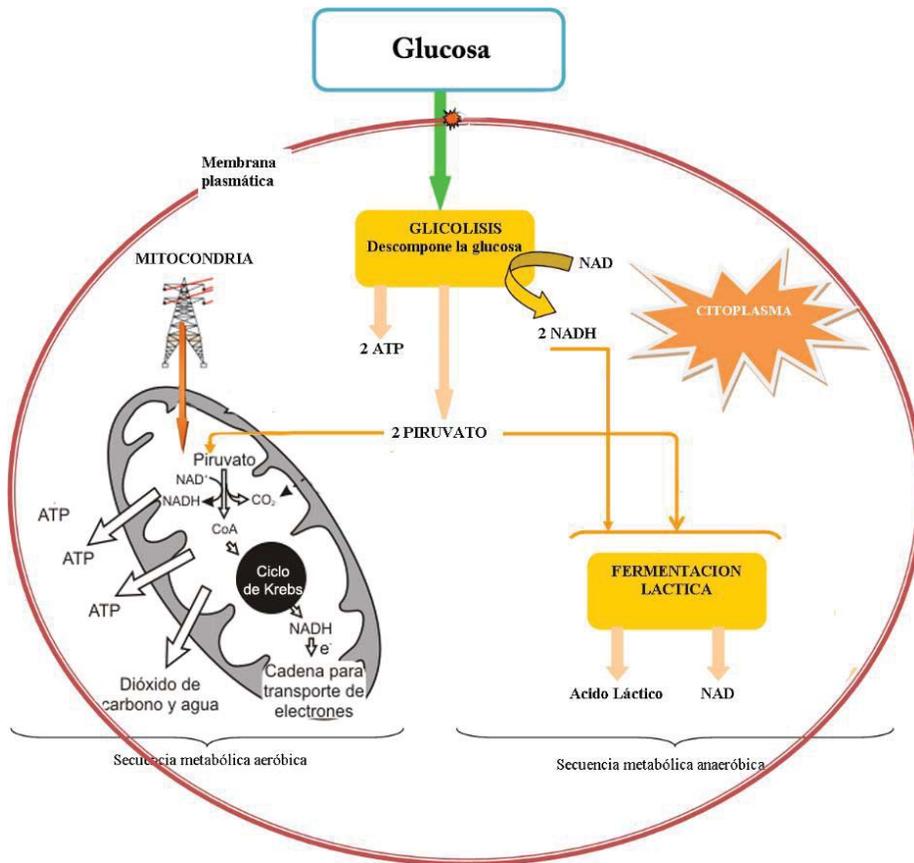


Figura 2.2: Procesos de metabolización de la glucosa en las células. (Adaptado de Teherán, 2013)

2.2.1. Glicólisis en células mamíferas

A diferencia de otros sistemas de producción, las células mamíferas presentan una baja eficiencia energética en lo referente a la utilización de la glucosa sólo por la vía glucolítica, evidenciándose que hasta un 95% de ésta puede ser convertida a lactato, aún en condiciones de crecimiento completamente aeróbicas (Cairó & Gòdia, 2002). Esta baja eficiencia energética podría obedecer a dos hechos importantes conjuntos, lo cual se traduce en una acumulación de lactato en el medio: una baja actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa y una alta tasa de consumo en la vía de la glicólisis (Neermann & Wagner, 1996).

Se ha observado que en células altamente proliferativas existe un incremento de los transportadores de glucosa GLUT 1 y GLUT3 (Macheda *et al.*, 2005) y de las enzimas relacionadas con la vía glucolítica. Para este último caso, ha sido posible evidenciar una sobreexpresión en hasta 300 veces de las enzimas hexoquinasa II (HK-II) y fosfofructoquinasa tipo I (PFK-1). La sobreexpresión de la HK favorecería su unión a la membrana externa mitocondrial, incrementando su acceso al ATP sintetizado a través de la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007).

Un alto flujo glicolítico puede depender de la rápida regeneración de NAD^+ a partir de NADH a través de la conversión de piruvato a lactato y por los sistemas de transporte de NADH. Por consiguiente, es interesante tener en consideración a la lanzadera malato-aspartato (MAS), la cual ha sido identificada en muchas líneas celulares (Greenhouse & Lehninger, 1976), y que juega un rol en el transporte de equivalentes de NADH en la mitocondria con el fin de que se produzca regeneración de NAD^+ (dado que la membrana mitocondrial es impermeable al NADH del citosol). Se ha reportado que, bajo determinadas condiciones, el flujo a través de la lanzadera MAS limita la velocidad de regeneración de NAD^+ en el citosol (Eigenbrodt *et al.*, 1985). Si bien no se han realizado estudios en detalle que abarquen el mecanismo de estos sistemas de transporte, algunos reportes han evidenciado que, en algunos casos, su eficiencia y velocidad de transporte podría ser menor que la velocidad de producción de NADH en la glicólisis (Bartley *et al.*, 2004).

Como consecuencia del ineficiente uso de la fuente de carbono por la vía glucolítica en las células, éstas requieren una fuente adicional que ayude a satisfacer sus necesidades, relacionadas con la mantención de los procesos metabólicos normales y con la producción de la proteína de interés, rol que usualmente desempeña la glutamina. Este sustrato cumple función en la producción de ATP vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos, tal como se muestra en la figura 2.1, y fosforilación oxidativa (Kennen *et al.*, 1979; Fiers *et al.*, 1996). No obstante, el metabolismo de consumo de la glutamina (la glutaminólisis) produce amonio, un metabolito capaz de disminuir la productividad del cultivo, como se trata en la sección 2.3.

2.3. LACTATO Y AMONIO

2.3.1. Efectos producidos en el cultivo de células mamíferas

El lactato y el amonio constituyen dos metabolitos principales generados por las células CHO. No obstante, ambos pueden causar problemas al medio de cultivo alcanzadas ciertas concentraciones y alterar la productividad.

El lactato puede causar una significativa reducción de pH en el medio, el cual inhibe el crecimiento de la célula, aunque este efecto se puede evitar con un sistema de control que mantenga el pH en un rango óptimo. Sin embargo, el principal mecanismo por el cual el lactato parece afectar de forma negativa a los cultivos es a través del incremento de la osmolaridad del medio de cultivo (Alves *et al.*, 2000).

Por otro lado, el ion amonio posee un mayor impacto que el lactato en el cultivo de células: concentraciones entre 2 y 5 mM pueden inhibir el crecimiento y disminuir la productividad. Es preciso señalar que el mecanismo preciso de toxicidad no está claro, pero parece ser dependiente del pH (Marison *et al.*, 1996). Asimismo, también parece tener efecto sobre la glicosilación, lo cual se señala en la sección 2.4.

2.3.2. Alternativas para disminuir la concentración en el medio de lactato y amonio

Algunas investigaciones abocadas a la disminución de los principales metabolitos indeseados en el medio (lactato y amonio) han buscado modificar las enzimas lactato deshidrogenasa (Chen *et al.*, 2001), piruvato carboxilasa (Kim & Lee, 2007), o bien piruvato deshidrogenasa kinasa (Crawford *et al.*, 2011), mientras que otras se han centrado en factores como el reemplazo de las fuentes principales de carbono y energía con el fin de que exista una metabolización más lenta o una menor disponibilidad de ellas.

Cairó *et al.* (1997) utilizaron oxamato, un inhibidor específico de la LDH, con la finalidad de modular su actividad en hibridomas. Se llegó a la conclusión de que esta actividad es fundamental para la mantención de la viabilidad de la célula dado su papel en ayudar a recuperar el NADH producido y acumulado durante la glicólisis. No obstante, de forma más reciente se han realizado investigaciones modificando los hibridomas genéticamente para que tengan un 50% de actividad menos en la LDH (Chen *et al.*, 2001), lográndose para cepas modificadas una mejora en el crecimiento y viabilidad de las células, además de un aumento de la productividad de la r-proteína en un factor de 3. Por otro lado, se evidenció que una disminución de la actividad de LDH redujo la producción específica de lactato cerca del 79% y mejoró la concentración de producto hasta en 2.2 veces (Kim & Lee, 2007).

Por otra parte, estudios realizados en cultivo por lote con sustitución de glucosa por galactosa, mostraron que las células CHO son capaces de crecer en este medio, pero esto ocurre a una baja velocidad específica de crecimiento, evidenciándose que el tipo de hexosa utilizado como fuente principal de carbono también posee un efecto importante en la producción de la proteína recombinante. Es interesante señalar la existencia de consumo de lactato del medio al utilizar galactosa, lo cual no ocurre en presencia de glucosa (Altamirano *et al.*, 2000).

La galactosa presenta una baja afinidad por la enzima hexoquinasa (Couturier *et al.*, 1984), la cual cataliza el paso a galactosa-1-fosfato mediante una fosforilación, como se muestra en la figura 2.3, con la finalidad de incorporarse posteriormente en la glicólisis como glucosa-6-fosfato, mediante lo que se conoce como la vía de Leloir.

En ella, intervienen las enzimas galactoquinasa, galactosa-1-fosfatouridiltransferasa y UDP-galactosepimerasa (Klapa & Lai, 2004), además de una UDP-Glucosa-pirofosfatasa (Frey, 1996). La existencia de menor afinidad del sustrato con la enzima hexoquinasa, en comparación con la glucosa, es un aspecto importante a considerar dado que contribuye a que exista una metabolización más lenta de la fuente.

Por otra parte, fuentes como la fructosa y la manosa también han sido estudiadas como reemplazo de la glucosa. La fructosa posee cerca de 20 veces menor afinidad con la enzima que con la glucosa, situación que también ocurre con la galactosa (Wagner, 1997b).

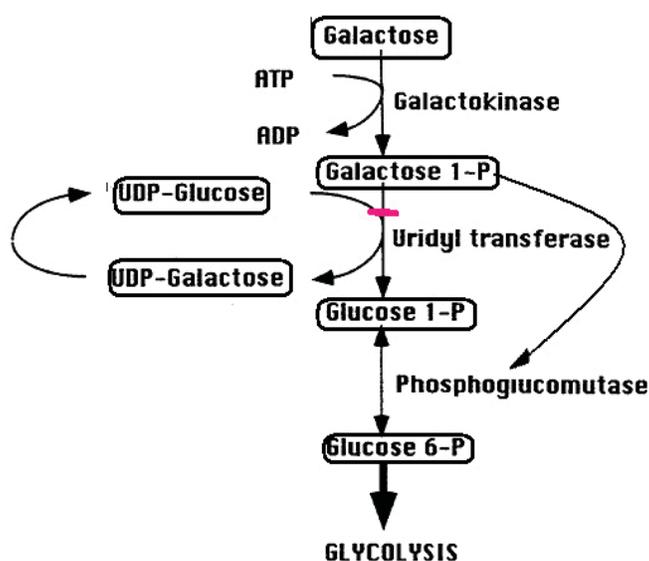


Figura 2.3: Incorporación de la galactosa a la glucólisis en las células mamíferas (Vía de Leloir)

Altamirano *et al.* (2000) realizaron estudios con diversas fuentes de carbono en el medio de cultivo, utilizando glucosa como control, pudiendo constatar una alta velocidad de consumo de manosa y glucosa, mientras que la correspondiente a fructosa fue significativamente menor, alcanzando cerca del 25% de la velocidad específica de consumo de glucosa. Asimismo, la cantidad de lactato generada en presencia de manosa fue similar que cuando la glucosa se encontraba en el medio, mientras que la magnitud de la velocidad específica de producción de lactato para la fructosa alcanzó cerca de un 22% de la existente en presencia de glucosa.

En lo referente a la cantidad de células viables, se observó similares valores al utilizar tanto glucosa como manosa, siendo notablemente menor para el caso de la fructosa; es importante señalar que el mismo comportamiento o tendencia se encontró para la producción de tPA, alcanzándose las mayores concentraciones con manosa y glucosa.

Algo interesante de notar es que cuando se utiliza manosa, el metabolismo intracelular parece responder de una manera diferente a cuando la glucosa es la fuente principal de carbono (Ryll *et al.*, 1994; Cayli *et al.*, 1999), en especial en los niveles del pool de UDP-GNAC, cuyo aumento es uno de los mecanismos de toxicidad por el cual actúa el amonio. La manosa-6-fosfato actúa como inhibidor de la glucosamina-6-fosfato-isomerasa, la cual cataliza la reacción entre fructosa-6-fosfato y amonio con la finalidad de obtener glucosamina-6-fosfato, precursor de UDP-GNAC.

Cayli *et al.* (1999) evidencian que, por consiguiente, la manosa es una alternativa para una posible estrategia para la reducción de los efectos del amonio en los cultivos. Asimismo, con la finalidad también de disminuir la concentración de amonio en el cultivo se ha estudiado el reemplazo de la glutamina por algún compuesto capaz de ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como lo es el glutamato. Éste presenta tres importantes ventajas: primero, el glutamato no sufre descomposición espontánea como la glutamina, para generar amonio; segundo, el glutamato puede ser obtenido directamente de la glutamina por las células CHO, dado que poseen actividad de la glutamina sintasa; y tercero, el glutamato sólo posee un grupo amino (Altamirano *et al.*, 2000). Con ello, se encontró una mejora de un 17% en el crecimiento de las células y una reducción de acumulación de amonio en un 70% al realizar la sustitución de glutamina por glutamato (Marison, 1996).

Por otro lado, Altamirano *et al.* (2001) han encontrado que, al utilizar glucosa y galactosa como fuentes principales de carbono en el medio, se genera un interesante comportamiento en el cultivo. Existe en primera instancia un consumo de glucosa con generación de lactato; no obstante, cuando comienza a utilizarse la galactosa, se observa consumo conjunto con el lactato existente en el medio, evidenciándose que las células continúan creciendo a una velocidad específica de crecimiento similar a la existente en presencia de glucosa.

Con estos hallazgos, se plantearon posteriormente estudios en cultivo por lote alimentado, analizando la posibilidad de realizar ciclos de alimentación con glucosa y galactosa, agregándose en primera instancia una mezcla de glucosa con galactosa; en primer lugar se produjo un consumo de glucosa y generación de lactato, posteriormente se observó que la galactosa comenzaba a consumirse en conjunto con el lactato, cuando éste llegó a cierta concentración se volvió a agregar glucosa-galactosa y así sucesivamente. Esta modalidad dejó abierta la posibilidad de la implementación de una estrategia de operación para el cultivo de células CHO (Altamirano *et al.*, 2006).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la co-metabolización de lactato cuando la galactosa se encuentra presente en el medio aún no se ha dilucidado con claridad. Mientras que algunos estudios se han centrado en explicar el catabolismo a través de vías oxidativas, otros han evidenciado que esta metabolización se realizaría a partir de rutas no oxidativas, lo cual ha generado hasta la actualidad un dilema en cuanto a la búsqueda de una explicación a este comportamiento. Por una parte, Atlante *et al.* (2002) han reportado evidencia de la existencia de transportadores mitocondriales de L-lactato. Recientemente, el descubrimiento de procesos de transporte mediados de lactato y de la enzima mitocondrial L-lactato deshidrogenasa (mL-LDH) en células mamíferas sugiere que la mitocondria juega un rol importante en el metabolismo del lactato (Atlante *et al.*, 2008). Tal como se muestra en la figura 2.4, el lactato producido a partir de la glicólisis en el citosol estaría entrando a la mitocondria mediante un sistema simporte y siendo oxidado posteriormente dentro de ella mediante la mL-LDH a piruvato.

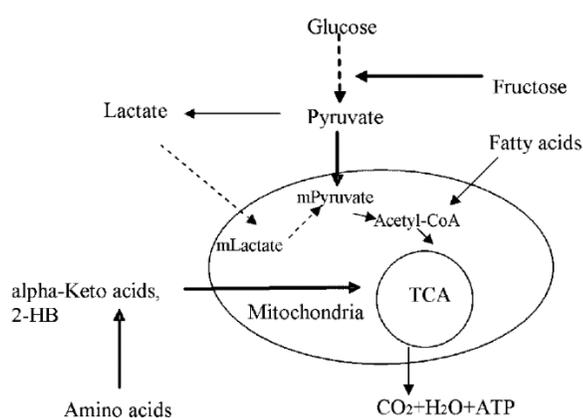


Figura 2.4: Mecanismo propuesto de metabolización del lactato (Atlante *et al.*, 2008)

No obstante, por otro lado, se ha evidenciado en líneas de células malignas de la existencia de vías que conducen a un alto nivel de descarboxilación no oxidativa del piruvato, encontrándose una anormal presencia de acetoína en estas células (Baggetto, 1992). Considerando este antecedente, Altamirano *et al.* (2006) propusieron que, en células CHO, la co-metabolización del lactato en presencia de galactosa estaría dada por una vía no oxidativa, con acetoína como producto final de este proceso.

2.4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Actualmente el cultivo de células mamíferas constituye uno de los sistemas más usados en la producción de biofármacos, dada las ventajas que presenta en relación a la expresión de proteínas recombinantes por sobre sistemas como las bacterias y levaduras, con características únicas que no es posible obtener en ellos. En la tabla 2.1 se muestran ejemplos de algunas proteínas recombinantes producidas en células animales.

Tabla 2.1: Ejemplos de r-proteínas comercializadas y sus características (Biopharma, 2009)

Enzima	Nombre comercial	Características
Glucosidasa	Alglucosidase alfa-Myozyme	Recombinante, glicosilada, degrada glicógeno, expresada en células CHO transformadas. Tratamiento de pacientes con enfermedad de Pompe.
Iduronidasa	Laronidasa-Aldurazyme	Alfa L-iduronidasa humana recombinante. Terapia de reemplazo enzimático en pacientes con mucopolisacaridosis I.
Activador del plasminógeno tisular (tPA)	Alteplase-Activase Cathflo Activase	Glicoproteína recombinante de cadena simple, tPA del tipo I. Tratamiento de infartos agudos al miocardio.
	Tenecteplase-TNKase	Forma modificada de tPA con sustituciones aminoacídicas que conducen a una mayor afinidad por la fibrina.
Hormona estimuladora de la tiroides (TSH)	Thyrogen	Hormona recombinante producida en células CHO transformadas. Glicoproteína heterodimérica, carece de sulfatación a diferencia de la hormona nativa.
Anticuerpo para Inmunoglobulina E	Omalizumab-Xolair	Anticuerpo monoclonal glicoproteico recombinante humanizado, específico para inmunoglobulina E humana. Expresado en células CHO. Tratamiento de asma.

Adicionalmente, algunas proteínas glicosiladas han constituido íconos de la tecnología recombinante en células animales como es el caso de los factores de coagulación, los cuales son de gran relevancia en pacientes hemofílicos. La eritropoyetina (EPO), la cual es ampliamente glicosilada, ha tenido un enorme éxito comercial debido a que es la citosina de mayor uso en el mundo para el tratamiento de anemias, siendo empleadas las células CHO para producirla a nivel industrial (Dávila *et al.*, 2009)

El costo y la complejidad de realizar un cultivo de células mamíferas han hecho que la producción de proteínas sea viable de forma económica sólo para productos de alto valor agregado. Es importante señalar que cerca del 70% de las proteínas recombinantes de uso terapéutico provienen de células CHO, y las ventas a nivel mundial exceden anualmente los 30 billones de dólares (Jayapal *et al.*, 2007).

2.4.1. Glicosilación de las proteínas

La mayoría de las proteínas secretadas por células mamíferas, incluyendo varias proteínas de importancia farmacológica, son glicoproteínas con contenido carbohidrato que varía desde cerca del 3% del peso (como la inmunoglobulina G) y más del 40%, como la eritropoyetina. Es importante tener en consideración que el perfil terapéutico de un polipéptido administrado podría estar profundamente influenciada por su glicosilación (Wagner, 1997b).

En la tabla 2.2 es posible apreciar una comparación de sistemas de expresión y la similitud que son capaces de entregar en sus glicoproteínas en comparación a las de origen humano.

De ello, es posible desprender que sistemas de expresión como las células CHO presentan una importante ventaja, por sobre otras como levaduras, cuando se desea obtención de proteínas de uso terapéutico lo más similares posibles a las producidas de forma humana.

Tabla 2.2: Comparación de glicanos en varios sistemas de expresión (Zhong & Somers, 2012).

Sistemas de expresión	Similitud a los glicanos humanos
CHO	Alta
NS0/SP2/0	Alta
Levaduras	Baja
Plantas	Baja
Animales transgénicos	Baja

En la figura 2.5 se muestra la estructura de los azúcares utilizados en las glicosilaciones, siendo interesante señalar que a pesar de la variedad total existente, sólo se utilizan estos 8 en las células mamíferas: β -D-Glucosa (Glc), β -D-galactosa (Gal), α -D-Manosa (Man), α -L-fucosa (Fuc), N-acetil- β -D-Glucosamina (GlcNAc), N-acetil- β -D-Galactosamina (GalNAc), α -D-Xilosa (Xyl) y Ácido α -N-Acetilneuramínico o Ácido Siálico (NeuAc).

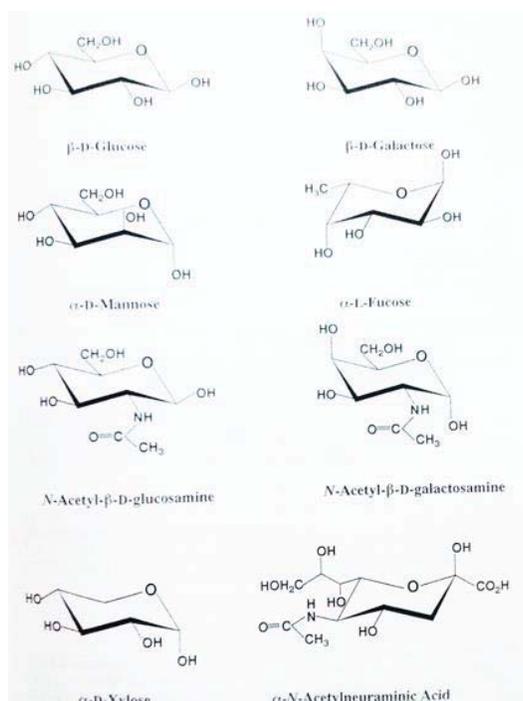


Figura 2.5: Estructura de los azúcares que participan en las glicosilaciones en células mamíferas (Wagner, 1997b).

Dentro de este fenómeno, se destacan dos tipos de enlaces: los de N-glicosilaciones y los de O-glicosilaciones.

Es importante señalar la presencia del ácido siálico, en ambos tipos de glicosilaciones, al final de la cadena de los oligosacáridos. Este componente es fundamental para prolongar la vida media de una proteína en la sangre, evitando su transporte hacia el interior de los hepatocitos en el hígado (Ferrari *et al.*, 1998), lo cual evidentemente podría ser de utilidad si se desea aumentar la duración de un biofármaco en el torrente sanguíneo, producido en estos sistemas.

2.4.2. Características del activador tisular del plasminógeno (tPA)

El tPA, conocido también como fibrinoquinasa, es una glicoproteína de 68 kDA de peso molecular, sintetizada principalmente en las células endoteliales vasculares y posee cinco dominios estructurales, además de cuatro sitios potenciales para glicosilación, tres de los cuales usualmente se encuentran glicosilados (Walsh, 2007).

En la sangre, usualmente se encuentra de dos formas: tPA tipo I, que consiste en una única cadena polipeptídica; y tPA tipo II, que posee una estructura de doble cadena. No obstante, ambas poseen actividad fibrinolítica.

2.5. ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS

2.5.1. Ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica ha sido definida como “la mejora dirigida de la formación de producto o de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o introducción de nuevas con el uso de la tecnología de ADN recombinante” (Stephanopoulos, 1999).

Como tal, la ingeniería metabólica se refiere a redes de reacciones bioquímicas completas y se enfoca en aspectos como las vías de síntesis, la viabilidad termodinámica, y las vías de los flux, en conjunto con el control de éstos; es decir, se acerca a las interacciones de las reacciones bioquímicas dentro de una red metabólica.

Es dentro de este contexto que es fundamental la noción de red metabólica en el sentido de que se puede obtener una mejor perspectiva del metabolismo y de la función celular, considerando reacciones en su totalidad en lugar de aisladas unas de otras. Asimismo, podría considerarse que la mayor contribución de la ingeniería metabólica es que permite la medición y el control en condiciones *in vivo*.

Asimismo, las herramientas comprendidas en esta área han podido ser utilizadas para proponer mecanismos de control de las rutas metabólicas, entender la importancia de algunas de ellas, conocer las causas de determinadas enfermedades e incluso aumentar el conocimiento existente sin que exista un proceso productivo o industrial de por medio (Fell & Snell, 1990; Vogt *et al.*, 2002; Bouzier-Sore *et al.*, 2001; Klapa & Lai, 2004; Bakker *et al.*, 2000; Schuster, 1999; Hardie, 2000).

2.5.2. Generalidades del Análisis de Flujos Metabólicos

Al momento de introducirse en el análisis de flujos metabólicos, es importante tener en consideración con anterioridad conceptos que resulta fundamentales entender con claridad, como lo son las vías metabólicas y los flujos metabólicos.

Una vía metabólica se define como cualquier secuencia de reacciones bioquímicas factibles y observables que conectan un conjunto de entradas y salidas de metabolitos. Aunque a menudo es posible encontrar más de una secuencia de reacciones entre metabolitos entrantes y salientes, si los flujos de estas secuencias no se pueden determinar de forma separada, no proveen información adicional. Por ello, es preferible agrupar estas secuencias de reacciones en un número menor de vías cuyos flujos en general pueden ser observados de forma experimental (Stephanopoulos, 1999).

Asimismo, es importante definir el concepto de flujo metabólico, el cual corresponde a la velocidad a la cual se procesa el material a través de una vía metabólica. Dentro de este contexto, nace otro concepto: la determinación y el estudio de estos flujos *in vivo* se ha denominado análisis de flujos metabólicos y ocupa un lugar central en la ingeniería metabólica (Stephanopoulos, 1999).

En el análisis de flujos metabólicos (AFM), los flujos intracelulares son calculados utilizando un modelo estequiométrico que describe la bioquímica del sistema a analizar, constituyendo una poderosa herramienta para la estimación de las redes metabólicas. Sin embargo, ya que el análisis cuantitativo del metabolismo requiere de datos experimentales, es importante que la consistencia de los datos sea verificada antes de utilizarlos en determinación de flujos metabólicos (Jørgensen *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1997). Esta herramienta es especialmente útil en conjunto con estudios de producción de metabolitos, en donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico (Nissen *et al.*, 1997).

Otras aplicaciones del AFM consisten en (Páez-Lerma & Soto-Cruz, 2005):

1. Cálculo de flujos extracelulares no medidos: en algunas situaciones el modelo estequiométrico y los datos experimentales obtenidos permiten calcular, además de los flujos intracelulares, flujos extracelulares no medidos o incluso algunos que sí lo fueron, pero que se omitieron en los cálculos. En este último caso, el grado de concordancia entre los flujos medidos y los valores entregados por el modelo sirven para validarlo.
2. Con base en el modelo estequiométrico y la especificación de algunas restricciones en el metabolismo, es posible calcular el rendimiento teórico máximo para un metabolito (Heijnen & van Gulik, 1995).
3. Identificar vías alternativas: El formular un modelo estequiométrico requiere de una información detallada. No obstante, en muchos casos algunos detalles son desconocidos o puede que no se sepa con exactitud si una determinada vía se encuentra o no activa bajo las condiciones en las cuales se está realizando el experimento. Calculando los flujos metabólicos con diferentes arreglos de vías bioquímicas, puede ser posible identificar cuál de los arreglos es el que más probablemente se encuentre activo.

4. Identificación de puntos ramificados de control metabólico (rigidez de nodos): Al comparar bajo diferentes condiciones de operación la distribución de flujos, es posible identificar si un nodo es flexible o rígido. Para ello, se debe tener en consideración que en un nodo flexible las proporciones de los flujos en las diferentes ramas se ajustan de acuerdo a las condiciones de cultivo, mientras que en un nodo rígido las proporciones son constantes independientemente de estas condiciones (Stephanopoulos & Vallino, 1991).

Al momento de querer realizar un análisis de flujos metabólicos, se ha de tener en consideración que existen dos tipos de restricciones que siempre son utilizadas en el AFM: un grupo surge de la medición directa de parámetros relacionados con los metabolitos extracelulares, como lo son la velocidad de consumo de sustrato, la velocidad de producción de un determinado metabolito o de un componente de la biomasa; el otro grupo se desprende del balance de masa que se debe cumplir en torno a cada metabolito (Moreira *et al.*, 2004). Los flux se pueden calcular basándose en la medición de la velocidad específica de producción y consumo, realizando los balances de masa para todos los compuestos en la red metabólica.

El primer paso para la realización del AFM consiste en la obtención de la red metabólica, debiendo para ello iniciarse con un análisis estequiométrico de la red de reacciones que describan el comportamiento metabólico a analizar. Adicionalmente, se ha de tener presente las siguientes consideraciones (Martens, 2007):

- Aquellas reacciones en serie que se encuentren en vías consideradas como lineales pueden ser agrupadas en una reacción global. No obstante, para el caso de reacciones que conforman un punto de bifurcación esto no es recomendable, dado que podría perderse información.
- Los componentes de la biomasa que tengan la misma vía biosintética son agrupados en un solo compuesto con una composición promedio. Por ejemplo, todas las distintas proteínas de la célula son agrupadas dentro de una sola molécula de proteína con una composición promedio de aminoácidos.
- Se asume que no existe acumulación intracelular de los metabolitos.

2.5.3. Análisis matemático del AFM

Martens (2007) realizó un análisis matemático en torno al AFM, el cual será presentado en esta sección. La red final que se ha de analizar contiene m metabolitos y n reacciones, siendo trasladadas estas reacciones a una matriz estequiométrica S , la cual constituye un arreglo matricial. Por consiguiente, las m columnas de esta matriz S contienen los metabolitos, mientras que las n filas las reacciones.

Dado que se conoce la composición elemental de los metabolitos, es posible comprobar la consistencia elemental de la matriz, pues se debe cumplir que:

$$S \cdot E = 0 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

En donde E es la matriz de composición elemental que contiene la composición elemental (columnas) para todos los compuestos (m filas).

Luego, se pueden escribir los balances de masa para los m compuestos presentes en la red metabólica. Para un compuesto i se tiene que:

$$\frac{dc_i}{dt} = -r_i + \sum_{j=1}^n s_{ij}x_j \quad (\text{Ec. 2.2})$$

En donde c_i es la cantidad de compuesto i por célula (mol/célula), r_i es la velocidad de producción del compuesto i (mol/células · s), x_j corresponde al flux en la reacción j (mol/célula · s) y s_{ij} es la cantidad de i que participa en la reacción j . Asumiendo que no existe acumulación de los metabolitos en la célula, tal como se había señalado con anterioridad, en estado estacionario el lado izquierdo de la ecuación 2.2 es cero, siendo posible reescribirla en notación matricial de la siguiente forma:

$$\left[S^T - I_r - I_l \right] \cdot \begin{pmatrix} X \\ r \\ r_l \end{pmatrix} = 0 \Rightarrow A' \cdot \begin{pmatrix} X \\ r \\ r_l \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{Ec. 2.3})$$

En donde A' corresponde a una matriz con dimensiones $[(n+m) \times m]$, compuesta por la transpuesta de la matriz estequiométrica (S^T) y la matriz identidad negativa ($-I$), la cual se puede subdividir dentro de una submatriz perteneciente a r , I_r , y la submatriz correspondiente a r_i , I_i , mientras que x es un vector que contiene los fluxes, r el vector que engloba las velocidades de producción de todos los compuestos que se encuentran al final de cada ruta metabólica (pudiendo ser producidos o consumidos) y r_i corresponde a la velocidad de producción para los compuestos intermediarios.

Para éstos, la velocidad neta de producción es equivalente a la velocidad de crecimiento multiplicada por la concentración intracelular del compuesto. Considerando que las concentraciones intracelulares suelen ser muy bajas, las velocidades de producción de los intermediarios pueden despreciarse y, por consiguiente, ser iguales a cero. Así, r_i y la columna correspondiente en A' puede removerse, quedando de esta manera:

$$\left[S^T - I_r \right] \cdot \begin{pmatrix} X \\ r \end{pmatrix} = A' \cdot \begin{pmatrix} X \\ r \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{Ec. 2.4})$$

Para aquellos compuestos que son excretados o son consumidos se debe incluir un flux de transporte adicional que considere esta situación. No obstante, por simplicidad este flux suele ser reemplazado directamente por la velocidad neta de producción o de consumo del metabolito, siendo importante señalar que esto incluye las velocidades para la formación de macromoléculas que constituyen la biomasa. La ecuación 2.4 es la expresión básica que describe los balances de masa en una red metabólica. El número de reacciones o incógnitas $q=(x+r)$ es usualmente más larga que el rango de la matriz A . De forma adicional, el número de filas de A suele ser también mayor que el rango de A debido a las ramificaciones conservadas en la célula, como NAD^+ y NADH . Se debe tener en consideración que las dependencias lineales en A pueden ser removidas, aunque esto no es necesario hacerlo, sin que esto implique una pérdida de información. No todos los compuestos que son excretados o consumidos por la célula son o pueden ser medidos (como es el caso del agua), por lo que para tales efectos la ecuación 2.4 se puede escribir de la siguiente manera:

$$A \cdot \begin{pmatrix} r_c \\ r_m \end{pmatrix} = [A_c A_M] \cdot \begin{pmatrix} r_c \\ r_m \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{Ec. 2.5})$$

En donde r_c corresponde a los flux y las velocidades no medidas experimentalmente (calculadas), mientras que r_m contiene todas las velocidades medidas. Al dividir, por consiguiente, la matriz A en dos partes, una que abarque los flux no medidos y otra que contenga las velocidades medidas, se puede obtener la ecuación 2.6.

$$A_c \cdot r_c = -A_m \cdot r_m \quad (\text{Ec. 2.6})$$

Esta es la expresión que representa la ecuación central del balance de masa de los fluxes.

2.5.4. Criterios de clasificación de la red metabólica

A la hora de establecer un modelo metabólico, en términos de AFM, se han de tener en consideración ciertos criterios o conceptos, en conjunto con la ecuación 2.6, los cuales Martens (2007) expone y se dan a conocer en esta sección (van der Heijden *et al.*, 1994; Klamt *et al.*, 2002),

- **Subdeterminado:** Si el rango de $(A_c) <$ número de incógnitas. No existen suficientes relaciones lineales independientes para calcular todas las incógnitas r_c a partir de r_m . No obstante, se ha de tener en consideración de que algunas de estas incógnitas pueden ser calculables.
- **Determinado:** Si el rango de $(A_c) >$ número de incógnitas. Todas las incógnitas de r_c pueden ser calculadas a partir de las velocidades medidas de forma experimental.
- **Redundante:** al menos alguna de las filas de A_c pueden ser expresadas como combinación lineal de otras filas. Esto puede conducir a un sistema inconsistente si es que r_m contiene un set de valores tal que no existe r_c que resuelva la ecuación 2.6. Es posible chequear la consistencia de un sistema redundante.

- No redundante: no existe dependencia lineal entre las filas. Por lo tanto el sistema es siempre consistente para cualquier valor de r_m .

2.5.5. Cultivo continuo como herramienta para el AFM

Con la finalidad de obtener información reproducible y significativa, la población celular debe crecer en un conjunto de condiciones físico-químicas definidas, idealmente constantes y controlables. El realizar estos experimentos en un sistema simple de cultivo por lote implica la existencia de condiciones físico-químicas dinámicas, produciendo complejos patrones de información que son complejos o imposibles de interpretar (Hobbs & Hoskisson, 2005). Por consiguiente, el sistema ideal para tales estudios es el quimiostato, un sistema de cultivo continuo que provee un medio ambiente constante.

El uso de cultivo continuo para desacoplar el crecimiento de las condiciones transitorias encontradas en los cultivos por lote ofrece ventajas ilimitadas para los investigadores. El desarrollo de técnicas de biología molecular y su aplicación en la manipulación de vías metabólicas ha revolucionado la mejora de las propiedades y de la productividad de los sistemas de expresión utilizados de forma industrial. Dentro de este contexto, algo importante de señalar es que la determinación de los flujos metabólicos *in vivo* y posteriores análisis de flujos metabólicos se pueden llevar a cabo de mejor forma en condiciones de estado estacionario, dado que la eliminación de los efectos transitorios de crecimiento permite una estimación más realista de las eliminaciones o mejoras de las rutas metabólicas (Hobbs & Hoskisson, 2005).

El uso de mediciones de metabolitos, en conjunto con la estequiometría de las reacciones, ha sido aplicado principalmente en la validación de las redes metabólicas. Sin embargo, estos enfoques no pueden diferenciar entre los controles metabólicos, y el control del flujo de un punto de ramificación clave no pueden ser estudiados en detalle (Stephanopoulos, 1999).

La naturaleza dinámica de estas redes requiere la aplicación de un cultivo continuo, en el cual el crecimiento en estado estacionario puede ser perturbado, de tal forma en que la influencia de un único componente del medio pueda ser evaluado mientras que todos los demás factores se mantienen constantes.

En el presente trabajo se pretende establecer un modelo metabólico con la finalidad de evaluar la co-metabolización de Gal/Lac en las células CHO en cultivo continuo. Se dispone de una serie de mediciones experimentales, resumidas en el capítulo 4, las cuales son utilizadas principalmente para el establecimiento de restricciones y la validación del modelo.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

Abreviaciones

AFM: Análisis de Flujos Metabólicos

Asn: Asparagina

CHO: *Chinese Hamster Ovary*, ovario de hámster chino

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GalNac: N-acetilgalactosamina

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

LDH: lactato deshidrogenasa

mL-LDH: L-lactato deshidrogenasa mitocondrial

Man: Manosa

NeuAc: Ácido neuramínico o ácido siálico

r-proteína: proteína recombinante

Ser: Serina

Thr: Treonina

tPA: Activador del plasminógeno tisular

TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

UDP-GNAc: UDP-N-acetilhexosamina

Xyl: Xilosa

Símbolos:

C_i : cantidad de compuesto i por célula (mol/célula)

r_c : los flux y las velocidades no medidas experimentalmente, esto es, calculadas (mol/células · s)

r_i : velocidad de producción del compuesto i (mol/células · s)

r_i : velocidad de producción para los compuestos intermediarios (mol/células · s)

r_m : velocidades de producción o consumo medidas experimentalmente (mol/células · s)

S : matriz estequiométrica correspondiente al arreglo matricial del AFM.

s_{ij} : cantidad de i que participa en la reacción j

x_j : flux en la reacción j (mol/célula · s)

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1. RECOPIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Para efectos de este trabajo, se recopiló una serie de datos experimentales para células CHO (Berríos, 2008), los cuales fueron obtenidos en cultivo continuo. En la sección 2.5.5 se detallan algunas de las ventajas que tiene esta modalidad de cultivo, en especial en el análisis de flujos metabólicos.

En primer lugar, se ejecutó una revisión de los datos experimentales disponibles para glucosa y galactosa/lactato en la alimentación. Berríos (2008) realizó una serie de experimentos en cultivo continuo, cuyos datos experimentales obtenidos para glucosa fueron utilizados para efectos de comparación. Como el estudio se llevó a cabo a diversas concentraciones de glucosa, se procedió a elegir una determinada condición, siendo ésta la correspondiente a Glc 10 mM, considerando que se dispone de datos experimentales de razones Gal/Lac equivalentes 10/5 mM y 20/10mM. Esto tiene su fundamento en que, para el primer caso, la concentración de hexosa en el medio corresponde a 10 mM; mientras que para el segundo, el doble de dicha magnitud.

Los datos experimentales se ordenaron de forma comparativa de acuerdo a diversas variables, tales como el número de células viables, la viabilidad, la velocidad de crecimiento, el tiempo de cultivo y las velocidades de producción o consumo de los compuestos que fueron medidos experimentalmente. Posteriormente, se procedió a contrastar estos resultados, estableciendo similitudes y diferencias en los parámetros considerados en el capítulo 4.

No obstante, para realizar la comparación se procedió al cálculo de parámetros básicos relacionados con el porcentaje de viabilidad y la velocidad específica de crecimiento.

3.1.1. Viabilidad celular

Es importante señalar que para estos efectos se debe tener en consideración el cálculo de la viabilidad del cultivo, expresada en porcentaje de viabilidad (PV), el cual se puede obtener partir de la ecuación 3.1.

$$PV = \frac{N_v}{N_T} \cdot 100\% \quad (\text{Ec. 3.1})$$

En donde N_v corresponde a la concentración de células viables y N_T a la concentración total de células.

3.1.2. Velocidad específica de crecimiento en cultivo continuo

Berríos (2008) señala la importancia de tener en consideración que en un cultivo continuo de células animales, a diferencia de uno de microorganismos, la cantidad de células muertas es mayor (por consiguiente, la viabilidad no se mantiene cercana al 100% en todo el transcurso del tiempo), situación que no puede ser despreciada para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento. Asumiendo la masa de cada célula y el volumen del reactor constante, se puede plantear la siguiente expresión, en donde N_d corresponde a la cantidad de células no viables:

$$\frac{dN_T}{dt} = \frac{dN_v}{dt} + \frac{dN_d}{dt} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Por otro lado, es posible señalar, tanto para la concentración de células viables como la de no viables:

$$\frac{dN_v}{dt} = \mu \cdot N_v - DN_v - k_D N_v \quad (\text{Ec. 3.3})$$

$$\frac{dN_d}{dt} = k_D N_v - DN_d \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Reemplazando las ecuaciones 3.3 y 3.4 en la ecuación 3.2, se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{dN_T}{dt} = \mu \cdot N_v - DN_v - DN_d \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Cuando se llega a estado estacionario, la variación de concentración de las células totales es cero, ante lo cual la ecuación 3.5 queda de la siguiente forma:

$$0 = \mu \cdot N_v - DN_v - DN_d \quad (\text{Ec. 3.6})$$

Despejando la velocidad específica de crecimiento (μ), se obtiene finalmente:

$$\mu = \frac{D \cdot (N_v + N_d)}{N_v} = D \cdot \frac{N_T}{N_v}; \quad N_v \neq 0 \quad (\text{Ec. 3.7})$$

De lo anterior, se desprende que la velocidad específica de crecimiento es mayor que la velocidad de dilución D cuando la viabilidad es distinta de 100% (se cumple que $N_T > N_v$).

3.2. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO METABÓLICO

Luego de la comparación de los datos experimentales obtenidos, se requiere realizar una recopilación de antecedentes con la finalidad de formular el modelo metabólico que represente el catabolismo de la glucosa y de la galactosa, respectivamente. Dentro de esta recopilación de información, se encuentra la selección de un modelo metabólico previamente establecido para glucosa en la alimentación.

Para efectos de implementar el modelo metabólico, se dispone del software MetaFluxNet en su versión 1.8, el cual permite la revisión automática de los criterios señalados en la sección 2.5.4, como lo son la consistencia y la calculabilidad, tal como se muestra en la figura 3.1.

Asimismo, este programa realiza la suposición de estado estacionario para construir el modelo, tal como se hace en la sección 2.5.3.

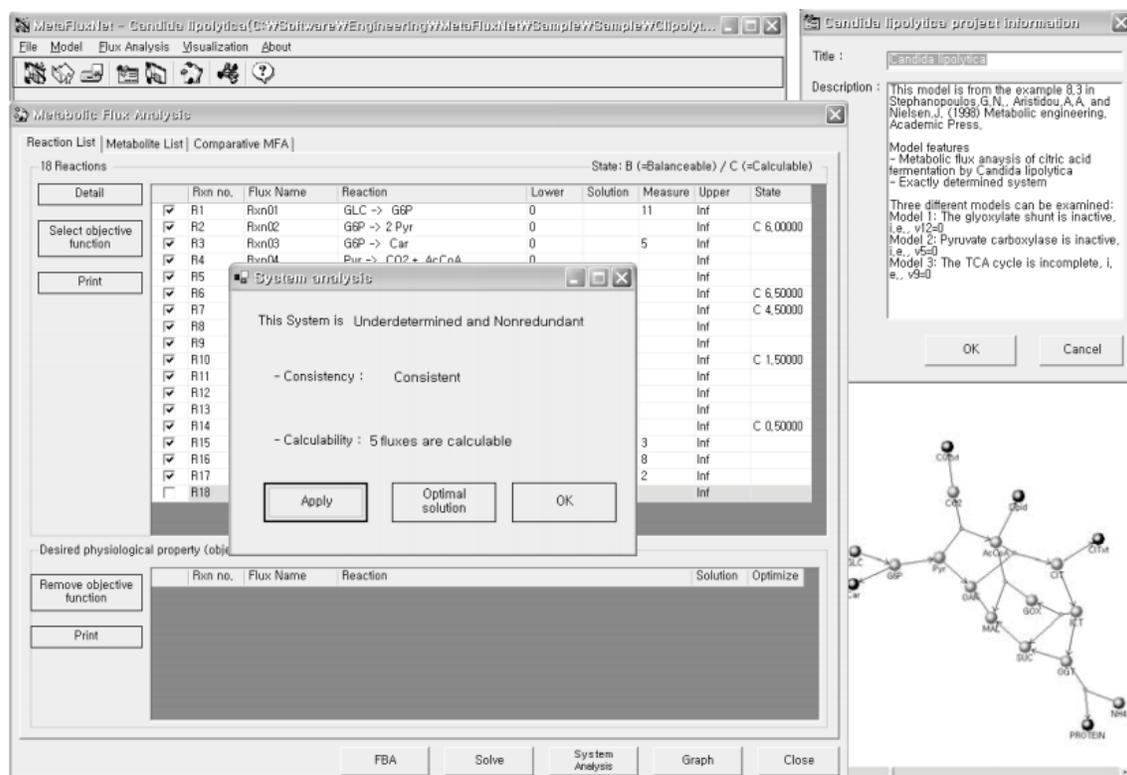


Figura 3.1: Vista general de la interfaz de MetaFluxNet para AFM (Lee et al., 2003).

Con la finalidad de realizar posteriormente el AFM se requiere calcular parámetros cinéticos como la velocidad específica de consumo o producción de los metabolitos medidos experimentalmente para las dos razones de Gal/Lac utilizadas.

3.2.1. Cálculo de la velocidad específica de consumo o producción de un metabolito

Para ello, es necesario realizar un balance de masa en torno al reactor para un metabolito i , en donde C_i^E corresponde a la concentración en la alimentación de éste, mientras que C_i^S es la concentración a la salida:

$$\frac{dC_i}{dt} = D \cdot C_i^S - D \cdot C_i^E - q_i \cdot N_v \cdot 10^{-9} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Considerando que, en estado estacionario, la concentración de los metabolitos en el reactor es constante y por consiguiente el lado izquierdo de la ecuación 3.8 se vuelve cero:

$$q_i = \frac{D \cdot (C_i^S - C_i^E)}{N_v} \cdot 10^9 \quad (\text{Ec. 3.9})$$

3.2.2. Construcción del modelo estequiométrico

El análisis de flujos metabólicos se inicia seleccionando la red metabólica que engloba el fenómeno estudiado, en este caso, el catabolismo del lactato y de la galactosa. En primera instancia, es necesario tener la serie de reacciones principales que explican este proceso bioquímico. Para ello se tomó un modelo base (Berríos, 2008), el cual fue modificado para que cumpliera con los requerimientos mencionados con anterioridad.

El modelo que se presenta a continuación consta de una serie de reacciones que consideran la co-metabolización de galactosa y lactato. En aquellas reacciones en que exista doble flecha, ésta indicará reversibilidad de la reacción. Asimismo, la letra “e” indica que corresponden a compuestos extracelulares.

En el anexo 1 se encuentran las simbologías utilizadas en el modelo, con su respectivo significado.

Vía de Leloir

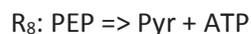
La galactosa es incorporada a las células mediante una serie de reacciones, tal como se muestra en la sección 2.3.2, para luego ingresar a la glicólisis como glucosa-6-fosfato.



Con lo cual puede hacer ingreso a la glicólisis a partir de G6P.

Glicólisis

A continuación se exponen las principales reacciones a considerar para este proceso. (Campbell & Farrell, 2003a). En la sección 2.2 se encuentra un esquema de estas reacciones. Como el AFM permite la compactación de reacciones en serie, para el caso de R_3 se resumió el paso de Fructosa-6-P a fructosa-1,6-BiP y de ésta tanto a dihidroxiacetona fosfato (la cual posteriormente se convertirá en gliceraldehído-3-fosfato, G3P) como directamente a G3P. Caso análogo ocurre en R_4 , en donde el paso de G3P a PEP es lineal y se resume en una sola reacción global.



Destino del piruvato hacia la formación de lactato

Tal como se explicó en la sección 2.2, parte del piruvato es destinado hacia la formación de lactato, el cual es posteriormente excretado al medio, siendo importante tener en consideración para la red metabólica que por consiguiente es un metabolito extracelular. La siguiente reacción resume lo señalado:



Conversión a AcetilCoA

Esta conversión se encuentra realizada por el complejo de piruvato deshidrogenasa y tiene como destino el TCA:



Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

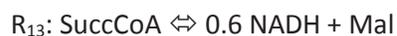
Las primeras tres reacciones del TCA pueden ser resumidas en una sola reacción global, dado que cumplen con la condición de ser vías lineales. Por lo tanto, aquellas mediadas por las enzimas citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (Campbell & Farrell, 2003a) se representan en la siguiente expresión, la cual tiene como producto α -cetoglutarato (α -KG):



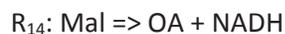
Para la reacción catalizada por la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa:



Las siguientes tres reacciones pueden ser agrupadas de igual forma. No obstante, se ha de tener en consideración la existencia de FADH_2 en la segunda de estas reacciones, el cual debe ser expresado de alguna forma en la ecuación. Sabiendo que NADH equivale a 2.5 ATP y que el FADH_2 a sólo 1.5 ATP (Cox & Nelson, 2004), es posible realizar una relación simple de proporcionalidad, obteniéndose que el FADH_2 equivale a 0.6 NADH :



Y por último, se tiene la reacción final del TCA, mediada por la enzima malato deshidrogenasa:

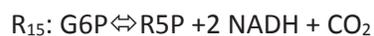


Vía de las pentosas fosfatos (PPP)

La vía de la pentosa fosfato constituye una alternativa a la glicólisis y difiere de ella en varios aspectos importantes. Mientras que en la glicólisis constituye lo más importante la producción de ATP, en esta vía aquello no es el objetivo principal. Aquí se producen azúcares que contienen cinco carbonos (Campbell & Farrell, 2003b).

Existen dos fases: una oxidativa y una no oxidativa. La primera tiene como finalidad la producción de ribosa-5-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato, mientras que la otra conecta la ribosa-5-fosfato con la glicólisis, en específico a fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato.

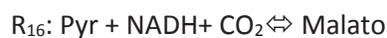
Para efectos del modelo, se supondrá que la ribosa-5-fosfato proviene a partir de glucosa-6-fosfato, consideración que se ha reportado para modelos metabólicos basados en células CHO (Altamirano *et al.*, 2001).



Vías Anapleróticas

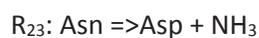
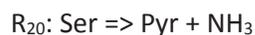
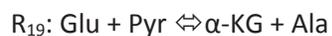
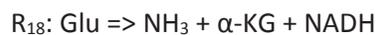
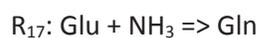
En la actualidad se conocen cuatro vías anapleróticas, las cuales tienen como función restituir los intermediarios del TCA a partir de la glicólisis.

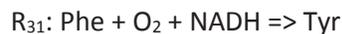
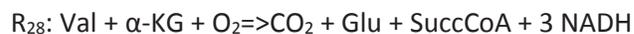
No obstante, de ellas la correspondiente a la enzima málica se destaca, la cual se encuentra ampliamente distribuida en eucariontes y procariontes (Cox & Nelson, 2004). Como no se conoce con exactitud la conexión entre la glicólisis y TCA en producción de r-proteínas en células animales, se eligió esta reacción anaplerótica por ser la más representativa para el sistema de expresión utilizado:



Metabolismo de los aminoácidos

Las reacciones que explican el comportamiento metabólico fueron obtenidas con ayuda de la base de datos KEGG y la información metabólica disponible en bibliografía (Lehninger, 1978a). Es necesario señalar la existencia de síntesis de los aminoácidos alanina, glicina y aspartato, lo cual fue considerado en el modelo metabólico.





Glicosilaciones

Para estos efectos se debe tener en consideración la generación de UDP-Gal y UDP-Glc a partir de la vía de Leloir, mientras que CMP-NeuAc y UDP-GlcNAc provienen de la síntesis a partir de la conversión de Fructosa-6-P en Glucosamina-6-P. Por otra parte, es necesario considerar la síntesis de Manosa-6-fosfato a partir de la glicólisis.



Transporte de aminoácidos

Suponiendo que sólo existe transporte pasivo de los aminoácidos, se tienen las siguientes reacciones:



R₄₀: Arge -> Arg

R₄₁: Aspe ⇔ Asp

R₄₂: Glue -> Glu

R₄₃: Glye ⇔ Gly

R₄₄: Hise -> His

R₄₅: Ilee -> Ile

R₄₆: Leue -> Leu

R₄₇: Lyse -> Lys

R₄₈: Mete -> Met

R₄₉: Phee -> Phe

R₅₀: Proe -> Pro

R₅₁: Sere -> Ser

R₅₂: Thre -> Thr

R₅₃: Tyre -> Tyr

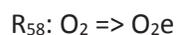
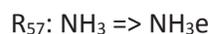
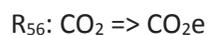
R₅₄: Vale -> Va

R₅₅: Asne -> Asn

La Gln no fue considerada en estas ecuaciones debido a que no se encontraba presente en el medio de cultivo, mientras que la Cys se encuentra en un orden de magnitud inferior de cualquier otro aminoácido en células CHO y la Trp posee una contribución de energía no significativa (Gambhir *et al.*, 2003).

Salida de metabolitos gaseosos al medio extracelular

Como ya se pudo apreciar con anterioridad, se generan como productos el oxígeno, el dióxido de carbono y el amoníaco (NH_3). Este último se disuelve en agua formando los iones amonio (NH_4^+), el cual no puede traspasar la membrana de la célula; no obstante, existe un equilibrio entre el amonio y el amoníaco, ya que este último sí puede atravesarla, convirtiéndose en amonio nuevamente en medio acuoso (Berríos, 2008).



Ingreso del lactato a la célula

Dado que se utilizó lactato en la alimentación del cultivo, es necesario considerar una ecuación que represente en el modelo su ingreso a las células CHO.



Síntesis y glicosilación de tPA

Para poder realizar una estimación que se traduzca en reacciones que modelen el comportamiento metabólico, es necesario conocer las estructuras de glicosilación del tPA y el porcentaje de frecuencia en el que éstas se pueden encontrar. Berríos (2008) realiza una aproximación tomando en cuenta esto y los aminoácidos presentes en la proteína, lo cual se muestra a continuación:

R_{60} : 36 Ala + 40 Arg + 22 Asn + 29 Asp + 27 Gln + 27 Glu + 46 Gly + 17 His + 20 Ile + 43 Leu + 22 Lys + 7 Met + 30 Pro + 50 Ser + 24 Tyr + 28 Val + 18 Phe + 22.37 GDP-Man + 3.47 UDP-Gal + 7.46 UDP-Glc + 8.44 UDP-GlcNAc \rightarrow tPAe

R_{61} : CMP-NeuAc \Rightarrow NeuAc tPA

Es importante señalar que ecuación R_{60} corresponde a la síntesis y glicosilación de tPA sin la adición de ácido siálico, mientras que en la expresión R_{61} el metabolito “NeuAc tPA” representa el tPA que contiene ácido siálico en sus glicosilaciones.

Glicosilación de la superficie celular

Dentro de los datos experimentales disponibles para el modelo se encuentra la glicosilación de la superficie celular, por lo que se debe considerar también esto para la construcción de la red metabólica.

Asumiendo que el ácido siálico medido de forma experimental en la superficie celular se halla unido en una estructura similar a una N-glicosilación, es posible estimar un flux mínimo asociado. Esto se debe a que puede ocurrir que existan glicosilaciones sin ácido siálico y que, por consiguiente, no se encuentren cuantificadas para estos efectos.

R_{62} : CMP-NeuAc + 3 GDP-Man + UDP-Gal + UDP-Glc + 1.67 UDP-GlcNAc \Rightarrow Glycos cell surface

Macromoléculas y biomasa

Para poder estimar la proporción de macromoléculas que contiene la célula (en términos de proteínas, lípidos, polisacáridos y nucleótidos) es necesario recopilar información bibliográfica existente, así como la composición aproximada de aminoácidos en las proteínas de las células mamíferas y de los ácidos nucleicos. Se consideró para efectos del modelo metabólico la síntesis de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y polisacáridos, macromoléculas que en distintas proporciones conforman la célula. Es importante señalar que para efectos del modelo metabólico no se consideró un balance de fósforo (P), por lo que las ecuaciones empíricas que surgen a partir de las aproximaciones realizadas no consideran este elemento.

Con la finalidad de realizar una estimación de la composición de la célula, es necesario obtener una fórmula empírica para las macromoléculas consideradas, lo cual se realiza a continuación:

- **Ácidos nucleicos**

En primer lugar, para poder estimar ecuaciones que representen la síntesis de ácidos nucleicos en la célula se sabe que:

- La proporción molar aproximada de nucleótidos es de 2:2:3:3 para G:C:A:T(U) (Karp, 1998)
- Como se puede apreciar en la figura 3.2, cada nucleótido se encuentra conformado por tres elementos principales: una base nitrogenada, una pentosa (desoxirribosa o ribosa, dependiendo de si es ADN o ARN respectivamente) y un grupo fosfato. Respecto a esto último, se debe señalar que antes de unirse al ácido nucleico existen tres grupos fosfatos, pero dos de ellos se pierden en el proceso.

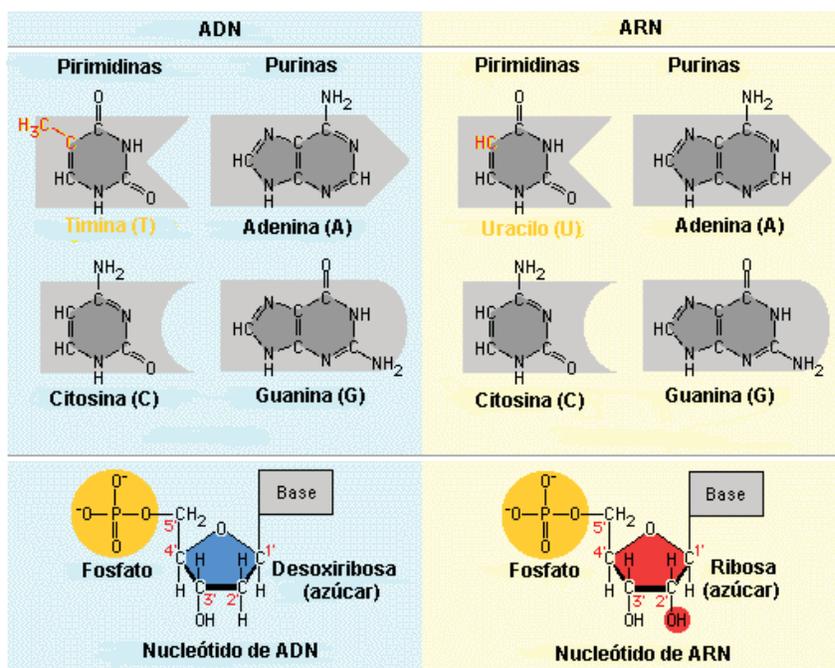


Figura 3.2: Estructura de los nucleótidos de ADN y ARN (Gálvez, 2009)

Con estos dos aspectos en consideración, es posible determinar la fórmula de un nucleótido promedio en base a un mol de C, obteniéndose:

- Para ADN promedio: $\text{CH}_{1.15}\text{O}_{0.62}\text{N}_{0.39}$
- Para ARN promedio: $\text{CH}_{1.25}\text{O}_{0.25}\text{N}_{0.38}$

Teniendo en consideración estas fórmulas y que la síntesis de las bases nitrogenadas se lleva a cabo a partir de CO_2 , amonio, O_2 , aminoácidos y ATP (Cox & Nelson, 2004) se obtiene:

- Para ARN:

$R_{63}: 0.137 \text{ Asp} + 0.053 \text{ CO}_2 + 0.158 \text{ Gln} + 0.053 \text{ Gly} + 0.042 \text{ NH}_3 + 0.026 \text{ O}_2 + 0.105 \text{ R5P} + 0.632 \text{ ATP} \Rightarrow$
 ARN + 0.158 Glu + 0.084 Mal + 0.021 NADH

- **Polisacáridos**

En el caso de los polisacáridos, la composición se mantiene relativamente constante, pues los bloques de construcción de la mayoría de ellos lo constituyen hexosas con fórmula $C_6H_{12}O_6$. Es importante señalar que es necesario tener en cuenta la pérdida de una molécula de agua por la formación del enlace glicosídico (Cox & Nelson, 2004), algo que variará la fórmula empírica del polisacárido. Teniendo esto en consideración y expresando en término de un mol de carbono, se tiene:

- Polisacárido promedio: $CH_{1.67}O_{0.83}$

R₆₆: $0.056 \text{ ATP} + 0.167 \text{ G6P} \Rightarrow \text{Polisacáridos}$

- **Proteínas**

Para construir una ecuación estequiométrica que representase a las proteínas, se hizo uso de lo explicado en la sección 2.5.2., ante lo cual sólo se considera una reacción global para proteína celular en la que se incluyen los aminoácidos medidos de forma experimental, en conjunto con Asn y Gln, cuyas ecuaciones de síntesis fueron consideradas en el modelo.

La reacción que abarca la síntesis de una proteína modelo es la siguiente:

R₆₇: $a \text{ Ala} + b \text{ Arg} + c \text{ Asn} + d \text{ Asp} + e \text{ Gln} + f \text{ Glu} + g \text{ Gly} + h \text{ His} + i \text{ Ile} + j \text{ Leu} + k \text{ Lys} + l \text{ Met} + m \text{ Phe} + n \text{ Pro} + o \text{ Ser} + p \text{ Thr} + q \text{ Tyr} + r \text{ Val} + s \text{ ATP} \rightarrow \text{Proteína Celular}$

- **Células**

Considerando que la célula se encuentra conformada por ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y polisacáridos, ésta se puede representar de la siguiente manera:

R₆₈: $t \text{ Proteína celular} + u \text{ ARN} + v \text{ ADN} + w \text{ Lípidos} + x \text{ Polisacáridos} \Rightarrow \text{Célula}$

Para el cálculo de los coeficientes estequiométricos de las ecuaciones R_{67} y R_{68} se requiere conocer la composición estimada de aminoácidos en las proteínas celulares, así como la composición elemental de la célula para cada caso, para lo cual se considera que ésta se encuentra principalmente formada por los elementos carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. La obtención de los coeficientes se detalla en la sección 3.3.

Metabolismo energético

La fosforilación oxidativa constituye un proceso en el cual se genera ATP, ocurriendo un transporte de los electrones hasta el oxígeno molecular (el cual es el aceptor final) y constituye el proceso que viene tras la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lehninger, 1978b). Para este proceso, se puede expresar el comportamiento de la siguiente forma (Berríos, 2008):



Además de la fosforilación oxidativa, se ha de tener en consideración de que parte del ATP es destinado a mantención. Al ser muy difícil su medición directa, se define como el flux de ATP resultante de la diferencia entre el flux de ATP producido y los fluxes que lo consumen.



3.3. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES PARA LAS REACCIONES R_{67} Y R_{68}

Tal como se señaló en la sección 3.2.3, es necesario realizar el cálculo de los coeficientes estequiométricos para las reacciones de síntesis de proteínas y células.

Para ello, se dispone de información bibliográfica en cultivo continuo y con la utilización del mismo medio en todos los casos (BIOPRO1), difiriendo únicamente en las concentraciones y el tipo de fuente

principal de carbono en la alimentación. Asimismo, se tienen las fórmulas empíricas de lípidos, polisacáridos, ADN y ARN.

No obstante, para poder realizar un balance de contribución de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno de cada macromolécula (el cual dará como resultado una fórmula empírica teórica para la célula), es necesario tener en consideración que además se necesita estimar la fórmula empírica para una proteína modelo celular.

Para poder realizar la estimación de la composición de macromoléculas de la célula, en primer lugar se efectuó una recopilación y comparación de valores obtenidos para distintas condiciones de cultivo (manosa y glucosa), lo cual se puede apreciar en la tabla 3.1. En forma general, en todos los casos las proteínas constituyen el mayor porcentaje de macromoléculas y los valores de composición muestran similitud en su magnitud.

Tabla 3.1: Composición porcentual en masa seca de macromoléculas en células mamíferas a diferentes condiciones de cultivo (Berríos, 2008)

Componente	Glc (2,5)	Glc (10)	Glc (15)	Man (2,5)	Man (10)	Man (15)
Proteínas	69.5	70.5	69.19	71	69.5	69.19
ADN	2	2	2	2	2	2
ARN	3.7	3.7	3.89	3.7	3.7	3.7
Polisacáridos	7.1	7	7.09	7.1	7.1	7.1
Lípidos	7.7	7.79	7.88	7.7	7.7	7.7

Es importante señalar que para el cálculo de los coeficientes de R_{68} , estos valores deben ser convertidos a porcentajes molares, lo cual se puede realizar mediante el uso de una base de cálculo y del peso molecular de cada macromolécula promedio obtenida.

Asumiendo que las proteínas de la célula están representadas por una única proteína modelo, tal como se expresa en la sección 3.2.3, es necesario calcular su fórmula empírica con la finalidad de obtener los

respectivos coeficientes estequiométricos a ser utilizados en la reacción R_{67} del modelo metabólico. Para su determinación, se utilizaron los datos presentados en la tabla 3.2, en donde se observa la composición estimada de aminoácidos para distintas condiciones de cultivo en glucosa y manosa. Considerando estos valores como referencia, se realizó un ajuste para determinar aquella condición que entregase la menor diferencia entre la fórmula teórica de la célula obtenida a través del balance de contribuciones de carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno para cada macromolécula, con sus respectivas fórmulas empíricas (ver sección 4.2), y aquellas obtenidas de forma experimental para cada condición de Gal/Lac.

Tabla 3.2: Composición estimada de aminoácidos de células CHO con distintas fuentes principales de carbono en cultivo continuo (Berríos, 2008)

Aminoácido	Glc (2,5)	Glc (10)	Glc (15)	Man (2,5)	Man (10)	Man (15)
	% Molar del Aminoácido en las proteínas celulares					
Ala	7.5	8.16	7.53	6.75	7.5	7.5
Asn	7	6.02	7	7.7	5.4	7
Asp	10	8.35	10	11	10	10
Gln	2.5	2.09	2.5	1.53	1.7	2.5
Gly	9.14	3.43	9.14	10.05	5.64	9.14
Ser	8.6	7.34	8.6	9.46	8.6	8.6
Trp	1.8	2.18	1.8	2.42	2.2	1.8
Tyr	3.37	5.47	2.73	6.05	5.5	2.73
Arg	4.4	7.76	4.43	3.96	4.4	4.4
Cis	0.72	0.63	0.4	0.23	0.26	1.36
Glu	12.6	12.6	12.6	13.86	12.6	12.6
His	0.3	0.39	0.3	0.27	0.3	0.3
Ile	5.7	6.67	5.7	5.13	5.7	5.7
Leu	4.7	5.62	4.7	4.23	4.7	4.7
Lys	4.2	4.27	4.2	3.78	4.2	4.2
Met	2.27	5.44	2.27	2.04	2.27	2.27
Phe	2.4	3.12	2.4	4.1	3.73	2.4
Pro	0.3	0.27	0.3	0.27	2.8	0.3
Thr	5.9	5.31	5.9	4.23	5.9	5.9
Val	4.6	5.21	4.6	4.14	4.6	4.6

Los resultados obtenidos de este ajuste se muestran en la sección 4.2.

3.4 IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO METABÓLICO EN EL SOFTWARE

Luego de la obtención de las 71 reacciones incluidas en el modelo metabólico, se procede a su implementación en MetaFluxNet 1.8, definiéndose un listado de metabolitos intra y extracelulares para tales efectos, como se muestra en el apéndice 1.

Una vez implementada la red metabólica en el software, se puede iniciar el uso de la herramienta del análisis de flujos metabólicos. Para ello, en primer lugar, con los datos experimentales recopilados (ver capítulo 4) para las dos razones de Gal/Lac y se realizó un ajuste y verificación del modelo, con la finalidad de que los datos entregados de forma experimental coincidieran con los predichos por el modelo. Al existir 71 reacciones y 76 metabolitos, se entregaron al sistema cinco de los valores recopilados de velocidades específicas de consumo y producción, mientras que los restantes se utilizaron para ajustar y verificar las soluciones entregadas por el modelo metabólico. En el apéndice 2 se encuentran las reacciones del modelo metabólico, cada una considerando si para dicho flux existió una medición experimental de velocidad específica de consumo/producción en los datos experimentales recopilados.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

Abreviaciones

AFM: Análisis de Flujos Metabólicos

CER: Velocidad específica de producción de O₂

Gal: Galactosa

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

Glu: Glutamato

G3P: Gliceraldehído-3-fosfato

Lac: Lactato

Man: Manosa

NeuAc: Ácido neuramínico o ácido siálico

OA: Oxalacetato

Pyr: Piruvato

R_n: Reacción *n* del modelo estequiométrico

UDP-GNAc: UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

α-KG: α-cetoglutarato

Símbolos

A : matriz estequiométrica

$c(A)$: número de condición para la matriz A .

C_i^E : Concentración del metabolito i en la alimentación del reactor (mM)

C_i^S : Concentración del metabolito i en la salida del reactor (mM)

D : velocidad de dilución del cultivo (h^{-1})

k_d : velocidad específica de muerte celular (h^{-1})

N_d : Concentración de células no viables (número de células muertas/mL)

N_T : Concentración de células totales (número de células totales/mL)

N_V : Concentración de células viables (número de células viables/mL)

PV : Porcentaje de células viables

q_i : velocidad específica de consumo o producción del metabolito i ($\text{nmol/h} \cdot 10^6$ células)

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECOPIACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES PARA DISTINTAS RAZONES GAL/LAC EN CULTIVO CONTINUO

Se procedió a ordenar la información existente (Berríos, 2008) para Glc 10 mM y las dos razones de Gal/Lac en la alimentación de los cultivos continuos. Es importante señalar que los parámetros de viabilidad y velocidad específica de crecimiento se calcularon según se expone en la sección 3.1.

En la tabla 4.1 se puede apreciar la comparación de parámetros relacionados con la viabilidad celular y la velocidad específica de crecimiento. Es posible observar que la mayor viabilidad celular se encontró para la razón Gal(10)/Lac(5) mM con un 97%, seguido por el cultivo de Gal(20)/lac(10) mM con un 95%, en donde se obtuvo un porcentaje de viabilidad similar al del cultivo en Glc(10) mM; mientras que la velocidad específica de crecimiento se sostuvo relativamente constante para los tres casos.

Tabla 4.1: Comparación de parámetros de viabilidad y velocidad específica de crecimiento.

Parámetros	Glc(10) mM	Gal(10)/lac(5)mM	Gal(20)/lac(10) mM
N_T (10^5 cel/ml)	7,836	8,479	9,316
N_v (10^5 cel/ml)	7,48	8,23	8,85
Viabilidad (PV) %	95	97	95
D (h^{-1})	0,0147	0,0153	0,0153
μ (h^{-1})	0,0154	0,0158	0,0161

Para la construcción del modelo metabólico se requiere conocer las velocidades específicas de consumo y producción de lactato y galactosa, las cuales son presentadas en la tabla 4.2. El cálculo de estos valores se realizó de acuerdo a lo explicado en la sección 3.2.1.

Tabla 4.2: Concentraciones y velocidades específicas de consumo/producción de lactato (q_{lac}) y hexosas (q_{hex}).

Parámetro	Glc(10) mM	Gal(10)/lac(5) mM	Gal(20)/lac(10) mM
Concentración Lactato alimentación (mM)	-	4.2	8.5
Concentración Lactato residual (mM)	7.27	3.5	7.43
q_{lac} (nmol/h·10 ⁶ cel)	142.87	-13.23	-18.67
Concentración Hexosa alimentación (mM)	10	10	20
Concentración Hexosa residual (mM)	4.34	8.82	16.7
q_{hex} (nmol/h·10 ⁶ cel)	-110.69	-22.15	-55.57

Es interesante señalar que en el caso de las alimentaciones llevadas a cabo con galactosa y lactato, la velocidad específica de producción de lactato es de magnitud negativa, de lo cual se desprende que existe un ingreso del lactato del medio a la célula. Esto se puede corroborar a través de la observación de las concentraciones de alimentación y salida del reactor de lactato, siendo esta última mayor a la concentración de entrada. Además, este comportamiento es concordante con lo expuesto en la sección 2.3.2, en donde Altamirano *et al.* (2001) evidenciaron un comportamiento similar, existiendo un consumo de lactato en presencia de galactosa como fuente principal de carbono en la alimentación del cultivo. En el caso del cultivo realizado con glucosa, se observa una producción y excreción de lactato hacia el medio.

Asimismo, se puede observar que la magnitud de la velocidad específica de consumo de la glucosa es mayor que la de galactosa en ambas condiciones de cultivo, lo cual podría tener su explicación en lo señalado en la sección 2.3.2, acerca de la menor afinidad de esta fuente de carbono por la enzima hexoquinasa, con lo cual se produce una metabolización más lenta en comparación a la glucosa.

En la tabla 4.3 se presentan los valores recopilados de producción de tPA, cuya velocidad específica de producción se requiere en el modelo metabólico.

Para los cultivos que contienen Gal/lac, es posible apreciar un aumento en la concentración y velocidad de producción de la proteína al incrementarse la concentración de estos sustratos en el medio. Esto podría deberse precisamente a la mayor disponibilidad de sustrato en el medio de cultivo, con lo cual sería posible cumplir de mejor forma con los requerimientos energéticos de la célula para la síntesis de proteína.

Por otro lado, las variaciones en las cantidades obtenidas de tPA podrían tener su explicación en un cambio en la velocidad específica de producción, en la cantidad de células disponibles, o en una combinación de ambos factores. Si se observa el caso de Gal (10)/lac (5) mM, es posible notar una velocidad específica de producción del tPA equivalente a la mitad de la existente en los restantes cultivos; asimismo, la concentración obtenida de la proteína recombinante es cercana al 53% de la lograda para Glc (10) mM y Gal (20)/lac(10) mM.

Tabla 4.3: Producción de tPA a diferentes condiciones de cultivo

Parámetro	Glc(10)mM	Gal(10)/lac(5)mM	Gal(20)/lac(10)mM
tPA ($\mu\text{g/L}$)	509	273.4	511
Velocidad Prod. tPA($\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$)	8.54	4.18	7.81
q_{tPA} ($\mu\text{g/h}\cdot 10^9 \text{ cel}$)	11.41	5.1	8.78
Velocidad específica Prod. tPA ($\mu\text{g/h}\cdot\text{g cel}$)	40.63	21.30	39.41

Otro aspecto que se tuvo en consideración en el modelo está relacionado con el proceso de glicosilación. Se dispone de los datos de mediciones realizadas a la cantidad de ácido siálico presente en el tPA y en la superficie celular en los cultivos, los cuales se resumen en la tabla 4.4. Se puede apreciar que la mayor velocidad específica de producción de ácido siálico unido a las glicosilaciones del tPA se encuentra en Glc (10) mM.

Adicionalmente, el grado de sialización de la proteína recombinante es muy importante en la definición de su actividad biológica, tal como se señala en la sección 2.4.1, por ello la relevancia de considerar este parámetro en la realización del análisis del cultivo.

Para tener una idea del grado de sialización de la proteína es que se dispone entre los datos recopilados de la razón molar entre el ácido siálico y el tPA, con lo cual se deja en evidencia que los mayores niveles de sialización se encuentran en el cultivo con Glc, seguido por Gal (20)/Lac (10) mM.

Teniendo en consideración lo anteriormente señalado, si se analizan los resultados obtenidos para Gal/Lac, es posible observar que las mejores condiciones para la producción de la proteína se encuentran a 20 mM de hexosa, dado que se logra tanto la mayor velocidad de producción de tPA como el mayor grado de sialización de éste. No obstante, es importante señalar que los valores de ambos parámetros son inferiores a los obtenidos en Glc(10) mM en ambas condiciones de cultivo en Gal/Lac.

Por otro lado, si bien la mayor velocidad específica de producción de ácido siálico unido a las glicosilaciones en la superficie celular se encuentra en la condición de Glc(10), resulta complejo comparar las variaciones de ácido siálico presente en la superficie celular debido a que éstas pueden deberse no sólo a las diferentes condiciones de cultivo, sino que también a aspectos como los grados de sialización que pudieran tener las glicosilaciones, a los sitios en que éstas se llevan a cabo y en la cantidad de estos sitios en las proteínas.

Tabla 4.4: Contenido de ácido siálico (AS) en la superficie celular y en las glicosilaciones de tPA

Parámetro	Glc(10)	Gal(10)/lac(5)	Gal(20)/lac(10)
q_{AS} en superficie celular (nmol/h·10⁶ cel)	0.186	0.141	0.163
q_{AS} en glicosilaciones de tPA (nmol/h·10⁹ cel)	0.52	0.22	0.28
Razón molar (AS:tPA)	3.3	2.5	2.8

Asimismo, entre los datos experimentales recopilados se dispone de las concentraciones de entrada y salida de los aminoácidos más importantes presentes en el medio de cultivo, con lo cual es posible calcular las velocidades específicas de consumo/producción para cada metabolito, las cuales son requeridas en el modelo metabólico.

En la figura 4.1 se pueden observar estas velocidades en presencia de glucosa y de galactosa/lactato, respectivamente, en donde los valores negativos indican consumo de aminoácido. Al analizar la figura,

es posible observar para los cultivos con utilización de Gal/Lac la existencia de síntesis y excreción al medio de los aminoácidos alanina, glicina y aspartato. Este comportamiento coincide con lo reportado previamente para Gal/lac por Altamirano *et al.* (2006) en cultivo por lotes, y Berríos (2008), para Glc y Man en cultivo continuo.

Para todos los casos, el aminoácido que se consumió más rápidamente fue el glutamato, con magnitudes que varían entre los 14.224 y 17.934 (nmol/h·10⁶ cel), pudiendo desprenderse de ello que se trata de la principal fuente de amonio del metabolismo celular. Por otro lado, es posible notar que el segundo aminoácido metabolizado más rápidamente es la serina, cuyas velocidades específicas de consumo fluctúan entre 2.213 y 11.031 (nmol/h·10⁶ cel).

Sin embargo, algo muy particular es el hecho de que al aumentar la concentración de hexosa disponible en los cultivos con Gal/Lac, esta magnitud de velocidad específica de consumo disminuye, algo que también se observa con aminoácidos como lisina, metionina y fenilalanina. Esto podría deberse a cambios en la respuesta metabólica a concentraciones más altas. En el apéndice 3 se encuentran los valores residuales de los aminoácidos en estado estacionario.

Si bien, como se señala en la sección 2.2.1 el glutamato constituye la fuente principal de energía de la célula, es importante tener en consideración que el metabolismo de la serina permite que ésta pueda contribuir en el metabolismo energético a través de su conversión a piruvato (Lehninger, 1978a), un antecedente que podría ser utilizado posteriormente en el análisis de flujos metabólicos, en la búsqueda de la explicación a las variaciones en las velocidades específicas de consumo.

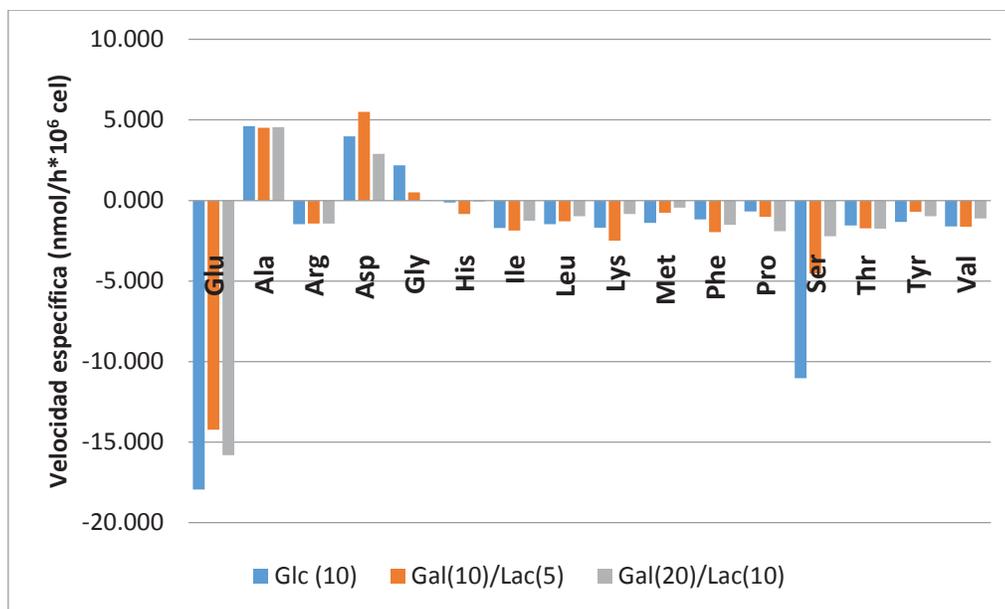


Figura 4.1: Velocidades específicas de consumo/producción de aminoácidos con Glc y Gal/Lac.

Asimismo, otro parámetro de importancia para la realización del análisis de flujos metabólicos es conocer la velocidad específica de producción de amonio, lo cual se presenta en la tabla 4.5, en donde se evidencia magnitudes mucho menores de estas velocidades para las condiciones de cultivo con Gal/Lac en relación a la obtenida para Glc (10). Esto podría tener una relación directa con la velocidad específica de consumo de glutamato, el cual estaría actuando como fuente principal de amonio en el metabolismo. No obstante, no se debe olvidar que el glutamato también realiza aportes a la síntesis de otros metabolitos, tales como a los aminoácidos alanina y aspartato (Lehninger, 1978a), lo que podría explicar la variación existente entre las dos condiciones de Gal/lac en la velocidad específica de producción de amonio, en donde ésta disminuye con el aumento de concentración de hexosa y de la velocidad específica de consumo de glutamato.

Tabla 4.5: Concentración y velocidad específica de producción de amonio

Parámetro	Glc(10)	Gal(10)/lac(5)	Gal(20)/lac(10)
Concentración residual de amonio (mM)	0.435	0.263	0.206
q_{amonio} (nmol/h·10 ⁶ cel)	8.51	4.95	3.59

4.2. ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA CÉLULA

Teniendo en consideración lo explicado en la sección 3.3, se efectuó el cálculo de los coeficientes estequiométricos para las reacciones R₆₇ y R₆₈.

Para calcular los coeficientes de R₆₇, de los datos experimentales recopilados se utilizó la composición obtenida por el promedio de ellos, condición para la cual se obtuvo el menor error entre la fórmula teórica entregada por el balance de contribuciones a las macromoléculas, con sus respectivas fórmulas empíricas estimadas, y la obtenida de forma experimental. Es importante señalar que con dicha finalidad se utilizó el error máximo porcentual. Para ello se realizó el cálculo de error para N, H y O entre la fórmula teórica estimada y la experimental, tomando en consideración el valor máximo entre estos errores obtenidos.

El criterio anteriormente mencionado asegura que la estimación realizada contemple un margen de error que en ningún caso será superior al error máximo, con respecto a las fórmulas teóricas obtenidas para cada condición de cultivo.

R₆₇: 0.0157 Ala + 0.0103 Arg + 0.0140 Asn + 0.0208 Asp + 0.0045 Gln + 0.0269 Glu + 0.0163 Gly + 0.0007 His + 0.0121 Ile + 0.0100 Leu + 0.0087 Lys + 0.0058 Met + 0.0063 Phe + 0.0015 Pro + 0.0179 Ser + 0.0116 Thr + 0.0090 Tyr + 0.0097 Val + 0.8328 ATP -> Proteína Celular

Procedimiento similar se llevó a cabo para efectuar el cálculo de los coeficientes para la reacción R₆₈. En la tabla 4.6 se presenta un resumen de estos resultados, en conjunto con la fórmula empírica estimada para cada uno de ellos:

Tabla 4.6: Valores obtenidos para los coeficientes de la ecuación R_{68}

Componente	Coefficiente	Valor	Fórmula
Proteínas	t	0.734	$CH_{1.97}O_{0.57}N_{0.27}$
ARN	u	0.047	$CH_{1.25}O_{0.25}N_{0.38}$
ADN	v	0.020	$CH_{1.15}O_{0.62}N_{0.39}$
Lípidos	w	0.125	$CH_{1.91}O_{0.23}N_{0.02}$
Polisacáridos	x	0.074	$CH_{1.67}O_{0.83}$

Por otra parte, tal como se señaló en la sección 3.3, se realizó una comparación entre la fórmula obtenida teóricamente a través del análisis de contribuciones de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno por parte de las macromoléculas, y las obtenidas experimentalmente. En la tabla 4.7 se muestra esta situación, en donde el error máximo porcentual corresponde al mayor error obtenido al calcular individualmente cada uno de ellos para los distintos elementos (C, H, N y O) considerando la fórmula experimental como base. Se debe señalar que el peso molecular de las células en condiciones Gal/lac se encuentra dentro de lo reportado para células mamíferas (Europa et al., 2000).

Tabla 4.7: Comparación del error máximo porcentual obtenido para cada condición de cultivo por la fórmula empírica estimada en relación a la obtenida de forma experimental.

Fórmula Teórica estimada: $CH_{1.87}O_{0.53}N_{0.227}$ (PM: 26.8 g/mol)			
Condición de cultivo	Fórmula empírica	Peso Molecular	% Error máximo
Gal(10)/Lac(5)	$CH_{1.78}O_{0.52}N_{0.23}$	25.38 (g/mol)	4.84
Gal(20)/Lac(10)	$CH_{1.73}O_{0.48}N_{0.22}$	24.47 (g/mol)	10.5

4.3. ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS

Teniendo todos estos antecedentes y cálculos realizados en consideración, ya es posible implementar el modelo metabólico, como se describe en la sección 3.4. El listado de los fluxes calculados se encuentra en el apéndice 4.

4.3.1. Análisis del metabolismo central de las células

En primer lugar, se realizará el análisis del metabolismo central, el cual incluye la glicólisis y TCA, que constituye la mayor proporción de los fluxes intracelulares para las células CHO (Altamirano *et al.*, 2000). Los fluxes para Glc (10) fueron recopilados a partir del AFM realizado por Berríos (2008). Los resultados obtenidos para cada condición con los modelos metabólicos propuestos se resumen en los apéndices 4 y 5.

En la tabla 4.8 se resume los valores obtenidos para los fluxes intra y extracelulares (en el caso de la hexosa) para algunas de las reacciones del metabolismo central, a distintas condiciones de cultivo. Las reacciones que se encuentran marcadas en negrita contienen datos para los cuales existió medición de flujos experimental. Asimismo, con la finalidad de poder realizar una mejor comparación, adicionalmente en la tabla 4.9 se presentan estos datos expresados como porcentaje de la velocidad específica de consumo de la hexosa. Es importante señalar que para el caso de R5P, el flux calculado para Glc (10) consideraba como ecuación de síntesis $G3P + 2F6P \Leftrightarrow 3R5P$. Si se realiza una equivalencia en cuanto a cantidad de flux destinado a R5P, es posible apreciar que los valores obtenidos para las tres condiciones se encontrarían en órdenes de magnitud más bien cercanos. No obstante, los porcentajes de flux de hexosa destinados al proceso varían considerablemente, tal como se puede apreciar en la tabla 4.9, siendo el menor para Glc y el mayor para Gal(10)/Lac (5).

Si se observa la figura 4.2, es posible apreciar que el porcentaje de flux de hexosa destinado a síntesis de F6P y G3P (intermediarios de la glicólisis) es menor en las dos condiciones Gal/lac en relación a Glc, siendo más notorio para Gal (10)/Lac (5), en donde se presentan los menores porcentajes en relación a las otras condiciones. Esto lleva a pensar que existiría un redireccionamiento del flux de hexosa traducido en aspectos como un mayor porcentaje de éste dirigido a la síntesis de R5P (R_{15}) y de precursores de azúcares activados para la glicosilación de las proteínas (R_{35} , R_{37} y R_{38}), lo cual podría estar relacionado con una condición de limitación por el azúcar con respecto a las otras condiciones.

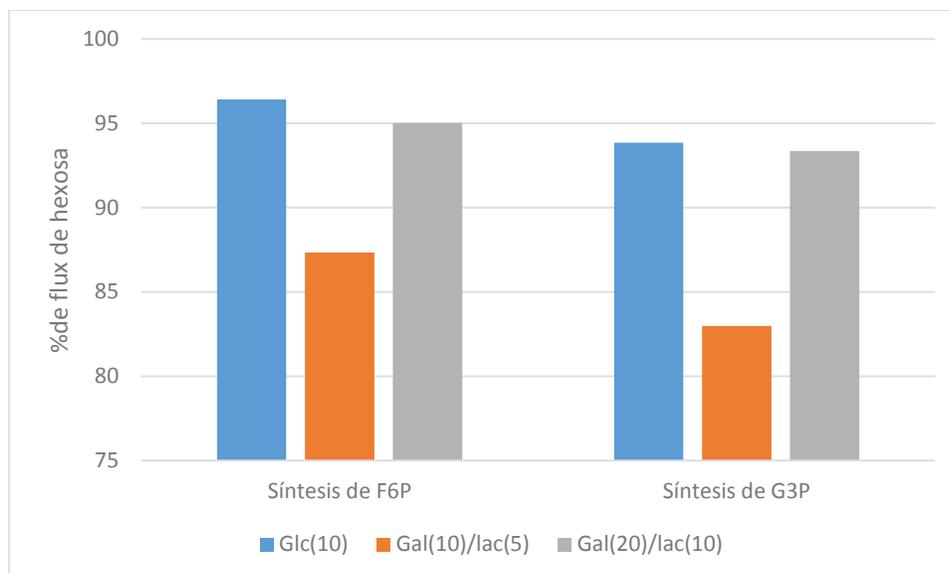


Figura 4.2: Comparación de los porcentajes de flux de hexosa destinados por cada condición a síntesis de F6P y G3P

Por otro lado, analizando la figura 4.3 se puede apreciar que efectivamente existe un mayor porcentaje de flux de hexosa destinado a formación de UDP-Gal, UDP-Glc y Man6P, los cuales participan en el proceso de glicosilación. Asimismo, el porcentaje destinado a síntesis de R5P es mayor para ambas condiciones Gal/lac, en especial para la de menor concentración de hexosa (4.01% para Gal(10)/lac(5)), lo cual corrobora lo anteriormente observado respecto a un redireccionamiento de mayor porcentaje de flux de hexosa hacia síntesis de metabolitos fuera de la glicólisis.

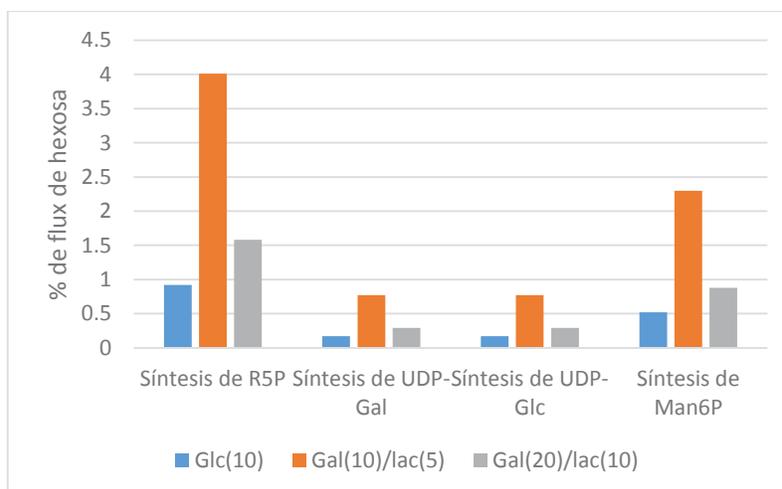


Figura 4.3: Comparación de los porcentajes de flux de hexosa destinados por las distintas condiciones a síntesis de R5P, UDP-Gal, UDP-Glc y Man6P.

Por otra parte, en las reacciones asociadas al lactato (R_9 y R_{59}), para Glc (10) se observa una producción de este metabolito, mientras que para los cultivos con Gal/Lac existe un consumo de aquel. Al analizar los porcentajes de flux de hexosa, es sumamente relevante notar que gran cantidad de éste, en el caso de glucosa, se destina a la producción de lactato y sólo aproximadamente un 38% continúa hacia el TCA; lo anterior claramente no ocurre en las otras condiciones de cultivo, en donde el lactato se integra a la célula con la finalidad de ser metabolizado. Este comportamiento es coherente con lo reportado por Altamirano *et al.* (2006), en donde también se observa un aumento del flux entre dichas reacciones de la red metabólica en presencia de Gal/Lac.

En las siguientes reacciones de la tabla 4.8, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se puede observar un comportamiento similar en lo referente al incremento o descenso de los fluxes en las tres condiciones de cultivo. Algunas de estas variaciones se encuentran relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos, el cual provee metabolitos tales como AcetilCoA, necesario para la síntesis de precursores de la glicosilación y de lípidos, cuyo flux proveniente exclusivamente de la síntesis a partir de piruvato es insuficiente para cubrir todos los requerimientos de la célula. En este caso, el metabolismo de los aminoácidos aporta 7.369 [nmol/h* 10^6 cel] de AcetilCoA en el caso de Gal(10)/lac(5) y 2.956 [nmol/h* 10^6 cel] en Gal(20)/lac(10).

Por otro lado, para α -KG existe una producción a partir del metabolismo de los aminoácidos de 13.249 [nmol/h* 10^6 cel] y 15.151 [nmol/h* 10^6 cel], para Gal(10)/lac(5) y Gal(20)/lac(10), respectivamente, lo cual contribuye a satisfacer la demanda de este intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; mientras que para SuccCoA esta cantidad asciende a 1.147 para Gal(10)/lac(5) y 0.346 [nmol/h* 10^6 cel] para Gal(20)/lac(10), cumpliendo de igual forma la función de ayudar a producir la cantidad necesaria del intermediario en el TCA. El cálculo completo se encuentra detallado en el apéndice 6.

Uno de los metabolitos que podría estar involucrado en las variaciones presentes en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es el glutamato. Tal como se puede observar en el modelo metabólico presentado en la sección 3.2.3, éste es utilizado en la síntesis de Gln y Ala (R_{17} y R_{19}), en el metabolismo del Asp (R_{22}), en la producción de tPA (R_{60}) y de la proteína celular (Lehninger, 1978).

Si se toma como ejemplo el caso de Gal (10)/Lac(5) y se realiza una sumatoria del flux necesario, a partir de los resultados obtenidos, para satisfacer las necesidades de Glu en la célula, se obtiene un requerimiento total de aproximadamente 23.904 [nmol Glu/ h* 10⁶ cel], de los cuales sólo 14.224 [nmol Glu/ h* 10⁶ cel] provinieron del medio extracelular (ver sección 4.1), cantidad insuficiente por sí sola para la mantención del metabolismo de las células, en tanto que los 9.68 [nmol Glu/ h* 10⁶ cel] restantes se generaron a partir del metabolismo de los aminoácidos. Dicho análisis permite observar que esta vía es necesaria para cumplir la demanda de Glu de la célula. Asimismo, en estas reacciones también se produce SuccCoA, AcetilCoA (mencionado con anterioridad) y Mal, entre otros metabolitos de importancia, lo cual influiría en los cambios de los flux en el TCA observados en la tabla 4.8. Para mayores referencias, en el apéndice 7 se encuentra desglosado el cálculo realizado.

Teniendo en consideración que el flux destinado al metabolismo de los aminoácidos en cada una de las condiciones varía, es interesante notar que en la mayoría de las reacciones que tienen como producto algún metabolito que participa en el TCA o glutamato, Gal (10)/Lac(5) es la condición que destina las mayores cantidades de flux (y % del flux de hexosa) a la producción de dichos metabolitos a partir de estas vías, lo cual reafirma el hecho de que las células responderían a una condición de limitación del azúcar en relación a las otras condiciones, ya que requiere destinar mayores porcentajes del flux de hexosa para poder cumplir con la demanda metabólica.

La disminución del flux de malato en el TCA (R₁₃ vs R₁₄), a pesar de la existencia de síntesis a partir de aminoácidos, podría tener explicación en su utilización en la vía anaplerótica para la obtención de piruvato.

Si bien también se encuentra presente como producto en la síntesis de ARN y ADN, el flux obtenido en cada caso no es considerable. Los valores obtenidos sugieren que para Gal (10)/Lac(5) existiría una mayor porcentaje de flux de hexosa destinado a la reacción catalizada por la enzima málica (R₁₆), en relación a las otras condiciones. Esto podría tener relación directa con la síntesis de alanina, cuya velocidad específica de producción (4.8 [nmol/10⁶ cel]), si bien es similar para las tres condiciones, requiere de distintas proporciones del flux de hexosa.

Tabla 4.8: Fluxes para algunas reacciones del metabolismo central a distinta condición de cultivo.

N° de reacción en modelo Gal/Lac	Reacción	Flux Glc (10) (nmol/h*10 ⁶ cel)	Flux Gal 10/Lac 5 (nmol/h*10 ⁶ cel)	Flux Gal 20/Lac 10 (nmol/h*10 ⁶ cel)
R₀ a R₄	Consumo de Hexosa	110.69	22.150	55.570
R₅	G6P ⇌ F6P	108.49	19.347	52.807
R₆	F6P + ATP => 2 G3P	106.73	18.383	51.882
R₇	G3P => PEP	212.65	36.351	103.355
R₈	PEP => Pyr	212.46	36.181	103.192
R₅₉	Lace ⇌ Lac	-142.00	13.330	18.670
R₉	Pyr ⇌ Lac	142.00	-13.330	-18.670
R₁₀	Pyr => AcetilCoA	81.29	52.597	127.191
R₁₁	AcetilCoA + OA => α-KG	74.57	52.187	122.465
R₁₂	α-KG => SuccCoA	90.74	65.436	137.614
R₁₃	SuccCoA ⇌ Mal	91.04	66.883	137.961
R₁₄	Mal => OA	80.55	60.892	128.393
R₁₅	Síntesis de R5P	0.34	0.889	0.879
R₁₆	Pyr ⇌ Mal	-11.71	-7.945	-11.340
R₃₅	F6P ⇌ Man6P	0.570	0.510	0.489

Es interesante señalar que mientras los fluxes en la glicólisis presentan cambios entre las distintas condiciones de cultivo, ciertas rutas como las de síntesis de polisacáridos no muestran grandes variaciones. No obstante, al expresar estos fluxes como porcentaje del flux de hexosa, se puede notar que el porcentaje destinado a polisacáridos en Gal (10)/Lac(5) es aproximadamente 4 veces mayor que con Glc (10) y mucho mayor que con Gal (20)/Lac (10), cuyos valores ascienden a 42.63%, 9.85% y 16.54%, respectivamente (ver apéndice 5).

Tabla 4.9: Fluxes para algunas reacciones del metabolismo central en distintas condiciones de cultivo (expresados como % del flux de la hexosa)

N° de reacción en modelo Gal/Lac	Reacción	Flux Glc (10)	Flux Gal (10)/Lac(5)	Flux Gal (20)/Lac(10)
R ₀ a R ₄	Consumo de Hexosa	100	100	100
R ₅	G6P ⇌ F6P	98.01	87.34	95.03
R ₆	F6P + ATP => 2 G3P	96.42	82.99	93.36
R ₇	G3P => PEP	192.12	164.11	185.99
R ₈	PEP => Pyr	191.94	163.34	185.70
R ₉	Pyr ⇌ Lac	128.29	-60.18	-33.60
R ₁₀	Pyr => AcetilCoA	73.44	237.46	228.88
R ₁₁	AcetilCoA + OA => α-KG	67.37	235.61	220.38
R ₁₂	α-KG => SuccCoA	81.98	295.42	247.64
R ₁₃	SuccCoA ⇌ Mal	82.25	301.91	248.26
R ₁₄	Mal => OA	72.77	274.91	231.05
R ₁₅	Síntesis de R5P	0.30	4.01	1.58
R ₁₆	Pyr ⇌ Mal	-10.58	-35.87	-20.41
R ₃₅	F6P ⇌ Man6P	0.52	2.30	0.88

4.3.2. Análisis del metabolismo energético

Las reacciones R₆₉ y R₇₀ del modelo metabólico dan cuenta de dos aspectos del metabolismo energético: la fosforilación oxidativa y el ATP requerido para la mantención de los procesos celulares.

En la tabla 4.10 se puede observar una comparación de los valores obtenidos para los fluxes del metabolismo energético. En el caso de Gal (10)/Lac(5) se presenta el menor flux de fosforilación oxidativa de las tres condiciones, pudiendo estar esto asociado a la menor cantidad de flux entrante al TCA en comparación a las otras condiciones. Un mayor flujo hacia el TCA incrementaría la producción de equivalentes reductores (NADH), los cuales posteriormente ceden sus electrones al oxígeno como aceptor final (Lehninger, 1978b).

Teniendo en consideración lo anterior, al comparar los fluxes calculados para la fosforilación oxidativa entre las dos condiciones de Gal/Lac, se puede observar que con el incremento de la disponibilidad de hexosa aumenta hasta aproximadamente 2.2 veces la magnitud de la velocidad específica asociada a este proceso, siendo el mayor valor de todas las condiciones. Es posible que el alto flujo existente en la vía glicolítica y en el TCA hayan sido causantes de una mayor producción de equivalentes reductores y, por consiguiente, también de una mayor velocidad específica de consumo de oxígeno, tal como se puede apreciar en la tabla 4.10.

Por otro lado, es importante señalar que el ATP de mantención considerado en el modelo busca tener una idea de la energía disponible para una gran cantidad de procesos celulares, tales como fosforilación de proteínas y mantención del gradiente de concentración de iones (Lodish *et al.*, 2003).

Al observar los valores de los fluxes de ATP de mantención, se puede observar que la menor velocidad específica pertenece a Gal(10)/Lac(5), mientras que Gal(20)/Lac(10) presenta un flux 2.25 veces superior a ésta, lo que en teoría indicaría un aprovechamiento más eficiente de la hexosa y del glutamato en relación a los otros casos.

Asimismo, se debe considerar que también existe una co-metabolización de lactato, lo cual podría influir en cierto modo en el incremento de esta velocidad específica de producción, ya que en el caso de Gal(20)/Lac(10) ingresaría al TCA un mayor flux con respecto a Glc(10).

Tabla 4.10: Fluxes calculados para el metabolismo energético, consumo de O₂ y producción de CO₂ (nmol/h·10⁶ cel)

Proceso	Glc (10)	Gal(10)/Lac(5)	Gal(20)/Lac(10)
Fosforilación oxidativa	454.97	332.23	728.97
ATP Mantención	1315.30	848.48	1907.62
Producción de CO ₂	258.03	181.67	400.80
Consumo de O ₂	230.13	171.74	368.78

Por otro lado, con los valores obtenidos de producción de CO₂ y de consumo de O₂ es posible calcular un parámetro muy importante denominado cociente respiratorio (CR), el cual refleja el estado metabólico de la célula. Para el análisis de flujos metabólicos, se puede utilizar como un indicador de fiabilidad del modelo estequiométrico y de la consistencia de los datos experimentales (Altamirano *et al.*, 2000), definiéndose de la siguiente manera:

$$CR = \frac{\text{Velocidad específica de producción de CO}_2}{\text{Velocidad específica de consumo de O}_2} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Si se observan los cocientes obtenidos para las tres condiciones en la tabla 4.11, además de ser similares en su magnitud, se asemejan a los reportados en diversas publicaciones (Altamirano *et al.*, 2000; Bonarius *et al.*, 1995; Berríos, 2008).

Tabla 4.11: Cálculo del Cuociente respiratorio (CR)

Variable	Glc (10)	Gal(10)/Lac(5)	Gal(20)/Lac(10)
CR	1.12	1.06	1.09

4.3.3. Análisis de la síntesis de macromoléculas

En el modelo metabólico se consideró la síntesis de proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos, representándose cada una a través de una determinada ecuación. Las formas de obtención de los coeficientes en las expresiones que así lo requerían se encuentran detalladas en las secciones 3.3 y 4.2. En la tabla 4.12 se encuentra el resumen de los fluxes obtenidos para la síntesis de las macromoléculas. En general se puede observar que la proporción de macromoléculas en la célula se mantiene relativamente constante al comparar entre los resultados obtenidos para Glc y Gal/Lac.

Tabla 4.12: Fluxes calculados para la síntesis de macromoléculas (nmol/h·10⁶ cel)

Proceso	Glc (10)	Gal(10)/Lac(5)	Gal(20)/Lac(10)
Síntesis de Proteínas	131.47	93.51	92.51
Síntesis de ARN	6.81	5.99	5.92
Síntesis de ADN	2.90	2.55	2.52
Síntesis de Lípidos	18.22	15.93	15.75
Síntesis de Polisacáridos	10.90	9.43	9.33
Síntesis de células	170.30	127.40	126.03

4.3.4. Análisis de los precursores de las glicosilaciones

En la tabla 4.13 se resumen los fluxes relacionados con la síntesis del tPA y de las glicosilaciones en las tres condiciones estudiadas. Al observar los resultados obtenidos, es posible notar que en todos los casos el flux destinado en Glc (10) es mayor respecto a las dos condiciones Gal/Lac. Esto se complementa con los datos mostrados en la tabla 4.4, en donde se evidencia que Glc (10) presenta tanto el mayor nivel de glicosilación de la superficie celular como el mayor grado de sialización y síntesis del tPA, por lo que este comportamiento es coherente con el comportamiento de la célula, ya que se requiere destinar un mayor flux para satisfacer la demanda de estos procesos.

Tabla 4.13: Fluxes calculados para las reacciones de glicosilación y síntesis de tPA (nmol/h·10⁶ cel)

Proceso	Glc (10)	Gal(10)/Lac(5)	Gal(20)/Lac(10)
Síntesis GDP-Man	0.574	0.510	0.489
Síntesis UDP-Gal	0.191	0.170	0.163
Síntesis UDP-Glc	0.191	0.170	0.163
Síntesis UDP-GINAc	0.509	0.454	0.436
Síntesis CMP-NeuAc	0.19	0.17	0.16
Síntesis tPA	0.00016	0.00007	0.00012
Glicosilación Superficie Celular	0.19	0.17	0.16
Sialización tPA	0.00052	0.00022	0.00028

4.3.5. Relación entre el metabolismo energético y las glicosilaciones

La demanda energética para la síntesis de los precursores se puede estimar sumando las moléculas energéticas requeridas para la síntesis de cada una de ellos, comenzando desde una molécula de hexosa (Berríos, 2008). Al observar las reacciones que componen el modelo metabólico, es posible notar que algunos de los precursores que participan en la glicosilación requieren de metabolitos como el PEP o el AcetilCoA, los cuales pueden generar potencialmente hasta 13.5 ATP y 10 ATP, respectivamente (Lehninger, 1978b).

En la figura 4.4 se muestra un resumen de la participación de las moléculas energéticas en la síntesis de GDP-Man, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc y CMP-NeuAc, con la utilización de galactosa como hexosa, pudiendo aplicarse de forma análoga para Glc. La ruta inicia con una molécula de hexosa, la cual se fosforila con gasto de 1 ATP, tras lo cual se da paso a la síntesis de los precursores anteriormente mencionados. Asimismo, en la tabla 4.14 se muestra el total de equivalentes de ATP necesarios para la síntesis de los intermediarios de la glicosilación. Para este fin, se consideró que 1 ATP= 2.5 NADH (ver sección 3.2.3) y que UTP, GTP Y CTP son equivalentes a ATP.

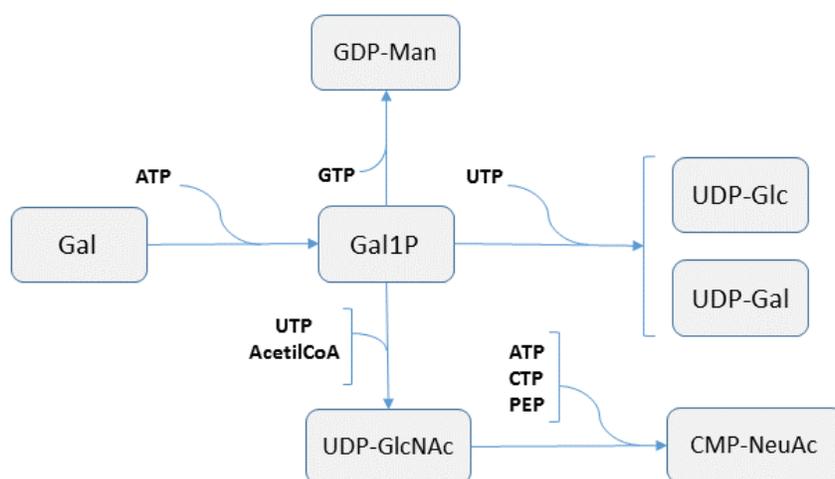


Figura 4.4: Participación de las moléculas energéticas en la síntesis de los intermediarios de las glicosilaciones.

Si se analizan los datos de la tabla 4.14, se desprende que CMP-NeuAc es el precursor que requiere la mayor cantidad de equivalentes de ATP, seguido por UDP-GlcNAc, con un total de 27.5 y 12 equivalentes, respectivamente. Por otro lado, los intermediarios UDP-Glc, UDP-Gal y GDP-Man sólo utilizan 2 equivalentes, lo implica que existe una diferencia considerable con respecto a los otros 2 precursores. Esta diferencia se debe principalmente a la utilización de las moléculas AcetilCoA y PEP en la síntesis, las cuales dejan de producir potencialmente una cantidad considerable de ATP al ser requeridas en estas reacciones.

Tabla 4.14: Equivalentes de ATP utilizados en la síntesis de precursores de la glicosilación

Precursor	Número de moléculas requeridas						Total de equivalentes ATP
	ATP	GTP	UTP	CTP	PEP	AcetilCoA	
UDP-Glc	1	-	1	-	-	-	2
UDP-Gal	1	-	1	-	-	-	2
UDP-GlcNAc	1	-	1	-	-	1	12
CMP-NeuAc	2	-	1	1	1	1	27.5
GDP-Man	1	1	-	-	-	-	2

Es importante tener en consideración que la demanda de cada uno de los intermediarios es diferente, lo cual se traduce en velocidades específicas de síntesis diferentes, tal como se pudo apreciar en la tabla 4.13. Por consiguiente, para calcular el requerimiento energético no sólo se necesita obtener el número total de equivalentes de ATP para cada uno de los precursores, sino que también se debe considerar estas velocidades específicas.

En la tabla 4.15 se presenta la estimación realizada del flux de equivalentes de ATP requeridos en la síntesis de los azúcares activados, para cada condición. La síntesis de UDP-GlcNAc necesita aproximadamente 6 veces la energía requerida para GDP-Man, y más de 15 veces la energía para UDP-Glc y UDP-Gal; mientras que la síntesis de CMP-NeuAc utiliza 13 veces la cantidad necesaria de energía para generar cada uno de ellos.

Tabla 4.15: Flux de equivalentes de ATP utilizados en la síntesis de azúcares activados.

Precursor	Flux de equivalentes de ATP [nmol/ h* 10 ⁶ cel]		
	Glc (10)	Gal(10)/Iac(5)	Gal(20)/Iac(10)
UDP-Glc	0.382	0.340	0.326
UDP-Gal	0.381	0.340	0.326
UDP-GlcNAc	6.110	5.448	5.232
CMP-NeuAc	5.258	4.675	4.483
GDP-Man	1.147	1.020	0.978

Es importante analizar si existe alguna relación entre las glicosilaciones del tPA y el metabolismo energético de la célula. Como antecedente, en la figura 4.5 se puede observar los fluxes de tPA, de ácido siálico destinado al tPA y la razón AS:tPA, todo esto en función del ATP de mantención, para glucosa. Berríos (2008) establece que si bien el menor flux de tPA y de ácido siálico no coincide con el menor flux de ATP de mantención, esta relación sí se cumple en el caso del grado de sialización (razón AS:tPA), en donde es directamente proporcional.

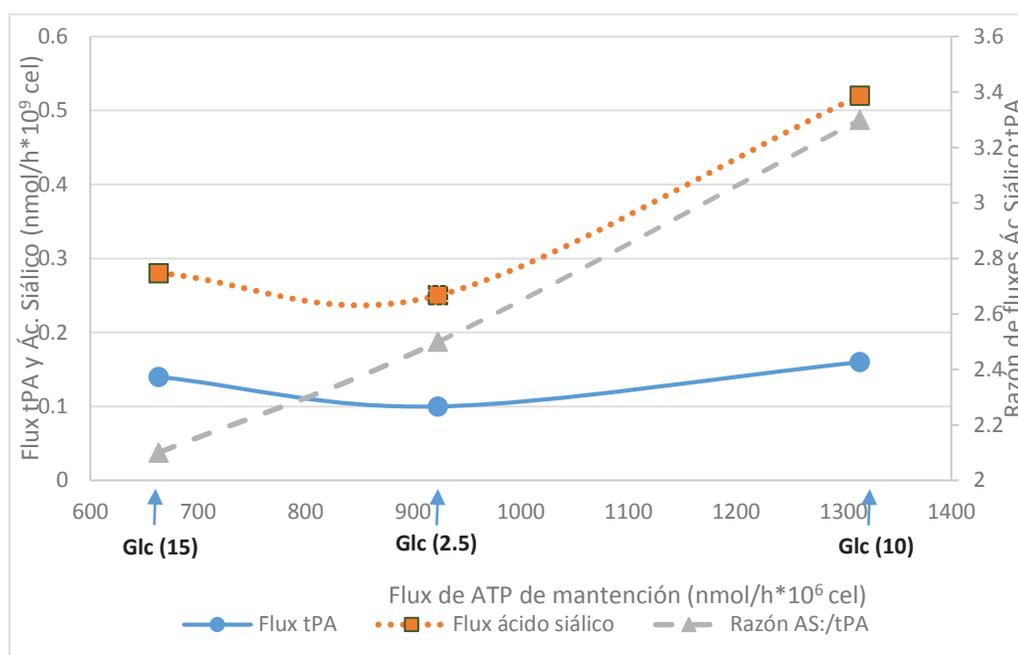


Figura 4.5: Relación entre el flux de ATP de mantención y la producción de tPA, ácido siálico para el tPA y la razón AS:tPA para cultivos en presencia de glucosa (Adaptado de Berríos, 2008)

Por otro lado, en la figura 4.6 se puede observar la relación previamente descrita, esta vez para las dos condiciones Gal-Lac, en conjunto con Glc (10). Es interesante notar que en este caso, las 3 variables muestran un comportamiento directamente proporcional en Gal/Lac: el menor flux de tPA, ácido siálico en el tPA y la menor razón AS:tPA se encuentran en la condición Gal (10)/Lac(5), mientras que los mayores valores se encuentran en Gal (20)/Lac(10). Algo interesante en notar es que estas variables aumentan conforme lo hacen la concentración de hexosa y el flux de ATP de mantención, correlación que no se observa en presencia de glucosa al considerar las tres condiciones presentadas en la figura 4.3.

Asimismo, es interesante notar que entre las condiciones de Glc (2.5) y Glc (10) la relación observada para Gal-Lac sí se cumple, mientras que para Glc (15) se produce una disminución en los valores obtenidos para estos parámetros, lo cual podría explicarse por una respuesta diferenciada de la célula a tales concentraciones de hexosa. Por consiguiente, existe la posibilidad de que si se hubieran utilizado concentraciones más altas de Gal-Lac, se pudiese haber observado un comportamiento análogo al de la figura 4.3; no obstante, para corroborar esta hipótesis sería necesario realizar mediciones experimentales a mayores concentraciones de las utilizadas.

Por otra parte, se puede observar que para Glc (10) mM, si bien existe un menor flux de ATP de mantención en relación a la condición de Gal (20)/Lac (10), existe un mayor flux de producción de tPA, así como un mayor grado de sialización de esta proteína recombinante. Esto podría deberse a la menor velocidad específica de consumo de hexosa existente en presencia de Gal/Lac, lo cual afecta la disponibilidad de la hexosa dentro de la célula, causando que ésta priorice el funcionamiento de las vías y síntesis de metabolitos que sean esenciales para su supervivencia, causando que el flux destinado a la producción de la proteína se vea afectado negativamente.

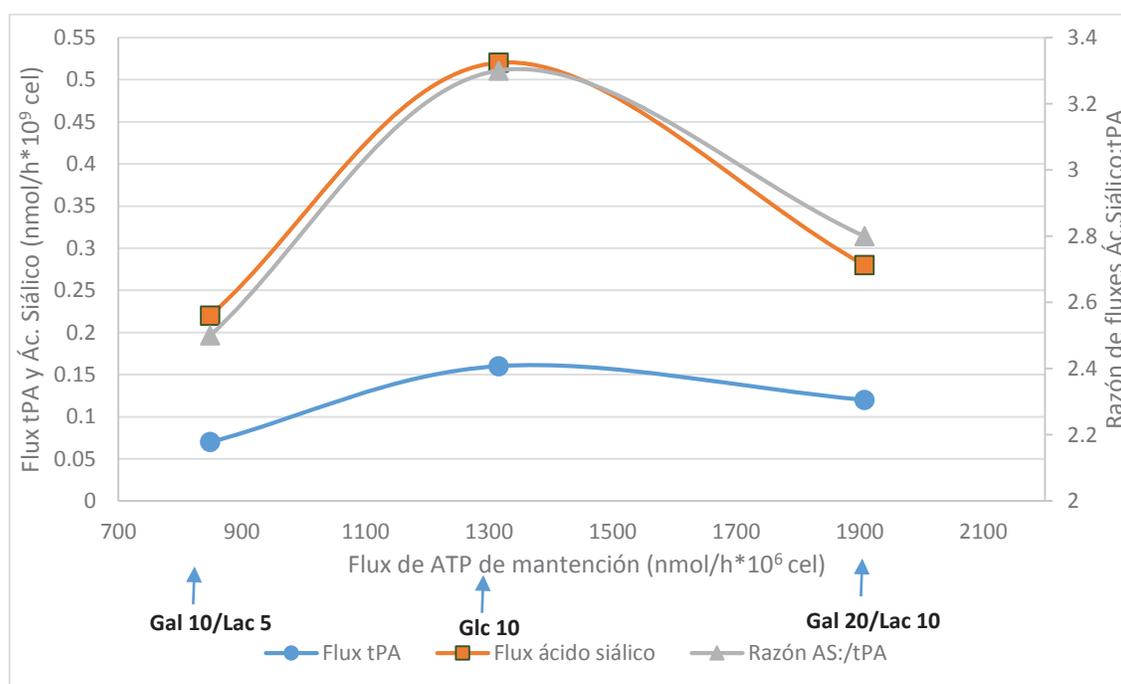


Figura 4.6: Relación entre el flux de ATP de mantención y la producción de tPA, ácido siálico para el tPA y la razón AS:tPA para cultivos en presencia de Gal- Lac y Glc (10).

En síntesis, el grado de glicosilación, la producción de tPA y de ácido siálico para el tPA podrían tener relación no sólo con la disponibilidad energética, sino que también con las velocidades específicas de consumo de hexosa, pudiendo existir un comportamiento diferenciado de la célula a altas concentraciones de hexosa.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

Abreviaciones

Gal: Galactosa

Glc: Glucosa

Lac: Lactato

tPA: Activador del plasminógeno tisular

Símbolos

D: velocidad de dilución del cultivo (h^{-1})

N_v : concentración de células viables (10^5 cel/ml o 10^6 cel/ml)

N_T : concentración de células totales (10^5 cel/ml o 10^6 cel/ml)

PV: Porcentaje de viabilidad

q_i : velocidad específica de consumo/producción del metabolito i ($\text{nmol/h}\cdot 10^6$ cel)

X_T : concentración de biomasa total (g/L)

X_v : concentración de biomasa viable (g/L)

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

5. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se mostraron los resultados obtenidos por el modelo metabólico establecido a partir de los datos recopilados para dos condiciones de cultivo Gal/Lac, los cuales fueron comparados con los valores obtenidos para cultivos en Glc (10) mM, estableciéndose las principales diferencias en la distribución de los fluxes intracelulares entre las tres condiciones y cómo estas variaciones afectaban la producción de la proteína recombinante. Se constató que el reemplazo de glucosa por galactosa-lactato produce una modificación a nivel del metabolismo celular, traducido en cambios en los fluxes intracelulares en la glicólisis, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en el metabolismo de los aminoácidos. Este último actúa como proveedor de importantes intermediarios del TCA, cuya demanda no se logra satisfacer exclusivamente por dicha vía debido a que también son requeridos en síntesis de otros metabolitos, como ácidos grasos o precursores de la glicosilación. Asimismo, se evidenció que un aumento de la concentración Gal/lac disminuía la necesidad de la utilización del metabolismo de los aminoácidos para generar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Por otro lado, los resultados mostraron que el incremento en la concentración de galactosa-lactato se traduce en un aumento en la producción de la proteína recombinante y en un mayor grado de sialización de ésta. No obstante, los valores obtenidos para las dos condiciones de cultivo Gal/Lac fueron menores a los reportados para Glc (10), pudiendo esto estar relacionado con la menor velocidad específica de consumo de hexosa evidenciada en ambos casos, lo cual afecta la disponibilidad de hexosa para la síntesis de metabolitos esenciales en la célula, disponiendo ésta de menores recursos en relación a los cultivos en glucosa para la producción de aquellos metabolitos que considera no tan esenciales para su supervivencia, como lo es la proteína recombinante deseada.

Finalmente, se pudo establecer una relación directa entre el metabolismo energético y los parámetros de flux de tPA, flux de ácido siálico y la relación ácido siálico:tPA para las condiciones Gal/Lac estudiadas. Como materia de investigación, sería de interés a futuro evaluar condiciones que consideren mayores concentraciones de galactosa y lactato, con la finalidad de constatar si existe un comportamiento análogo al observado en glucosa, lo cual podría ser de gran interés para ayudar a optimizar el proceso de producción de proteínas recombinantes en células CHO.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, C., Cairó, J.J., Gòdia, F. & Paredes C. (2000).Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. *Biotechnology Progress*, 16, 69-75.
- Altamirano, C., Cairó, J.J., Casablanco, A., Gámez, X., Gòdia, C. & Illanes, A. (2001). Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17, 1032-1041.
- Altamirano, C., Becerra, S., Cairó, J.J., Gòdia, F. & Illanes, A. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125, 547-556.
- Alves, P.M., Carrondo, M.J.T., Cruz, H.J., Freitas, C.M. & Moreira, J.L. (2000).Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 43-52.
- Atlante, A., Bari, L., Passarella, S. & Valenti, D. (2002). L-lactate transport into rat heart mitochondria and reconstruction of the l-lactate/pyruvate shuttle. *Biochemical Journal*, 364, 101–104.
- Atlante, A., Bari L., Passarella, S., Paventi, G., Pizzuto, R. & Valenti, D. (2008). Mitochondria and l-lactate metabolism. *FEBS Letters* 582, 3569–3576.
- Baggetto, L. G. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, 74: 959-974.
- Bakker, B., Michels, P., Opperdoes, F. & Westerhoff, H., (2000). Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs.*Molecular and Biochemical Parasitology*, 106, 1-10.
- Baldi L., Hacker D.L., Matasci, M. & Wurm F. M. (2009). Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5, 37-42.
- Baldecchi, A. (2013). *Caracterización De Clones De Células CHO Productoras De IGG Mediante Análisis Metabólico y Expresión Transcripcional*. Tesis de grado no publicada, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Barnes, L., Bentley, C. & Dickson, A. (2003). Stability of Protein Production From Recombinant Mammalian Cells.*Biotechnology and Bioengineering*, 81, 751-765.
- Bartley, C., Del Arco, A., Maechler, P., Rubi, B. & Satrustegui, J. (2004). The malate-aspartate NADH shuttle member Aralar1 determines glucose metabolic fate, mitochondrial activity, and insulin secretion in beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 55659-55666.

- Berríos, J. (2008). *Efecto del tipo de concentración de fuente de carbono sobre la síntesis y glicosilación del tPA producido en células CHO*. Tesis doctoral no publicada, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Biopharma (2009). *U.S. Approvals, 2002-present*. Extraído el 10 de junio del 2014 desde <http://www.biopharma.com/approvals.html>
- Bonarius, H., de Gooijer, C., Tramper, J. & Schmid, G. (1995). Determination of the Respiration Quotient in Mammalian Cell Culture in Bicarbonate Buffered Media. *Biotechnology and Bioengineering*, 45:524-535.
- Bonarius, H., Ozemre, A., Timmerarends, B., Skrabal, P., Tramper, J., Schmid, G. & Heinzle, E. (2001). Metabolic-Flux Analysis of Continuously Cultured Hybridoma Cells Using $^{13}\text{CO}_2$ Mass Spectrometry in Combination with ^{13}C -Lactate Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Metabolite Balancing. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 528-538.
- Bouzier-Sore, A., Canioni, P. & Merle, M. (2001). Effect of Exogenous Lactate on Rat Glioma Metabolism. *Journal of Neuroscience Research*, 65, 543-548.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 283-291.
- Butler, M. & Durocher, Y. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 700-707.
- Campbell, M. & Farrell, S. (2003a). La glucólisis. *Bioquímica* (pp. 463-485), 4° edición. México: Editorial Thomson.
- Campbell, M. & Farrell, S. (2003b). Los mecanismos de almacenamiento y control en el metabolismo de los carbohidratos. *Bioquímica* (pp. 506-511), 4° edición. México: Editorial Thomson.
- Cairó, J., Gòdia, F., Paredes, C. & Sanfeliu, A. (1997). Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 421-428.
- Cairó, J. & Gòdia, F. (2002). Metabolic Engineering of Animal Cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24, 289-298.
- Cayli, A., Hauser, H., Hirschmann, F., Wagner, R. & Wirth, M. (1999). Cell Lines With Reduced UDP-N-Acetylhexosamine Pool in the Presence of Ammonium. *Biotechnology and Bioengineering*, 65, 192-200.
- Chen, G., Fann, C., Guirgis, F., Lao, M. & Piret, J. (2000). Limitations to the Amplification and Stability of Human Tissue-Type Plasminogen Activator Expression by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 204-212.

- Chen, K., Liu, Q., Sharp, P. A., Wang D. & Xie, L. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 55-61.
- Couturier, M., Delhotal, B., Gautier, M., Lemmonier, A., Lemmonier, F. & Wolfram, C. (1984) Comparative use of fructose and glucose in human liver and fibroblastic cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 20, 699-706.
- Cox, M. & Nelson, D. (2004) en *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª Edición, W.H. Freeman.
- Crawford, Y., Joly, J., Leach, K., Meier, A., Ng, D., Pynn, A.F.J., Shen, A., Snedecor, B., Tung, J., Vijayasankaran, N., Yuk, I.H. & Zhou, M. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Biotechnology*, 153, 27–34.
- Dávila, I., Estrada, S., Ortega, A. & Tavira C. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40, 35-46.
- Drago, M. & Sainz, T. (2006) Sistemas de expresión de proteínas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 38-42.
- Eigenbrodt, E., Fister, P. & Reinacher, M. (1985). New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells, En: Beitner, R. ed. *Regulation of carbohydrate metabolism* (pp. 141-179.). Boca Raton: CRC Press.
- Europa, A., Gambhir, A., Fu, P., & Hu, W. (2000). Multiple Steady States with Distinct Cellular Metabolism in Continuous Culture of Mammalian Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67:25-34.
- Fell, D.A. & Snell, K. (1990) Metabolic Control Analysis of Mammalian Serine Metabolism. *Advances in Enzyme Regulation*, 30, 13-32
- Ferrari, J., Gunson, J., Krummen, L., Lofgren, J. & Warner, T. (1998). Chinese Hamster Ovary Cells with Constitutively Expressed Sialidase Antisense RNA Produce Recombinant DNase in Batch Culture with Increased Sialic Acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 589-595.
- Fiers, W., Goossens, V. & Grooten, J. (1996). The Oxidative Metabolism of Glutamine. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 192-196.
- Frey, P. (1996). The Leloir Pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB Journal*, 10, 461-470.
- Gálvez, F.J. (2009). *Ácidos Nucleicos*. Extraído el 27 de enero del 2015, desde la Universidad Politécnica de Valencia. Sitio web: <http://goo.gl/7iLtY4>

- Gambhir, A., Korke, R., Lee, J., Fu, P., Europa, A. & Hu, W. (2003). Analysis of Cellular Metabolism of Hybridoma Cells at Distinct Physiological States. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 317-327.
- Greenhouse, W. & Lehninger, A. (1976). Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. *Cancer Research*, 36, 1392-1396.
- Hardie, D. (2000). Metabolic Control: A new Solution to an Old Problem. *Current Biology*, 10, R757-R759.
- Heijden, J. J. & van Gulik, W. M. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 681-698.
- Hesse, F. & Wagner, R. (2000). Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *TIBTECH*, 18, 173-180.
- Hobbs, G. & Hoskisson, P. (2005). Continuous Culture- making a comeback? *Microbiology*, 151, 3153-3159.
- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J. & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 238-246.
- Jayapal, K., Hu, W., Wlashing, K. & Yap, M. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103, 40-47.
- Jørgensen, H., Mølgaard, H., Nielsen, J. & Villadsen, J. (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 117-131.
- Karp, G. (1998). En: *Biología Celular y Molecular*. México: Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Klamt, S., Schuster, S. & Giles, E. (2002). Calculability Analysis in Underdetermined Metabolic Networks Illustrated by a Model of central metabolism in Purple Nonsulfur Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 734-751.
- Kennell, D., Reitzer, L. & Wice, B. (1979). Evidence that Glutamine, not Sugar, is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 254, 2669-2676.
- Kim, S.H. & Lee, G.M. (2007). Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 659-665.
- Klapa, M. & Lai, K. (2004). Alternative pathways of galactose assimilation: could inverse metabolic engineering provide an alternative to galactosemic patients? *Metabolic Engineering*, 6, 239-244.

- Lee, D.-Y., Yun, H., Lee, S.Y. & Park, S. (2003). MetaFluxNet: the management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis. *Bioinformatics*, 19, 2144–2146.
- Lehninger, A. (1978a). Degradación oxidativa de los aminoácidos. En *Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular*(pp. 571-597). Barcelona: Ediciones Omega.
- Lehninger, A. (1978b). Ciclo de los ácidos tricarbónicos y ruta del fosfogluconato. En *Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular* (pp. 453-483). Barcelona: Ediciones Omega.
- Lim, Y., Wong, N.S.C., Lee, Y.L., Ku, S.C.Y., Wong, D.C.F. & Yap, M.G.S. (2010) Engineering mammalian cells in bioprocessing - current achievements and future perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55, 175-189.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. & Darnell, J. (2003). En: *Molecular Cell Biology* (5ª Edición). Londres: W. H. Freeman.
- Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A. & Li, F. (2011). Comparative Metabolite Analysis to Understand Lactate Metabolism Shift in Chinese Hamster Ovary Cell Culture Process. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 146-156.
- Macheda, M.L., Rogers, S. & Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 202, 654-662.
- Marison, I.W., Schneider, M. & Von Stockar, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46, 161-185.
- Martens, D. (2007). Metabolic Flux Analysis of Mammalian Cells. En: Al-Rubeai & Fussenegger, M. (ed). *Systems Biology* (pp. 275-299), Springer.
- Moreira, M., Akesson, M. & Nielsen, J. (2004). Metabolic Flux Analysis in the Post Genomic Era. En: Kholodenko & Westerhoff (ed.). *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era* (pp. 89-103). Inglaterra: Horizon Bioscience.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A. & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274, 1393-1418.
- Neermann, J. & Wagner, R. (1996). Comparative Analysis of Glucose and Glutamine Metabolism in Transformed Mammalian Cell Lines, Insect and Primary Liver Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 166, 152-169.
- Nielsen, J., Nissen, T. L., Schulze, U. & Villadsen, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143, 203-218.
- Omasa, T., Onitsuka, M. & Kim, W.D. (2010). Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 233-240.

- Páez-Lerma, J. & Soto-Cruz, O. (2005). Balances en Procesos de Fermentación: Análisis de Consistencia y de Flujos Metabólicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4, 59-74.
- Ryll, T., Valley, U. & Wagner, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 184-193.
- Schröder, M. (2008). Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnology Letters*, 30, 187-196.
- Schuster, S. (1999). Use and Limitations of Modular Metabolic Control Analysis in Medicine and Biotechnology. *Metabolic Engineering*, 1, 232-242.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 1, 1-11.
- Stephanopoulos, G. & Vallino, J. J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 252, 1675-1681.
- Sunley, K. & Butler, M. (2010). Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology Advances*, 28, 385-394.
- Teherán, J. (2013). *Los procesos bioquímicos en las enfermedades crónicas*. Extraído el 11 de junio del 2014, desde Qisoma Sitio web: <http://goo.gl/HwSxub>
- UIC (2011). *Biological Membranes and the Cell Surface*. Extraído el 27 de enero del 2015, desde <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/membranes.htm>
- van der Heijden, R., van der Heijden, J., Hellinga, C., Romein, B & Luyben, K. (1994) Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I. Classification of the Calculability and the Balanceability of Conversion Rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 3-10.
- Vogt, A., Nef, H., Schaper, J., Poolman, M., Fell, D., Kubler, W. & Elsasser, A. (2002). Metabolic control analysis of anaerobic glycolysis in human hibernating myocardium replaces traditional concepts of flux control. *FEBS Letters*, 517, 245-250.
- Wagner, R. (1997a). Genetic Manipulation of Mammalian Cells. En: Hauser, H. and Wagner, R. (ed.). *Mammalian cell biotechnology in protein production* (pp. 88-89). Berlín: Walter de Gruyter.
- Wagner, R. (1997b). Metabolic Control of Animal Cell Culture Processes. En: Hauser, H. and Wagner, R. (ed.). *Mammalian cell biotechnology in protein production* (pp. 194-276). Berlín: Walter de Gruyter.
- Zhong, X. & Somers, W. (2012). Recent Advances in Glycosylation Modifications in the Context of Therapeutic Glycoproteins. En: Eastwood, H. (ed.). *Integrative Proteomics* (pp. 183-196). INTECH Open Access Publisher.

APÉNDICE 1: LISTA DE METABOLITOS DEL MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

a) Metabolitos extracelulares:

Simbología	Nombre	Simbología	Nombre
Alae	Alanina	Leue	Leucina
Arge	Arginina	Lyse	Lisina
Asne	Asparagina	Met	Metionina
Aspe	Aspartato	NeuAc tPA	Ácido siálico en tPA
Cell	Célula	NH3e	Amonio o amoníaco
CO2e	Dióxido de carbono	O2e	Oxígeno molecular
Gale	Galactosa	Phee	Fenilalanina
Glue	Glutamato	Proe	Prolina
Glycos cell sur	Glicosilación superficie celular	Sere	Serina
Glye	Glicina	Thre	Treonina
Hise	Histidina	tPA	Activador del plasminógeno tisular
Ilee	Isoleucina	Tyre	Tirosina
Lace	Lactato	Vale	Valina

b) Metabolitos intracelulares

Simbología	Nombre	Simbología	Nombre
AcetilCoA	Acetil-coenzima A	Leu	Leucina
ADN	Ácido desoxiribonucleico	Lípidos	Lípidos
α-KG	α -cetoglutarato	Lys	Lisina
Ala	Alanina	Mal	Malato
Arg	Arginina	Man6P	Manosa-6-Fosfato
ARN	Ácido ribonucleico	Met	Metionina
Asn	Asparagina	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Asp	Aspartato	NH3	Amonio o amoníaco

Simbología	Nombre	Simbología	Nombre
ATP	Adenosín Trifosfato	O2	Oxígeno molecular
CMP-NeuAc	CMP-Ácido Neuramínico o CMP-Ácido Siálico	OA	Oxalacetato
		PEP	Fosfoenolpiruvato
CO2	Dióxido de carbono	Phe	Fenilalanina
F6P	Fructosa-6-Fosfato	Polisacáridos	Polisacáridos
G3P	Gliceraldehido-3-Fosfato	Pro	Prolina
G6P	Glucosa-6-Fosfato	Proteína	Proteína celular
Gal	Galactosa	Pyr	Piruvato
Gal1P	Galactosa-1-Fosfato	R5P	Ribosa-5-Fosfato
GDP-Man	GDP-Manosa	Ser	Serina
Gln	Glicina	SuccCoA	Succinil-Coenzima A
Glu	Glutamato	Thr	Treonina
Gly	Glicina	Tyr	Tirosina
His	Histidina	UDP-Gal	UDP-Galactosa
Ile	Isoleucina	UDP-Glc	UDP-Glucosa
Lac	Lactato	Val	Valina

APÉNDICE 2: LISTADO DE REACCIONES DEL MODELO METABÓLICO

Nombre		Reacción	M/C*
R ₀		Gale \leftrightarrow Gal	M
R ₁		Gal+ ATP => Gal1P	C
R ₂		Gal1P + ATP \leftrightarrow UDP-Gal	C
R ₃		Gal1P \leftrightarrow G6P	C
R ₄	Vía de Leloir	Gal1P + ATP \leftrightarrow UDP-Glc	C
R ₅		G6P \leftrightarrow F6P	C
R ₆		F6P + ATP => 2 G3P	C
R ₇	Glicólisis	G3P => PEP + ATP + NADH	C
R ₈		PEP => Pyr + ATP	C
R ₉	Formación de lactato	Pyr + NADH \leftrightarrow Lac	C
R ₁₀	Conversión a AcetilCoA	Pyr => AcetilCoA + CO ₂ + NADH	C
R ₁₁		AcetilCoA + OA => α -KG + NADH+ CO ₂	C
R ₁₂	Ciclo de los Ácidos	α -KG => SuccCoA+ NADH + CO ₂	C
R ₁₃	Tricarboxílicos	SuccCoA \leftrightarrow 0.6 NADH + Mal	C
R ₁₄	(TCA)	Mal => OA + NADH	C
R ₁₅	Vía de las Pentosas Fosfato	G6P \leftrightarrow R5P + 2 NADH + CO ₂	C
R ₁₆	Vía Anaplerótica	Pyr + NADH+ CO ₂ \leftrightarrow Malato	C
R ₁₇		Glu + NH ₃ => Gln	C
R ₁₈	Metabolismo de los Aminoácidos	Glu => NH ₃ + α -KG + NADH	C
R ₁₉		Glu + Pyr \leftrightarrow α -KG + Ala	C
R ₂₀		Ser => Pyr + NH ₃	C
R ₂₁		Ser \leftrightarrow Gly	C

R ₂₂	Metabolismo de los Aminoácidos	Asp + α-KG ⇌ Glu + OA	C
R ₂₃		Asn => Asp + NH ₃	C
R ₂₄		His => Glu + 2 NH ₃ + CO ₂ + NADH	C
R ₂₅		Arg + α-KG ⇌ 2 Glu + CO ₂ + 2 NH ₃ + NADH	C
R ₂₆		Pro ⇌ Glu + 2 NADH	C
R ₂₇		Ile + α-KG + ATP => Glu + AcetilCoA + SuccCoA + 2.6 NADH	C
R ₂₈		Val + α-KG + O ₂ => CO ₂ + Glu + SuccCoA + 3 NADH	C
R ₂₉		Met + Ser + O ₂ => SuccCoA + 2 NH ₃ + Pyr + NADH	C
R ₃₀		Thr => Gly + NADH + AcetilCoA	C
R ₃₁		Phe + O ₂ + NADH => Tyr	C
R ₃₂		Tyr + α-KG + 2 O ₂ => CO ₂ + Glu + 2 AcetilCoA + Mal	C
R ₃₃		Lys + 2 α-KG => 2 Glu + 2 AcetilCoA + 3 NADH	C
R ₃₄		Leu + α-KG + ATP + SuccCoA => Glu + 3 AcetilCoA + CO ₂ + 2.2 NADH	C
R ₃₅		Glicosilaciones	F6P ⇌ Man6P
R ₃₆	Man6P + ATP -> GDP-Man		C
R ₃₇	F6P + NH ₃ + ATP + AcetilCoA -> UDP-GlcNAc		C
R ₃₈	UDP-GlcNAc + 2 ATP + PEP -> CMP-NeuAc		C
R ₃₉	Transporte de Aminoácidos	Alae ⇌ Ala	M
R ₄₀		Arge -> Arg	M
R ₄₁		Aspe ⇌ Asp	M
R ₄₂		Glue -> Glu	M
R ₄₃		Glye ⇌ Gly	M
R ₄₄		Hise -> His	M
R ₄₅		Ilee -> Ile	M
R ₄₆		Leue -> Leu	M

R ₄₇	Transporte de Aminoácidos	Lyse -> Lys	M
R ₄₈		Mete -> Met	M
R ₄₉		Phee -> Phe	M
R ₅₀		Proe -> Pro	M
R ₅₁		Sere -> Ser	M
R ₅₂		Thre -> Thr	M
R ₅₃		Tyre -> Tyr	M
R ₅₄		Vale -> Val	M
R ₅₅		Asne -> Asn	C
R ₅₆	Transporte de gases	CO ₂ => CO ₂ e	C
R ₅₇		NH ₃ => NH ₃ e	M
R ₅₈		O ₂ => O ₂ e	C
R ₅₉	Ingreso del lactato	Lace ⇌ Lac	M
R ₆₀	Síntesis y glicosilación del tPA	36 Ala + 40 Arg + 22 Asn + 29 Asp + 27 Gln + 27 Glu + 46 Gly + 17 His + 20 Ile + 43 Leu + 22 Lys + 7 Met + 30 Pro + 50 Ser + 24 Tyr + 28 Val + 18 Phe + 22.37 GDP-Man + 3.47 UDP-Gal + 7.46 UDP-Glc + 8.44 UDP-GlcNAc -> tPAe	M
R ₆₁		CMP-NeuAc => NeuAc tPA	M
R ₆₂	Glicosilación de la superficie celular	CMP-NeuAc + 3 GDP-Man + UDP-Gal + UDP-Glc + 1.67 UDP-GlcNAc => Glycos cell surface	M
R ₆₃	Síntesis de ARN	0.137 Asp + 0.053 CO ₂ + 0.158 Gln + 0.053 Gly + 0.042 NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.105 R5P + 0.632 ATP=> ARN + 0.158 Glu + 0.084 Mal + 0.021 NADH	C

R₆₄	Síntesis de ADN	0.133 Asp + 0.051 CO ₂ + 0.153 Gln + 0.051 Gly + 0.163 NADH + 0.0421NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.102 R5P + 0.612 ATP=> ADN + 0.153 Glu + 0.082 Mal	C
R₆₅	Síntesis de lípidos	0.46 AcetilCoA + 0.051 O ₂ + 0.026 G3P + 0.41 ATP + 0.9 NADH =>Lípidos	C
R₆₆	Síntesis de Polisacáridos	0.056 ATP + 0.167 G6P =>Polisacáridos	C
R₆₇	Síntesis de proteínas	a Ala + b Arg + c Asn + d Asp + e Gln + f Glu + g Gly + h His + i Ile + j Leu + k Lys + l Met + m Phe + n Pro + o Ser + p Thr + q Tyr + r Val + s ATP -> Proteína Celular	C
R₆₈	Composición de la célula	t Proteína celular + u ARN + v ADN + w Lípidos + x Polisacáridos => Célula	M
R₆₉	Fosforilación oxidativa	½ O ₂ + NADH => 2.5 ATP	C
R₇₀	Mantención de la célula	ATP => Mantención	C

M*: flux medido, C*: flux calculado

APÉNDICE 3: CONCENTRACIONES DE ENTRADA Y RESIDUALES (EN ESTADO ESTACIONARIO) DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Entrada (mM)	Residuales (mM)		
	Biopro	Glc (10)	Gal 10/Lac 5	Gal20/Lac 10
Glu	5.17	4.214	4.410	4.261
Ala	0.056	0.302	0.297	0.318
Arg	1.19	1.112	1.114	1.108
Asp	0.726	0.938	1.020	0.893
Gly	0.467	0.584	0.494	0.468
His	0.646	0.639	0.602	0.643
Ile	0.649	0.558	0.550	0.577
Leu	0.611	0.533	0.542	0.555
Lys	2.74	2.650	2.607	2.692
Met	0.235	0.161	0.195	0.209
Phe	0.364	0.301	0.259	0.277
Pro	0.705	0.669	0.651	0.596
Ser	1.159	0.571	0.917	1.032
Thr	0.672	0.590	0.580	0.572
Tyr	0.442	0.371	0.404	0.386
Val	0.589	0.503	0.502	0.525

APÉNDICE 4: FLUXES CALCULADOS PARA GAL/LAC EN LA ALIMENTACIÓN

N°	Reacción	Flux Gal(10)/Lac(5) (nmol/h*10 ⁶ cel)	Flux Gal(20)/Lac(10) (nmol/h*10 ⁶ cel)
R ₀	Gale ⇌ Gal	22.150	55.570
R ₁	Gal+ ATP => Gal1P	22.150	55.570
R ₂	Gal1P + ATP ⇌ UDP-Gal	0.170	0.163
R ₃	Gal1P ⇌ G6P	21.810	55.244
R ₄	Gal1P + ATP ⇌ UDP-Glc	0.170	0.163
R ₅	G6P ⇌ F6P	19.347	52.807
R ₆	F6P + ATP => 2 G3P	18.383	51.882
R ₇	G3P => PEP + ATP + NADH	36.351	103.355
R ₈	PEP => Pyr + ATP	36.181	103.192
R ₉	Pyr + NADH ⇌ Lac	-13.330	-18.670
R ₁₀	Pyr => AcetilCoA + CO ₂ + NADH	52.597	127.191
R ₁₁	AcetilCoA + OA =>α-KG + NADH +CO ₂	52.187	122.465
R ₁₂	α-KG => SuccCoA+ NADH + CO ₂	65.436	137.614
R ₁₃	SuccCoA ⇌ 0.6 NADH + Mal	66.883	137.961
R ₁₄	Mal => OA + NADH	60.892	128.393
R ₁₅	G6P ⇌ R5P + 2 NADH +CO ₂	0.889	0.879
R ₁₆	Pyr + NADH+ CO ₂ ⇌ Mal	-7.945	-11.340
R ₁₇	Glu + NH ₃ => Gln	1.757	1.738
R ₁₈	Glu => NH ₃ + α-KG + NADH	4.858	5.113
R ₁₉	Glu + Pyr ⇌α-KG + Ala	6.068	6.012
R ₂₀	Ser => Pyr + NH ₃	1.209	0.000
R ₂₁	Ser ⇌Gly	1.656	1.288
R ₂₂	Asp + α-KG ⇌ Glu + OA	-8.704	-5.928
R ₂₃	Asn =>Asp + NH ₃	0.000	0.047
R ₂₄	His =>Glu + 2 NH ₃ + CO ₂ + NADH	0.754	0.000
R ₂₅	Arg + α-KG ⇌2 Glu + CO ₂ + 2 NH ₃ + NADH	0.340	0.478
R ₂₆	Pro ⇌ Glu + 2 NADH	0.867	1.766
R ₂₇	Ile +α-KG + ATP=>Glu +AcetilCoA + SuccCoA + 2.6 NADH	0.718	0.137
R ₂₈	Val + α-KG + O ₂ =>CO ₂ + Glu + SuccCoA + 3 NADH	0.729	0.209
R ₂₉	Met + Ser + O ₂ =>SuccCoA + 2 NH ₃ + Pyr + NADH	0.000	0.000
R ₃₀	Thr=> Gly + NADH + AcetilCoA	0.815	0.673

R ₃₁	Phe + O ₂ + NADH => Tyr	1.376	0.923
R ₃₂	Tyr + α-KG + 2 O ₂ => CO ₂ + Glu + 2 AcetilCoA + Mal	1.242	1.068
R ₃₃	Lys + 2 α-KG => 2 Glu + 2 AcetilCoA + 3 NADH	1.676	0.005
R ₃₄	Leu+α-KG+ATP+SuccCoA=>Glu+3 AcetilCoA+CO ₂ +2.2 NADH	0.000	0.000
R ₃₅	F6P ⇌ Man6P	0.510	0.489
R ₃₆	Man6P + ATP -> GDP-Man	0.510	0.489
R ₃₇	F6P + NH ₃ + ATP + AcetilCoA -> UDP-GlcNAc	0.454	0.436
R ₃₈	UDP-GlcNAc + 2 ATP + PEP -> CMP-NeuAc	0.170	0.163
R ₃₉	Alae ⇌ Ala	-4.600	-4.559
R ₄₀	Arge -> Arg	1.301	1.428
R ₄₁	Aspe ⇌ Asp	-5.602	-2.903
R ₄₂	Glue -> Glu	14.224	15.810
R ₄₃	Glye ⇌ Gly	-0.499	-0.010
R ₄₄	Hise -> His	0.820	0.065
R ₄₅	Ilee -> Ile	1.850	1.257
R ₄₆	Leue -> Leu	0.937	0.927
R ₄₇	Lyse -> Lys	2.491	0.810
R ₄₈	Mete -> Met	0.542	0.537
R ₄₉	Phee -> Phe	1.965	1.506
R ₅₀	Proe -> Pro	1.007	1.905
R ₅₁	Sere -> Ser	4.539	2.944
R ₅₂	Thre -> Thr	1.900	1.746
R ₅₃	Tyre -> Tyr	0.708	0.978
R ₅₄	Vale -> Val	1.636	1.107
R ₅₅	Asne -> Asn	1.309	1.342
R ₅₆	CO ₂ => CO _{2e}	181.672	400.802
R ₅₇	NH ₃ => NH _{3e}	5.689	3.590
R ₅₈	O ₂ => O _{2e}	171.738	368.776
R ₅₉	Lace ⇌ Lac	13.330	18.660
R ₆₀	36 Ala + 40 Arg + 22 Asn + 29 Asp + 27 Gln + 27 Glu + 46 Gly + 17 His + 20 Ile + 43 Leu + 22 Lys + 7 Met + 30 Pro + 50 Ser + 24 Tyr + 28 Val + 18 Phe + 22.37 GDP- Man + 3.47 UDP-Gal + 7.46 UDP-Glc + 8.44 UDP-GlcNAc -> tPAe	0.00007	0.00012
R ₆₁	CMP-NeuAc => NeuAc tPA	0.00022	0.00028
R ₆₂	CMP- NeuAc +3 GDP-Man +UDP-Gal + UDP-Glc + 1.67. UDP-GINAc => Glycos cell surface	0.170	0.163

R₆₃	0.137 Asp + 0.053 CO ₂ + 0.158 Gln + 0.053 Gly + 0.042 NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.105 R5P + 0.632 ATP=> ARN + 0.158 Glu + 0.084 Mal + 0.021 NADH	5.988	5.923
R₆₄	0.133 Asp + 0.051 CO ₂ + 0.153 Gln + 0.051 Gly + 0.163 NADH+ 0.0421NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.102 R5P + 0.612 ATP=> ADN + 0.153 Glu + 0.082 Mal	2.548	2.521
R₆₅	0.46 AcetilCoA + 0.051 O ₂ + 0.026 G3P + 0.41 ATP + 0.9 NADH =>Lípidos	15.925	15.754
R₆₆	0.056 ATP + 0.167 G6P =>Polisacáridos	9.428	9.326
R₆₇	a Ala + b Arg + c Asn +d Asp + e Gln + f Glu + g Gly + h His + i lle + j Leu + k Lys + l Met + m Phe + n Pro + o Ser + p Thr + q Tyr + r Val + s ATP -> Proteína Celular	93.512	92.506
R₆₈	t Proteína celular + u ARN + v ADN + w Lípidos + x Polisacáridos => Célula	127.400	126.030
R₆₉	½ O ₂ + NADH => 2.5 ATP	332.230	728.970
R₇₀	ATP => Mantenición	848.479	1907.624

**APÉNDICE 5: FLUXES CALCULADOS PARA GAL/LAC EN LA ALIMENTACIÓN
(COMO % DEL FLUX DE HEXOSA)**

N°	Reacción	%Flux de hexosa Gal(10)/Lac(5)	% Flux de hexosa Gal(20)/Lac(10)
R ₀	Gal ⇌ Gal	100.00	100.00
R ₁	Gal + ATP ⇒ Gal1P	100.00	100.00
R ₂	Gal1P + ATP ⇌ UDP-Gal	0.77	0.29
R ₃	Gal1P ⇌ G6P	98.46	99.41
R ₄	Gal1P + ATP ⇌ UDP-Glc	0.77	0.29
R ₅	G6P ⇌ F6P	87.34	95.03
R ₆	F6P + ATP ⇒ 2 G3P	82.99	93.36
R ₇	G3P ⇒ PEP + ATP + NADH	164.11	185.99
R ₈	PEP ⇒ Pyr + ATP	163.34	185.70
R ₉	Pyr + NADH ⇌ Lac	-60.18	-33.60
R ₁₀	Pyr ⇒ AcetilCoA + CO ₂ + NADH	237.46	228.88
R ₁₁	AcetilCoA + OA ⇒ α-KG + NADH + CO ₂	235.61	220.38
R ₁₂	α-KG ⇒ SuccCoA + NADH + CO ₂	295.42	247.64
R ₁₃	SuccCoA ⇌ 0.6 NADH + Mal	301.95	248.26
R ₁₄	Mal ⇒ OA + NADH	274.91	231.05
R ₁₅	G6P ⇌ R5P + 2 NADH + CO ₂	4.01	1.58
R ₁₆	Pyr + NADH + CO ₂ ⇌ Mal	-35.87	-20.41
R ₁₇	Glu + NH ₃ ⇒ Gln	7.93	3.13
R ₁₈	Glu ⇒ NH ₃ + α-KG + NADH	21.93	9.20
R ₁₉	Glu + Pyr ⇌ α-KG + Ala	27.40	10.82
R ₂₀	Ser ⇒ Pyr + NH ₃	5.46	0.00
R ₂₁	Ser ⇌ Gly	7.47	2.32
R ₂₂	Asp + α-KG ⇌ Glu + OA	-39.30	-10.67
R ₂₃	Asn ⇒ Asp + NH ₃	0.00	0.08
R ₂₄	His ⇒ Glu + 2 NH ₃ + CO ₂ + NADH	3.41	0.00
R ₂₅	Arg + α-KG ⇌ 2 Glu + CO ₂ + 2 NH ₃ + NADH	1.54	0.86
R ₂₆	Pro ⇌ Glu + 2 NADH	3.91	3.18
R ₂₇	Ile + α-KG + ATP ⇒ Glu + AcetilCoA + SuccCoA + 2.6 NADH	3.24	0.25
R ₂₈	Val + α-KG + O ₂ ⇒ CO ₂ + Glu + SuccCoA + 3 NADH	3.29	0.38
R ₂₉	Met + Ser + O ₂ ⇒ SuccCoA + 2 NH ₃ + Pyr + NADH	0.00	0.00

R ₃₀	Thr=> Gly + NADH + AcetilCoA	3.68	1.21
R ₃₁	Phe + O ₂ + NADH => Tyr	6.21	1.66
R ₃₂	Tyr + α-KG + 2 O ₂ => CO ₂ + Glu + 2 AcetilCoA + Mal	5.61	1.92
R ₃₃	Lys + 2 α-KG => 2 Glu + 2 AcetilCoA + 3 NADH	7.57	0.01
R ₃₄	Leu+α-KG+ATP+SuccCoA=>Glu+3 AcetilCoA+CO ₂ +2.2 NADH	0.00	0.00
R ₃₅	F6P ⇌ Man6P	2.30	0.88
R ₃₆	Man6P + ATP -> GDP-Man	2.30	0.88
R ₃₇	F6P + NH ₃ + ATP + AcetilCoA -> UDP-GlcNAc	2.05	0.78
R ₃₈	UDP-GlcNAc + 2 ATP + PEP -> CMP-NeuAc	0.77	0.29
R ₃₉	Alae ⇌ Ala	-20.77	-8.20
R ₄₀	Arge -> Arg	5.87	2.57
R ₄₁	Aspe ⇌ Asp	-25.29	-5.22
R ₄₂	Glue -> Glu	64.22	28.45
R ₄₃	Glye ⇌ Gly	-2.25	-0.02
R ₄₄	Hise -> His	3.70	0.12
R ₄₅	Ilee -> Ile	8.35	2.26
R ₄₆	Leue -> Leu	4.23	1.67
R ₄₇	Lyse -> Lys	11.25	1.46
R ₄₈	Mete -> Met	2.45	0.97
R ₄₉	Phee -> Phe	8.87	2.71
R ₅₀	Proe -> Pro	4.55	3.43
R ₅₁	Sere -> Ser	20.49	5.30
R ₅₂	Thre -> Thr	8.58	3.14
R ₅₃	Tyre -> Tyr	3.20	1.76
R ₅₄	Vale -> Val	7.39	1.99
R ₅₅	Asne -> Asn	5.91	2.41
R ₅₆	CO ₂ => CO ₂ e	820.19	721.26
R ₅₇	NH ₃ => NH ₃ e	25.68	6.46
R ₅₈	O ₂ => O ₂ e	775.34	663.63
R ₅₉	Lace ⇌ Lac	60.18	33.58
R ₆₀	36 Ala + 40 Arg + 22 Asn + 29 Asp + 27 Gln + 27 Glu + 46 Gly + 17 His + 20 Ile + 43 Leu + 22 Lys + 7 Met + 30 Pro + 50 Ser + 24 Tyr + 28 Val + 18 Phe + 22.37 GDP- Man + 3.47 UDP-Gal + 7.46 UDP-Glc + 8.44 UDP-GlcNAc -> tPAe	0.00032	0.00022
R ₆₁	CMP-NeuAc => NeuAc tPA	0.0010	0.0005
R ₆₂	CMP- NeuAc +3 GDP-Man +UDP-Gal + UDP-Glc + 1.67. UDP-GINAc => Glycos cell surface	0.77	0.29

R₆₃	0.137 Asp + 0.053 CO ₂ + 0.158 Gln + 0.053 Gly + 0.042 NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.105 R5P + 0.632 ATP=> ARN + 0.158 Glu + 0.084 Mal + 0.021 NADH	27.03	10.66
R₆₄	0.133 Asp + 0.051 CO ₂ + 0.153 Gln + 0.051 Gly + 0.163 NADH+ 0.0421NH ₃ + 0.026 O ₂ + 0.102 R5P + 0.612 ATP=> ADN + 0.153 Glu + 0.082 Mal	11.50	4.54
R₆₅	0.46 AcetilCoA + 0.051 O ₂ + 0.026 G3P + 0.41 ATP + 0.9 NADH =>Lípidos	71.90	28.35
R₆₆	0.056 ATP + 0.167 G6P =>Polisacáridos	42.56	16.78
R₆₇	a Ala + b Arg + c Asn +d Asp + e Gln + f Glu + g Gly + h His + i lle + j Leu + k Lys + l Met + m Phe + n Pro + o Ser + p Thr + q Tyr + r Val + s ATP -> Proteína Celular	422.17	166.47
R₆₈	t Proteína celular + u ARN + v ADN + w Lípidos + x Polisacáridos => Célula	575.17	226.80
R₆₉	½ O ₂ + NADH => 2.5 ATP	1499.91	1311.80
R₇₀	ATP => Mantenición	3830.60	3432.83

APÉNDICE 6: PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE INTERMEDIARIOS DEL TCA EN EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS

Para realizar el cálculo de la producción/consumo de los principales intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos involucrados en el metabolismo de los aminoácidos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Flux metabolito} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right] = \text{Coeficiente metabolito en la reacción} \cdot \text{Flux de la reacción} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

a) α -KG

En la siguiente tabla se presenta el cálculo realizado de producción y consumo de α -KG en el metabolismo de los aminoácidos. Se consideraron las reacciones que según el modelo aportaron o consumieron efectivamente el metabolito (valores distintos a cero de flux):

Metabolito	Reacción	Gal 10/Lac 5		Gal 20/Lac 10	
		Producción	Consumo	Producción	Consumo
α -KG	R ₁₈	4.858	-	5.113	-
	R ₁₉	6.068	-	6.012	-
	R ₂₂	8.704	-	5.928	-
	R ₂₅	-	0.34	-	0.478
	R ₂₇	-	0.718	-	0.137
	R ₂₈	-	0.729	-	0.209
	R ₃₂	-	1.242	-	1.068
	R ₃₃	-	3.352	-	0.01
Sumatoria Prod./Consumo		19.63	6.381	17.053	1.902
Total		13.249		15.151	

Para Gal 10/Lac 5, el flux producido en TCA por R₁₁ fue de 52.187 [nmol/h*10⁶ cel], mientras que en R₁₂ el flux de α -KG que se consume es de 65.436 [nmol/h*10⁶ cel], esto es, existió un aumento de flux del intermediario. Calculando la diferencia:

$$65.436 - 52.187 = 13.249 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

Lo cual coincide con el balance realizado para el metabolito en las reacciones de los aminoácidos. Por consiguiente, la variación del flux de este intermediario se debe a su síntesis y consumo en dicha vía.

b) Pyr

Para Pyr, en el modelo existen sólo dos reacciones del metabolismo de los aminoácidos en las que participa este intermediario. El signo negativo indica que existe un consumo de Pyr en esta vía. Todos los valores se encuentran en [nmol/h*10⁶ cel]:

Metabolito	Reacción	Gal 10/Lac 5		Gal 20/Lac 10	
		Producción	Consumo	Producción	Consumo
Pyr	R ₁₉	-	6.068	-	6.012
	R ₂₀	1.209	-	0.000	-
Total		-4.859		-6.012	

No obstante, se debe considerar que Pyr participa en otras reacciones, como la vía anaplerótica con Mal, por lo que su variación está sujeta no sólo al metabolismo de los aminoácidos.

c) AcetilCoA

En el caso de AcetilCoA, sólo se encontraron reacciones de producción de este intermediario, las cuales se detallan a continuación (en [nmol/h*10⁶ cel]):

Metabolito	Reacción	Gal 10/Lac 5		Gal 20/Lac 10	
		Producción	Consumo	Producción	Consumo
AcetilCoA	R ₂₇	0.718	-	0.137	-
	R ₃₀	0.815	-	0.673	-
	R ₃₂	2.484	-	2.136	-
	R ₃₃	3.352	-	0.01	-
Total		7.369		2.956	

No obstante, al observar las reacciones R₁₀ y R₁₁ se ve que el incremento real del flux es mucho menor al obtenido por esta vía. AcetilCoA participa no sólo en el metabolismo de los aminoácidos, sino que también en síntesis de lípidos (R₆₅) y de UDP-GlcNAc (R₃₇). Por consiguiente:

Vía	Gal 10/Lac 5	Gal 20/Lac 10
Producción TCA	52.597	127.191
Síntesis de Lípidos	-7.325	-7.246
Síntesis de UDP-GlcNAc	-0.454	-0.436
Metabolismo Aminoácidos	7.369	2.956
Total[nmol/h*10⁶ cel]	52.187	122.465

Lo cual coincide con el flux que se consume en R₁₁. El metabolismo de los aminoácidos tiene contribución positiva en la variación del flux de AcetilCoA, ayudando a suministrar este metabolito para satisfacer la demanda del TCA.

d) SuccCoA

Al observar las reacciones de producción y consumo de SuccCoA en el TCA (R₁₂ y R₁₃, respectivamente), se encuentra un aumento del flux que asciende a:

$$\text{- Gal 10/Lac 5:} \quad 66.883 - 65.436 = 1.447 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

$$\text{- Gal 20/Lac 10:} \quad 137.961 - 137.614 = 0.347 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

Por otro lado, al realizar el balance del intermediario en el metabolismo de los aminoácidos, se tiene lo siguiente (valores en [nmol/h*10⁶ cel]):

Metabolito	Reacción	Gal 10/Lac 5		Gal 20/Lac 10	
		Producción	Consumo	Producción	Consumo
SuccCoA	R ₂₇	0.718	-	0.137	-
	R ₂₈	0.729	-	0.209	-
Total		1.447		0.346	

Estos valores obtenidos coinciden con los obtenidos por la variación de flux entre R12 y R13 para el TCA, por lo que la fluctuación de la cantidad de intermediario se debe exclusivamente a su síntesis en el metabolismo de los aminoácidos.

APÉNDICE 7: EJEMPLO DE CÁLCULO: DISTRIBUCIÓN DEL FLUX DE GLUTAMATO EN LA CÉLULA.

a) CONSUMO DE GLUTAMATO

En la tabla que se muestra a continuación se resume el cálculo del consumo de glutamato en la célula para Gal (10)/Lac(5). La fórmula utilizada para obtener el flux de Glu en cada reacción es la siguiente:

$$\text{Flux Glutamato} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right] = \text{Coeficiente Glu} \cdot \text{Flux de la reacción} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

En donde:

Flux Glutamato: Corresponde al flux consumido/producido en la reacción.

Coeficiente Glu: El coeficiente estequiométrico de Glu en la reacción.

Flux de la reacción: Corresponde al flux obtenido por el modelo metabólico para la condición estudiada.

Reacción	Coeficiente Glu	Flux reacción [nmol/h*10 ⁶ cel]	Flux consumido Glu [nmol/h*10 ⁶ cel]
Síntesis de Gln	1	1.757	1.757
Metabolismo Glu	1	4.858	4.858
Síntesis de Ala	1	6.068	6.068
Metabolismo Asp	1	8.708	8.708
Síntesis tPA	27	0.00007	0.002
Síntesis Proteína	0.027	93.512	2.515
Sumatoria			23.908

Por consiguiente, tomando como base el modelo metabólico establecido, se requerirían 23.908 [nmol/h*10⁶cel] de glutamato para cumplir con los requerimientos de la célula.

A) INGRESO DE GLUTAMATO A LA CÉLULA

Analizando los resultados del apéndice 4, se puede observar que ingresaron 14.224 [nmol/h*10⁶ cel] de Glu desde el medio extracelular, lo cual no alcanza para cubrir los requerimientos de la célula según los cálculos realizados anteriormente. Calculando la diferencia:

$$\text{Flux consumido Glu} - \text{Flux Glu}_{\text{extracelular}} = 23.904 - 14.224 = 9.68 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot 10^6 \text{ cel}} \right]$$

Al observar las reacciones del modelo, es posible notar que el metabolismo de los aminoácidos tiene la capacidad de producir glutamato, siendo además producto de la síntesis de ADN y ARN.

B) SÍNTESIS DE GLUTAMATO

El cálculo se realiza de manera análoga a lo anteriormente señalado. En la siguiente tabla se detallan los valores obtenidos para cada reacción:

Reacción	Coefficiente Glu	Flux reacción [nmol/h*10 ⁶ cel]	Flux Producido Glu [nmol/h*10 ⁶ cel]
Metabolismo His	1	0.754	0.754
Metabolismo Arg	2	0.340	0.680
Metabolismo Pro	1	0.867	0.867
Metabolismo Ile	1	0.718	0.718
Metabolismo Val	1	0.729	0.729
Metabolismo Tyr	1	1.242	1.242
Metabolismo Lys	2	1.676	3.352
Producción ARN	0.158	5.988	0.946
Producción ADN	0.153	2.548	0.390
Sumatoria			9.678

Por lo tanto, se producen intracelularmente 9.678 [nmol/h*10⁶ cel] de Glu, esto es, precisamente el déficit existente entre lo requerido por la célula y lo ingresado desde el medio extracelular.