



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL METABOLISMO DE LACTATO PARA CÉLULAS CHO EN GLUCOSA Y GALACTOSA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA
MENCION QUIMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGIA**

CAMILA ALEJANDRA WILKENS DÍAZ-MUÑOZ

SANTIAGO DE CHILE



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL METABOLISMO DE LACTATO PARA CÉLULAS CHO EN GLUCOSA Y GALACTOSA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA
MENCION QUIMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGIA**

CAMILA ALEJANDRA WILKENS DÍAZ-MUÑOZ

PROFESORA GUÍA:
Dra. ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
Dra. CLAUDIA ALTAMIRANO GÓMEZ
Dra. BARBARA ANDREWS FARROW
Dr. JUAN ASENJO DE LEUZE
Dr. FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE
MAYO, 2011

Resumen

En estudios anteriores se ha mostrado que células CHO productoras de tPA sufren una alteración del estado metabólico cuando el cultivo es suplementado con una mezcla de glucosa y galactosa. Este cambio se caracteriza por la reincorporación de lactato a la célula, pero su destino metabólico no ha sido determinado aún.

Para comprender las condiciones que permiten la utilización de lactato como fuente de carbono se realizaron cuatro experimentos en cultivo *batch* con distintas combinaciones de glucosa y galactosa. Cuando el medio es suplementado solamente con glucosa se observa una producción sostenida de lactato. En cambio, en las condiciones con glucosa y galactosa se ve que primero se utiliza exclusivamente glucosa y se produce lactato, y una vez que se agota esta fuente de carbono comienza el consumo de galactosa junto a lactato. Al comparar mediante análisis de flujos metabólicos los estados de las células con y sin alteración metabólica, se observa un cambio en la distribución de flujos involucrados en el metabolismo del piruvato. Cuando la tasa específica de consumo de la fuente de carbono principal es baja no se produce suficiente piruvato para que las células mantengan sus requerimientos energéticos. Este resultado es consistente con los entregados por el modelo dinámico del metabolismo de glucosa y galactosa desarrollado en este trabajo. Inicialmente en los cultivos se observan flujos intracelulares altos, los cuales disminuyen lenta pero continuamente hasta alcanzar una condición en que no se produce suficiente piruvato para mantener el metabolismo energético de la célula.

El consumo de lactato es posible en cultivos suplementados con glucosa y galactosa debido a que la célula alcanza condiciones intra y extracelulares específicas que permiten la inversión de la reacción catalizada por la enzima lactato dehidrogenasa y del gradiente que impulsa transporte de lactato. La evidencia encontrada en este trabajo sugiere que durante el consumo de glucosa se produce piruvato en exceso lo que lleva su acumulación y posterior conversión hacia lactato el cual se acumula también en el interior de la célula. Las altas concentraciones de lactato en el medio intracelular y la acidificación de éste debido a la glicólisis promueven el flujo del ácido láctico hacia el exterior de la célula mediante el transportador de monocarboxilatos. Cuando comienza el consumo de galactosa, el cual es más lento que el de glucosa, la concentración de piruvato, lactato y H^+ disminuye permitiendo la inversión de la dirección de transporte del transportador y de la enzima lactato dehidrogenasa, promoviendo el consumo de lactato. Mediante el análisis de flujos metabólicos se determinó que en esta etapa del cultivo la mayoría de los recursos celulares y el ácido láctico son utilizados para mantener el metabolismo energético lo que explica también la disminución de la proliferación celular observada.

Los resultados obtenidos indican que las concentraciones de piruvato, H^+ , lactato intra y extracelular, el estado RedOx y su evolución en el tiempo son los responsables en determinar la dirección del metabolismo del lactato. El entendimiento de la vía del lactato permitiría nuevos diseños de medio de cultivo, en los cuales se produzcan concentraciones menores de lactato. En cultivos donde el lactato es consumido o producido en una nueva tasa se observa una viabilidad extendida y por lo tanto en estas condiciones es factible alcanzar mayores niveles de producción de proteína recombinante.

A mi papás

Agradecimientos

Después de tanto tiempo trabajando para ser una Ingeniera Civil en Biotecnología me gustaría agradecer a todos los que me han acompañado, tanto en parte como en todo este trayecto. En especial quiero darle las gracias a mi papá y a mi mamá, quienes me inculcaron el valor del trabajo y me apoyaron todo este tiempo. No puedo dejar afuera a la Maca, el Tomas, a mi Yaya y Oma, quienes también han estado ahí.

Como no soy buena con las palabras solo quiero darle gracias a todos mis compañeros BT's y Químicos por todas las tardes de estudio, por los ratos en solo hablábamos tonteras para relajarnos y por los momentos en que simplemente no hacíamos nada. Gracias Chicho, Sergio y Panky por aguantarme en los trabajos y por su ayuda más que necesaria cuando me la dieron. Dani, Gabi y Fran, les agradezco su compañía y risas.

Christian, gracias por tu amor, comprensión, apoyo y en especial paciencia, esto no habría sido lo mismo sin ti.

De manera muy especial quiero agradecer a la profe Ziomara por sus consejos y fe en mí y a la profe Barbara Andrews por el apoyo a través de los años. De esto no puede quedar afuera la profe Claudia Altamirano quien siempre respondió muy rápido todas mis dudas y guió en este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a los proyectos Fondecyt 1061119 y 1070337 y Fondecyt Iniciación 11090268 por el financiamiento del proyecto.

Tabla de contenido

Resumen	i
Agradecimientos	iii
Índice de figuras	vii
Índice de tablas.....	vii
Nomenclatura y abreviaciones.....	viii
Subíndices.....	viii
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes bibliográficos.....	3
1.2.1. Cultivos Celulares.....	3
1.2.2. Células CHO y producción de biofármacos	5
1.2.3. Lactato y el metabolismo celular.....	6
1.2.3.1. <i>Transporte de lactato</i>	7
1.2.3.2. <i>Metabolismo</i>	7
1.2.4. Modelamiento matemático.....	9
1.2.4.1. <i>Análisis de Flujos Metabólicos</i>	10
1.2.4.2. <i>Modelos dinámicos</i>	12
1.3. Objetivos.....	14
1.3.1. Objetivo general	14
1.3.2. Objetivos específicos.....	14
1.4. Alcances.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Metodología general.....	16
2.2. Materiales y Métodos.....	18
2.2.1. Materiales.....	18
2.2.2. Cultivo celular	20
2.2.3. Preparación Spinners	20
2.2.4. Caracterización metabólica del cultivo.....	21
2.2.5. Metabolitos intracelulares	22
2.2.6. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA).....	22
2.2.6.1. <i>Reacciones del metabolismo central del carbono y aminoácidos para análisis de flujo metabólico</i>	24
2.2.6.2. <i>Glicólisis</i>	25

2.2.6.3.	<i>Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....</i>	25
2.2.6.4.	<i>Glutaminólisis.....</i>	26
2.2.6.5.	<i>Síntesis y degradación de aminoácidos</i>	26
2.2.6.6.	<i>Definición de molécula equivalente energética.....</i>	28
2.2.6.7.	<i>Definición de reacción de síntesis de biomasa.....</i>	28
2.2.6.8.	<i>Definición de reacción de síntesis de t-PA</i>	29
2.2.6.9.	<i>Ajuste de parámetros</i>	29
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	30
3.1.	Condiciones de cultivo	30
3.2.	Cultivos.....	31
3.3.	Metabolitos intracelulares	36
3.4.	Análisis de flujos metabólicos	38
3.5.	Efecto del pH intracelular y balance de NAD ⁺ /NADH en la producción de lactato y su transporte.....	42
3.6.	Modelo Dinámico	44
3.6.1.	Definición de reacciones del metabolismo central del carbono para realización del modelo dinámico.....	44
3.6.1.1.	<i>Determinación de etapas controladoras de las rutas metabólicas.....</i>	45
3.6.1.3.	<i>Ecuaciones diferenciales que definen el modelo.....</i>	47
3.6.1.4.	<i>Cinética de las etapas controladoras.....</i>	48
4.	CONCLUSIONES	57
5.	REFERENCIAS	59
	ANEXOS.....	63
	Anexo 1: Preparación de medio cultivo	63
	Anexo 2: Subcultivos.....	63
	Anexo 3: Congelación de las células CHO TF 70R	63
	Anexo 4: Descongelación de las Células CHO TF 70R	64
	Anexo 5: Determinación de concentración celular, método de exclusión celular	65
	Anexo 6: Medición de la Tasa de Consumo de Oxígeno (OUR).....	65
	Anexo 7: Cuantificación de Glucosa, Galactosa, Lactato y Glutamato mediante analizador YSI 2700	66
	Anexo 8: Determinación de la concentración de t-PA por ELISA.....	66
	Anexo 9: Determinación de concentración de amino ácidos.....	67
	Anexo 10: Extracción Ácida de metabolitos intracelulares.....	74
	Anexo 11: Determinación de concentración de ácidos orgánicos.....	75

Anexo 12: Programación del modelo dinámico.....	76
Anexo 13: Programa de ajuste de parámetros	88
Anexo 14: Simulaciones G6 y GG6/14	98
Anexo 15: Manuscrito “Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose”	101

Índice de figuras

FIGURA 1: CÉLULAS CHO EN ADHERENCIA	6
FIGURA 2: METODOLOGÍA SEGUIDA PARA EL ASPECTO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO	16
FIGURA 3: METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL MODELO DINÁMICO	17
FIGURA 4: RED METABÓLICA CONSIDERADA EN EL ANÁLISIS DE FLUJO METABÓLICO.....	24
FIGURA 5: CULTIVOS BATCH DE CÉLULAS CHO CON GLUTAMATO Y DISTINTAS FUENTES DE DE CARBONO	32
FIGURA 6: TASAS ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE ALGUNOS METABOLITOS.....	35
FIGURA 7: METABOLITOS INTRACELULARES: EN LA FIGURA SE OBSERVA EL CAMBIO EN LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACELULAR DE GLUCOSA, LACTATO Y ALANINA Y DE ALGUNAS ESPECIES INTRACELULARES COMO LACTATO, ALANINA, OXALACETATO Y CITRATO. (A) G20; (B) G6; (c) GG6/14; (d) GG2/18	37
FIGURA 8: ANÁLISIS DE FLUJO METABÓLICO	41
FIGURA 9: DINÁMICA ENTRE GLICÓLISIS Y TRANSPORTE DE LACTATO	43
FIGURA 10: RED METABÓLICA CONSIDERADA PARA EL MODELO DINÁMICO	45
FIGURA 11: SIMULACIÓN EXPERIMENTO GG6/14	55
FIGURA 12: COMPARACIÓN ENTRE SIMULACIÓN Y DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO GG6/14	55
FIGURA 13: SIMULACIÓN EXPERIMENTO G20	56
FIGURA 14: COMPARACIÓN ENTRE SIMULACIÓN Y DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO G20.....	56
FIGURA 15: BOTÓN MOBILE PHASE SETUP.....	71
FIGURA 16: VENTANA AUTOPURGE	71
FIGURA 17: BOTÓN AUTOPURGE.....	72
FIGURA 18: CAMBIO DE BOMBA A A BOMBA B.....	72
FIGURA 19: ILUSTRACIÓN DE LA LLAVE DEL EQUIPO ABIERTA Y CERRADA	73
FIGURA 20: BOTÓN SHUTDOWN	74
FIGURA 21: CROMATOGRAMA DE ESTÁNDAR DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	75
FIGURA 22: SIMULACIÓN EXPERIMENTO G6	98
FIGURA 23: COMPARACIÓN ENTRE SIMULACIÓN Y DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO G6.....	99
FIGURA 24: SIMULACIÓN DEL EXPERIMENTO GG2/18	99
FIGURA 25: COMPARACIÓN ENTRE SIMULACIÓN Y DATOS EXPERIMENTALES DEL EXPERIMENTO GG2/18.....	100

Índice de tablas

TABLA 1: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES	4
TABLA 2: BIOFÁRMACOS PRODUCIDOS EN CÉLULAS CHO	5
TABLA 3: ESPECIES MEDIDAS PARA REALIZAR ANÁLISIS DE FLUJO METABÓLICO	23
TABLA 4: VALORES DE μ_{MAX} Y $\Delta L/\Delta H$ PARA CADA ETAPA METABÓLICA DE LOS CULTIVOS	33
TABLA 5: TASAS ESPECÍFICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE FLUJO METABÓLICO EN $[MMOL/10^9 \text{ CÉLULAS/HR}]$	38
TABLA 6: PREPARACIÓN BUFFER PARA ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.	69

Nomenclatura y abreviaciones

AlaAT	Alanina aminotransferase
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
G6P	Glucosa-6-fosfato
Gal	Galactosa
GalK	Galactosa kinasa
GalTr	Transportador de galactosa
Glc	Glucosa
GlcTr	Transportador de glucosa
HK	Hexokinasa
Km	Constante de Michaelis
Lac	Lactato
LDH	Lactato dehidrogenasa
MCT	Transportador de monocarboxilato
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
OAA	Oxalacetato
PDH	Piruvato dehidrogenasa
PFK	Fosfofructokinasa
Pyr	Piruvato
V	Volumen
Vmax	Velocidad máxima
α KG	α -Ketoglutarato

Subíndices

c	Citosólica
e	Exterior
<i>efflux</i>	Flujo hacia afuera
f	<i>Forward</i>
<i>in</i>	Dentro / intracelular
<i>influx</i>	Flujo hacia dentro
m	mitocondrial
r	<i>reverse</i>
<i>out</i>	Fuera/ extracelular

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Introducción

La industria biotecnológica se extiende en diversos ámbitos de la vida diaria, desde la producción de cerveza, desarrollo de combustibles alternativos hasta la medicina. Un gran número de proteínas terapéuticas desarrolladas en los últimos años se sintetizan mediante bacterias o células animales. En particular, el biofármaco conocido como t-PA (Tissue Plasminogen Activator) es un ejemplo de estos fármacos. El t-PA es usado para el tratamiento de accidentes cardiovasculares ya que es capaz de desencadenar el proceso biológico que degrada los coágulos. Este producto que es frecuentemente utilizado hoy fue la primera proteína terapéutica producida en cultivos de células animales recombinantes en obtener aprobación para su venta y uso en humanos por autoridades de salud estadounidenses en 1986. La producción de t-PA se lleva a cabo en una línea celular derivada de ovarios de hamsters chinos conocidas como CHO por sus siglas en inglés. Desde entonces hasta ahora, cerca del 70% de las proteínas con usos farmacológicos son producidos mediante sistemas de cultivos similares en células de distintos orígenes, como por ejemplo, mielomas de ratón (NS0), riñón de hámsteres bebés (BHK) y riñón de embrión humano (HEK-293) ya que éstos proporcionan ventajas claras respecto a la calidad del producto final en comparación a otros tipos de huéspedes como las bacterias, levaduras u hongos que producen proteínas con baja o ninguna glicosilación.

Los rendimientos que alcanzan los cultivos y el precio de los biofármacos permiten que la producción de estos sea rentable, pero aún así se continúa estudiando formas que permitan mejorar el rendimiento de los cultivos. Se ha demostrado que la alta velocidad de síntesis de lactato y alta concentración de este en el medio limitan la síntesis de biomasa y proteína por lo que varios estudios se han abocado hacia la disminución de producción de este metabolito secundario. En particular se ha visto que distintos regímenes de alimentación y composiciones de medio permiten disminuir la producción de ácido láctico e incluso permitir el consumo de éste. Esta última condición es de gran interés ya que permite extender la viabilidad del cultivo. Sin embargo los mecanismos celulares que permiten este efecto ni el destino metabólico del lactato no se encuentran claros.

Para comprender el metabolismo del lactato en células CHO se realizarán en este trabajo una serie de experimentos que permitirán dilucidar las condiciones que permiten la incorporación de lactato y las vías que lo utilizan posteriormente. Se medirán las concentraciones intracelulares de algunos metabolitos claves del metabolismo y se estudiará el metabolismo celular mediante análisis de flujos metabólicos y desarrollará un modelo dinámico simple del metabolismo.

1.2. Antecedentes bibliográficos.

1.2.1. Cultivos Celulares

Los cultivos a partir de tejidos animales se iniciaron a principio de 1890 con el fin de estudiar células animales independientemente de las variaciones del sistema en que éstas se encuentran, así Harrison, uno de los estudiosos de este tema, logró observar el desarrollo de nervios en embriones de rana. En la segunda mitad del siglo 20 se comenzó a trabajar con células disgregadas, dando origen a células inmortalizadas que se conocen hoy como líneas celulares. El desarrollo de medios de cultivos definidos empezó a tomar forma hasta que en la década del 1960 se consiguieron los primeros cultivos libres de suero (Freshney, 2005).

Los cultivos de tejidos han aportado respuestas en distintos tipos de investigación entre éstos (Freshney, 2005) :

1. Actividad intracelular: Estudio de mecanismos de replicación, transcripción, síntesis de macromoléculas y metabolismo.
2. Flujos intracelulares: Determinación de señales intracelulares.
3. Interacción con el ambiente: Efectos de la nutrición, drogas y toxicidad de compuestos.
4. Interacción célula-célula: Métodos de proliferación y adhesión celular así como la movilidad de ellas también.
5. Genética: Análisis genómico y manipulación de genes.
6. Productos celulares, secreción, diseño de reactores, etc...

Actualmente se trabaja con diferentes tipos de cultivos, para los cuales existen diferentes técnicas y objetivos. Entre éstos se encuentra el cultivo de órganos, el cual consiste en trabajar con tejidos que conservan gran parte de las propiedades histológicas originales y mantienen su diferenciación, pero en este tipo de cultivos las células no logran proliferar más allá de los límites del órgano. Otro tipo son los cultivo celulares, estos consisten en células disgregadas que pueden pertenecer a alguna línea celular y crecer tanto en monocapas como

en suspensión, han perdido algo de su grado de diferenciación y se caracterizan por su alta homogeneidad. Finalmente, existen los cultivos histotípicos y organotípicos, los cuales intentan reagrupar células desligadas, tanto de un mismo tipo o de distintos, respectivamente, para así obtener tejidos tridimensionales.

En los últimos 20 años el interés por los cultivos de células animales ha aumentado debido a su capacidad de producir proteínas recombinantes. La industria farmacéutica utiliza a estos huéspedes ya que permiten obtener productos de alto valor, y son capaces de producir proteínas complejas con modificaciones postraduccionales y glicosilaciones que al intentar reproducir en bacterias se vuelve imposible. Además, existe un sinnúmero de ventajas y desventajas al trabajar con cultivos celulares, tanto con fines científicos como industriales, entre ellas se encuentran:

Tabla 1: Ventajas y desventajas de los cultivos de células animales

Ventajas		Desventajas	
i.	Posibilidad de controlar las condiciones químicas y fisiológicas.	i.	Gran cantidad de suministros y altos costos de éstos.
ii.	Homogeneidad de la línea celular.	ii.	Inestabilidad genética y fenotípica.
iii.	Caracterización del medio celular	iii.	Dificultad en controlar el medio ambiente.
iv.	Preservación, validación y acreditación del sistema de producción	iv.	Alto nivel de especialización.
v.	Reducción de uso de animales para pruebas clínicas.	v.	Largos tiempos de cultivo.

El mercado para las proteínas terapéuticas es uno de los sectores de la industria farmacéutica con mayor crecimiento y su producción mediante cultivos de células animales domina sobre la producción en bacterias (Jenkins et al., 2008). Debido al sostenido aumento de la demanda de estos productos se prevé una crisis en la capacidad de producción en los próximos años. Se han realizado avances para evitar esta situación y muchos están dirigidos hacia el diseño del medio apto para poder mejorar la producción específica de las líneas celulares (Browne and Al-Rubeai, 2007). Se ha propuesto el cambio de algunos nutrientes como glucosa y glutamina por análogos que se consuman a tasas menores. Mediante esta estrategia se

puede extender la vida del el cultivo y mejorar la producción de proteína recombinante al reducir la producción de metabolitos secundarios (Altamirano et al., 2000).

1.2.2. Células CHO y producción de biofármacos

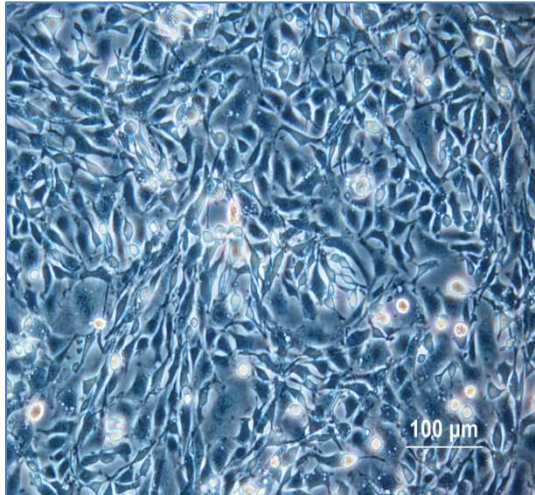
Para la producción de biofármacos es necesario trabajar con líneas celulares que sean capaces de producir proteínas a una tasa específica que haga posible que el precio del fármaco sea accesible al público y que a la vez permita a la empresa farmacéutica obtener ganancias. Por esto, en las primeras etapas de desarrollo del producto se estudian líneas celulares que logren cumplir estos dos objetivos. La línea celular CHO, derivada de ovarios de hámster chino, se ha convertido en el tipo celular estándar para la producción de biofármacos desde que en 1986 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó la proteína tPA producida en CHO para su uso en humanos y hoy en día hay más de 25 remedios producidos a partir de estos huéspedes, algunos de los cuales se listan en la Tabla 2.

Tabla 2: Biofármacos producidos en células CHO

Tipo de proteína	Tratamiento	Empresa
Eritropoyetina	Anemia	Amgen, J&J, Sankyo
Anti-CD11a mAb	Soriasis crónica	Genentech
r-Factor VIII	Hemophilia A	Genentech
Anti-IgE mAb	Asma	SmithLine Beecham, Merck
tPA	Disolución de coagulos	Genentech/Roche, Centocor
β -Interferón	Esclerosis multiple	Biogen, Chiron/Schering
Anti- CD52 E mAb	Leucemia	Genzyme, Bayer
Anti-TNF α mAb	Artritis reumatoide	Abott
β -Interferón	Esclerosis multiple	Biogen, Chiron/Schering

Fuente:(Walsh, 2004)

Entre las características que hacen que las células CHO sean tan utilizadas, es que trabajando con ellas es posible garantizar la calidad y pureza del producto final. Los procesos de purificación son capaces de separar eficazmente trazas de células de la proteína. Otro aspecto importante, es que se ha comprobado que varios virus son incapaces de replicarse dentro de este tipo de célula y por lo tanto contaminar el cultivo. Una importante ventaja que presentan éstas células sobre otras líneas celulares, es que se encuentran bien caracterizadas

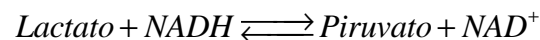


y siendo fácil su manipulación, expresan establemente el gen clonado, produciendo clones con altas tasas específicas de síntesis de proteína recombinante y finalmente alcanzan altas densidades celulares en cultivos en suspensión.

Figura 1: Células CHO en adherencia

1.2.3. Lactato y el metabolismo celular

Al finalizar la glicólisis una molécula de glucosa ha sido oxidada hasta producir dos moléculas de piruvato capaces de ingresar al ciclo de Krebs y producir energía para mantener el metabolismo celular. Sin embargo, existe la enzima lactato dehidrogenasa la cual transforma una molécula de piruvato en una de ácido láctico y además oxida NADH a NAD⁺. El máximo teórico de producción de lactato es de 2 unidades por glucosa consumida, sin embargo este valor no se alcanza en la realidad ya que si así fuera significaría que la glucosa no estaría aportando a la síntesis de biomasa ni ingresando al ciclo del TCA.



La producción de lactato no solo refleja un consumo ineficiente de la glucosa. Múltiples estudios han comprobado que la presencia de lactato en el cultivo y el aumento de osmolaridad causado por su transporte a través de la membrana plasmática, restringen el crecimiento celular y formación de producto (Glacken et al., 1986; Kurano et al., 1990). Debido a esto se han realizado muchos estudios e intentos para disminuir la presencia de este metabolito en cultivos y así aumentar los rendimientos de producción de proteínas.

1.2.3.1. Transporte de lactato

El movimiento de moléculas de lactato a través de la membrana plasmática se realiza mediante el transportador de monocarboxilatos (MCT) y en células CHO se expresa preferentemente la forma 1 (MCT1), el cual también puede transportar piruvato. El mecanismo que presenta el transportador es simporte, moviendo un H⁺ y una molécula de lactato en la misma dirección. La reacción es reversible y encuentra su equilibrio cuando $[lactato]_{in}/[lactato]_{out} = [H^+]_{out}/[H^+]_{in}$ mientras que sus parámetros cinéticos están relacionados termodinámicamente de manera tal que $(V_{max}/Km)_{influx} = (V_{max}/Km)_{efflux}$. (Halestrap and Price, 1999).

La velocidad de transporte depende del gradiente entre las concentraciones intracelulares y extracelulares de sus sustratos. En cultivos celulares en lote con altas concentraciones iniciales de glucosa se observa una acumulación de lactato en el espacio extracelular y una disminución gradual de la tasa específica de producción en el tiempo. El cambio en la velocidad de transporte se debe a que a medida que un cultivo evoluciona el gradiente de lactato entre el exterior e interior de la célula se vuelve cada vez más pequeño. Se estudió en células HeLa el efecto del pH extracelular sobre la tasa de consumo de lactato en condiciones que favorecen el ingreso de lactato a la célula y se determinó que cuando mayor es la concentración de H⁺ en el espacio extracelular, mayor es la tasa de consumo. Además, en el mismo estudio se mostró que cuando se forzaba un gradiente de pH o lactato con mayores concentraciones en el citoplasma la velocidad de consumo era directamente proporcional al tamaño del gradiente (Cheeti et al., 2006)

1.2.3.2. Metabolismo

La presencia de lactato no es lo único que afecta a los cultivos, si no que la tasa específica a la que se produce este metabolito en comparación al consumo de glucosa tiene un impacto en la proliferación celular y síntesis de proteína recombinante. Durante el cultivo, sea debido a su progreso, composición del medio o régimen de alimentación las células pueden alcanzar distintos estados metabólicos. Éstos se pueden caracterizar por la razón

estequiométrica de lactato producido por glucosa consumida ($\Delta L/\Delta G$). Valores altos de $\Delta L/\Delta G$ reflejan un alto desvío de carbonos desde el metabolismo central del carbono hacia la producción de lactato evidenciando una ineficiencia en el consumo de glucosa. Usualmente en cultivos se observan cambios desde un $\Delta L/\Delta G$ alto a un bajo, pero es posible ver también $\Delta L/\Delta G$ negativos. Europa y sus colaboradores lograron manipular las tasas específicas de consumo de glucosa y glutamina mediante alimentación controlada y así pudieron alcanzar distintos estados metabólicos (Europa et al., 2000). La comparación de éstos demostró que es posible alcanzar mayores densidades celulares y producción de proteína y menores concentraciones de amonio y lactato cuando las células se encuentran en un estado metabólico bajo. El consumo de las fuentes principales de carbono no fue lo único alterado durante este metabolismo más eficiente, también lo fue el consumo de aminoácidos ya que se observó una menor producción de aminoácidos no esenciales y de amonio. Otros estudios sugieren que existe un cambio en la expresión de genes claves para el metabolismo central del carbono (Korke et al., 2004). Korke y colaboradores mostraron que la existencia de menores flujos a través de la glicólisis y el ciclo del TCA están correlacionados con una disminución de las enzimas involucradas en estas reacciones. El trabajo concluye que la alteración del estado metabólico se debe a una combinación de causas bioquímicas que afectan directamente a las reacciones involucradas y a la alteración en la expresión y transcripción de genes que expresan dichas enzimas.

Un *shift* metabólico también puede ocurrir cuando se consume lactato. Varios autores han estudiado este tipo de alteración del estado metabólico bajo distintas condiciones. Trabajos con células humanas y CHO mostraron que se puede lograr este tipo de alteración cuando el sistema ha sido suplementado con una mezcla de glucosa y galactosa. En estos cultivos se consume primero la glucosa y se observa producción de lactato. Una vez que se agota la glucosa comienza el uso de galactosa y se ve una disminución de la concentración de lactato debido a su uso como fuente adicional de carbono (Altamirano et al., 2006; Wagner et al., 1991). Como resultado directo de la reducción del lactato la duración del cultivo se extiende. Hay un estudio que investiga el efecto del pH y suplementación de aminoácidos en cultivos con alteración del metabolismo hacia valores negativos de $\Delta L/\Delta G$ y su importancia en la producción de antitrombina recombinante y metabolismo celular. Evidencia experimental indicó que una adecuada suplementación de aminoácidos permitía aumentar la producción de la proteína recombinante y que la alteración ocurre antes en cultivos con menor pH (Kuwaie et al., 2005). Pascoe y su equipo estudiaron las diferencias proteómicas entre células en diferentes estados

metabólicos. Los experimentos mostraron que los cambios de expresión más sustanciales se concentraban en enzimas de la vía glicolítica, en particular la cantidad de enolasa presente evidenció una disminución después del *shift*. Este resultado es consistente con la disminución de la tasa de consumo de glucosa (Pascoe et al., 2007). Estos trabajos sugieren que tanto cambios externos e internos de la célula están relacionados a los cambios metabólicos que las células sufren durante la alteración del estado metabólico.

1.2.4. Modelamiento matemático

El modelamiento matemático es una de las metodologías claves para la ingeniería metabólica. Mediante modelos es posible simular, interpretar datos, analizar un sistema biológico, predecir, diseñar y optimizar vías metabólicas. Para obtener un adecuado modelo es necesario tener en consideración los siguientes aspectos (Wiechert, 2002):

- Nivel de abstracción: Es importante para poder simplificar el modelo de manera que describa los componentes y procesos de interés.
- Principios del modelo: Es necesario establecer la leyes que rigen al sistema, como por ejemplo, la conservación de masa y energía.
- Simplificación: Debido a la alta complejidad de las redes metabólicas, éstas se pueden simplificar para así disminuir la dificultad asociada a la realización del modelo.
- Cinéticas: Es importante conocer la expresión matemática que representa cada flujo como también los parámetros cinéticos.
- Datos medidos: Para complementar y validar los resultados es importante tener datos con los que comparar y calibrar las expresiones ya definidas.

Entre los distintos modelos que se pueden realizar destacan el Análisis de Flujos Metabólicos y los modelos dinámicos, los cuales se describen a continuación.

1.2.4.1. Análisis de Flujos Metabólicos

El análisis de flujos metabólicos (MFA) es una herramienta utilizada para el modelamiento de redes metabólicas. En éstas, los nodos representan metabolitos intracelulares, las entradas y las salidas son los sustratos y productos y las reacciones son representadas por los flujos entre nodos. La técnica permite estimar los flujos metabólicos tan solo conociendo las tasas específicas de consumo y producción de algunas especies. Esta información permite comparar la distribución del flujo entre dos condiciones de cultivo diferentes y determinar por ejemplo qué vías se favorecen en una condición dada y por lo tanto dilucidar algunos mecanismos celulares.

Existen ciertas limitaciones y dificultades inherentes al estudio de flujos intracelulares. Entre éstas se encuentra la determinación de una red de reacciones adecuada que represente los flujos más importantes de carbono y nitrógeno en la célula. La correcta medición de las tasas específicas de las especies que entran y salen del sistema es difícil y cuando las células se encuentran en un medio complejo no se puede medir el consumo de todos los nutrientes involucrados. Además los cultivos presentan una heterogeneidad en cuanto al estado metabólico de las células ya que conviven células viables con otras en estado apoptótico (Boghigian et al.).

El análisis consiste en un balance de masa que comienza con el supuesto de que el sistema se encuentra en un estado pseudoestacionario lo que significa que no hay acumulación de los metabolitos intracelulares. Se define la matriz estequiométrica A , el vector $Y(t)$ que contiene las concentraciones de los intermediarios, $x(t)$ que representa los flujos del sistema y $r(t)$ que presenta las tasas específicas de consumo y producción de las especies. El sistema de ecuaciones es entonces:

$$\frac{dY(t)}{dt} = Ax(t) - r(t) \quad (1)$$

Dado el supuesto de estado pseudoestacionario la derivada de las concentraciones intracelulares es cero por lo que se reescribe el sistema de ecuaciones:

$$Ax(t) = r(t) \quad (2)$$

Para conocer la cómo afecta un error en la medición de las tasas específicas medidas y el resultado se estudia la sensibilidad del sistema.

$$\frac{dx(t)}{dt} = (A^T A)^{-1} A^T \quad (3)$$

Los grados de libertad del sistema (GL) se define como la resta entre el número de incógnitas (número de reacciones) y metabolitos; cuando se compara este número con la cantidad de especies medidas experimentalmente (EM) se determina si el sistema se encuentra determinado (GL=EM), subdeterminado (EM<GL) o sobredeterminado (EM>GL). Conocer esta clasificación es importante para saber qué estrategia usar para solucionar el sistema de ecuaciones. Los sistemas determinados se resuelven multiplicando con la inversa de la matriz estequiométrica. Para aquellos sistemas subdeterminados se utiliza programación lineal asumiendo que el metabolismo celular trabaja hacia alguna función objetivo que puede ser maximizar biomasa. Finalmente, se soluciona el sistema de ecuaciones sobredeterminados mediante la regresión lineal de mínimos cuadrados la cual multiplica los dos lados de la ecuación por una pseudoinversa de la matriz estequiométrica.

Diversos autores han utilizado MFA para estudiar el metabolismo de células animales que producen alguna proteína recombinante con uso terapéutico. Altamirano y sus colaboradores compararon la distribución de flujos en células CHO productoras de tPA entre una etapa caracterizada por el consumo de glucosa y producción de lactato y una segunda fase en que se consumía galactosa y lactato simultáneamente y postularon que posiblemente el lactato se dirige hacia la producción de acetoina (Altamirano et al., 2006). Europa y colaboradores estudiaron la producción de IgG por células de hibridoma en distintos estados metabólicos caracterizados por distintos valores de $\Delta L/\Delta G$ y concluyeron que menores niveles de $\Delta L/\Delta G$ significan un metabolismo más eficiente (Europa et al., 2000). Nyberg y su equipo estudiaron el metabolismo de aminoácidos de células CHO que producen interferón obteniendo una estimación de la tasa de consumo de oxígeno y respiración a partir del consumo del metabolismo de péptidos (Nyberg et al., 1999).

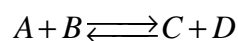
1.2.4.2. Modelos dinámicos.

La relación que existe entre el consumo de nutrientes, producción de metabolitos y el metabolismo celular es compleja y para obtener una visión integral de cómo se relacionan se puede construir un modelo dinámico que represente algún sistema. A pesar de que se han desarrollado más modelos de organismos como bacterias y levaduras, algunos investigadores se han abocado al trabajo sobre células animales, organismos más complejos que representan un mayor reto. Algunos trabajos han explorado la producción de proteínas recombinantes, el metabolismo de eritrocitos y otros han estudiado la gluconeogénesis en diferentes tejidos (Garfinkel et al., 1979; Lambeth and Kushmerick, 2002; Mulquiney and Kuchel, 1999; Wu et al., 1993).

Los modelos describen la actividad metabólica que se lleva a cabo la célula, capturando aspectos relevantes de las respuestas de un sistema bajo ciertas condiciones de interés. Los modelos se pueden construir mediante el planteamiento de una serie de ecuaciones diferenciales que representan la variación en el tiempo de los metabolitos considerados y esta expresión diferencial será igual a las velocidades de las reacciones que producen dicho metabolito menos las velocidades de aquellas que utilizan a la molécula como sustrato.

$$\frac{dX}{dt} = \sum r_{producción} - \sum r_{consumo} \quad (4)$$

La expresión para la velocidad de reacción de cada enzima involucrada pueden ser recogidas de estudios específicos de cada reacción y enzima involucrada y presentan distintas formas dependiendo de las formas de regulación que tienen y de su reversibilidad. Uno de los mecanismos más simples y más utilizado para reacciones que involucran dos sustratos y productos que no muestran mayores factores de inhibición o control es el bi-bi que tiene la siguiente expresión:



$$r = \frac{V_{\max}^f \frac{[A][B]}{K_{m_A} \cdot K_{m_B}} - V_{\max}^r \frac{[C][D]}{K_{m_C} \cdot K_{m_D}}}{1 + \frac{[A]}{K_{m_A}} + \frac{[B]}{K_{m_B}} + \frac{[A][B]}{K_{m_A} \cdot K_{m_B}} + \frac{[C]}{K_{m_C}} + \frac{[D]}{K_{m_D}} + \frac{[C][D]}{K_{m_C} \cdot K_{m_D}}} \quad (5)$$

Donde V_{\max}^f y V_{\max}^r son la velocidad máxima hacia adelante y reversa respectivamente, K_{m_x} es la constante de Michaelis-Menten de la enzima para el sustrato. En algunos casos, el valor de estos parámetros se puede encontrar en bibliografía.

Una vez definido el conjunto de ecuaciones, es necesario calibrar el modelo de manera que se ajusten ciertos parámetros para que el modelamiento represente lo obtenido en los experimentos. En una siguiente etapa se debe validar el modelo calibrado con un conjunto de datos experimentales distintos al usado para la calibración.

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo, es comprender el metabolismo de lactato. Específicamente, se desea entender las condiciones intracelulares que permiten el consumo de lactato en cultivos suplementados con una mezcla de fuentes de carbono y evaluar la distribución de flujos intracelulares durante el consumo de lactato.

Las condiciones en las que se realizarán los análisis consisten en medios suplementados con distintas mezclas de glucosa y galactosa en comparación a cultivos control con glucosa como única fuente de carbono.

1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar niveles de metabolitos y tasas de consumo o producción del metabolismo celular bajo distintas condiciones de cultivo.
- Elucidar las condiciones en las cuales el lactato es reincorporado a la célula mediante experimentos con glucosa y mezclas de glucosa y galactosa o galactosa con lactato.
- Desarrollo MFA para cultivos en condiciones de consumo de glucosa o galactosa.
- Comparar flujos en el metabolismo celular bajos los diferentes estados metabólicos.
- Desarrollo de un modelo dinámico del metabolismo que incorpore las vías más importantes de éste que apoye los resultados y discusiones de los experimentos y del MFA.

1.4. Alcances.

Entre los alcances de este trabajo esta la realización de distintos cultivos diseñados para explicar el metabolismo de lactato en células CHO en medio suplementado con glucosa y mezclas de glucosa con galactosa. Para esto se caracterizará su estado metabólico midiendo el crecimiento celular, consumo de nutrientes como glucosa y aminoácidos y producción lactato, amonio y tPA. Además se determinarán relación entre metabolitos extracelulares y algunos intracelulares como lactato, alanina, citrato y oxalacetato.

Un segundo alcance es el planteamiento de un modelo dinámico simple que represente las vías más importantes del metabolismo de una célula CHO. Este modelo apoyará los resultados entregados por el análisis de los experimentos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología general.

El desarrollo de este trabajo consistió en dos partes, la primera consiste en la realización del aspecto experimental de éste y la segunda sobre la implementación del modelo dinámico del metabolismo de células CHO. Las metodologías del trabajo se esquematizan en la Figura 2 y Figura 3

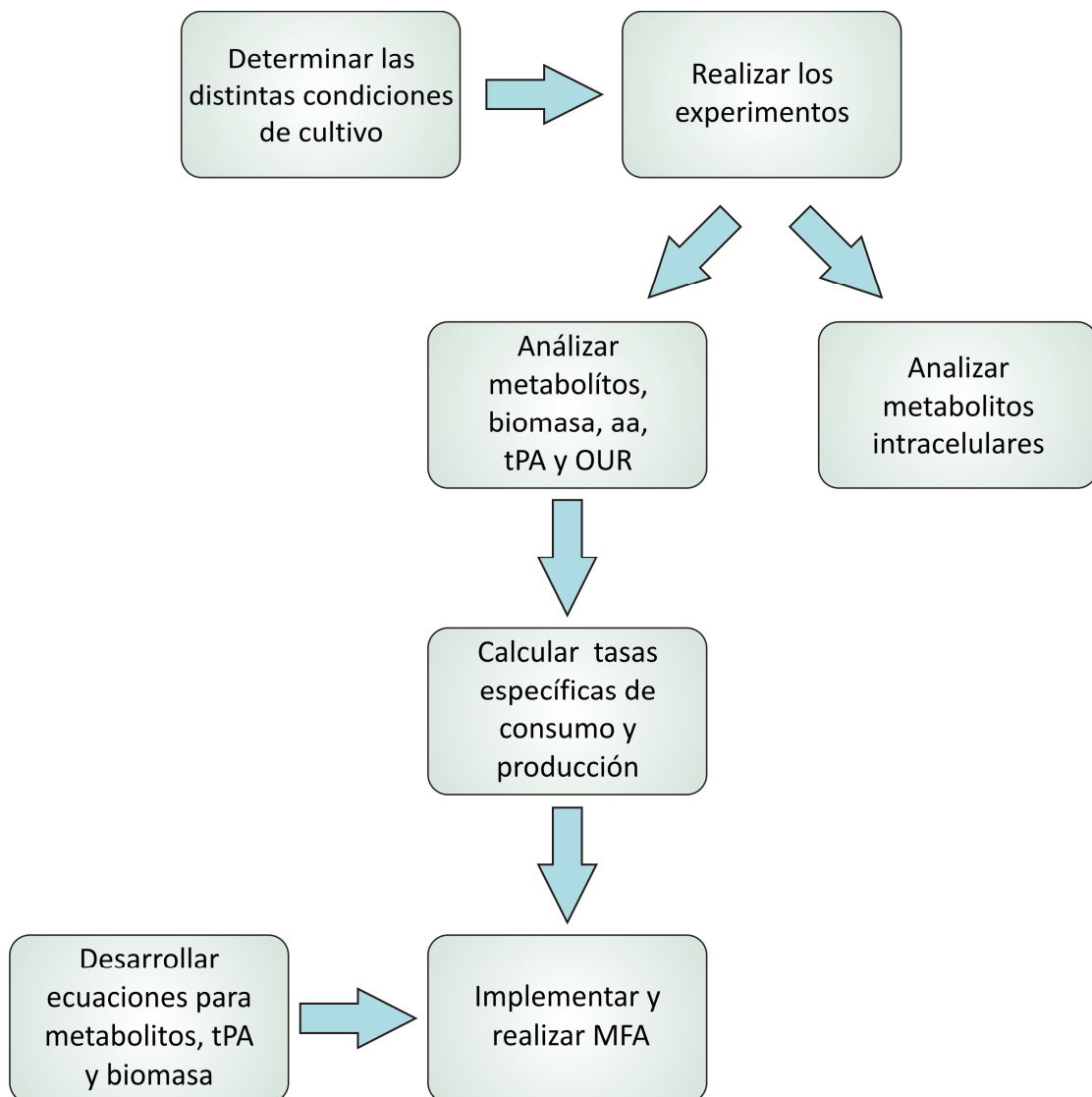


Figura 2: Metodología seguida para el aspecto experimental del trabajo

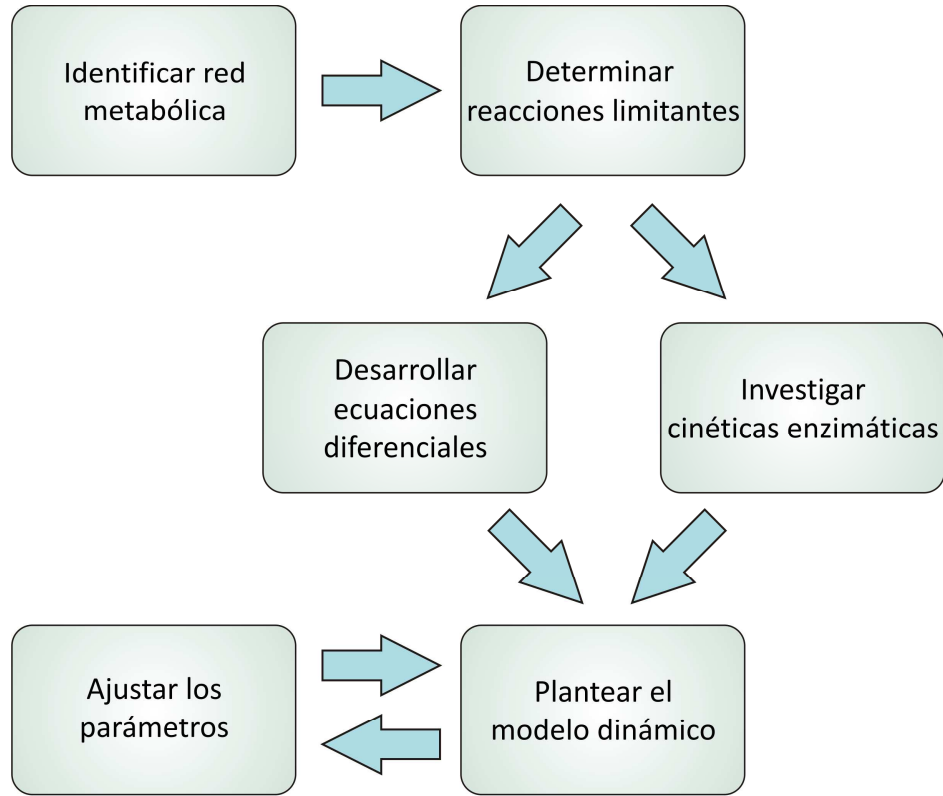


Figura 3: Metodología para la realización del modelo dinámico

2.2. Materiales y Métodos.

2.2.1. Materiales

Línea celular

- CHO TF 70R

Reactivos

- 2-mercaptoetanol (Sigma, M3148-250)
- Ácido bórico (J.T. Baker, 0084-01)
- Ácido perclórico (Malincrodt Chemicals, 2766-44)
- Ácido sulfurico (Merck 1.00731.2500)
- Agente revelador DakoCytomation TMB+Substrate (Chromogen)
- Agua Milli Q
- Anticuerpo monoclonal tPA
- Azul tripán (Sigma, T-0776)
- Brij-35 (Sigma, P1254-500G)
- BSA (Perbio, 23209)
- Buffer glucosa, galactosa, lactato y glutamato para YSI 2700
- Calibrador O₂ (Metler Toledo, 341001032)
- Carbonato de sodio (Merck, 1.06392.1000)
- Citrato de litio (Fluka, 62484)
- CO₂ (Agas)
- Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma, D2650)
- Estándar de ácidos orgánicos (Bio-Rad, 125-0586)
- Estándar de aminoácidos (Sigma, AAS18-10)
- Etanol grado HPLC (Merck, 1.11727.2500)
- Galactosa (Sigma, G5388)
- Gentamicina (Sigma, 48755)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Glutamato (Sigma, G8415)
- Hidróxido de litio (Merck, 1.05691-0.100)
- Hidróxido de potasio (Merck, 105012)
- Hipoclorito de sodio (7-10%) (TCL)
- Medio SFM4CHO de Hyclone (Hyclone, SH3A2300.01)
- Methyl cellsolve
- o-phtalaldehido (Sigma, P0675)
- PBS (Gibco, 21600-010)
- Pluronic (Sigma, P1300)
- Suero fetal bovino (Hyclone, SH30910.03)

- Sulfato de potasio (Merck, 1.05153.1000)
- Tween 20 (Roche, 11 332 465 001)

Equipos:

- Agitador magnético (Barnstead Thermolyne, 45600 cellgro™ Stirrer)
- Baño térmico (Labtech)
- Cámara de flujo laminar (Nuare, Nu201330E)
- Centrífuga Boeco C-28
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Columna Aminex® HPX-87H (Bio-Rad)
- Computador
- Lector de placa
- Fermentador (B. Braun Biotech International, Biostat)
- HPLC Perkin Elmer
- HPLC Shimadzu controlador CBM20A
- Incubadora (Shel Lab, TC2323)
- Refrigerador -80°C (SO-LOW, U85-13)
- Sensor de oxígeno (Mettler Toledo)
- Shim-pack column (Shimadzu, 228-00821-91)
- Shim-pack Amino-Li (100mmL. × 6.0mmI.D.) (Shimadzu, 228-18837-92)
- Tanque N₂ líquido (Taylor Wharton XT20)
- YSI 2700 Analyzer

Materiales del laboratorio:

- Filtros de 0.2 nm, Advantec.
- Jeringas 20 mL
- Balanza digital, 10 mg de precisión.
- Agitador magnético con temperatura.
- Propipeta (Drummond)
- Pipetas plásticas estériles de 1, 2, 5, 10 y 25 mL
- Micropipetas
- Vasos precipitados.
- Botellas.
- Tubos eppendorf.
- Cámara Naubauer
- Contador
- Spinners Wheaton
- Placas T25 y T75
- Crioviales
- Tubos 15 y 50 mL estériles
- Membranas glucosa, galactosa, lactato y glutamato para YSI 2700
- Placas elisa

- Filtros de membrana 0,45 μm .

Softwares:

- Excel, para el análisis de datos.
- Fermentor Control Program v3.1, para controlar el fermentador
- Matlab 7.4 de Math Works Inc, para la programación y resolución del modelo de ecuaciones diferenciales.
- Shimadzu LC Driver Ver. 2.0, para controlar HPLC Shimadzu
- Sigmaplot, para la generación de gráficos
- CorelDraw, para crear figuras

2.2.2. Cultivo celular

La línea celular utilizada en los experimentos es conocida como CHO TF 70R y proviene de ovarios de hámster chino, ésta se encuentra transformada con el gen que produce t-PA. Se utilizó medio libre de suero y proteínas (SFM4CHO, Hyclone) con 20 mM de glucosa y 6 mM de glutamato (Anexo 1) para crecer las células en cada etapa de sus subcultivos (Anexo 2) realizados antes de los experimentos y para su congelamiento y descongelamiento (Anexo 3 y Anexo 4).

Los cultivos se llevaron a cabo en *spinners* con un inóculo inicial de $2 \cdot 10^5$ [células/ml] dentro de una incubadora con atmósfera controlada a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Muestras para determinar densidad celular X, viabilidad (Anexo 5) y la concentración de los metabolitos extracelulares se tomaron tres veces al día a intervalos regulares. En tanto, una vez al día se tomaron muestras para realizar extracción de metabolitos intracelulares (ver Anexo 10) y determinar la tasa de consumo de oxígeno (ver Anexo 6).

2.2.3. Preparación Spinners

Se lava el *spinner* con HCl 70%. Se deja secar en un horno y se impregna las paredes en silicona, nuevamente se seca en horno, se arman las partes y se esteriliza.

2.2.4. Caracterización metabólica del cultivo

Para conocer el estado metabólico de las células en cultivo se analizan las muestras recolectadas para obtener las concentraciones de glucosa, galactosa, lactato y glutamato (Anexo 7), t-PA (Anexo 8), amonio y aminoácidos (Anexo 9). A partir de los valores obtenidos se calcula la tasa específica de consumo (q_c) o producción (q_p) de metabolitos, número de células vivas (X_v), la tasa específica de crecimiento de ellas (μ) y la velocidad máxima (μ_{max}) que caracteriza el crecimiento exponencial de éstas, a partir de este último valor se obtiene el tiempo de duplicación.

$$X_v = X \cdot V \quad (6)$$

$$\mu = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} \quad (7)$$

$$q_c = \frac{-1}{X_v} \frac{dC}{dt} \quad (8)$$

$$q_p = \frac{1}{X_v} \frac{dP}{dt} \quad (9)$$

Para calcular las tasas específicas de consumo o producción se debe generar primero una curva cumulativa sumando las diferencias de cantidad de metabolito presente en el medio entre dos tiempos consecutivos y se ajusta un polinomio a la curva resultante. Las tasas específicas se calculan como la derivada de la curva evaluada en el tiempo t , dividida por la densidad celular en t . Este método asegura pequeñas fluctuaciones en los resultados a pesar de errores en las mediciones. Las tasas calculadas son utilizadas para en análisis de flujo metabólico y para calcular el valor $\Delta L/\Delta G$ que se define como la razón $-q_{Lac}/q_{Glc}$.

2.2.5. Metabolitos intracelulares

Para conocer la concentración de metabolitos intracelulares se realiza una extracción ácida de éstos mediante la técnica utilizada por Lu y sus colaboradores (Anexo 10) (Lu et al., 2003), con una etapa de lavado con PBS frío. El protocolo asegura la estabilidad de citrato, lactato y alanina si se guardan adecuadamente las muestras; sin embargo, oxalacetato es menos estable, pero aún se puede encontrar en cantidades medibles. La metodología permite comparar concentraciones intracelulares en distintos tiempos del cultivo a pesar de que exista algún error sistemático en su ejecución.

Para conocer la concentración intracelular de algún metabolito se debe determinar primero la concentración de los metabolitos (Anexo 7, Anexo 9 y Anexo 11) en el volumen final de extracción, multiplicar la concentración por el volumen total y dividir por el volumen total de las células de la muestra original. El volumen total de células se obtiene al multiplicar el número de células por el volumen celular que fue considerado ser $1,44 \cdot 10^{-9}$ mL (Lu et al., 2003).

2.2.6. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA).

Para obtener un buen resultado, el MFA depende en gran medida de la correcta identificación de las principales reacciones bioquímicas que dominan el metabolismo de las células. Debido a la complejidad de la red metabólica es necesario simplificarla, concentrándose en el metabolismo central del carbono de las células CHO. Esto significa considerar la producción de biomasa y producto, así como el catabolismo de glucosa y aminoácidos esenciales y síntesis de los no esenciales. Para cerrar el balance del carbono se calculó la tasa de respiración (CER) a partir la tasa de consumo de oxígeno (OUR) asumiendo una razón de respiración ($RQ = CER/OUR$) igual a uno, lo que significa que que por cada mol de O_2 consumido uno de CO_2 es liberado (Bonarius et al., 1995).

En la Tabla 3 se da una lista de todas las especies a las que se les midió su tasa específica de consumo o producción. Entre estas especies glucosa y galactosa son las fuentes

principales de carbono y glutamato es la fuente principal de nitrógeno, pero debido a su alta concentración es también una fuente importante de carbono para la célula. No se midió glutamina ya que se consideró que toda la glutamina producida era utilizada por vías metabólicas o producción de biomasa o tPA. El total de aminoácidos monitoreados representan más del 95% del total en el medio.

Tabla 3: Especies medidas para realizar análisis de flujo metabólico

Especies medidas

tPA
Biomasa
Glucosa
Galactosa
Lactato
CO₂
Amonio
Alanina
Arginina
Asparagina
Aspartato
Cisteína
Fenilalanina
Glutamato
Glicina
Histidina
Isoleucina
Leucina
Lisina
Metionina
Prolina
Serina
Tirosina
Treonina
Valina

La estimación de los flujos se realiza resolviendo el sistema de ecuaciones $A \cdot x(t) = r(t)$. Donde A es la matriz estequiométrica, $x(t)$ es el vector que representa los flujos intracelulares y $r(t)$ contiene las tasas de acumulación de cada especie consideradas en el sistema. El sistema que se considera en este trabajo tiene 31 reacciones y

33 especies involucradas en el metabolismo central del carbono incluyendo glicólisis, ciclo de Krebs y metabolismo de aminoácidos y la elección de éstas se detalla más adelante. El sistema se encuentra sobredeterminado y se resuelve mediante el método de mínimos cuadrados (Bonarius et al., 1996; Vallino and Stephanopoulos, 1993).

Resultados del análisis de la matriz establecen que ésta no es singular y está bien planteada ya que su número de condicionamiento es 31, lo que indica que la propagación de cualquier error es insignificante. El análisis de sensibilidad sobre A estequiométrica indican que los las reacciones Pyr-AcCoA, OAA- α KG, α KG-SucCoA, Mal-OAA y Ser-Pyr son sensibles a errores en las mediciones de leucina, lisina y metionina. Sin embargo, el consumo de estos aminoácidos es baja y debido a la calidad de la cromatografía se espera que la amplificación del error sea mínima.

2.2.6.1. Reacciones del metabolismo central del carbono y aminoácidos para análisis de flujo metabólico.

Las reacciones metabólicas que se incluyeron en el análisis de flujo metabólico son las que se consideran como principales en las vías tanto anabólicas como catabólicas de la célula. Entre estas se encuentran la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), glutaminólisis, metabolismo de aminoácidos, síntesis de biomasa y t-PA como se observa en la Figura 4.

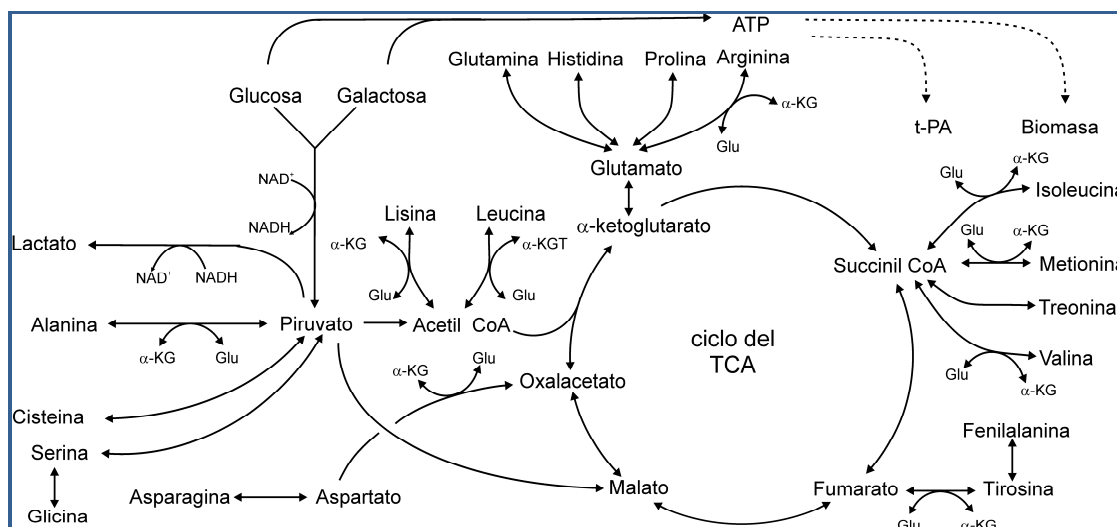


Figura 4: Red metabólica considerada en el análisis de flujo metabólico

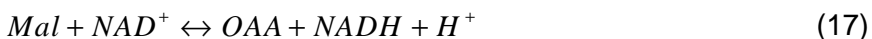
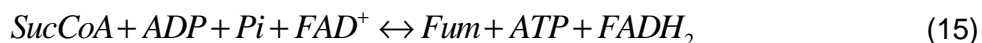
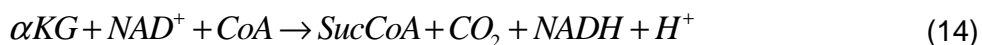
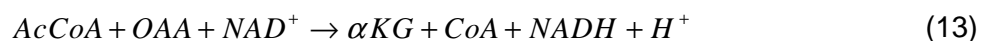
2.2.6.2. Glicólisis

La glicólisis es la ruta por la cual se degrada la glucosa (Glc) hasta producir 2 moléculas de piruvato (Pyr), La vía consta de 10 reacciones consecutivas, las cuales se condensan en una sola para el análisis metabólico. Se considera además la producción de lactato (Lac) a partir de piruvato.



2.2.6.3. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El ciclo del TCA consiste de una serie de 10 reacciones catalizadas por diferentes enzimas. Éste ciclo es de crucial importancia en organismos aeróbicos ya que su objetivo principal es la producción de moléculas precursoras de aminoácidos y otras involucradas en la producción de ATP. Para el análisis se simplificó el ciclo a 8 reacciones.



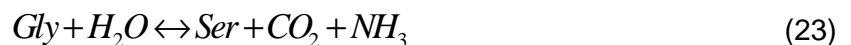
2.2.6.4. Glutaminólisis

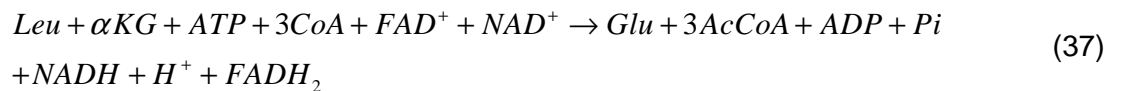
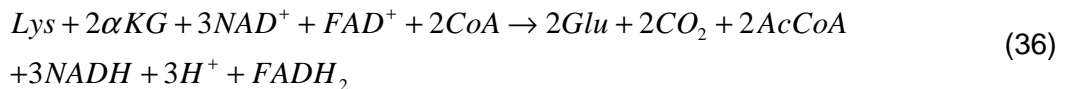
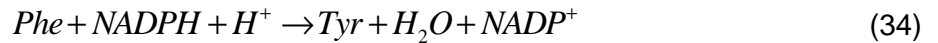
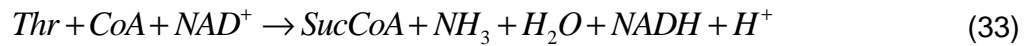
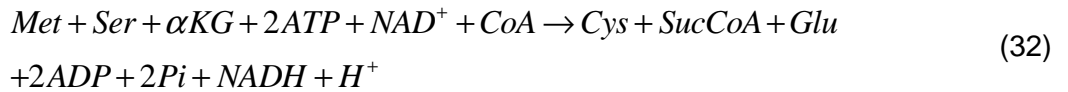
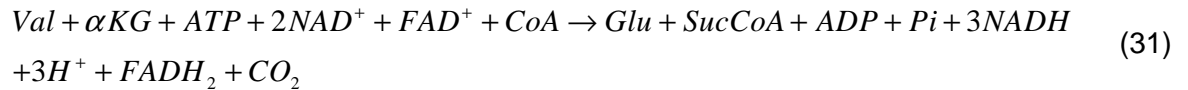
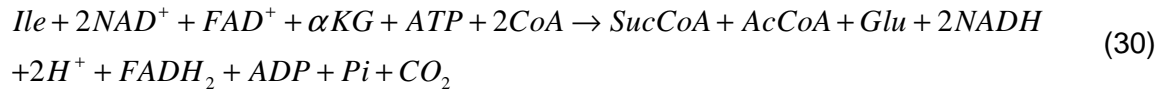
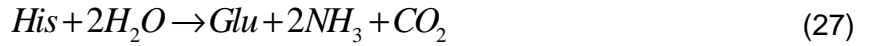
Varias publicaciones (Reitzer et al., 1979; Zielke et al., 1984) han establecido que la glutamina (Gln) es una de las fuentes principales de energía que tiene la célula. En este trabajo el aminoácido es reemplazado por glutamato (Glu), sin embargo las vías de la glutaminólisis son igualmente válidas, ya que la primera etapa es la reacción reversible entre glutamina y glutamato, mientras que la segunda es la conversión de glutamato hacia α -ketoglutarato para su incorporación al TCA. Además se agrega a esta vía la reacción mediante la cual malato (Mal) se convierte en piruvato.



2.2.6.5. Síntesis y degradación de aminoácidos

Las reacciones más importantes de síntesis de aminoácidos no esenciales y de catabolismo de los esenciales son:





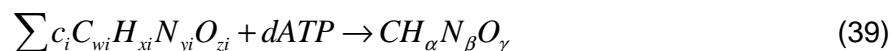
2.2.6.6. Definición de molécula equivalente energética

Para poder tomar en consideración los requerimientos energéticos que tiene la célula para poder sintetizar biomasa y t-PA se definió una molécula energética *CE* (por las siglas en inglés Carbon Equivalent), la cual se produce a partir de la oxidación completa de una molécula de glucosa.

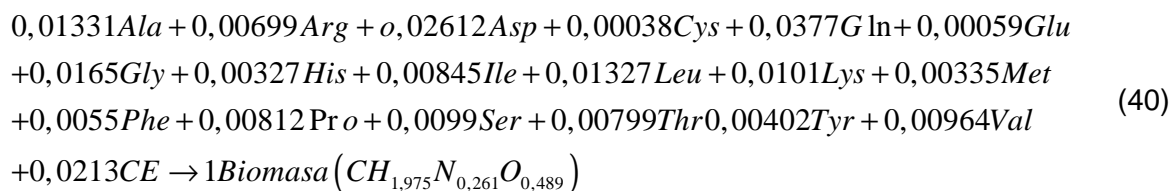


2.2.6.7. Definición de reacción de síntesis de biomasa

La reacción de síntesis de biomasa es uno de los pasos más importantes y a la vez complicados en un análisis de flujo metabólico. Es necesario obtener una ecuación que considere la síntesis de las macromoléculas que conforman la célula como son las proteínas, lípidos en general y ácidos nucleicos a partir de la contribución de distintos precursores. La ecuación es de la forma

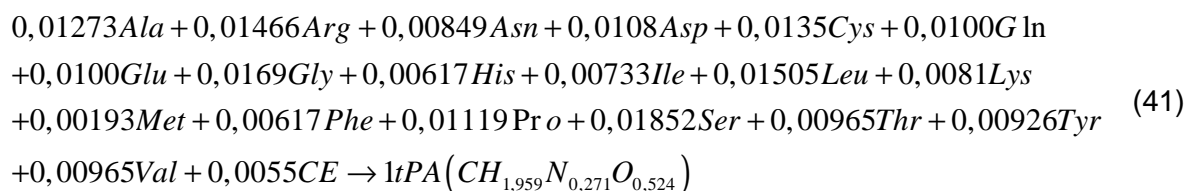


Análisis establecen que la fórmula elemental de la biomasa de una célula CHO es $C_{1}H_{1,975} N_{0,261} O_{0,489}$, de la cual se desprende que su peso molecular es 25,474 g/mol (Gambhir et al., 2003). Además, la suma de las reacciones más importantes de anabolismo dentro de la célula da lugar a la siguiente ecuación de síntesis:



2.2.6.8. Definición de reacción de síntesis de t-PA

Para establecer la ecuación que rige la síntesis de tPA se considera la secuencia de aminoácidos de la proteína y además la energía que utiliza la célula para crear los enlaces peptídicos que proviene las moléculas CE. Dada la fórmula elemental del tPA obtenida, la cual es $C_1H_{1,959}N_{0,271}O_{0,524}$ con un peso molecular de 24,24 g/mol, se tiene la ecuación:



2.2.6.9. Ajuste de parámetros

El ajuste de parámetros se realizó alternando entre un ajuste de parámetros manual, en el cual se juzgaba si los valores cinéticos deberían ser mayores o menores a los propuestos inicialmente y se probaba con estos hasta ver una mayor similitud entre los valores modelados y experimentales, y otro computacional, los cuales buscaban encontrar el conjunto de parámetros que mejor describieran el comportamiento de un experimento que tiene como condición inicial 6 mM de glucosa y 14 mM de galactosa buscando minimizar una función objetivo. Se programó en Matlab un algoritmo que minimiza el error cuadrático medio cambiando los valores de los parámetros en cada interacción. Se utilizó el criterio de mínimo cuadrático medio ya que éste cuantifica el error entre los datos calculados por el modelo y los experimentales. La función fue definida como:

$$MSE = \sqrt{\sum_i \left(\frac{C_i^{sim} - C_i^{exp}}{C_i^{exp}} \right)^2} \quad (42)$$

Donde las especies i son glucosa, galactosa, alanina intra y extracelular y lactato intra y extracelular.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Condiciones de cultivo

Se diseñaron 5 experimentos que se realizaron en *spinners* para poder estudiar el metabolismo del lactato en cultivos con mezclas de glucosa, galactosa y lactato como fuentes principales de carbono para células CHO productoras de tPA). Las condiciones y los nombres de los experimentos se listan a continuación

- | | |
|--------------|--|
| 1. G20 | Glucosa 20 mM, Glutamato 6 mM. |
| 2. G6 | Glucosa 6 mM, Glutamato 6 mM. |
| 3. GG6/14 | Glucosa 6 mM, Galactosa 14 mM, Glutamato 6mM. |
| 4. GG2/18 | Glucosa 2 mM, Galactosa 18 mM, Glutamato 6 mM. |
| 5. GalL14/12 | Galactosa 14 mM, Lactato 12 mM, Glutamato 6 mM |

La primera condición sirve de control para los siguientes, ya que cultivos altos en glucosa suelen ser los estados de cultivo con los que se normalmente se trabaja. G6 tiene también como objetivo ser un control pero para comparar el crecimiento en condiciones de baja glucosa, como es la primera etapa de los cultivos GG6/14 y GG2/18. Estos últimos sirven para estudiar el consumo de lactato en distintas concentraciones de glucosa y galactosa y lo que significa esto para la célula. GalL14/12 fue diseñado para observar el crecimiento y dinámica con solo galactosa y lactato suplementados. Para que los resultados fueran comparables, todos los experimentos fueron diseñados con igual cantidad de carbonos alimentados excepto G6.

3.2. Cultivos

Se obtuvo las curvas de crecimiento, consumo de glucosa, galactosa, glutamato, producción de lactato y tPA para los experimentos G20, G6, GG6/14 y GG2/18 hasta que la viabilidad celular bajaba del 85%. El cultivo GalL14/12 perdió viabilidad en las primeras 3 horas de cultivo por lo que no se presentan resultados para esta condición.

Es posible observar en la Figura 5.(a) que G20 alcanza una densidad celular $1,3 \cdot 10^6$ [células/mL] después de 120 horas de cultivo consumiendo aproximadamente el 60% de la glucosa inicial y la disminución de la viabilidad comienza antes de alcanzar niveles inhibitorios de lactato y amonio. G6 mantuvo una alta viabilidad durante 75 horas hasta que se consumió toda la glucosa. La duración es significativamente menor y solamente alcanza la mitad de la densidad celular de G20. Los cultivos con mezcla de fuentes de carbono (GG6/14 y GG2/18) a pesar de tener la misma cantidad de carbonos que G20 a disposición de las células presentan curvas muy distintas a éste. GG6/14 alcanzó similar densidad celular pero mantuvo alta viabilidad durante un periodo mucho mayor, en tanto la densidad máxima de GG2/18 es la mitad de la de G20 pero en una extensión de tiempo igual.

Los experimentos suplementados solamente con glucosa presentan una sola fase de crecimiento mantenida por esta azúcar. En cambio se pueden identificar dos etapas en GG6/14 y GG2/18, la primera es sustentada por glucosa y una vez que ésta se termina comienza el consumo de galactosa acompañado por lactato (Figura 5.(c) y (d)). Cada etapa se caracteriza por valores distintos en la tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) y se presentan en la Tabla 4. Mientras se consumía glucosa valores altos y similares de μ_{max} fueron alcanzados sin importar la concentración inicial de glucosa; en cambio durante el consumo de galactosa las tasas más bajas fueron alcanzadas. Los valores de crecimiento menores pueden ser explicados debido a la reducción en la tasa de consumo de azúcar entre la etapa de uso de glucosa y galactosa. Un estudio anterior muestra que las células CHO no son capaces de crecer en lactato (Eagle et al., 1958) y otro demostró que no había actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa que se encuentra involucrada en la ruta de la gluconeogénesis (Neermann and Wagner, 1996), por lo que la galactosa es la única fuente de carbono que mantiene la proliferación celular en la segunda etapa de los cultivos con mezclas de carbono.

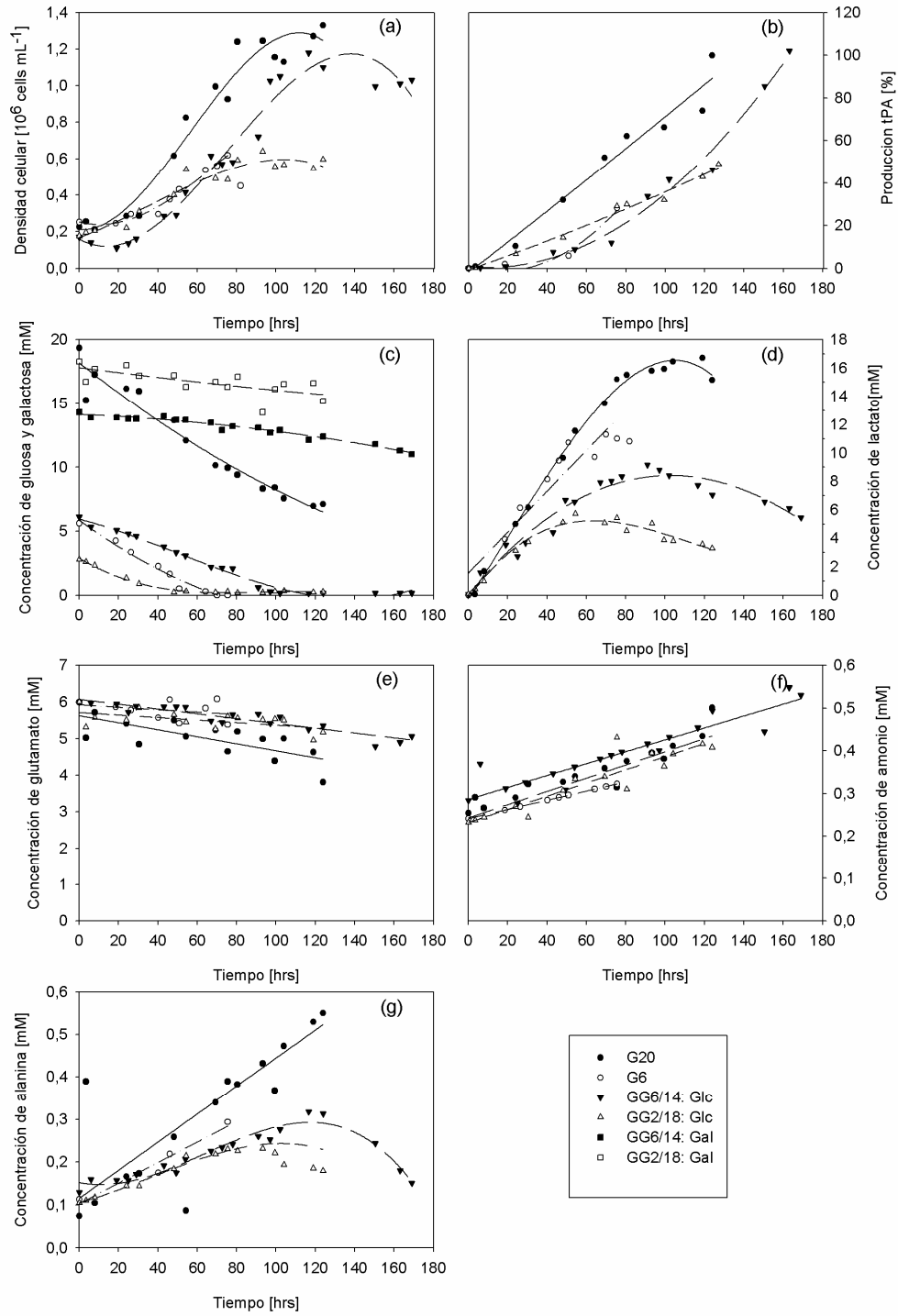


Figura 5: Cultivos Batch de células CHO con glutamato y distintas fuentes de de carbono

Tabla 4: Valores de μ_{\max} y $\Delta L/\Delta H$ para cada etapa metabólica de los cultivos

Cultivo	$\mu_{\max} [10^{-2} \text{ hrs}^{-1}]$		$\Delta L/\Delta H^*$	
	fase		Fase	
	Glc	Gal	Glc	Gal
G20	2,60	-	1,5	-
G6	1,93	-	1,3	-
GG6/14	2,44	0,74	1,3	-2,5
GG2/18	2,58	0,59	1,8	-2,5

* H: puede ser glucosa o galactosa dependiendo del cultivo y etapa.

Al comparar los perfiles de producción de tPA en la Figura 5.(b) y Figura 6.(b) es posible ver la síntesis de esta proteína depende de dos parámetros del cultivo, el primero es biomasa y el segundo la extensión. Al comparar las figuras se observa que G20 y GG6/14 producen cantidades similares de biomasa y tPA. Esto muestra que la formación de producto está fuertemente relacionada con la cantidad de células viables presentes en el cultivo. Por otro lado G6 y GG2/18 presentan una densidad similar pero el segundo produce más tPA probablemente debido a que a la prolongada vida del cultivo en comparación a G6. El estudio de Takagi y sus colaboradores muestra que existe una correlación inversa entre la tasa específica de crecimiento celular y la tasa específica de producción de proteína recombinante (Takagi et al., 2001). La segunda etapa de crecimiento de GG2/18 está sujeta a una baja tasa de proliferación debido al uso de galactosa, esto lleva a la maquinaria celular a desviar aquellos elementos que sustentaban la síntesis de biomasa hacia la síntesis de tPA. En otros estudios ya se había relacionado inhibición de la proliferación celular y el redireccionamiento de recursos celulares con el aumento de producción de proteína recombinante (Fussenegger et al., 1997; Terada et al., 1996).

En cada cultivo es posible observar una o dos etapas metabólicas, en este trabajo la primera se caracteriza por el cociente entre el las tasas específicas de producción de lactato y consumo de glucosa ($\Delta L/\Delta G$), en tanto la segunda se describe por la razón de lactato producido por galactosa consumida ($\Delta L/\Delta Gal$). Los valores promedio de $\Delta L/\Delta G$ y $\Delta L/\Delta Gal$ para cada experimento se muestran en la Tabla 4. Otros autores han demostrado que valores de $\Delta L/\Delta G$ de 1,4 pueden ser esperados en cultivos con alta glucosa, lo que significa que más moles de lactato son producidos que moles glucosa consumidos (Korke et al., 2004; Gambhir et al., 2003). Los valores negativos de $\Delta L/\Delta Gal$ son explicados por el alto consumo específico de lactato en

comparación al de galactosa durante la segunda etapa metabólica de los cultivos GG6/14 y GG2/18.

Al observar los perfiles de lactato en la Figura 5.(d) se ve que los cultivos suplementados solamente con glucosa tienen un aumento sostenido de lactato extracelular. En cambio aquellos con glucosa y galactosa presentan un aumento de la concentración de lactato extracelular durante el consumo de glucosa y una disminución durante el uso de galactosa como fuente de carbono como también ha sido reportado en otros trabajos (Altamirano et al., 2006; Altamirano et al., 2004). Mayor análisis establece que a mayor concentración inicial de glucosa mayor es la concentración de lactato alcanzada en el momento en que se detiene el consumo de glucosa. Durante las últimas horas de G20 y G6 una pequeña cantidad de lactato es consumida pero no es capaz de mantener el crecimiento celular lo que explica la fase de muerte en que entran los cultivos.

La concentración de alanina en el tiempo fue medida y se muestra en la Figura 5.(g), al comparar estos perfiles se observa una similitud a los de lactato. Tal como el lactato la alanina es producida a partir de piruvato cuando muchos carbonos entran a la vía de la glicólisis y cuando alcanzan el nodo de piruvato el exceso se canaliza hacia la producción de lactato y alanina mediante diferentes reacciones reversibles. Debido a esto la concentración de alanina y su tasa específica son similares a las observadas para lactato.

En el cultivo glutamato no solo es la fuente principal de nitrógeno, pero debido a su alta concentración es una fuente secundaria de carbono. Al comparar Figura 6.(a) y (d) se ve una disminución del consumo de glutamato en el tiempo, tal como sucede con las otras fuentes de carbono. Un estudio anterior evidencia que el catabolismo de glutamina, que es el mismo de glutamato, es capaz de alimentar el ciclo del TCA y entregar así carbonos que participarán en la síntesis de energía (Reitzer et al., 1979). Distintas vías permiten que la célula metabolice el glutamato, una de ellas es la deaminación la cual causa producción de amonio. Debido a esto la aparición de amonio se relaciona al consumo de glutamato lo que sugiere que cerca del 13% del glutamato consumido se va por esta vía.

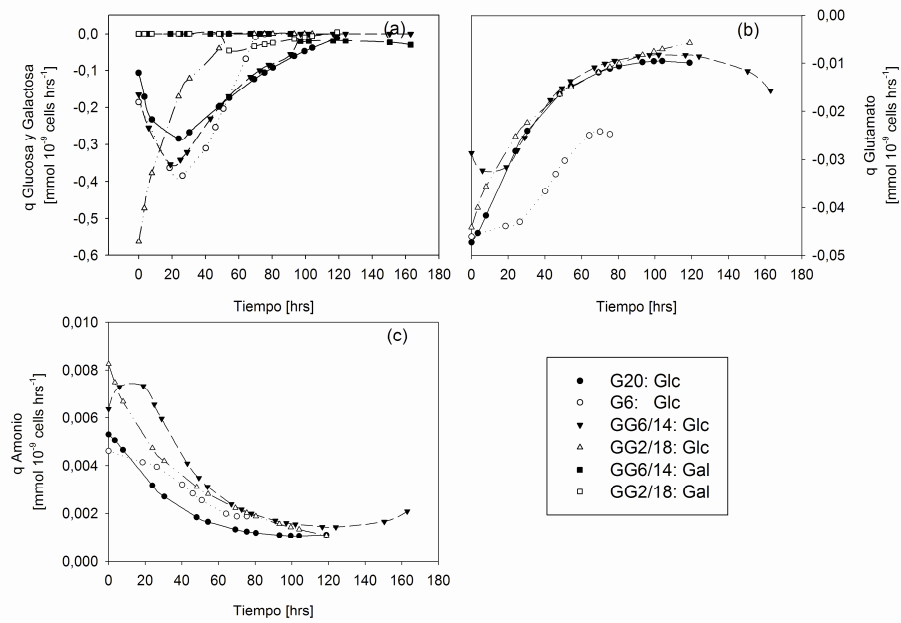


Figura 6: Tasas específicas de producción y consumo de algunos metabolitos.

La evidencia ya mencionada indica que bajo las condiciones de cultivo estudiadas en este trabajo mayores concentraciones iniciales de glucosa se traducen en mayores concentraciones alcanzadas de lactato, pero cuando se utiliza una combinación de fuentes de carbono es posible ver una segunda etapa metabólica durante la cual se consume lactato. La razón de esta alteración puede ser explicada por la menor velocidad de transporte de galactosa en comparación a la de galactosa. El consumo lento de galactosa puede no ser suficiente para mantener una alta viabilidad en el cultivo ni los requerimientos energéticos. El uso de una segunda hexosa permite una extensión de la etapa de alta viabilidad, pero esto no se debe solamente al consumo de galactosa y lactato, pero también la disminución de protones en el medio extracelular que se produce cuando una molécula de lactato es transportada (Plagemann et al., 1981). Esto debería permitir un aumento del pH extracelular y por lo tanto una reducción del efecto negativo que tiene el pH bajo sobre el cultivo.

3.3. Metabolitos intracelulares

Para entender el destino metabólico del lactato una vez que regresa a la célula se muestra la relación entre glucosa, galactosa, lactato y alanina extracelular con lactato, alanina, citrato y oxalacetato intracelular (Figura 7). Se observa una disminución general de los metabolitos intracelulares a medida que disminuye el consumo de hexosa, pero para los experimentos GG6/14 y GG2/18 la caída de la concentración de los intermediarios del ciclo del TCA es menos pronunciada que para G20 y G6.

Interesantemente el lactato intracelular tiene una dinámica similar al del extracelular. Durante el consumo de glucosa se acumula lactato dentro de la célula como consecuencia de una rápida conversión desde piruvato. Cuando comienza el uso de galactosa el lactato intracelular disminuye en los cultivos GG6/14 y GG2/18 a pesar de que lactato está siendo incorporado a la célula. Esta reducción puede ser explicada por su uso como fuente de piruvato para mantener el flujo en el ciclo del TCA. En esta condición citrato y oxalacetato de GG6/14 y GG2/18 presentan caídas menos pronunciadas que G20 y G6.

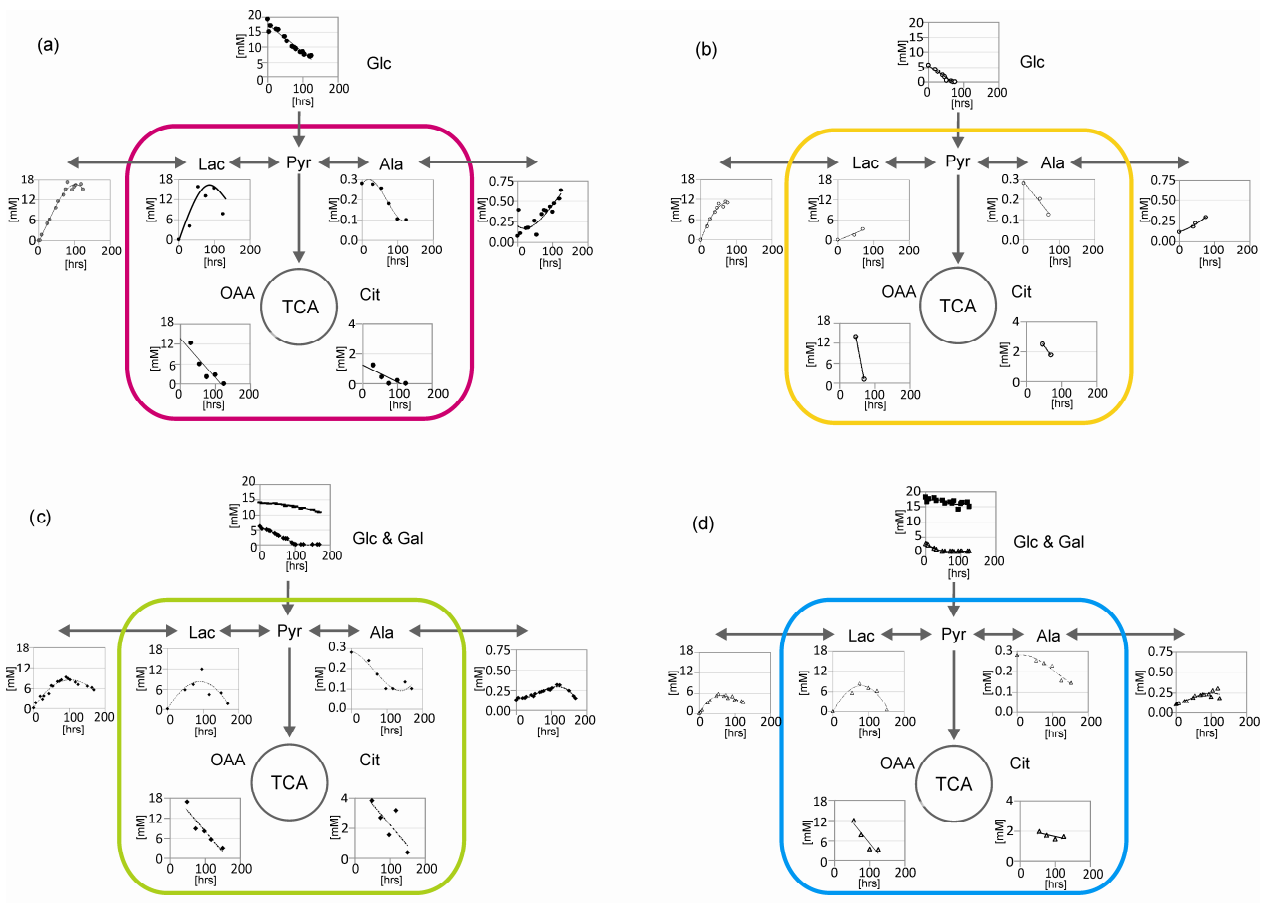


Figura 7: Metabolitos intracelulares: En la figura se observa el cambio en la concentración de extracelular de glucosa, lactato y alanina y de algunas especies intracelulares como lactato, alanina, oxalacetato y citrato.

(a) G20; (b) G6; (c) GG6/14; (d) GG2/18

3.4. Análisis de flujos metabólicos

Un análisis metabólico fue realizado para todos los experimentos en dos instantes diferentes del cultivo. Los resultados se presentan en la Figura 8, las primeras dos columnas de la Figura 8.(a) corresponden al análisis del cultivo G20 a las 51 y 80 horas de cultivo; la tercera columna representa los flujos metabólicos de G6 a las 50 horas; en la Figura 8.(b) las dos primeras columnas muestran el análisis para GG6/14 a las 51 y 124 horas y las últimas dos representan GG2/18 a las 30 y 93 horas. Las tasas específicas utilizadas en estos tiempos se muestran en la Tabla 5; los flujos en la red metabólica simplificada se presentan en $\text{mmol C}/10^9$ células/hr.

Tabla 5: Tasas específicas utilizadas para el análisis de flujo metabólico en $[\text{mmol}/10^9$ células/hr]

Especies	G20		G6	GG6/14		GG2/18	
	51 [hrs]	80 [hrs]	51 [hrs]	51 [hrs]	124 [hrs]	30 [hrs]	93 [hrs]
tPA	1.39×10^{-4}	7.90×10^{-5}	$1,13 \times 10^{-4}$	1.09×10^{-4}	1.14×10^{-4}	$1,12 \times 10^{-4}$	$7,96 \times 10^{-5}$
Biomasa	1.74×10^{-1}	7.86×10^{-2}	$1,99 \times 10^{-1}$	2.40×10^{-1}	4.39×10^{-2}	$1,73 \times 10^{-1}$	$1,89 \times 10^{-3}$
Glc/Gal	-2.00×10^{-1}	-8.19×10^{-2}	$-2,07 \times 10^{-1}$	-1.40×10^{-1}	-1.93×10^{-2}	$-1,86 \times 10^{-1}$	$-5,33 \times 10^{-2}$
Lac	3.16×10^{-1}	9.40×10^{-2}	$2,54 \times 10^{-1}$	2.16×10^{-1}	-4.15×10^{-2}	$3,13 \times 10^{-1}$	$-5,35 \times 10^{-2}$
CO ₂	7.75×10^{-1}	3.17×10^{-1}	$4,49 \times 10^{-1}$	6.80×10^{-1}	3.55×10^{-1}	$7,15 \times 10^{-1}$	$2,08 \times 10^{-1}$
NH ₃	1.86×10^{-3}	1.06×10^{-3}	$2,59 \times 10^{-3}$	4.00×10^{-3}	8.81×10^{-4}	$5,10 \times 10^{-3}$	$5,24 \times 10^{-3}$
Ala	5.73×10^{-3}	3.27×10^{-3}	$6,02 \times 10^{-3}$	2.68×10^{-3}	-2.56×10^{-3}	$3,21 \times 10^{-3}$	$2,06 \times 10^{-3}$
Arg	-8.41×10^{-4}	-4.80×10^{-4}	$-8,59 \times 10^{-4}$	-5.79×10^{-3}	1.29×10^{-3}	$-1,88 \times 10^{-2}$	$-9,77 \times 10^{-3}$
Asn	6.65×10^{-4}	3.79×10^{-4}	$-1,36 \times 10^{-3}$	7.79×10^{-4}	-7.81×10^{-5}	$6,41 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$
Asp	-1.33×10^{-3}	-7.59×10^{-4}	$1,74 \times 10^{-3}$	-4.30×10^{-3}	9.18×10^{-4}	$1,03 \times 10^{-1}$	$1,35 \times 10^{-3}$
Cys	-1.97×10^{-4}	-1.12×10^{-4}	$4,25 \times 10^{-4}$	-1.07×10^{-3}	-2.77×10^{-5}	$-2,82 \times 10^{-4}$	$-6,79 \times 10^{-4}$
Glu	-3.39×10^{-2}	-1.19×10^{-2}	$-3,09 \times 10^{-2}$	-2.24×10^{-2}	-1.02×10^{-2}	$-1,29 \times 10^{-2}$	$-1,13 \times 10^{-2}$
Gly	-4.82×10^{-3}	-2.74×10^{-3}	$1,67 \times 10^{-2}$	-9.90×10^{-3}	-1.14×10^{-3}	$-1,18 \times 10^{-2}$	$-5,90 \times 10^{-3}$
His	5.77×10^{-3}	3.29×10^{-3}	$-2,92 \times 10^{-3}$	5.77×10^{-3}	2.43×10^{-3}	$9,47 \times 10^{-3}$	$5,65 \times 10^{-3}$
Ile	-1.83×10^{-4}	-1.04×10^{-4}	$-1,87 \times 10^{-2}$	-1.61×10^{-3}	-9.69×10^{-6}	$-2,73 \times 10^{-3}$	$-2,23 \times 10^{-3}$
Leu	-2.01×10^{-3}	-4.30×10^{-4}	$-6,02 \times 10^{-3}$	-3.71×10^{-3}	-1.64×10^{-3}	$-2,47 \times 10^{-3}$	$-1,68 \times 10^{-3}$
Lys	-3.65×10^{-3}	-8.14×10^{-4}	-8.74×10^{-4}	-5.25×10^{-3}	-1.72×10^{-3}	$-4,33 \times 10^{-3}$	$-1,81 \times 10^{-3}$
Met	-1.05×10^{-3}	-2.27×10^{-4}	$-5,91 \times 10^{-4}$	-8.00×10^{-4}	-3.49×10^{-4}	$-1,27 \times 10^{-3}$	$-1,32 \times 10^{-3}$
Phe	-1.25×10^{-2}	-1.19×10^{-2}	$-4,61 \times 10^{-3}$	-9.15×10^{-5}	-1.92×10^{-4}	$1,54 \times 10^{-4}$	$-7,59 \times 10^{-4}$
Pro	4.32×10^{-4}	2.46×10^{-4}	$1,80 \times 10^{-5}$	-4.81×10^{-3}	2.06×10^{-3}	$-1,87 \times 10^{-3}$	$-2,90 \times 10^{-3}$
Ser	6.65×10^{-4}	3.79×10^{-4}	$-1,36 \times 10^{-3}$	7.79×10^{-4}	-7.81×10^{-5}	$-6,41 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$
Thr	-1.38×10^{-4}	-3.99×10^{-5}	$-8,52 \times 10^{-3}$	-1.08×10^{-3}	-2.41×10^{-4}	$-3,91 \times 10^{-5}$	$-7,70 \times 10^{-4}$
Tyr	-2.31×10^{-4}	-8.39×10^{-5}	$-5,67 \times 10^{-3}$	-1.07×10^{-3}	-2.77×10^{-5}	$-5,07 \times 10^{-4}$	$-8,27 \times 10^{-6}$
Val	-5.99×10^{-4}	$-5,76 \times 10^{-4}$	$-3,22 \times 10^{-3}$	$-2,28 \times 10^{-3}$	$-8,62 \times 10^{-4}$	$-8,44 \times 10^{-4}$	$-1,46 \times 10^{-3}$

Mientras se consume glucosa la magnitud del flujo Glc-Pyr es mayor que la de Pyr-AcCoA, lo que llevaría a una acumulación de piruvato en esta etapa del cultivo. Las moléculas que no son convertidas hacia acetil CoA se canalizan mediante las reacciones que producen lactato y alanina. Debido a la baja tasa específica de consumo de galactosa en la segunda etapa de GG6/14 se presenta un bajo flujo desde esta hexosa hacia piruvato, bajando su concentración intracelular. Sin embargo la producción de acetil CoA a partir de piruvato es mayor que el flujo Gal-Pyr. La producción adicional de piruvato se consigue por la inversión de las reacciones que anteriormente habían retirado carbonos del metabolismo central del carbono, es decir síntesis de lactato y alanina.

En la Figura 9, se puede observar que los cultivos tienen dos etapas, la primera se encuentra en el comienzo del cultivo cuando la concentración de glucosa y aminoácidos es alta lo que se traduce a tasas de consumo altas y se caracteriza por altos flujos intracelulares. En cambio, en las últimas horas del cultivo G20 y durante el consumo de galactosa en GG6/14 el transporte de nutrientes se hace más lento debido a su agotamiento, lo que se refleja en bajos flujos intracelulares. Al ver la Figura 8, se observa una disminución de los flujos del metabolismo central del carbono mayor al 60%, excepto en la reacción Pyr-AcCoA cuya baja no supera el 40%. La reacción catalizada por el complejo enzimático piruvato dehidrogenasa (PDH) tiene un rol central en la regulación del metabolismo en células mamíferas ya que conecta irreversiblemente la glicólisis con el ciclo de Krebs. Regulación del flujo en esta etapa es esperado y ayuda a nivelar la entrada de carbono hacia el ciclo del TCA a pesar de cambios en el flujo de carbono hacia la célula.

Control sobre los flujos del ciclo del TCA no solo se lleva a cabo por la enzima PDH. Como se observa, durante la fase de altos flujos muchos carbonos del ciclo del TCA son desviados desde éste hacia piruvato mediante la reacción Mal-Pyr. En cambio, cuando la célula se encuentra en un estado de bajos flujos, como al final de G20 o durante el consumo de galactosa en los cultivos GG6/14, la cantidad de carbonos que pasan por el desvío disminuyen de manera tal que casi no se remueven carbonos del ciclo. Este flujo entonces regula el flujo en el ciclo del Krebs eliminando carbonos en exceso y conservándolos cuando la célula enfrenta un bajo consumo de carbono.

Glutamato es una fuente importante de energía para la célula debido a su conversión a α -ketoglutarato, pero otros aminoácidos también alimentan al ciclo del TCA en distintas etapas de la vía. A pesar de que los carbonos aportados por la glicólisis son la fuente principal de intermediarios del ciclo la contribución de los aminoácidos sigue siendo importante para mantener el ciclo y llegan a representar un 10% de ingreso de carbonos.

Los perfiles de CO_2 muestran similitud con los del ciclo de Krebs. Por lo tanto es posible asumir que la mayoría del oxígeno consumido es usado para el catabolismo de piruvato a través de esta vía. Esto último es consistente con el supuesto de que la tasa de respiración de las células es igual a la tasa de consumo.

Para producir biomasa, carbonos provenientes de glucosa o galactosa se desvían a través de la vía de las pentosas fosfato para la síntesis de nucleótidos y otros precursores. La menor producción de biomasa en la etapa tardía de G20 y durante el consumo de galactosa de GG6/14 se relaciona a la disminución de carbonos que son dirigidos hacia esta función. A pesar de que la producción de piruvato disminuye en G20 2,5 veces, entre la etapa de altos a la de bajos flujos, la cantidad de glucosa dirigida hacia biomasa cae más de 22 veces. En el caso del experimento GG6/14 no se observa una cantidad considerable de galactosa que vaya hacia biomasa ya que la mayoría de los carbonos van hacia la producción de piruvato. Esta evidencia sugiere que el metabolismo energético es favorecido por sobre la proliferación celular cuando el consumo de carbonos es limitado.

El análisis entrega evidencia que la magnitud de los flujos intracelulares se relaciona a la de consumo de la fuente principal de carbono. Durante el consumo de glucosa existiría una acumulación de piruvato en la célula, pero la mayoría de estas moléculas no entran al ciclo del TCA debido al control ejercido por la PDH. Cuando no se produce suficiente piruvato y su concentración comienza a disminuir, para poder asegurar un flujo mínimo en el ciclo de Krebs, lactato se vuelve una fuente de carbono para la producción de piruvato. Finalmente, en aquellas etapas de flujos bajos, el metabolismo celular se centra en la mantención de los flujos del ciclo del TCA para obtener energía.

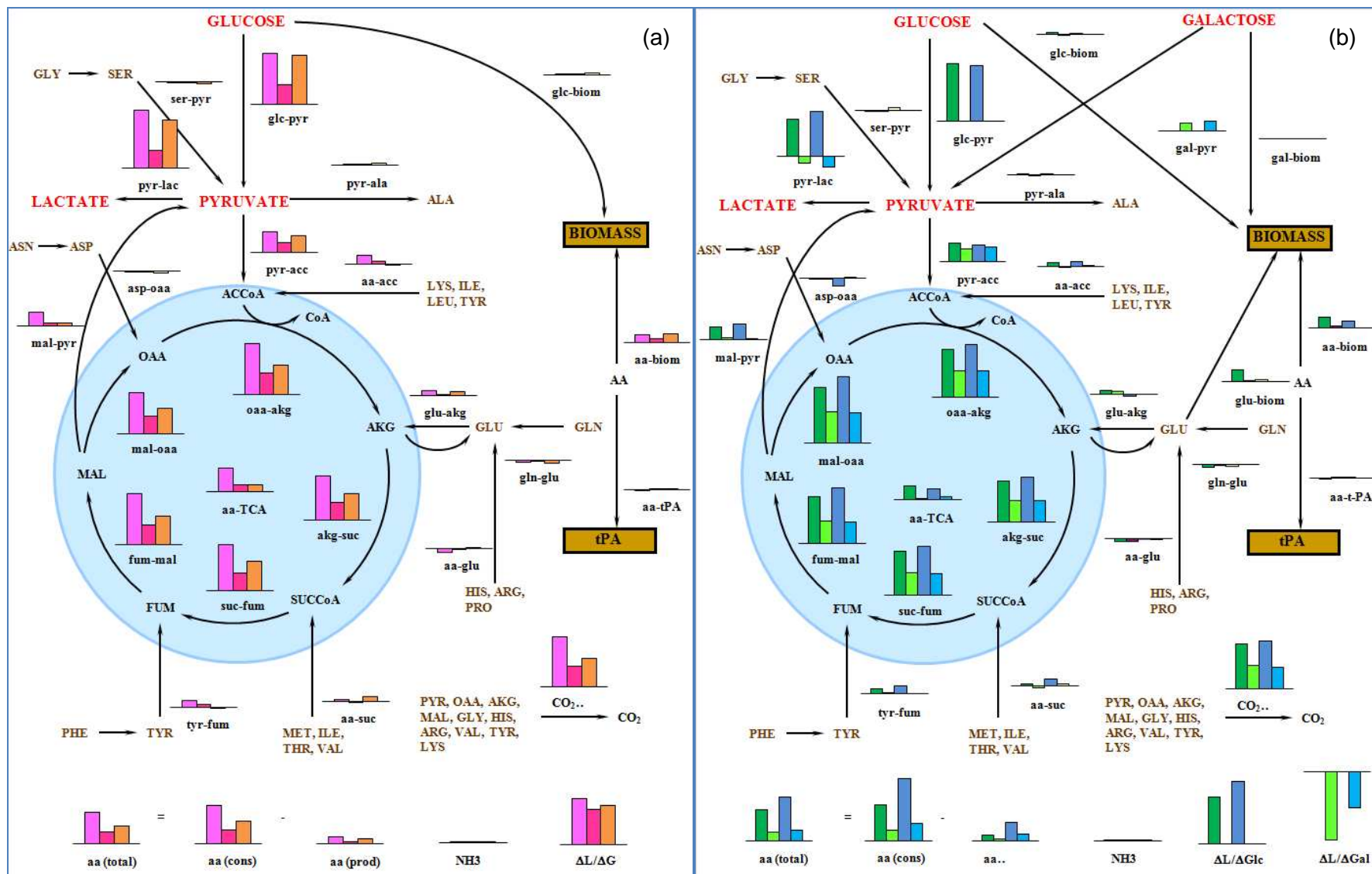


Figura 8: Análisis de flujo metabólico

3.5. Efecto del pH intracelular y balance de NAD⁺/NADH en la producción de lactato y su transporte

El transportador de monocarboxilatos (MCT) es capaz de transportar lactato a través de la membrana plasmática (Figura 9). Evidencia sugiere que la actividad del transportador está relacionada a un mecanismo asociado a H⁺ y que la velocidad de transporte depende del gradiente de concentración de las especies a través de la membrana (Cheeti et al., 2006; Dubinsky and Racker, 1978; Poole and Halestrap, 1993).

Durante el consumo de glucosa hay una acumulación de lactato intracelular y, dados los resultados del MFA, se asume que existiría un aumento en la concentración de piruvato intracelular. Además, un estudio anterior muestra que la fosforilación de azúcares a través de la glicólisis causa una disminución del pH intracelular en células tumorales Ehrlich ascites (Poole, 1967), lo que sugiere que algo similar podría suceder en otras células animales. Por lo tanto, durante la primera etapa de GG6/14 y GG2/18 el aumento de lactato, piruvato y H⁺ intracelulares crearía un estado que favorecería el transporte de las especies, en particular el lactato, hacia el exterior de la célula. En tanto, durante el consumo de galactosa existe una reducción de los sustratos del MCT, por lo que el gradiente de concentración de ellos se invierte, esta diferencia explicaría porque es posible que el lactato sea transportado hacia la célula nuevamente.

El experimento suplementado con galactosa y lactato no fue exitoso en términos de que no hubo proliferación celular y la viabilidad celular decayó rápidamente. En este caso, a pesar de haber una concentración externa de lactato mayor a la intracelular no se observó consumo de éste. Esto confirma que no solo las condiciones del medio determinan el consumo de lactato, sino que se necesita de una condición intracelular adecuada para que este fenómeno ocurra.

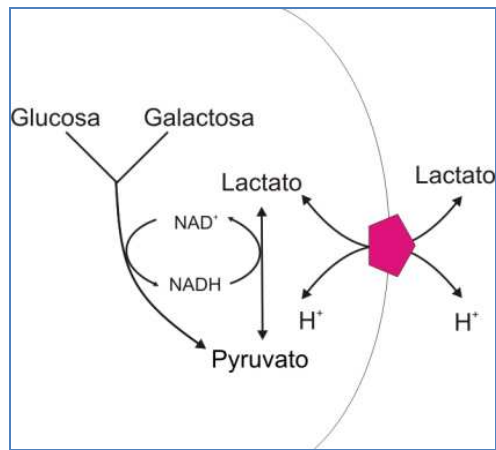


Figura 9: Dinámica entre glicólisis y transporte de lactato

En condiciones fisiológicas de células mamíferas la razón citosólica de NAD^+/NADH es aproximadamente de 700 a 1 y fuertemente controlado. NADH es producido por reacciones oxidativas mientras que NAD^+ es proveído por un sistema de reacciones que oxidan el NADH y llevan el poder reductor hacia la mitocondria (Dawson, 1979). Existe evidencia experimental que indica que cualquier alteración en este equilibrio puede causar efectos negativos sobre la célula (Ying, 2006); por ejemplo, se observa disminución de NADH en las etapas previas de la apoptosis mientras que de altos niveles de NADH contribuyen al daño oxidativo y aumento de NAD^+ se traduce a un bajo poder reductor de la célula.

Los cultivos GG6/14 y GG2/18 no consumieron completamente sus principales fuentes de carbono o nitrógeno, sin embargo entraron a la fase de muerte celular. Al observar los cambios de magnitud y dirección de los flujos intracelulares de muchas reacciones que involucran la interconversión de NAD^+/NADH en estos cultivos, se puede concluir que existe una alteración del equilibrio entre NAD^+ y NADH lo que contribuiría a fin de los cultivos. Las moléculas NAD^+ y NADH son importantes en la regulación de algunas vías del metabolismo actuando como cofactores en algunas reacciones. Entre estas se encuentran la síntesis de 1,3 bifosfoglicerato en la glicólisis y en la conversión de piruvato a lactato. Durante etapas metabólicas de altos flujos NADH se produce mediante la glicólisis y otras reacciones oxidativas a una alta velocidad, en un segundo paso se vuelve a oxidar mediante las reacciones de transporte de poder reductor o a través de la reacción catalizada por la enzima lactato dehidrogenasa (LDH). Debido al lento consumo de galactosa de GG6/14 y GG2/18 las células sufren de un bajo flujo en la vía de la glicólisis por lo tanto una baja producción de NADH. Para evitar una escases de NADH la inversión de la reacción catalizada por la LDH provee una nueva fuente de NADH permitiendo a la célula mantener una razón adecuada de NAD^+/NADH .

3.6. Modelo Dinámico

Se realizó un modelo dinámico que muestra cómo varía la concentración extracelular de glucosa, galactosa, alanina y lactato, y además describe como cambia la concentración intracelular de glucosa, galactosa, glucosa 6-fosfato, piruvato, alanina y lactato, además se ve cómo cambian las velocidades de las reacciones que fueron consideradas. Esto permite entender la dinámica del nodo de piruvato para apoyar los resultados obtenidos mediante los experimentos y el análisis de flujo metabólico. La programación del modelo se encuentra en el Anexo 12 y el algoritmo para la calibración de este en Anexo 13. Se utilizó los datos del experimento GG6/14 para ajustar los parámetros y los resultados se muestran en la Figura 11 y Figura 12; posteriormente se ejecutó el modelo con las condiciones de G20 como se observa en la Figura 13 y Figura 14, y los resultados de las simulaciones de G6 y GG2/18 se muestran en el Anexo 14

Este modelo dinámico describe cualitativamente el comportamiento de los metabolitos en todos los experimentos. El comportamiento exacto no puede ser duplicado por este trabajo ya que el metabolismo celular depende de mecanismos más complejos que los considerados. Entre estos podemos encontrar diferencias en la expresión génica a distintas concentraciones de fuentes de carbono en el medio extracelular (Korke et al., 2004) o cambios en las concentraciones relativas de NAD^+/NADH u otros mecanismos de homeostasis.

3.6.1. Definición de reacciones del metabolismo central del carbono para realización del modelo dinámico

Para la realización del modelo dinámico se consideraron las vías más importantes del metabolismo del carbono que son la glicólisis y el TCA. Además de éstas se incorporaron las rutas mediante las cuales se metaboliza la galactosa, y síntesis de lactato y alanina.

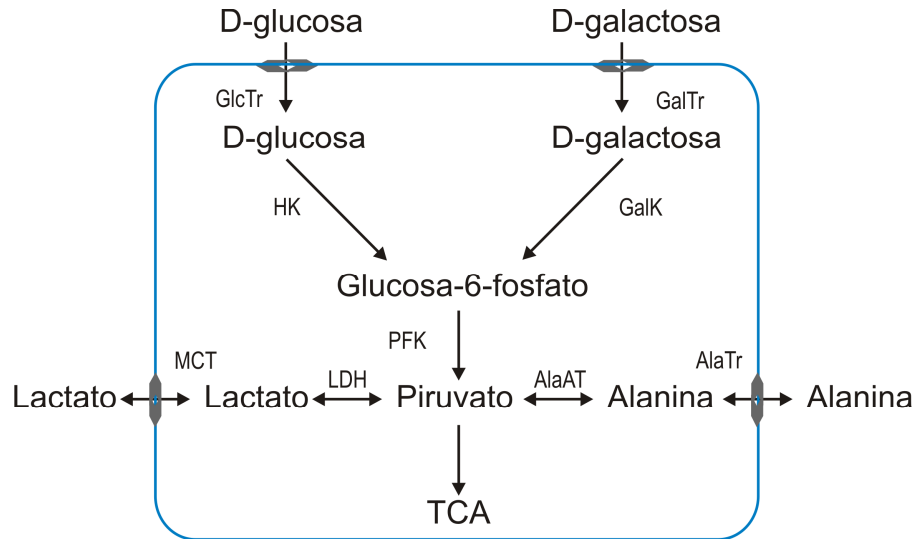


Figura 10: Red metabólica considerada para el modelo dinámico

3.6.1.1. Determinación de etapas controladoras de las rutas metabólicas.

Las vías metabólicas se encuentran limitadas por la etapa que tenga el menor flujo entre todas las reacciones. Para modelar el metabolismo del carbono se consideraron solamente aquellas reacciones controladoras de las rutas ya mencionadas, y las cinéticas de los transportadores de los metabolitos que ingresan a la célula.

Para simular la glicólisis se determinó necesario conocer la cinética del transportador de glucosa (GlcTr) y de las enzimas hexokinasa (HK) y fosfofuctokinasa (PFK) (Marin-Hernandez et al., 2006; Underwood and Newsholme, 1967). En tanto, el metabolismo de galactosa está caracterizado por su transportador (GalTr), el cual es inhibido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo, y por la etapa de fosforilación catalizada por la enzima galactosa kinasa (GalK) (Keiding, 1973).

La entrada de piruvato al ciclo del TCA se modela asumiendo que por cada molécula de piruvato se producen 3 de CO_2 . En los cultivos se midió la tasa de consumo de oxígeno y se utiliza este valor como la tasa de respiración dada la razón de 1 que existe entre estos valores (Bonarius et al., 1995).

3.6.1.2. Condiciones iniciales, constantes del modelo y parámetros

A continuación se muestran la concentración en mM de las especies del modelo

$$C_{Glc}^c = 0,147$$

$$C_{G6P}^c = 18,5 \cdot 10^{-4}$$

$$C_{Pyr}^c = 1 \cdot 10^{-4}$$

$$C_{Lac}^c = 0,03$$

$$C_{Lac}^e = 0,01$$

$$C_{Ala}^c = 0,1$$

$$C_{Ala}^e = 0,1$$

$$C_{Gal}^c = 7 \cdot 10^{-7}$$

Se consideró constante la concentración de especies como ATP, NADH y otros en el modelo. Los valores de estas concentraciones son en mM:

$$C_{ATP}^c = 0,8$$

$$C_{AMP}^c = 0,4$$

$$C_{ADP}^c = 2 - C_{ATP}^c - C_{AMP}^c$$

$$C_{Glu}^c = 0,15$$

$$C_{\alpha KG}^c = 0,03$$

$$C_{NAD}^c = 3,2 \cdot 10^{-4}$$

$$C_{NADH}^c = 6,1 \cdot 10^{-1}$$

Los parámetros del cultivo simulado son:

$$V_r = 0,15[L]$$

$$C_{cell} = 0,8[10^9 \text{ células}/L]$$

$$N_{cell} = C_{cell} \cdot V_r$$

$$V_{cell} = 1,44 \cdot 10^{-3} [L/10^9 \text{ células}]$$

$$V_{tc} = N_{cell} \cdot V_{cell}$$

$$V_c = 0,75 \cdot V_{cell}$$

$$V_{sn} = V_r - V_{tc}$$

3.6.1.3. Ecuaciones diferenciales que definen el modelo

$$\frac{dGlc^e}{dt} = -\frac{V_c}{V_{SN}} r_{GlcTr} \quad (43)$$

$$\frac{dGlc^c}{dt} = r_{GlcTr} - r_{HK} \quad (44)$$

$$\frac{dGal^e}{dt} = -r_{GalTr} \quad (45)$$

$$\frac{dGal^c}{dt} = r_{GalTr} - r_{GalK} \quad (46)$$

$$\frac{dG6P}{dt} = r_{HK} + r_{GalK} - r_{PFK} \quad (47)$$

$$\frac{dPyr}{dt} = 2r_{PFK} - r_{LDH} + r_{AlaAT} - r_{TCA} \quad (48)$$

$$\frac{dLac^c}{dt} = r_{LDH} - r_{MCT} \quad (49)$$

$$\frac{dLac^e}{dt} = \frac{V_c}{V_{SN}} r_{MCT} \quad (50)$$

$$\frac{dAla^c}{dt} = r_{AlaAT} + r_{AlaTr} \quad (51)$$

$$\frac{dAla^e}{dt} = -\frac{V_c}{V_{SN}} r_{AlaTr} \quad (52)$$

3.6.1.4. Cinética de las etapas controladoras

Glicólisis

Transportador glucose (Carruthers et al., 2009):

$$r_{GlcTr} = \frac{k_{GlcTr}^f C_{Glc}^e - k_{GlcTr}^r C_{Glc}^c}{1 + \frac{C_{Glc}^e}{K_{Glc}^{GlcTr}} + \frac{C_{Glc}^c}{K_{Glc}^c}} \quad (53)$$

$$k_{GlcTr}^f = 77,47 [h^{-1}]$$

$$k_{GlcTr}^r = 7,75 \cdot 10^{-1} [h^{-1}]$$

$$K_{Glc}^{GlcTr} = 1,50 [mM]$$

Hexokinasa (Mulquiney and Kuchel, 1999):

$$r_{HK} = \frac{e_{o, HK} \left(\frac{v_{max, HK}^f C_{MgATP}^c C_{Glc}^c}{K_{i, Glc}^{HK} K_{MgATP}^{HK}} - \frac{v_{max, HK}^r C_{MgADP}^c C_{Glc6P}^c}{K_{Glc6P}^{HK} K_{MgADP}^{HK}} \right)}{1 + \frac{C_{Glc}^c}{K_{i, Glc}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c}{K_{MgATP}^{HK}} + \frac{C_{Glc6P}^c}{K_{i, Glc6P}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c C_{Glc}^c}{K_{i, Glc}^{HK} K_{MgATP}^{HK}} + \frac{C_{MgATP}^c C_{Glc6P}^c}{K_{Glc6P}^{HK} K_{i, MgATP}^{HK}}} \quad (54)$$

$$e_{o, HK} = 7,22 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$v_{max, HK}^f = 72 \cdot 10^5 [h^{-1}]$$

$$v_{max, HK}^r = 60 [h^{-1}]$$

$$K_{MgATP}^{HK} = 6,3 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{i, MgATP}^{HK} = 6,3 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{MgADP}^{HK} = 2,3 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{i, MgADP}^{HK} = 2,3 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{Glc6P}^{HK} = 4 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{i, Glc6P}^{HK} = 6,7 [mM]$$

$$K_{Glc}^{HK} = 1 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{i, Glc}^{HK} = 1 \cdot 10^{-1} [mM]$$

Fosfofructokinasa (Lambeth and Kushmerick, 2002):

$$r_{PFK} = \left(\frac{k_{PFK}^f \frac{C_{ATP}^c C_{F6P}^c}{K_{ATP}^{PFK} K_{F6P}^{PFK}} - k_{PFK}^r \frac{C_{ADP}^c (C_{PYR}^c/2)}{K_{ADP}^{PFK} K_{FBP}^{PFK}}}{\Delta} \right) \left(\frac{1 + \alpha L \left(\frac{\Delta'}{\Delta} \right)^3}{1 + L \left(\frac{\Delta'}{\Delta} \right)^4} \right) \quad (55)$$

$$\Delta = \left(1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{PFK}} \right) \left(1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}^{PFK}} \right) + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{PFK}} + \frac{(C_{PYR}^c/2)}{K_{FBP}^{PFK}} \left(1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{PFK}} \right) \quad (56)$$

$$\Delta' = \left(1 + \frac{C_{F6P}^c}{K_{F6P}^{\prime PFK}} \right) \left(1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{ATP}^{\prime PFK}} \right) + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{\prime PFK}} + \frac{(C_{PYR}^c/2)}{K_{FBP}^{\prime PFK}} \left(1 + \frac{C_{ADP}^c}{K_{ADP}^{\prime PFK}} \right) \quad (57)$$

$$\alpha = \frac{K_{F6P}^{PFK} K_{ATP}^{PFK}}{K_{F6P}^{\prime PFK} K_{ATP}^{\prime PFK}} \quad (58)$$

$$L = L_0 \left[\left(\frac{1 + \frac{C_{ATP}^c}{K_{iATP}^{PFK}}}{1 + d \frac{C_{ATP}^c}{K_{iATP}^{PFK}}} \right) \left(\frac{1 + e \frac{C_{AMP}^c}{K_{aAMP}^{PFK}}}{1 + \frac{C_{AMP}^c}{K_{aAMP}^{PFK}}} \right) \right]^4 \quad (59)$$

$$k_{PFK}^r = \frac{k_{PFK}^f K_{ADP}^{PFK} K_{FBP}^{PFK}}{K_{ATP}^{PFK} K_{F6P}^{PFK}} \quad (60)$$

$$k_{PFK}^f = 6,75 \cdot 10^4 [mM]$$

$$K_{ATP}^{PFK} = 8 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_{F6P}^{PFK} = 1,8 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{ATP}^{\prime PFK} = 2,5 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{F6P}^{\prime PFK} = 20 [mM]$$

$$K_{FBP}^{PFK} = 4,02 [mM]$$

$$K_{ADP}^{PFK} = 2,71 [mM]$$

$$K_{iATP}^{PFK} = 8,7 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{aAMP}^{PFK} = 6 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$d = 0,01 []$$

$$e = 0,01 []$$

$$L_0 = 13 []$$

TCA:

$$r_{TCA} = \frac{TCA \cdot V_{SN}}{3 \cdot V_c} \quad (61)$$

$$TCA = 19,76 \cdot 10^{-2} [mM \cdot h^{-1}]$$

Metabolismo de galactosa

Transportador de galactosa (Craig and Elliott, 1980):

$$r_{GalTr} = \frac{k_{GalTr}^f \frac{C_{Gal}^e}{K_{GalTr}^{Gal}} - k_{GalTr}^r \frac{C_{Gal}^c}{K_{GalTr}^{Gal}}}{1 + \frac{C_{Glc}^e}{K_{Glc}^{GalTr}} + \frac{C_{Gal}^e}{K_{Gal}^{GalTr}} + \frac{C_{Gal}^c}{K_{Gal}^{GalTr}}} \quad (62)$$

$$k_{GalTr}^f = 300 [mM \cdot h^{-1}]$$

$$K_{Glc}^{GalTr} = 4 \cdot 10^2 [mM]$$

$$K_{Gal}^{GalTr} = 174 [mM]$$

Galactokinasa (Chu et al., 2009):

$$r_{GalK} = \frac{k_{GalK} N_{cell} \frac{C_{Gal}^c C_{MgATP}^c}{K_{Gal}^{GalK} K_{MgATP}^{GalK}}}{1 + \frac{C_{Gal}^c}{K_{Gal}^{GalK}} + \frac{C_{MgATP}^c}{K_{MgATP}^{GalK}}} \quad (63)$$

$$k_{GalK} = 5000 [mmol \cdot h^{-1} \cdot (10^9 cells)^{-1}]$$

$$K_{Gal}^{GalK} = 6,98 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{MgATP}^{GalK} = 9,48 \cdot 10^{-2} [mM]$$

Metabolismo de Lactato

Transportador de monocarboxilato (Poole and Halestrap, 1993):

$$r_{MCT} = \frac{k_{MCT}^f \frac{C_{Lac}^c}{K_{MCT}^f} - k_{MCT}^r \frac{C_{Lac}^e}{K_{MCT}^r}}{1 + \frac{C_{Lac}^c}{K_{MCT}^f} + \frac{C_{Lac}^e}{K_{MCT}^r}} \quad (64)$$

$$k_{MCT}^f = 3,66 \cdot 10^2 [mM \cdot h^{-1}]$$

$$k_{MCT}^r = 710,03 [mM \cdot h^{-1}]$$

$$K_f^{MCT} = 5,00 \cdot 10^{-2} [mM]$$

$$K_r^{MCT} = 1,9386 [mM \cdot h^{-1}]$$

Lactato dehidrogenasa (Lambeth and Kushmerick, 2002):

$$r_{LDH} = \frac{v_{\max,LDH}^f \frac{C_{NADH}^c C_{Pyr}^c}{K_{Pyr}^{LDH} K_{NADH}^{LDH}} - v_{\max,LDH}^r \frac{C_{NAD}^c C_{Lac}^c}{K_{Lac}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}}{1 + \frac{C_{Pyr}^c}{K_{Pyr}^{LDH}} + \frac{C_{NADH}^c}{K_{Pyr}^{LDH}} + \frac{C_{Pyr}^c C_{NADH}^c}{K_{Pyr}^{LDH} K_{Pyr}^{LDH}} + \frac{C_{Lac}^c}{K_{Lac}^{LDH}} + \frac{C_{NAD}^c}{K_{NAD}^{LDH}} + \frac{C_{Lac}^c C_{NAD}^c}{K_{Lac}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}} \quad (65)$$

$$v_{\max,LDH}^r = \frac{v_{\max,LDH}^f K_{Lac}^{LDH} K_{NAD}^{LDH}}{K_{Pyr}^{LDH} K_{NADH}^{LDH} K_{eq}^{LDH}} \quad (66)$$

$$v_{\max,LDH}^f = 5,1036 \cdot 10^8 [mM \cdot h^{-1}]$$

$$K_{Pyr}^{LDH} = 0,6 [mM]$$

$$K_{NADH}^{LDH} = 8 \cdot 10^{-3} [mM]$$

$$K_{Lac}^{LDH} = 17 [mM]$$

$$K_{NAD}^{LDH} = 2,53 \cdot 10^{-1} [mM]$$

$$K_{eq}^{LDH} = 2$$

Transportador de alanina:

$$r_{AlaTr} = k_{AlaTr} \left(\frac{C_{Ala}^e - C_{Ala}^c}{1 + \frac{C_{Ala}^e}{K_{Ala}^{AlaTr}} + \frac{C_{Ala}^c}{K_{Ala}^{AlaTr}}} \right) \quad (67)$$

$$k_{AlaTr} = 100,21 [h^{-1}]$$

$$K_{Ala}^{AlaTr} = 0,40 [mM]$$

Alanina aminotransferasa (Groen et al., 2005; Hopper and Segal, 1962):

$$r_{AlaAT} = r^f \left(1 - \frac{\Gamma}{K_{eq}} \right) \quad (68)$$

$$r^f = \frac{\frac{k_{AlaAT}^f N_{cell}}{V_c} C_{Ala}^c C_{\alpha KG}^c}{\left(K_{\alpha KG}^{AlaAT} C_{Ala}^c + K_{Ala}^{AlaAT} C_{\alpha KG}^c + \frac{K_{iAla}^{AlaAT} K_{\alpha KG}^{AlaAT} C_{Glu}^c}{K_{iGlu}^{AlaAT}} + \frac{K_{Ala}^{AlaAT} K_{i\alpha KG}^{AlaAT} C_{Pyr}^c}{K_{iPyr}^{AlaAT}} + C_{Ala}^c C_{\alpha KG}^c + \frac{K_{Ala}^{AlaAT} C_{\alpha KG}^c C_{Pyr}^c}{K_{iPyr}^{AlaAT}} + \frac{K_{Glu}^{AlaAT} C_{Ala}^c C_{Glu}^c}{K_{iGlu}^{AlaAT}} \right)} \quad (69)$$

$$\Gamma = \frac{C_{Pyr}^c C_{Glu}^c}{C_{\alpha KG}^c C_{Ala}^c} \quad (70)$$

$$k_{AlaAT}^f = 3,41 \cdot 10^4 [mmol \cdot h^{-1} \cdot (10^9 cells)^{-1}]$$

$$K_{eq} = 1,5385 \cdot 10^{-1} []$$

$$K_{\alpha KG}^{AlaAT} = 0,40 [mM]$$

$$K_{i\alpha KG}^{AlaAT} = 0,40 [mM]$$

$$K_{Ala}^{AlaAT} = 2,80 \cdot 10^1 [mM]$$

$$K_{iAla}^{AlaAT} = 2,80 \cdot 10^1 [mM]$$

$$K_{iGlu}^{AlaAT} = 2,50 \cdot 10^1 [mM]$$

$$K_{iGlu}^{AlaAT} = 2,50 \cdot 10^1 [mM]$$

$$K_{iPyr}^{AlaAT} = 3,00 \cdot 10^{-1} [mM]$$

3.6.2. Modelamiento

Al ver las figuras se observa que se consume glucosa y galactosa en todo momento. Mientras las células incorporan la glucosa a su metabolismo aumenta la concentración de los metabolitos intracelulares, pero una vez que ésta se acaba, la concentración de las especies intracelulares comienza a descender. Las velocidades de las reacciones de las vías descienden constantemente como se había observado mediante análisis de flujo metabólico. La velocidad de las vías de metabolismo de lactato y alanina bajan hasta volverse negativas, lo lleva a la inversión de las vías permitiendo que lactato y alanina sean incorporadas al metabolismo como nuevas fuentes de producción de piruvato.

Detallando el análisis de las figuras, es posible observar que existe una acumulación de piruvato durante el consumo de glucosa como se había predicho anteriormente y que esto produce el aumento intracelular de lactato y alanina. Una vez que la concentración de glucosa es muy baja en el medio de cultivo, su velocidad de consumo disminuye considerablemente, como también la velocidad de las reacciones de la vía de la glicólisis, haciendo que disminuya la producción de piruvato. Por esto es que el máximo de piruvato ocurre unas horas antes de que se acabe la glucosa extracelular. En los cultivos con fuente de carbono combinada la velocidad de consumo de galactosa es mucho menor que la de glucosa e incapaz de mantener las altas concentraciones de piruvato, una vez acabada la glucosa, lo que causa la disminución de piruvato intracelular.

El perfil intracelular de lactato y alanina, ambos producidos a partir de piruvato, tienen un comportamiento similar al del piruvato. En los cultivos con fuentes de carbono combinadas su concentración máxima se alcanza cuando la concentración de piruvato es más alta, pero una vez que este disminuye, la velocidad de producción de los metabolitos decae por la dependencia de las enzimas a la concentración de piruvato. En este punto, ya que las concentraciones intracelulares de lactato y alanina son mayores que las extracelulares, los transportadores siguen removiéndolos del interior de la célula. Desde que los metabolitos intracelulares alcanzan su máximo de concentración, la velocidad de su transporte supera a la de su síntesis causando una disminución. La diferencia de concentraciones, entre dentro y fuera de la célula, comienza a bajar afectando a los transportadores, haciendo que caiga su velocidad. El transporte baja sostenidamente hasta ser nulo en el momento en que las concentraciones intra y extracelulares son la misma. Después de esto, las velocidades tanto de transporte como

de síntesis se vuelven negativas. Gracias a la reversibilidad de las enzimas y transportadores, comienza el uso de lactato y alanina como precursores de piruvato y se observa que la pendiente que muestra la disminución de piruvato se hace menos empinada.

Por lo tanto, el consumo rápido de glucosa lleva a una producción acelerada de piruvato que se traduce a altas concentraciones intracelulares de este. Mientras se acumula piruvato en la célula se produce lactato y alanina los cuales son transportados hacia afuera de la célula debido al gradiente de concentraciones. La disminución de piruvato es debido a la caída de la velocidad de síntesis y por su conversión hacia lactato y alanina. Lentamente comienzan a cambiar los gradientes de concentraciones intra y extracelulares permitiendo la inversión de las enzimas y transportadores causando el consumo de lactato y alanina. Cuando la concentración de piruvato comienza a caer fuertemente el uso de lactato y alanina como nuevas fuentes de piruvato permiten que la disminución de este sea más lenta evitando una muerte celular por agotamiento de fuente de energía.

El modelo dinámico planteado permite entender cualitativamente el comportamiento de algunos flujos intracelulares en células CHO en medios suplementados con mezclas de glucosa y galactosa. Explica cualitativamente la dinámica de las concentraciones intracelulares de las especies como piruvato y lactato lo que permite confirmar las conclusiones que se obtuvieron a partir del análisis de especies extracelulares e intracelulares de los cultivos como también del análisis de flujos metabólicos.

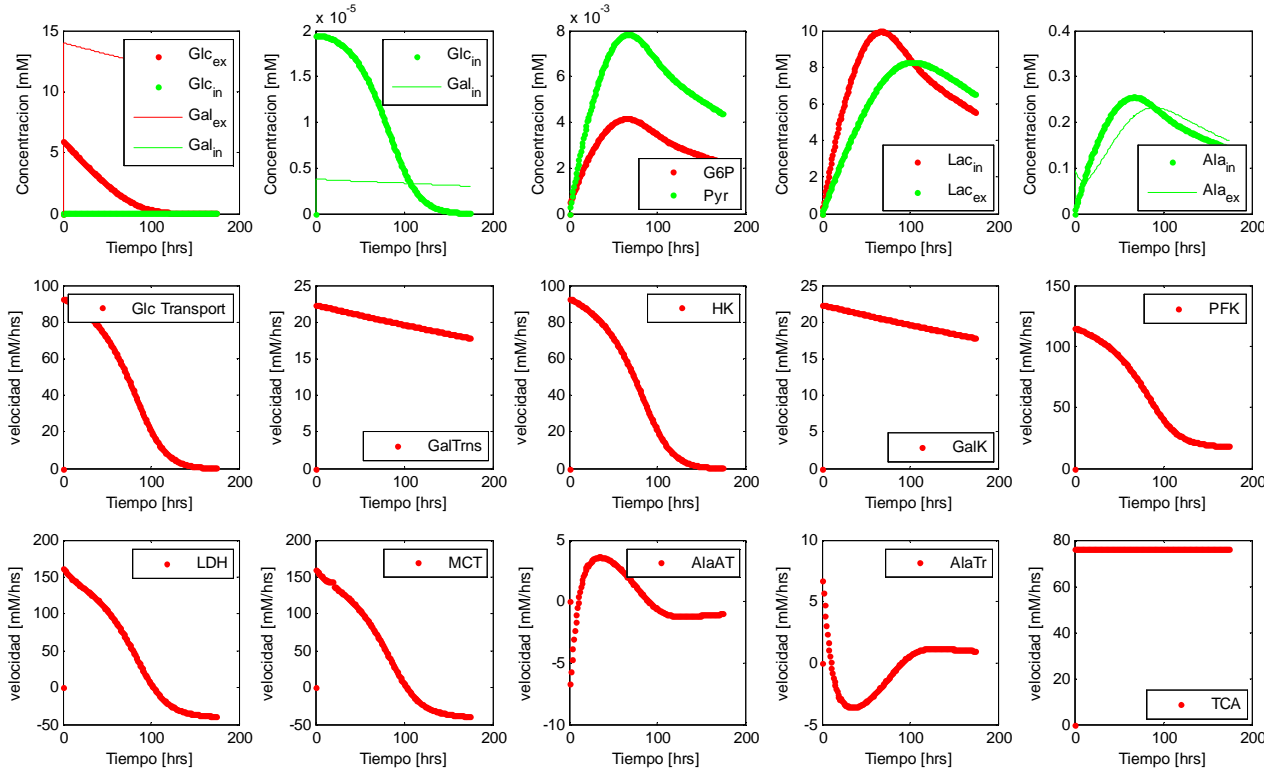


Figura 11: Simulación experimento GG6/14

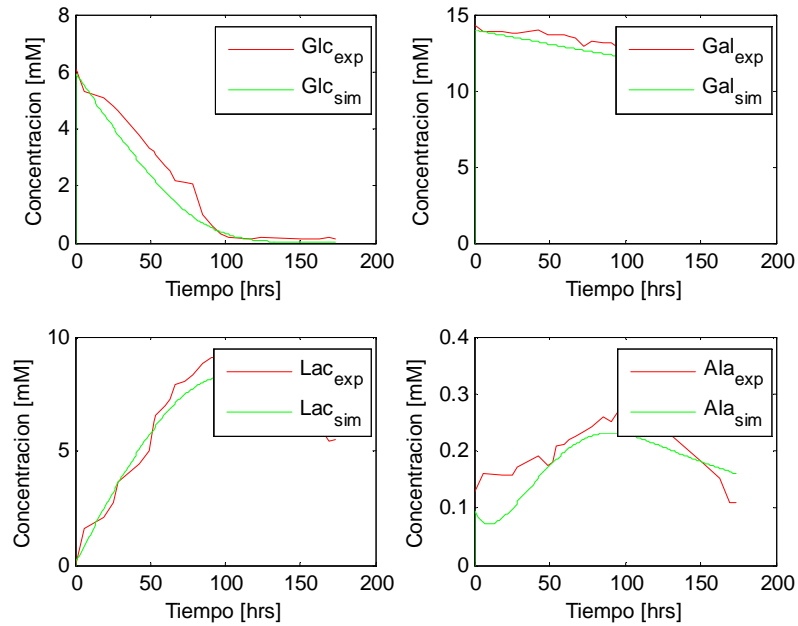


Figura 12: Comparación entre simulación y datos experimentales del experimento GG6/14

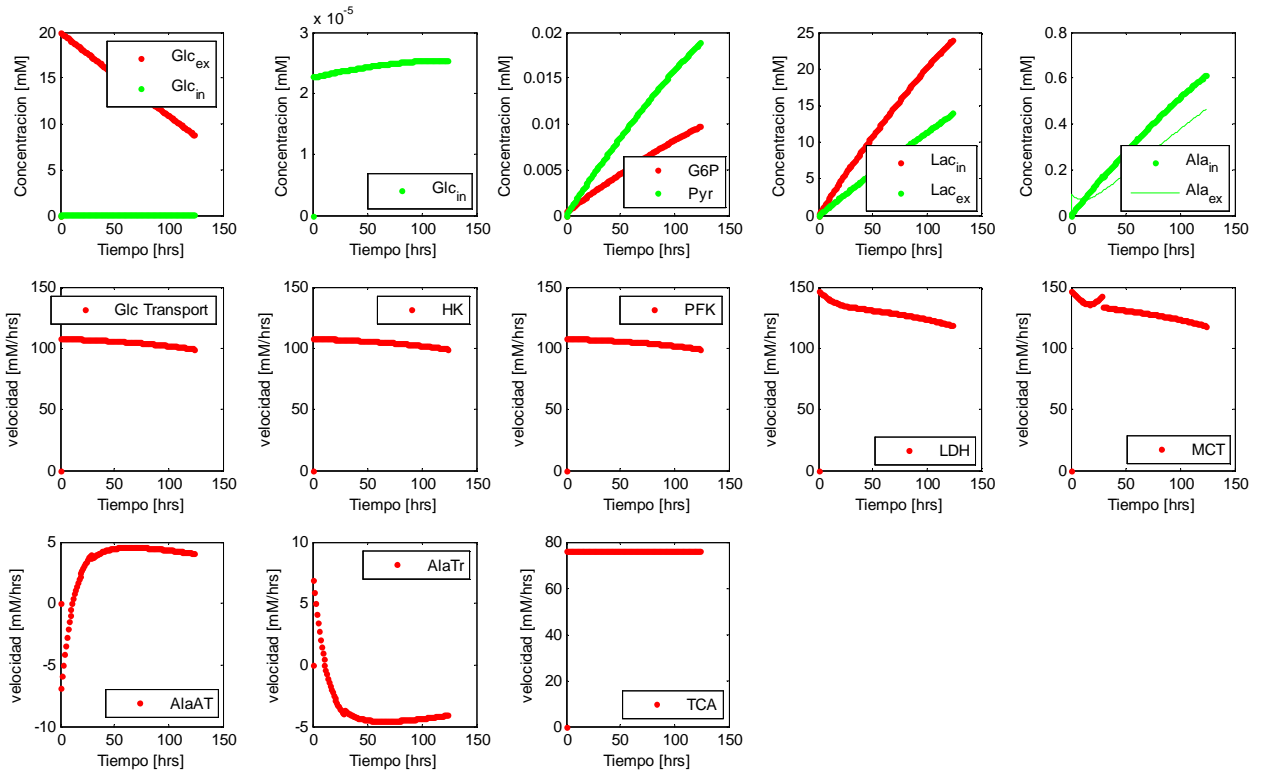


Figura 13: Simulación experimento G20

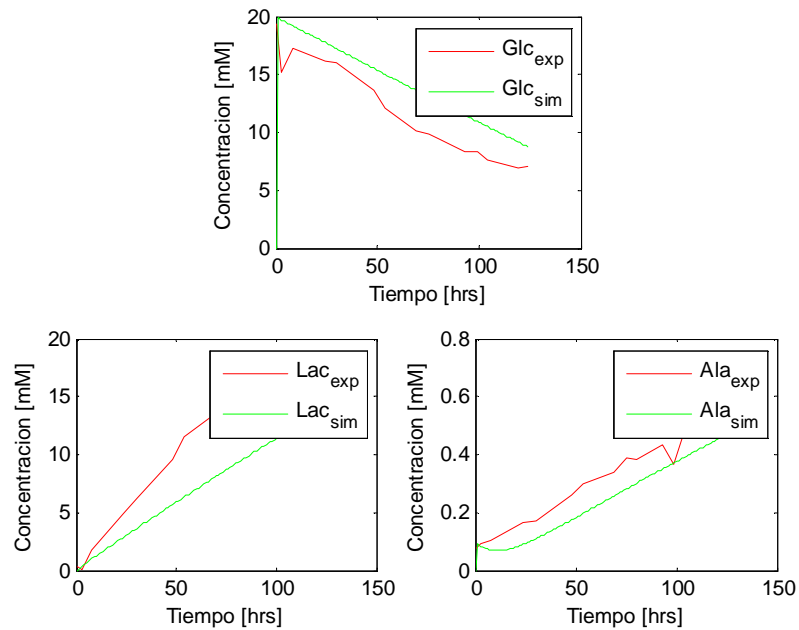


Figura 14: Comparación entre simulación y datos experimentales del experimento G20

4. CONCLUSIONES

Cultivos con alta concentración de glucosa muestran mayor producción de lactato debido al rápido consumo de glucosa y una vez que ésta se acaba las células no son capaces de mantener la viabilidad del cultivo ni continuar con la proliferación celular. Sin embargo, cuando cultivos de células CHO son suplementados con una mezcla de glucosa y galactosa es posible obtener una alta viabilidad por periodos más largos. Además de la extensión de la vida del cultivo, se observa una alteración en el metabolismo cuando la segunda hexosa es utilizada. Los transportadores de galactosa presentan bajas velocidades por lo que no se produce por esta vía suficiente piruvato para suplir los requerimientos energéticos de la célula energía, para aumentar la concentración de piruvato la célula consume lactato para su uso como precursor de piruvato. El transporte de lactato hacia las células permite además aliviar los efectos negativos que tiene el pH sobre el cultivo debido a que junto al lactato se transporta también un protón, por lo tanto se genera un ambiente más adecuado para la proliferación celular.

El análisis de los metabolitos intracelulares muestra una reducción general en la concentración de las especies intracelulares durante el cultivo. Sin embargo, el perfil del lactato no sigue esta tendencia ya que muestra acumulación durante el consumo de glucosa. Esto se debe a la rápida producción del metabolito que supera la capacidad del transportador. Durante el consumo de galactosa en aquellos experimentos con fuentes de carbono combinadas la concentración intracelular del ácido láctico baja. La disminución simultánea de lactato intra y extracelular sugiere el uso de esta molécula como precursor de piruvato en la segunda etapa de los cultivos con glucosa y galactosa. Finalmente, bajos niveles de los metabolitos del ciclo del TCA podrían explicar la muerte de los cultivos.

El análisis de flujos metabólicos indica que cuando no se produce suficiente piruvato para producir energía se metaboliza lactato para síntesis de piruvato. Esto se logra por la naturaleza reversible de la reacción catalizada por la enzima lactato dehidrogenasa y del transportador de lactato. Al estudiar el comportamiento general del metabolismo es posible observar que durante etapas de bajo consumo de carbono el uso de lactato no es la única forma que se compensa la falta de carbonos que entra al ciclo de Krebs. El flujo entre malato-piruvato disminuye considerablemente minimizando los carbonos que salen del ciclo, además

de esto la producción de biomasa baja notablemente. La evidencia sugiere que la mayoría de los carbonos consumidos durante etapas de bajo flujo se dirigen hacia la mantención del metabolismo energético.

El flujo a través del transportador de monocarboxilatos depende de la dirección del gradiente de todos sus sustratos, no solamente de lactato. En condiciones de alto pH extracelular y bajo lactato y piruvato intracelular el MCT invierte su flujo inicial permitiendo la incorporación de lactato. Una posible baja de NADH favorecería el uso de lactato como una fuente adicional de carbón. Por lo tanto es necesaria una condición específica intracelular para permitir el uso de lactato para mantener el metabolismo energético.

Es posible crear un modelo matemático que explique cualitativamente el comportamiento de células CHO creciendo únicamente en glucosa o en una mezcla de glucosa con galactosa. El modelo confirma que existe una acumulación de piruvato durante el consumo de glucosa y que una vez que acaba esta hexosa el piruvato comienza a disminuir. Esta caída de piruvato desencadena la disminución del flujo a través de la enzima que sintetiza lactato y su transportador. La velocidad cae hasta alcanzar valores negativos debido a una inversión de los gradientes de las especies involucradas. El consumo de lactato permite que la disminución de piruvato sea más lenta, como se observa en su perfil. La prolongada disponibilidad de piruvato como fuente de energía evitaría la muerte celular

5. REFERENCIAS

- [1] Freshney, R.I., 2005. Culture of animal cells : a manual of basic technique, 5th ed. Wiley-Liss.
- [2] Jenkins, N., Murphy, L., Tyther, R., 2008. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol*, 113-118.
- [3] Browne, S.M., Al-Rubeai, M., 2007. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol*, 425-432.
- [4] Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J.J., Godia, F., 2000. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog*, 69-75.
- [5] Walsh, G., 2004. Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*, 185-196.
- [6] Glacken, M.W., Fleischaker, R.J., Sinskey, A.J., 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 1376-1389.
- [7] Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S., Fiechter, A., 1990. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *J Biotechnol*, 113-128.
- [8] Halestrap, A.P., Price, N.T., 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 281-299.
- [9] Cheeti, S., Warriar, B.K., Lee, C.H., 2006. The role of monocarboxylate transporters in uptake of lactic acid in HeLa cells. *Int J Pharm*, 48-54.
- [10] Europa, A.F., Gambhir, A., Fu, P.C., Hu, W.S., 2000. Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 25-34.
- [11] Korke, R., Gatti Mde, L., Lau, A.L., Lim, J.W., Seow, T.K., Chung, M.C., Hu, W.S., 2004. Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *J Biotechnol*, 1-17.
- [12] Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairo, J.J., Godia, F., 2006. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J Biotechnol*, 547-556.
- [13] Wagner, A., Marc, A., Engasser, J.M., A., E., 1991. Growth and metabolism of human tumor kidney cells on galactose and glucose. *Cytotechnology*, 7-13.
- [14] Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., Kobayashi, K., 2005. Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*, 502-510.
- [15] Pascoe, D.E., Arnott, D., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M., Andersen, D.C., 2007. Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnol Bioeng*, 391-410.

- [16]Wiechert, W., 2002. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *J Biotechnol*, 37-63.
- [17]Boghigian, B.A., Seth, G., Kiss, R., Pfeifer, B.A., Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metab Eng*, 81-95.
- [18]Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., Wang, D.I., 1999. Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnol Bioeng*, 324-335.
- [19]Garfinkel, L., Kohn, M.C., Garfinkel, D., 1979. Computer simulation of the fructose bisphosphatase/phosphofructokinase couple in rat liver. *Eur J Biochem*, 183-192.
- [20]Lambeth, M.J., Kushmerick, M.J., 2002. A computational model for glycogenolysis in skeletal muscle. *Ann Biomed Eng*, 808-827.
- [21]Mulquiney, P.J., Kuchel, P.W., 1999. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement. *Biochem J*, 581-596.
- [22]Wu, P., Ray, N.G., Shuler, M.L., 1993. A computer model for intracellular pH regulation in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog*, 374-384.
- [23]Lu, S., Sun, X., Shi, C., Zhang, Y., 2003. Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection. *J Chromatogr A*, 161-168.
- [24]Bonarius, H.P., de Gooijer, C.D., Tramper, J., Schmid, G., 1995. Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media. *Biotechnol Bioeng*, 524-535.
- [25]Bonarius, H.P., Hatzimanikatis, V., Meesters, K.P., de Gooijer, C.D., Schmid, G., Tramper, J., 1996. Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol Bioeng*, 299-318.
- [26]Vallino, J.J., Stephanopoulos, G., 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol Bioeng*, 633-646.
- [27]Reitzer, L.J., Wice, B.M., Kennell, D., 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*, 2669-2676.
- [28]Zielke, H.R., Zielke, C.L., Ozand, P.T., 1984. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc*, 121-125.
- [29]Gambhir, A., Korke, R., Lee, J., Fu, P.C., Europa, A., Hu, W.S., 2003. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *J Biosci Bioeng*, 317-327.
- [30]Eagle, H., Barban, S., Levy, M., Schulze, H.O., 1958. The utilization of carbohydrates by human cell cultures. *J Biol Chem*, 551-558.
- [31]Neermann, J., Wagner, R., 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol*, 152-169.

- [32] Takagi, M., Hia, H.C., Jang, J.H., Yoshida, T., 2001. Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *J Biosci Bioeng*, 515-521.
- [33] Fussenegger, M., Mazur, X., Bailey, J.E., 1997. A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 927-939.
- [34] Terada, S., Suzuki, E., Ueda, H., Makishima, F., 1996. Cytokines involving gp130 in signal transduction suppressed growth of a mouse hybridoma cell line and enhanced its antibody production. *Cytokine*, 889-894.
- [35] Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J.J., Godia, F., 2004. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *J Biotechnol*, 171-179.
- [36] Plagemann, P.G., Wohlhueter, R.M., Graff, J., Erbe, J., Wilkie, P., 1981. Broad specificity hexose transport system with differential mobility of loaded and empty carrier, but directional symmetry, is common property of mammalian cell lines. *J Biol Chem*, 2835-2842.
- [37] Dubinsky, W.P., Racker, E., 1978. The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. *J Membr Biol*, 25-36.
- [38] Poole, R.C., Halestrap, A.P., 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*, C761-782.
- [39] Poole, D.T., 1967. Intracellular pH of the Ehrlich ascites tumour cell as it is affected by sugars and sugar derivatives. *J Biol Chem*, 3731-3736.
- [40] Dawson, A.G., 1979. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells *Trends in Biochemical Sciences*, 171-176.
- [41] Ying, W., 2006. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*, 3129-3148.
- [42] Marin-Hernandez, A., Rodriguez-Enriquez, S., Vital-Gonzalez, P.A., Flores-Rodriguez, F.L., Macias-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., Moreno-Sanchez, R., 2006. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *Febs J*, 1975-1988.
- [43] Underwood, A.H., Newsholme, E.A., 1967. Control of glycolysis and gluconeogenesis in rat kidney cortex slices. *Biochem J*, 300-305.
- [44] Keiding, S., 1973. Galactose elimination capacity in the rat. *Scand J Clin Lab Invest*, 319-325.
- [45] Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., Devaskar, S.U., 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab*, E836-848.
- [46] Craik, J.D., Elliott, K.R., 1980. Transport of D-fructose and D-galactose into isolated rat hepatocytes. *Biochem J*, 373-375.
- [47] Chu, X., Li, N., Liu, X., Li, D., 2009. Functional studies of rat galactokinase. *J Biotechnol*, 142-146.

[48] Groen, A.K., Sips, H.J., Vervoorn, R.C., Tager, J.M., 2005. Intracellular Compartmentation and Control of Alanine Metabolism in Rat Liver Parenchymal Cells. *European Journal of Biochemistry*, 87–93.

[49] Hopper, S., Segal, H.L., 1962. Kinetic studies of rat liver glutamic alanine transaminase. *J Biol Chem*, 3189-3195.

|

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de medio cultivo

El medio de cultivo utilizado en el trabajo experimental es un preparado comercial libre de suero, glucosa y glutamina, optimizado para cultivos de células CHO sin suero llamado Hyclone SFM4CHO. Debido a la composición de este medio, la adición de compuestos para suplementarlo es necesaria.

1. Calcular el peso del compuesto necesario para alcanzar la concentración deseada de éste en un volumen dado.
2. Pesar el compuesto según lo calculado.
3. Disolver el compuesto en una alícuota de medio.
4. Esterilizar el volumen de medio concentrado mediante el uso de una jeringa y filtros estériles con membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro.

Anexo 2: Subcultivos

Cada cultivo en expansión no se debe dejar de incubar por más de tres días sin cambiar de medio ya que de lo contrario disminuye la viabilidad celular.

1. Se toma una muestra del cultivo.
2. Se determina la concentración celular.
3. Se transfiere el volumen a tubos centrífugas estériles.
4. Se centrifugan a 1.000g por 5 minutos.
5. Se retira el sobrenadante.
6. Se resuspenden en el volumen de medio tal que la concentración inicial del subcultivo se encuentre entre $0,15$ y $0,20 \cdot 10^6$ células viables/mL.

Anexo 3: Congelación de las células CHO TF 70R

En el momento de proceder a la congelación de las células es sumamente importante que se encuentren a mitad de la fase de crecimiento exponencial y que presenten una alta viabilidad ($> 90\%$).

1. Se preparan los siguientes medios de congelación:
 - Medio A: medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (FCS).

- Medio B: medio de cultivo de referencia con 10% de FCS y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Se determina la concentración celular y viabilidad del cultivo.
 3. Dado la cantidad de células que se desea congelar se calcula el volúmen necesario para obtener una concentración final de éstas de $8-10 \cdot 10^6$ células/mL.
 4. Se transfiere el volúmen de células a congelar directamente desde el recipiente a tubos centrífuga estériles y se centrifugan a 1000g por 5 minutos.
 5. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en la mitad del volumen calculado en 2 con medio A.
 6. Se mantienen por 10 minutos a 4°C.
 7. Se adiciona la otra mitad del volúmen con medio B.
 8. Se transfiere la suspensión de células a criotubos, agregando 1mL a cada uno.
 9. Se guardan los criotubos a -80°C por 24 horas.
 10. Se transfieren los criotubos a un contenedor de nitrógeno líquido.

Anexo 4: Descongelación de las Células CHO TF 70R

Para una óptima recuperación de las células es esencial un rápido proceso de descongelación

1. Se preparan los siguientes medios:
 - Medio C: medio de cultivo con 20% de suero fetal bovino (FCS).
 - Medio D: medio de cultivo.
2. Se colocan 10 mL de medio C en 2 tubos de centrifuga estériles de 15 mL y se mantienen a 37°C.
3. Se retira el criotubo del contenedor de nitrógeno líquido y se calienta rápidamente a 37°C. Se agita hasta que el contenido esté totalmente descongelado.
4. Se transpasa todo el contenido del criotubo a uno de los tubos que contiene medio C.
5. Se centrifuga a 1000g durante 5 min.
6. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con los 10 mL restantes del medio C para así eliminar el DMSO.
7. Se toma una muestra y se hace el recuento celular.
8. Se calcula el volumen de medio necesario para obtener una concentración celular de $5 \cdot 10^5$ células/mL.
9. Se centrifuga a 1000g durante 5 min.
10. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con el volumen del medio D calculado anteriormente.
11. Se transfiere a un frasco de cultivo de 25 o 75 cm² según sea necesario.
12. Se guarda en una incubadora a 37°C, 5% CO₂ y 95%

Anexo 5: Determinación de concentración celular, método de exclusión celular

Para determinar la viabilidad celular se emplea un método de exclusión celular utilizando el colorante azul tripán. Las células vivas son impermeables al colorante y se pueden observar brillantes al microscopio óptico, mientras que las células muertas son permeables al azul de tripán, quedando teñidas de azul.

1. Se prepara una solución de azul tripán al 0,2% en PBS.
2. Se mezclan 75 µL de azul de tripán al 0.2% con 75 µL de la muestra, obteniendo una dilución de 1:2.
3. Se colocan 20 µL de la mezcla en un hemocitómetro.
4. Se procede con el conteo de células vivas y muertas en los 8 campos del hemocitómetro.

La concentración celular se determina según la siguiente fórmula:

$$X \left[\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] = N^{\circ} \text{células} \cdot \frac{\text{dilución}}{N^{\circ} \text{campos}} \cdot 10.000$$

El porcentaje de viabilidad celular se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{viabilidad} = \frac{N^{\circ} \text{células}_{\text{vivas}}}{N^{\circ} \text{células}_{\text{vivas}} + N^{\circ} \text{células}_{\text{muertas}}} \cdot 100$$

Anexo 6: Medición de la Tasa de Consumo de Oxígeno (OUR)

Para llevar a cabo este método es necesario tener un sensor de oxígeno disuelto con calibrado con anterioridad.

1. Sacar 20 ml de muestra del cultivo.
2. Transferir el volumen a un vial pequeño con un agitador pequeño.
3. Sellar el vial con el sensor de oxígeno y un tapón de manera que no hayan burbujas dentro de éste.
4. Mantener el sistema agitándose y en un baño térmico a 37°C.
5. Medir el tiempo en que demora en bajar el porcentaje de oxígeno disuelto a la mitad del inicial, tomando medidas cada 30 segundos.
6. El OUR corresponde a la pendiente del segmento lineal de gráfico obtenido en el paso anterior dividido por el número de células de la muestra.

Anexo 7: Cuantificación de Glucosa, Galactosa, Lactato y Glutamato mediante analizador YSI 2700

El fundamento del aparato se basa en un método enzimático. Se trabajan con distintas membranas en las cuales se encuentran inmovilizadas alguna de las siguientes enzimas, Glucosa oxidasa, Galactosa oxidasa, Lactato oxidasa ó Glutamato oxidasa, ésta a va colocada sobre un electrodo.

El equipo, mediante una aguja toma una muestra de 25 µL. El compuesto que se desea medir difunde a través de la membrana y reacciona con la enzima respectiva produciendo peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es oxidado electroquímicamente en el ánodo de plata del electrodo y esto produce una señal eléctrica, la intensidad de la cual es proporcional a la concentración de cada sustrato.

El analizador puede determinar concentraciones entre 0,05 y 20 g/L de glucosa, 0,05 y 2 g/L de lactato, y 0,05 y 1,5 g/L de glutamato. Cuando las muestras se encuentran más concentradas se diluyen con agua con el fin de que entren en el rango de medición.

Anexo 8: Determinación de la concentración de t-PA por ELISA

Preparación de soluciones

1. Buffer carbonato: 50 mg NaHCO_3 en 10 ml de H_2O
2. Solución de lavado: PBS 1x + 0,05% Tween 20
3. Solución de bloqueo: 250 mg BSA en 25 ml de PBS 1x
4. PBS 1x: 0,15 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na_2HPO_4 , 11,5 mM KH_2PO_4

Procedimiento

1. De estimarse necesario, diluir la muestra en buffer carbonato de modo que el t-PA quede en una concentración entre 1 y 10 ng/µl.
2. Agregar a cada pocillo de la microplaca 90 µl de buffer carbonato.
3. Agregar en cada pocillo 10 µl de la dilución de la muestra.
4. Incubar por 8 horas a 4°C o 5 horas a temperatura ambiente.
5. Enjuagar la placa tres veces con solución de lavado.
6. Agregar 200 µl por pocillo de solución de bloqueo e incubar a 4°C toda la noche.
7. Remover la solución de bloqueo enjuagando tres veces la placa con solución de lavado.
8. Resuspender 3,1 ul del primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal dilución 1/3300, almacenado a -20°C) en 10 ml de solución de bloqueo , agregar 100 ul por pocillo y dejar incubando por una hora a 37°C.

9. Lavar la placa 3 veces con solución de lavado.
10. Resuspender el segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado marcado con peroxidasa, almacenado a -20°C) en PBS 1x ocupando una dilución de 1/5000 (2 µl en 10 mL). Agregar 100 µl del conjugado a cada pocillo e incubar por una hora a 37°C.
11. Enjuagar tres veces con solución de lavado.
12. Agregar 100 µl del agente revelador DakoCytomation TMB+Substrate-Chromogen. Incubar de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
13. Detener la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 4,5N.
14. Dejar reposar 5 min
15. Leer absorbancia a 405 nm

La determinación de la concentración de t-PA se realiza interpolando la absorbancia obtenida de las muestras dentro de una curva de calibración

Anexo 9: Determinación de concentración de amino ácidos

Para determinar la concentración de amino ácidos en el sobrenadante de los cultivos se utiliza la técnica de HPLC. El método consiste en el mezclando las muestras con una solución de o-phtalaldehido (OPA) para su derivatización y pasar las muestras primero por una precolumna, la cual atrapa los iones de amonio que pueden contaminar el sistema y alterar la lectura, finalmente éstas pasan por una columna de litio la cual separa los aminoácidos mediante un intercambio catiónico.

Soluciones

Preparación de Reaction Reagent

1. Preparación de Buffer

Composición química para 3L:

Na ₂ CO ₃	122,1 g (0,384 M)
H ₃ BO ₃	40,7 g (0.216 M)
K ₂ SO ₄	56,4 g (0.108 M)

Método:

- a. En una botella con un aforo de 3 L agregar 2,5 L de agua grado HPLC.
- b. Pesar Na₂CO₃ y agregarlo de a tercios asegurándose que se haya disuelto correctamente lo anterior.

- c. Agregar el K_2SO_4 cuidando de disolverlo correctamente antes de seguir al siguiente paso.
- d. Agregar el H_3BO_3 .
- e. Agregar agua grado HPLC hasta completar los 3 L de solución.
- f. Filtrar en filtro de membrana de 0,45 μm .

El pH de la solución es alrededor de 10, no es necesario ajustar el pH.

2. Preparación solución 10% Brij-35.

Método

- a. Pesar 10 g de Brij-35.
- b. Agregar 50 ml de agua (grado de HPLC) a un recipiente de 100 ml aforado.
- c. Agregar Brij-35 al agua en un sistema agitado y calentado suavemente, esperar que se disuelva.
- d. Una vez enfriado, completar volumen a 100 ml.
- e. Agitar.

3. Preparación Reaction Solution A (AA-RA)

Método

- a. Agregar 500 ml de buffer de ácido carbónico en una botella.
- b. Agregar 0.2 ml de hipoclorito de sodio (7-10%).
- c. Mezclar.
- d. Filtrar en filtro de membrana de 0,45 μm .

No agregar Brij-35 a la solución

4. Preparación Reaction Solution B (AA-RB)

Composición química: OPA 0.08%

OPA	400 mg (4 ml de solución 10%)
Etanol	7 ml
2-mercaptoetanol	1 ml
Solución 10% Brij-35	2 ml

Lavar recipientes, puntas, todo el material que se utilizará en etanol.

Método:

- a. Agitar con agitador magnético hasta que todos los cristales se hayan disuelto.
- b. En un matraz aforado agregar 450 ml de buffer de ácido carbónico.
- c. Agregar solución etanol-OPA.
- d. Agregar 1 ml de 2-mercaptoetanol.
- e. Agregar 2 ml de solución 10% Brij-35.
- f. Completar volumen a 500 ml.
- g. Filtrar en filtro de membrana de 0,45 μm .

La vida útil de la solución es de 5 días.

Preparación de Fase Móvil

Tabla 6: Preparación Buffer para análisis de aminoácidos.

		Initial Mobile Phase (A) AA-MA	Eluent (B) AA-MB	Regenerator Liquid (C) AA-MC
Normalidad ión litio	(N)	0,15	0,3+ α	0,2
pH		2.60	10.00	Sin ajuste de pH
Citrato de litio	(g)	42,3	28,2	-
Hidróxido de litio	(g)	-	-	4,2
Ácido bórico	(g)	-	12.4	-
Methyl cellsolve	(ml)	210	-	-
Ácido perclórico	(ml)	40	-	-
Solución LiOH 4N	(ml)	-	30	-
Volumen final	L	3	1	0,5

Luego de realizar las mezclas éstas deben ser filtradas a través de una membrada de 0,45 μm para retirar cualquier impureza que pudiera causar un bloqueo en la columna. La vida útil de las soluciones es de 3 semanas.

El ajuste de pH se lleva a cabo con ácido perclórico o solución LiOH 4N

1. Preparación solución 4N LiOH
 - a. Pesar 33,6 g de LiOH y disolver en 200 ml de agua milli Q.

Instalación del equipo

Se debe comenzar instalando la columna de litio (Shim-pack Amino-Li (100mmL. × 6.0mmI.D.), Shimadzu) y la trampa de amonio (Shim-pack ISC-30/S0504Na (50mmL. × 4.0mmI.D.) Shimadzu) en el equipo. Luego se conectan las soluciones preparadas a sus bombas respectivas,

1-A: AA-MA
1-B: AA-MB
B: AA-MC
A': AA-RA
B': AA-RB

Preparación de Muestra Estándar

La solución estándar de amino ácidos (L-amino acids, LAA18, Sigma Aldrich,) se debe diluir 25 veces llevándola a una concentración final de 0,1µmol/ml en AA-MA. De esta manera al tomar una muestra de 10 µl se tiene 1nmol de amino ácidos.

Preparación de Muestras

Todas las muestras que se analizan mediante HPLC deben ser filtradas anteriormente por una membrana de al menos 0,45 µm.

Uso

El uso del equipo consta en tres pasos importantes, la purga del equipo para comenzar, la utilización del método para el análisis de muestras y el lavado del dispositivo al finalizar.

Purga

La purga se encuentra programada dentro del método "amino_acid_Li".

Antes de comenzar la purga siempre se debe actualizar la opción Mobile Phase Setup, en el cual se le informa al programa los volúmenes de las soluciones que tiene el equipo a su disposición.

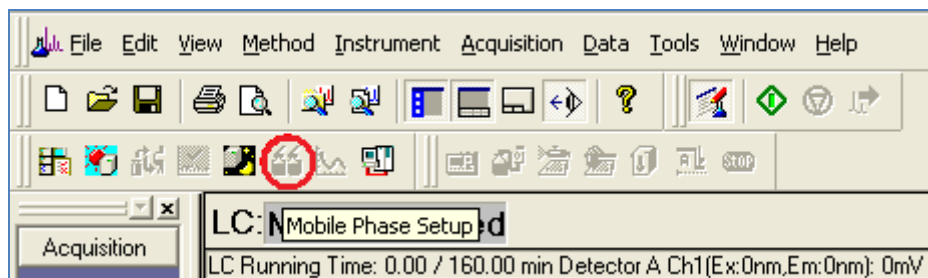


Figura 15: Botón Mobile Phase Setup

Para purgar el equipo se debe comenzar limpiando primero la bomba A. Para esto se debe cuidar que la ventana de la opción AutoPurgeSe se vea de la siguiente manera:

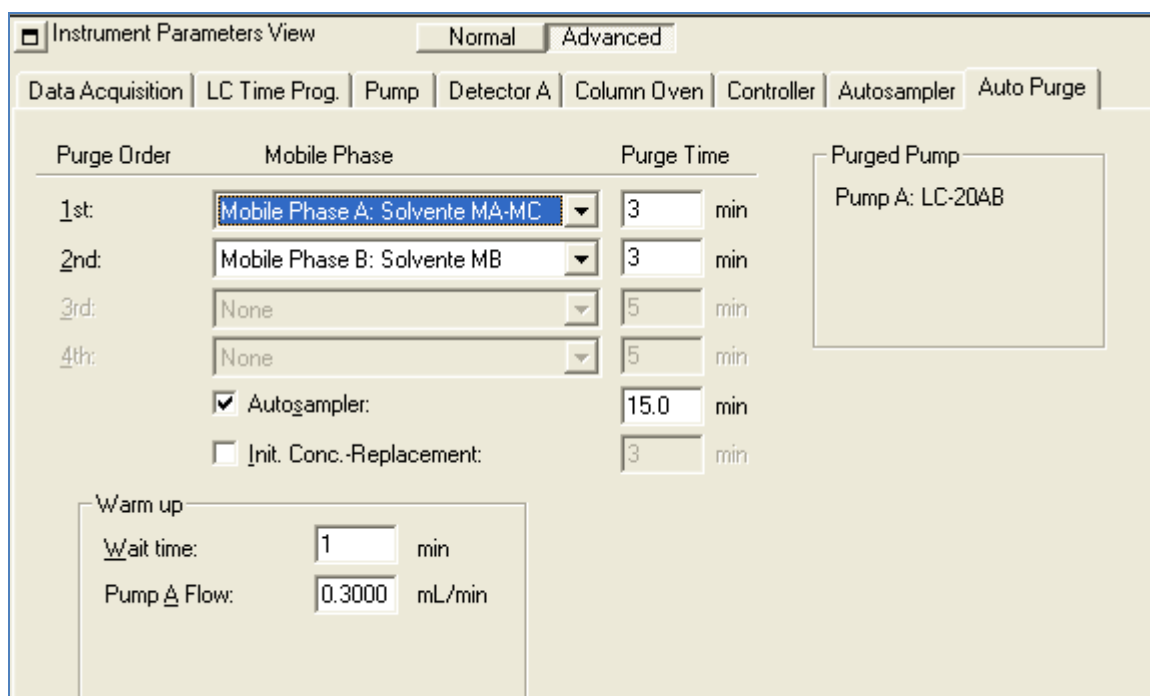


Figura 16: Ventana Autopurge

La ventana PUMP debe tener la siguiente configuración:

Total flow	0,6 ml/min	
B concentration	0%	Esto significa que no funciona B
B curve	0%	

Para realizar la autopurga se debe apretar el botón Autopurge

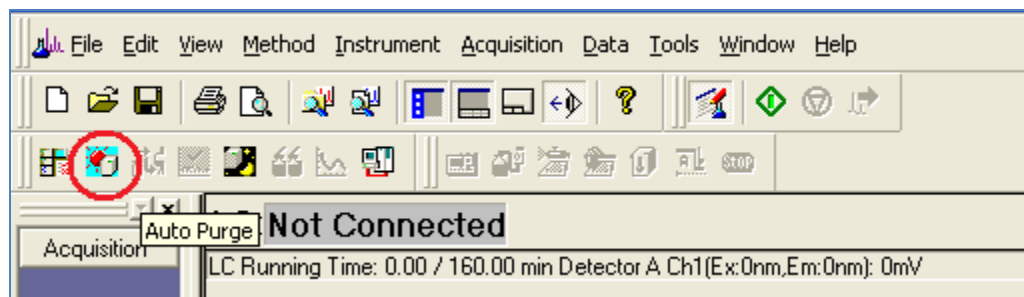


Figura 17: Botón autopurge

Una vez que termina la autopurga se debe purgar el canal que anteriormente no se encontraba activo, en este caso la bomba B.. Para esto se siguen las siguientes instrucciones:

- En la pestaña PUMP, cambiar de bomba A a B según se muestra en la figura XX. Esto permite trabajar con la bomba A-B.
- Apretar DOWNLOAD para guardar los cambios.
- En el equipo LC20AB apretar botón PUMP (éste activa y detiene la bomba de forma manual).
- Abrir llave del equipo LC20AB como se observa en la Figura 19.
- Apretar botón PURGE en equipo LC20AB y la purga se detiene automáticamente después de 3 minutos.
- En la pestaña PUMP, cambiar de bomba B a A par restaurar la configuración inicial.
- Apretar DOWNLOAD para guardar los cambios.
- Cerrar la llave del equipo LC20AB.

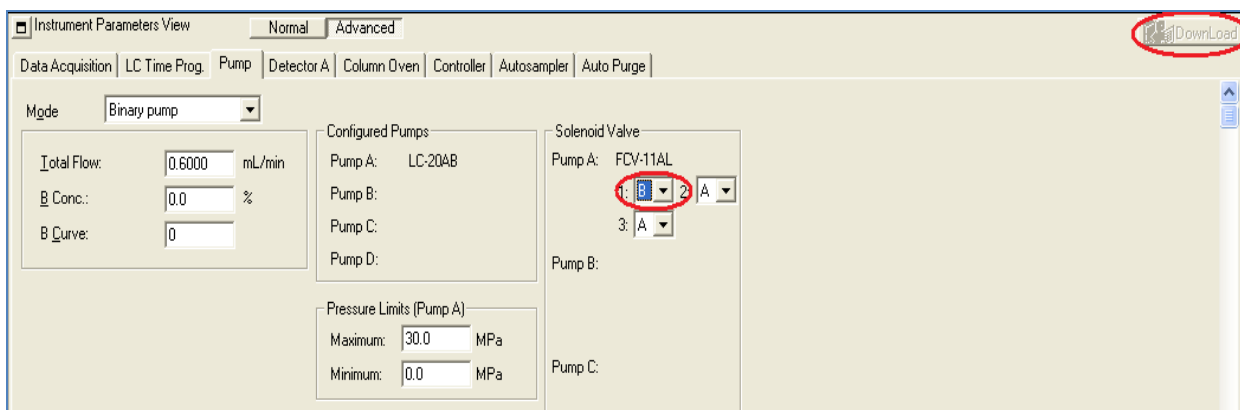


Figura 18: Cambio de Bomba A a Bomba B



Figura 19: Ilustración de la llave del equipo abierta y cerrada

Purga Bomba Peristáltica:

- a. Se puede hacer al mismo tiempo que la Autopurga.
- b. Poner el control de flujo al 50%.
- c. Purgar durante 3 mins.

Método

Línea base

Antes de comenzar a utilizar la columna se debe obtener una línea base estable. Para esto se debe permitir que fluya fase móvil durante 10 minutos a través del equipo, apagando la bomba peristáltica con la solución reactante. Después de este tiempo se aprieta el botón BASELINE CHECK en la interfaz del equipo en el computador. Se abre una ventana donde se observa si la base satisface los criterios de estabilizar. De no lograr la estabilidad deseada se debe revisar la presencia de burbujas las cuales se pueden eliminar del sistema purgando nuevamente la línea involucrada y volver a intentar.

Single Run y Batch Processing:

La opción Single Run instruye al equipo a tomar una muestra y obtener el cromatograma de ésta. En tanto Batch Processing permite programar un número de muestra analizadas consecutivamente. Para llevar a cabo cualquiera de estas dos opciones se debe entregar al programa información acerca del volumen de la muestra a analizar, nombre y otros, la opción de Background file debe quedar vacía ya que ésta resta a los datos obtenidos aquellos que se encuentran en el archivo seleccionado.

Shutdown

La función Shutdown permite que una vez que termine la muestra o muestras de analizarse se lave el equipo y se apague automáticamente. Para activarla se debe apretar el botón en el menú del programa, como se observa en la Figura 20. Debido a que la bomba peristáltica funciona independientemente se debe cuidar de conectar ésta a un *timmer* para asegurar que se apague y no quede prendido por un tiempo indefinido de tiempo.

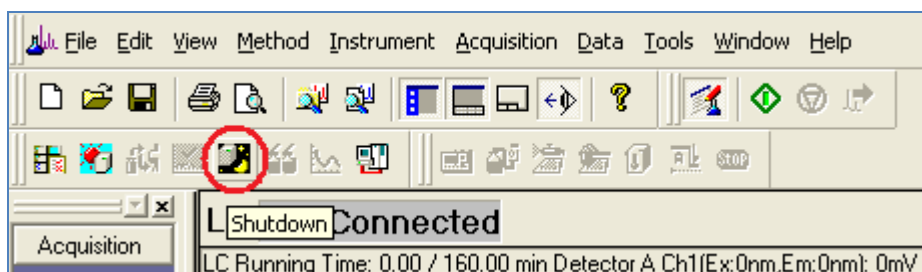


Figura 20: Botón Shutdown

Lavado del equipo

Cuando no se ocupará el equipo por más de dos días se debe dejar todas los canales en algún solvente orgánico al 100% como metanol o alcohol isopropílico de grado para cromatografía.. Para hacer esto se debe comenzar lavando las columnas con utilizando el método "Lavado aminoácido". Una vez terminado se retiran las columnas, se tapan y guardan.

El paso siguiente consiste en remplazar las botellas con soluciones orgánicas por botellas con metanol y las inorgánicas por agua de grado HPLC. Se debe repetir la purga de todas las líneas de como se explicó anteriormente. Luego dejar todas las mangueras en recipientes con metanol para hacer fluir este líquido a través del equipo durante un tiempo suficiente para desplazar todos los líquidos inorgánicos.

Anexo 10: Extracción Ácida de metabolitos intracelulares

Método basado del expuesto en el paper Wu et al, 2003. Se usa para extraer una solución 0,3 mM de ácido perclórico, otra 0,6 mM de KOH y PBS. Todas las sustancias utilizadas se mantienen en hielo durante la ejecución del protocolo.

1. Sacar 20 ml de muestra del cultivo y dejarlo 5 minutos en hielo.
2. Centrifugar a 180 g por 2 mins.
3. Eliminar sobrenadante y agregar 10 ml de PBS y resuspender suavemente.

4. Centrifugar a 180 g por 2 mins.
5. Eliminar sobrenadante y agregar 1 ml de extractante y resuspender suavemente.
6. Mantener el hielo por 10 mins.
7. Se centrifuga a 2000 g por 2 mins.
8. Recolectar el sobrenadante y se neutraliza con 0,6 mM KOH
9. Se centrifuga a 12000 g por 5 mins.
10. Se colecta el sobrenadante y congelado a -20°C.

Anexo 11: Determinación de concentración de ácidos orgánicos

Este método se lleva a cabo en un equipo de HPLC con una columna Aminex® HPX-87H. Las condiciones son:

- **Eluente:** H₂SO₄ 0.004 M
- **Flujo:** 0,35 mL/min
- **Temperatura:** 42°C
- **Detector:** UV a 215 nm
- **Injection volume:** 150 µL

Los ácidos que se pueden medir son:

- Ácido Oxálico
- Ácido Málico
- Ácido Succínico
- Ácido Fórmico
- Ácido Acético
- Ácido Láctico

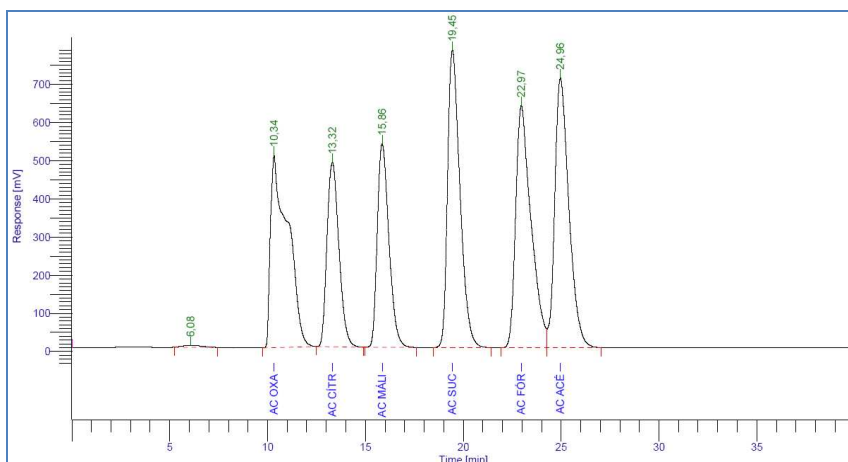


Figura 21: Cromatograma de estándar de ácidos orgánicos

Anexo 12: Programación del modelo dinámico

Programa resol_md

```
clear all;
clc;

global Param

disp(['Definicion experimento ']);
e=1;
%e=1 G20
%e=2 GG6/14

%Condiciones iniciales en mM
disp(['Condiciones iniciales']);

if (e==1);
CI.CeGlc = 20;
CI.CcGlc = 0.147;
CI.CcG6P = 0.000185;
CI.CcPyr = 0.0001;
CI.CcLac = 0.03;
CI.CeLac = 0.01;
CI.CcAla = 0.1;
CI.CeAla = 0.1;
CI.CeGal = 0;
CI.CcGal = 0.000007;

elseif(e==2);

CI.CeGlc = 6;
CI.CcGlc = 0.147;
CI.CcG6P = 0.000185;
CI.CcPyr = 0.0001;
CI.CcLac = 0.03;
CI.CeLac = 0.01;
CI.CcAla = 0.1;
CI.CeAla = 0.1;
CI.CeGal = 14;
CI.CcGal = 0.000007;

end

%Constantes

disp(['Concentraciones ']);
% Todas la concentraciones se encuentranen unidades mM %
Param.CcATP      = 0.8;
Param.CcAMP      = 0.4;
Param.CcADP      = 2-Param.CcATP-Param.CcAMP;
Param.CcMg       = 0.7;
Param.CcMgATP    = Param.CcMg*Param.CcATP/0.081;
Param.CcMgADP    = Param.CcMgATP/12;
Param.CcGlu      = 0.15;
Param.CcAKG      = 0.03;
Param.CcNAD      = 3.200*10^-4;
```

```

Param.CcNADH      = 6.1*10^-1 ;
Param.CeSer       = 0.25;
Param.CeThr       = 0.23;
Param.CcCit       = 5.36*10^-1;
Param.CcPi        = 0.9;

```

```
disp(['Condiciones del sistema ']);
```

```
%%%Condiciones del Sistema%%%
```

```

Param.Vr          = 0.15;           % [L] Volumen reactor
Param.Ccell       = 0.8;           % [10^9 cells/L ]
Param.Ncell       = Param.Ccell*Param.Vr; % [10^9 cells]
Param.Vcell       = 1.44*10^-3;    % [L /10^9 cells]
Param.Vtc         = Param.Vcell*Param.Ncell; % [L] volúmen total de células
Param.Vc          = Param.Vtc*0.75; % [L] volúmen citosólico
Param.Vm          = Param.Vtc*0.25; % [L] volúmen mitocondrial
Param.Vsn         = Param.Vr - Param.Vtc; % [L] volúmen del medio es 0.2 L - vol
total de células t=0; %hrs

```

```
disp(['GlcTr']);
```

```
%Transportador Glc%
```

```
Param.KGlcTrGlc = 1.50; %[mM]
```

```
disp(['HK']);
```

```
%Hexokinasa 4%
```

```

Param.KHKmATP     = 6.3*10^-2;      %[mM]
Param.KHKiATP     = Param.KHKmATP;
Param.KHKmADP     = 2.3*10^-1;     %[mM]
Param.KHKiADP     = Param.KHKmADP;
Param.KHKmG6P     = 4*10^-2;       %[mM]
Param.KHKiG6P     = 6.70;          %[mM]
Param.KHKiGlc     = 1*10^-1;       %[mM]
Param.KHKmGlc     = Param.KHKiGlc;
Param.VmaxfHK     = 2000*3600;     %[1/hr]
Param.VmaxrHK     = 1*60;          %[1/hr]

```

```
disp(['PFK']);
```

```
%Fosfofructokinasa 3 %
```

```

Param.KPFKeq      = 242;
Param.KPFKF6P     = 0.18;          %[mM]
Param.KPFKpF6P    = 20;           %[mM]
Param.KPFKATP     = 0.08;         %[mM]
Param.KPFKpATP    = 0.25;         %[mM]
Param.KPFKFBP     = 4.02;         %[mM]
Param.KPFKpFBP    = Param.KPFKFBP; %[mM]
Param.KPFKADP     = 2.71;         %[mM]
Param.KPFKpADP    = Param.KPFKADP; %[mM]
Param.KPFKiATP    = 0.87;         %[mM]
Param.KPFKaAMP    = 0.06;         %[mM]
Param.dPFK        = 0.01;
Param.ePFK        = 0.01;
Param.LoPFK       = 13;
Param.alfaPFK     = Param.KPFKF6P*Param.KPFKATP/Param.KPFKpF6P*Param.KPFKpATP;
Param.LPFK        =
Param.LoPFK*((1+Param.CcATP/Param.KPFKiATP)/(1+Param.dPFK*Param.CcATP/Param.K
PFKiATP))*((1+Param.ePFK*Param.CcAMP/Param.KPFKaAMP)/(1+Param.CcAMP/Param.KPFK
aAMP)))^4;

```

```

disp(['LDH']);
%Lactato dehidrogenasa 2%
Param.KLDHeq      = 2;
Param.KLDHPyr     = 0.6;  % [mM]
Param.KLDHNADH    = 0.008; % [mM]
Param.KLDHLac     = 17;   % [mM]
Param.KLDHNAD     = 0.253; % [mM]

disp(['MCT']);
%Transportador de monocarboxilato%
Param.kfMCT = 366.26;           % [mM 1/hr] ajustado
Param.KrMCT = 1.9386;
Param.krMCT = Param.kfMCT*Param.KrMCT; % [mM 1/hr]
Param.KMCTf = 5.00*10^-2;      % [mM]
Param.KMCTr = Param.KMCTf*Param.KrMCT; % [mM]

%%Metabolismo de alanina%%

disp(['AlaTr']);
%Transporte alanina%
Param.K_AlaTr = 0.59251; % [1/hr] ajustado
Param.KAala   = 0.4;     % [mM]

disp(['AlaAT ']);
%Alanina aminotransferasa%
Param.KAalaATeq      = 1/6.5;
Param.KAalaATAKG     = 0.40;  % [mM]
Param.KAalaATiAKG    = 0.40;  % [mM]
Param.KAalaATALa     = 2.80*10; % [mM]
Param.KAalaATiAla    = 2.80*10; % [mM]
Param.KAalaATGlu     = 2.50*10; % [mM]
Param.KAalaATiGlu    = 2.50*10; % [mM]
Param.KAalaATiPyr    = 3.00*10; % [mM]

disp(['TCA ']);
%TCA%

%% Metabolismo galactosa %%

disp(['GalTr ']);
%Transportador galactosa%
Param.KGalTrGlc = 4.00*10^2; % [mM]
Param.KGalTrGal = 174; % [mM]

disp(['Galk ']);
%Galactokinasa%

Param.KGalkGal = 6.98*10^-1; % [mM]
Param.KGalkATP = 9.48*10^-2; % [mM]

```



```

if (e==1);

    load T_ec_G20.txt; %archivo en txt con las horas de los datos
    experimentales
    texp = T_ec_G20;
    load Lac_ec_G20.txt;
    C_Lac_ec = Lac_ec_G20;
    load Ala_ec_G20.txt;
    C_Ala_ec = Ala_ec_G20;
    load Glc_ec_G20.txt;
    C_Glc_ec = Glc_ec_G20;

elseif (e==2);

    load T_ec_GG6_14.txt;
    texp = T_ec_GG6_14;
    load Lac_ec_GG6_14.txt;
    C_Lac_ec = Lac_ec_GG6_14;
    load Ala_ec_GG6_14.txt;
    C_Ala_ec = Ala_ec_GG6_14;
    load Glc_ec_GG6_14.txt;
    C_Glc_ec = Glc_ec_GG6_14;
    load Gal_ec_GG6_14.txt;
    C_Gal_ec = Gal_ec_GG6_14;

end

disp(['parametros optimizados']);

Param.kfGlcTr    = 77.4669;
Param.eoHK      = 0.0722;
Param.VPFKmaxf  = 6.7514e+004;
Param.VmaxfLDH  = 5.1036e+008;
Param.kA        = 3.579*10*2.8;
Param.KAlaATr   = 0.0016;
Param.kfAlaAT   = 0.0341*1000*1000;
Param.TCA       = 0.1976;
Param.kfGalTr   = 300;
Param.kGalK     = 5000;

disp(['Se definió la variable global Param con los parametros encontrados']);

if (e==1);
    tf=124;
elseif (e==2);
    tf=174;
end

varo = [CI.CeGlc CI.CcGlc CI.CcG6P CI.CcPyr CI.CcLac CI.CeLac CI.CcAla
CI.CeAla CI.CeGal CI.CcGal];
trango = [0:1:tf];
[t,y] = odel5s (@res_md,trango,varo);

%Generación de gráficos

```

```

ind=find(t>=1);
L=length(t);

for i=ind(1):L
    Glc_ex(i) = y(i,1);
    Glc_in(i) = y(i,2);
    G6P(i)    = y(i,3);
    Pyr(i)    = y(i,4);
    Lac_in(i) = y(i,5);
    Lac_ex(i) = y(i,6);
    Ala_in(i) = y(i,7);
    Ala_ex(i) = y(i,8);
    Gal_ex(i) = y(i,9);
    Gal_in(i) = y(i,10);
i/L
end

for j=ind(1):L;
GlcTrns(j) = (Param.kfGlcTr*Glc_ex(j)-
(Param.kfGlcTr/100)*Glc_in(j))/(1+Glc_ex(j)/Param.KGlcTrGlc+Glc_in(j)/Param.KGlcTrGlc);
HK(j)      =
Param.eoHK*((Param.VmaxfHK*Glc_in(j)*Param.CcATP/Param.KHKiGlc/Param.KHKmATP)-
(Param.VmaxrHK*G6P(j)*Param.CcADP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiADP))/(1+Glc_in(j)/Param.KHKiGlc+Param.CcATP/Param.KHKiATP+G6P(j)/Param.KHKiG6P+Glc_in(j)*Param.CcATP/Param.KHKiGlc/Param.KHKmATP+G6P(j)*Param.CcATP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiATP);
PFK(j)      =
((Param.VPFKmaxf*(Param.CcATP*G6P(j)/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P)-
(Param.VPFKmaxf*Param.KPFKADP*Param.KPFKFBP/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P)*(Param.CcADP*Pyr(j)/2/Param.KPFKADP/Param.KPFKFBP))/(((1+G6P(j)/Param.KPFKF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KPFKADP+Pyr(j)/Param.KPFKF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKADP))))*(1+Param.alfaPFK*Param.LPFK*(((1+G6P(j)/Param.KPFKpF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKpATP)+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+Pyr(j)/Param.KPFKpF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKpADP))))/(((1+G6P(j)/Param.KPFKF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KPFKADP+Pyr(j)/Param.KPFKF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKADP))))^3)/((1+Param.LPFK*(((1+G6P(j)/Param.KPFKpF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKpATP)+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+Pyr(j)/Param.KPFKpF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKpADP))))/(((1+G6P(j)/Param.KPFKF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KPFKADP+Pyr(j)/Param.KPFKF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKADP))))^4));
LDH(j)      =
(((Param.VmaxfLDH*Pyr(j)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH)-
(3*Param.VmaxfLDH*Param.KLDHLac*Param.KLDHNAD/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH/Param.KLDHeq)*Lac_in(j)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Param.KLDHNAD))/(1+Pyr(j)/Param.KLDHPyr+Param.CcNADH/Param.KLDHNADH+Pyr(j)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH+Lac_in(j)/Param.KLDHLac+Param.CcNAD/Param.KLDHNAD+Lac_in(j)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Param.KLDHNAD));
MCT(j)      = ((Param.kfMCT*Lac_in(j)/Param.KMCTf -
Param.kfMCT*Param.KrMCT*Lac_ex(j)/Param.KMCTf/Param.KrMCT)
/(1+Lac_in(j)/Param.KMCTf+Lac_ex(j)/Param.KMCTf/Param.KrMCT));
AlaAT(j)    = -(Param.kfAlaAT*Param.Ncell/Param.Vc*Ala_in(j)*Param.CcAKG) /
(Param.KAlaATAKG*Ala_in(j) + Param.KAlaATAla*Param.CcAKG +
Param.KAlaATiAla*Param.KAlaATAKG*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATiAKG*Pyr(j)/Param.KAlaATiPyr +

```

```

Ala_in(j)*Param.CcAKG +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATAKG*Pyr(j)/Param.KAlaATiPyr +
Param.KAlaATGlu*Ala_in(j)*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu)*(Param.KAlaATeq/(Pyr(j)
)*Param.CcGlu/Ala_in(j)/Param.CcAKG)-1);
AlaTr(j) = (Param.kA*(Ala_ex(j)-Ala_in(j)) / (1+ Ala_ex(j)/Param.KAAla +
(Ala_in(j)/Param.KAAla)));
GalTrns(j) = ((Param.kfGalTr* Gal_ex(j)/Param.KGalTrGal-
(Param.kfGalTr/100)*Gal_in(j)/Param.KGalTrGal) / (1+Glc_in(j)/Param.KGalTrGlc
+ Gal_ex(j)/Param.KGalTrGal+Gal_in(j)/Param.KGalTrGal));
GalK(j) =
((Param.kGalK*Param.Ncell/Param.Vc*Gal_in(j)*Param.CcATP/Param.KGalKGal/Param.
KGalkATP) / (1+Gal_in(j)/Param.KGalKGal + Param.CcATP/Param.KGalkATP ));
JTCA(j) = Param.TCA*Param.Vsn/3/Param.Vc;
eqAla(j) = (Param.KAlaATeq/(Pyr(j)*Param.CcGlu/Ala_in(j)/Param.CcAKG)-1);
end;

```

```

if (e==1);

```

```

figure(1)
subplot(2,2,1.5);
plot (texp,C_Glc_ec, '.r');
hold on
plot (t,Glc_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x_p', 'Glc_s_i_m');

```

```

subplot(2,2,3);
plot (texp,C_Lac_ec, '-r');
hold on
plot (t,Lac_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Lac_e_x_p', 'Lac_s_i_m');

```

```

subplot(2,2,4);
plot (texp,C_Ala_ec, '-r');
hold on
plot (t,Ala_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_e_x_p', 'Ala_s_i_m');

```

```

figure(2)
subplot(3,5,1);
plot (t,Glc_ex, '.r');
hold on
plot (t,Glc_in, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x', 'Glc_i_n', 'Gal_e_x', 'Gal_i_n');

```

```

subplot(3,5,2);

```

```

plot (t,Glc_in, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_i_n', 'Gal_i_n');

subplot(3,5,3);
plot (t,G6P, '.r');
hold on
plot (t,Pyr, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('G6P', 'Pyr');

subplot(3,5,4);
plot (t,Lac_in, '.r');
hold on
plot (t,Lac_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Lac_i_n', 'Lac_e_x');

subplot(3,5,5);
plot (t,Ala_in, '.g');
hold on
plot (t,Ala_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_i_n', 'Ala_e_x');

subplot(3,5,6);
plot (t,GlcTrns, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('Glc Transport');

subplot(3,5,7);
plot (t,HK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('HK');

subplot(3,5,8);
plot (t,GalK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('GalK');

subplot(3,5,9);
plot (t,PFK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('PFK');

```

```

subplot(3,5,10);
plot (t,LDH, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('LDH');

subplot(3,5,11);
plot (t,MCT, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('MCT');

subplot(3,5,12);
plot (t,AlaAT, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaAT');

subplot(3,5,13);
plot (t,AlaTr, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaTr');

subplot(3,5,14);
plot (t,JTCA, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('TCA');

elseif (e==2);

figure(1)
subplot(2,2,1);
plot (texp,C_Glc_ec, '.r');
hold on
plot (t,Glc_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x_p', 'Glc_s_i_m');

subplot(2,2,2);
plot (texp,C_Gal_ec, '-r');
hold on
plot (t,Gal_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Gal_e_x_p', 'Gal_s_i_m');

subplot(2,2,3);
plot (texp,C_Lac_ec, '-r');
hold on
plot (t,Lac_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');

```

```

ylabel('Concentracion');
legend('Lac_e_x_p','Lac_s_i_m');

subplot(2,2,4);
plot (texp,C_Ala_ec, '-r');
hold on
plot (t,Ala_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_e_x_p','Ala_s_i_m');

figure(2)
subplot(3,5,1);
plot (t,Glc_ex, '.r');
hold on
plot (t,Glc_in, '.g');
hold on
plot (t,Gal_ex, '-r');
hold on
plot (t,Gal_in, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x','Glc_i_n','Gal_e_x','Gal_i_n');

subplot(3,5,2);
plot (t,Glc_in, '.g');
hold on
plot (t,Gal_in, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_i_n','Gal_i_n');

subplot(3,5,3);
plot (t,G6P, '.r');
hold on
plot (t,Pyr, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('G6P','Pyr');

subplot(3,5,4);
plot (t,Lac_in, '.r');
hold on
plot (t,Lac_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Lac_i_n','Lac_e_x');

subplot(3,5,5);
plot (t,Ala_in, '.g');
hold on
plot (t,Ala_ex, '-g');
hold off

```

```
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_i_n', 'Ala_e_x');
```

```
subplot(3,5,6);
plot (t,GlcTrns, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('Glc Transport');
```

```
subplot(3,5,7);
plot (t,GalTrns, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('GalTrns');
```

```
subplot(3,5,8);
plot (t,HK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('HK');
```

```
subplot(3,5,9);
plot (t,GalK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('GalK');
```

```
subplot(3,5,10);
plot (t,PFK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('PFK');
```

```
subplot(3,5,11);
plot (t,LDH, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('LDH');
```

```
subplot(3,5,12);
plot (t,MCT, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('MCT');
```

```
subplot(3,5,13);
plot (t,AlaAT, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaAT');
```

```
subplot(3,5,14);
plot (t,AlaTr, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaTr');
```

```

subplot(3,5,15);
plot (t,JTCA,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('TCA');

```

```
end
```

Función res_md

```
function dydt = res_md(t,y)
```

```
global Param
```

```
dydt(1,1) = -Param.Vc/Param.Vsn*(( Param.kfGlcTr*y(1) -
(Param.kfGlcTr/100)*y(2) )/(1 + y(1)/Param.KGlcTrGlc + y(2)/Param.KGlcTrGlc));
%glc extra
```

```
dydt(2,1) = +(( Param.kfGlcTr*y(1) - (Param.kfGlcTr/100)*y(2) )/(1 +
y(1)/Param.KGlcTrGlc + y(2)/Param.KGlcTrGlc))-
(Param.eoHK*((Param.VmaxfHK*y(2)*Param.CcATP/Param.KHKiGlc/Param.KHKmATP)-
(Param.VmaxrHK*y(3)*Param.CcADP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiADP)))/(1+y(2)/Param.KH
KiGlc+Param.CcATP/Param.KHKiATP+y(3)/Param.KHKiG6P+y(2)*Param.CcATP/Param.KHKi
Glc/Param.KHKmATP+y(3)*Param.CcATP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiATP)); %Glc intra
```

```
dydt(3,1) =
+(Param.eoHK*((Param.VmaxfHK*y(2)*Param.CcATP/Param.KHKiGlc/Param.KHKmATP)-
(Param.VmaxrHK*y(3)*Param.CcADP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiADP)))/(1+y(2)/Param.KH
KiGlc+Param.CcATP/Param.KHKiATP+y(3)/Param.KHKiG6P+y(2)*Param.CcATP/Param.KHKi
Glc/Param.KHKmATP+y(3)*Param.CcATP/Param.KHKmG6P/Param.KHKiATP)) +
(((Param.kGalk*Param.Ncell/Param.Vc*y(10)*Param.CcATP/Param.KGalkGal/Param.KGa
lKATP) / (1+y(10)/Param.KGalkGal + Param.CcATP/Param.KGalkATP)))-
((Param.VPFKmaxf*(Param.CcATP*y(3)/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P) -
(Param.VPFKmaxf*Param.KPFKADP*Param.KPFKFBP/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P)*(Para
m.CcADP*y(4)/2/Param.KPFKADP/Param.KPFKFBP)))/(((1+y(3)/Param.KPFKF6P)*(1+Param
.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KPFKADP+y(4)/Param.KPFKF6P*(1+Param.Cc
ADP/Param.KPFKADP)
))) * ((1+Param.alfaPFK*Param.LPFK*(((1+y(3)/Param.KPFKpF6P)*(1+Param.CcATP/Par
am.KPFKpATP)+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+y(4)/Param.KPFKpF6P*(1+Param.CcADP/Par
am.KPFKpADP)
)))/(((1+y(3)/Param.KPFKF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KP
FKADP+y(4)/Param.KPFKF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKADP)
)))^3)/(1+Param.LPFK*(((1+y(3)/Param.KPFKpF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKpATP)
+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+y(4)/Param.KPFKpF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKpADP)
)))/(((1+y(3)/Param.KPFKF6P)*(1+Param.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KP
FKADP+y(4)/Param.KPFKF6P*(1+Param.CcADP/Param.KPFKADP)
)))^4) ; %G6P
```

```
dydt(4,1) =
+2*((Param.VPFKmaxf*(Param.CcATP*y(3)/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P)-
(Param.VPFKmaxf*Param.KPFKADP*Param.KPFKFBP/Param.KPFKATP/Param.KPFKF6P)*(Para
m.CcADP*y(4)/2/Param.KPFKADP/Param.KPFKFBP)))/(((1+y(3)/Param.KPFKF6P)*(1+Param
.CcATP/Param.KPFKATP)+Param.CcADP/Param.KPFKADP+y(4)/Param.KPFKF6P*(1+Param.Cc
ADP/Param.KPFKADP)
))) * ((1+Param.alfaPFK*Param.LPFK*(((1+y(3)/Param.KPFKpF6P)*(1+Param.CcATP/Par
am.KPFKpATP)+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+y(4)/Param.KPFKpF6P*(1+Param.CcADP/Par
am.KPFKpADP)

```



```

)) / (((1+y(3)/Param.KPFKF6P) * (1+Param.CcATP/Param.KPFKATP) + Param.CcADP/Param.KP
FKADP+y(4)/Param.KPFKF6P * (1+Param.CcADP/Param.KPFKADP)
)))^3) / (1+Param.LPFK * (((1+y(3)/Param.KPFKpF6P) * (1+Param.CcATP/Param.KPFKpATP)
+Param.CcADP/Param.KPFKpADP+y(4)/Param.KPFKpF6P * (1+Param.CcADP/Param.KPFKpADP)
)) / (((1+y(3)/Param.KPFKF6P) * (1+Param.CcATP/Param.KPFKATP) + Param.CcADP/Param.KP
FKADP+y(4)/Param.KPFKF6P * (1+Param.CcADP/Param.KPFKADP)
)))^4) + ((Param.kfAlaAT*Param.Ncell/Param.Vc*y(7)*Param.CcAKG) /
(Param.KAlaATAKG*y(7) + Param.KAlaATAla*Param.CcAKG +
Param.KAlaATiAla*Param.KAlaATAKG*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATiAKG*y(4)/Param.KAlaATiPyr + y(7)*Param.CcAKG +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATAKG*y(4)/Param.KAlaATiPyr +
Param.KAlaATGlu*y(7)*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu) * (1-
(y(4)*Param.CcGlu/y(7)/Param.CcAKG)/Param.KAlaATeq)) -
(((Param.VmaxfLDH*y(4)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH) -
(3*Param.VmaxfLDH*Param.KLDHLac*Param.KLDHNAD/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH/Pa
ram.KLDHeq)*y(5)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Param.KLDHNAD)) / (1+y(4)/Param.KLDHP
yr+Param.CcNADH/Param.KLDHNADH+y(4)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH+
y(5)/Param.KLDHLac+Param.CcNAD/Param.KLDHNAD+y(5)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Pa
ram.KLDHNAD)) - Param.TCA*Param.Vsn/3/Param.Vc;

```

```

dydt(5,1) =
+(((Param.VmaxfLDH*y(4)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH) -
(3*Param.VmaxfLDH*Param.KLDHLac*Param.KLDHNAD/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH/Pa
ram.KLDHeq)*y(5)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Param.KLDHNAD)) / (1+y(4)/Param.KLDHP
yr+Param.CcNADH/Param.KLDHNADH+y(4)*Param.CcNADH/Param.KLDHPyr/Param.KLDHNADH+
y(5)/Param.KLDHLac+Param.CcNAD/Param.KLDHNAD+y(5)*Param.CcNAD/Param.KLDHLac/Pa
ram.KLDHNAD)) - ((Param.kfMCT*y(5)/Param.KMCTf -
Param.KrMCT*Param.kfMCT*y(6)/Param.KrMCT/Param.KMCTf)
/(1+y(5)/Param.KMCTf+y(6)/Param.KrMCT/Param.KMCTf)); %Lac in

```

```

dydt(6,1) = +Param.Vc/Param.Vsn * ((Param.kfMCT*y(5)/Param.KMCTf -
Param.kfMCT*Param.KrMCT*y(6)/Param.KMCTf/Param.KrMCT)
/(1+y(5)/Param.KMCTf+y(6)/Param.KMCTf/Param.KrMCT)); % lac e

```

```

dydt(7,1) = - (Param.kfAlaAT*Param.Ncell/Param.Vc*y(7)*Param.CcAKG) /
(Param.KAlaATAKG*y(7) + Param.KAlaATAla*Param.CcAKG +
Param.KAlaATiAla*Param.KAlaATAKG*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATiAKG*y(4)/Param.KAlaATiPyr + y(7)*Param.CcAKG +
Param.KAlaATAla*Param.KAlaATAKG*y(4)/Param.KAlaATiPyr +
Param.KAlaATGlu*y(7)*Param.CcGlu/Param.KAlaATiGlu) * (1-
(y(4)*Param.CcGlu/y(7)/Param.CcAKG)/Param.KAlaATeq) + Param.kA*(y(8)-
y(7))/(1+y(8)/Param.KAAla+y(7)/Param.KAAla);

```

```

dydt(8,1) = -Param.Vc/Param.Vsn * Param.kA*(y(8)-
y(7))/(1+y(8)/Param.KAAla+y(7)/Param.KAAla);

```

```

dydt(9,1) = -Param.Vc/Param.Vsn * (Param.kfGalTr* y(9)/Param.KGalTrGal-
(Param.kfGalTr/100)*y(10)/Param.KGalTrGal) / (1+y(2)/Param.KGalTrGlc +
y(9)/Param.KGalTrGal+y(10)/Param.KGalTrGal);

```

```

dydt(10,1) = + ((Param.kfGalTr* y(9)/Param.KGalTrGal-
(Param.kfGalTr/100)*y(10)/Param.KGalTrGal) / (1+y(2)/Param.KGalTrGlc +
y(9)/Param.KGalTrGal+y(10)/Param.KGalTrGal)) -
((Param.kGalK*Param.Ncell/Param.Vc*y(10)*Param.CcATP/Param.KGalKGal/Param.KGal
KATP) / (1+y(10)/Param.KGalKGal + Param.CcATP/Param.KGalKATP));

```

Anexo 13: Programa de ajuste de parámetros

Programa fit_opt_md

```
clear all;
clc;

global C F temp tint C_Lac_ic C_Lac_ec C_Ala_ic C_Ala_ec C_Glc_ec C_Gal_ec

%experimento

%Condiciones iniciales

disp(['Condiciones iniciales']);
C.CeGlc=6;
C.CcGlc=0.147;
C.CcG6P=0.000185;
C.CcPyr=0.0001;
C.CcLac=0.03;
C.CeLac=0.01;
C.CcAla=0.1;
C.CeAla=0.1;
C.CeGal=14;
C.CcGal=0.000007;

%Constantes

disp(['Concentraciones ']);
% Todas la concentraciones se encuentran en unidades mM %
F.CcATP=0.8;
F.CcAMP=0.4;
F.CcADP=2-F.CcATP-F.CcAMP;
F.CcMg=0.7;
F.CcMgATP=F.CcMg*F.CcATP/0.081;
F.CcMgADP=F.CcMgATP/12;
F.CcGlu=0.001;
F.CcAKG=0.003;
F.CcNAD=3.200*10^-4;
F.CcNADH=6.1*10^-1 ;
F.CeSer=0.25 ;
F.CeThr =0.23;
F.CcCit= 5.36*10^-1;
F.CcPi= 0.9;

disp(['Condiciones del sistema ']);
%%%Condiciones del Sistema%%%
F.Vr=0.15; % [L] Volumen reactor
F.Ccell=0.8; % [10^9 cells/L ]
F.Ncell=F.Ccell*F.Vr; % [10^9 cells]
F.Vcell = 1.44*10^-3; %[L /10^9 cells]
F.Vtc = F.Vcell*F.Ncell; %[L] volúmen total de células
F.Vc = F.Vtc*0.75; %[L] volúmen en citosólico
F.Vm = F.Vtc*0.25; %[L] volúmen mitocondrial
```

```

F.Vsn = F.Vr - F.Vtc; % [L] volúmen del medio es 0.2 L - vol total de células
t=0; %hrs

disp(['GlcTr']);
%Transportador Glc%
F.KGlcTrGlc=1.50; %[mM]

disp(['HK']);
%Hexokinasa 4%
F.KHKmATP=6.3*10^-2; %[mM]
F.KHKiATP=F.KHKmATP;
F.KHKmADP=2.3*10^-1; %[mM]
F.KHKiADP=F.KHKmADP;
F.KHKmG6P=4*10^-2; %[mM]
F.KHKiG6P=6.70; %[mM]
F.KHKiGlc=1*10^-1; %[mM]
F.KHKmGlc=F.KHKiGlc;
F.VmaxfHK=2000*3600; %[1/hr]
F.VmaxrHK=1*60; %[1/hr]

disp(['PFK']);
%Fosfofructokinasa 3 %
F.KPFKeq=242;
F.KPFKF6P=0.18; %[mM]
F.KPFKpF6P=20; %[mM]
F.KPFKATP=0.08; %[mM]
F.KPFKpATP=0.25; %[mM]
F.KPFKF6BP=4.02; %[mM]
F.KPFKpF6BP=F.KPFKF6BP; %[mM]
F.KPFKADP=2.71; %[mM]
F.KPFKpADP=F.KPFKADP; %[mM]
F.KPFKiATP=0.87; %[mM]
F.KPFKaAMP=0.06; %[mM]
F.dPFK=0.01;
F.ePFK=0.01;
F.LoPFK=13;
F.alfaPFK=F.KPFKF6P*F.KPFKATP/F.KPFKpF6P*F.KPFKpATP;
F.LPFK=F.LoPFK*((1+F.CcATP/F.KPFKiATP)/(1+F.dPFK*F.CcATP/F.KPFKiATP))*((1+F.e
PFK*F.CcAMP/F.KPFKaAMP)/(1+F.CcAMP/F.KPFKaAMP))^4;

disp(['LDH']);
%Lactato dehidrogenasa 2%
F.KLDHeq=2;
F.KLDHPyr=0.6; %[mM]
F.KLDHNADH=0.008; %[mM]
F.KLDHLac=17; %[mM]
F.KLDHNAD=0.253; %[mM]

disp(['MCT']);
%Transportador de monocarboxilato%
F.kfMCT=366.26; %[mM 1/hr] ajustado
F.KrMCT=1.9386;
F.krMCT=F.kfMCT*F.KrMCT; %[mM 1/hr]
F.KMCTf=5.00*10^-2; %[mM]

```

```

F.KMCTr=F.KMCTf*F.KrMCT; %[mM]

%%%Metabolismo de alanina%%%

disp(['AlaTr']);
%Transporte alanina%
F.K_AlaTr=0.59251; %[1/hr] ajustado

%F.KASer=0.73; %[mM]
F.KAAla=0.4; %[mM]

disp(['AlaAT ']);
%Alanina aminotransferasa%
%F.KAlaATEq=0.005;
F.KAlaATAKG=0.40; %[mM]
F.KAlaATiAKG=0.40; %[mM]
F.KAlaATAla=2.80*10; %[mM]
F.KAlaATiAla=2.80*10; %[mM]
F.KAlaATGlu=2.50*10; %[mM]
F.KAlaATiGlu=2.50*10; %[mM]
F.KAlaATiPyr=3.00*10; %[mM]

disp(['TCA ']);
%TCA%

%%% Metabolismo galactosa %%%

disp(['GalTr ']);
%Transportador galactosa%
F.KGalTrGlc=4.00*10^2; %[mM]
F.KGalTrGal=174; %[mM]

%rGalTr = (kGalTr* CeGal / (((1+CeGlc/KGalTrGlc)*KGalTrGal) + CeGal));

disp(['Galk ']);
%Galactokinasa%

F.KGalkGal=6.98*10^-1; %[mM]
F.KGalkATP=9.48*10^-2; %[mM]

%datos experimentales

load T_ec_GG6_14.txt; %archivo en txt con las horas de los datos
experimentales
texp = T_ec_GG6_14;
load T_ic_GG6_14.txt;
tint = T_ic_GG6_14;
load Lac_ic_GG6_14.txt; %archivo en txt con los datos experimentales
C_Lac_ic = Lac_ic_GG6_14;
load Lac_ec_GG6_14.txt; %archivo en txt con los datos experimentales
C_Lac_ec = Lac_ec_GG6_14;
load Ala_ic_GG6_14.txt;

```

```

C_Ala_ic = Ala_ic_GG6_14;
load Ala_ec_GG6_14.txt;
C_Ala_ec = Ala_ec_GG6_14;
load Glc_ec_GG6_14.txt;
C_Glc_ec = Glc_ec_GG6_14;
load Gal_ec_GG6_14.txt;
C_Gal_ec = Gal_ec_GG6_14;

end

%fitting
optnew = optimset('TolX',1e-6,'MaxFunEvals',10000);

F.kfGlcTr    = 77.4669;          %estimado en el fitting exhaustivo: [cm/h]
eoHK_0      = 0.0657;
VPFKmaxf_0  = 6.7646e+004;
VmaxfLDH_0  = 5.3328e+008;
F.kA        = 3.579*10*2.8;
F.kfAlaAT   = 0.0341*1000*1000;
TCA_0       = 0.1811;
F.kfGalTr   = 300;
F.kGalK     = 5000;
F.KAlaATeq  = 1/6.5;

[ks_min error] = fminsearch(@calcular_MSE_md,[ eoHK_0 VPFKmaxf_0 VmaxfLDH_0
TCA_0 ],optnew);

disp(['Las variables encontradas son']);
ks_min
save('Param_mod_opt','F')

%gráfico

F.eoHK      = ks_min(1);
F.VPFKmaxf  = ks_min(2);
F.VmaxfLDH  = ks_min(3);
F.TCA       = ks_min(4);

F

disp(['Se definió la variable global F con los parametros encontrados']);
tf=texp(length(texp));
varo = [C.CeGlc C.CcGlc C.CcG6P C.CcPyr C.CcLac C.CeLac C.CcAla C.CeAla
C.CeGal C.CcGal];
trango = [0:1:tf];
[t,y] = ode15s (@(t,c) ode_opt_md(t,c,F),trango,varo);

L=length(t);
for i=1:L-1
    Glc_ex(i) = y(i,1);
    Glc_in(i) = y(i,2);
    G6P(i)    = y(i,3);
    Pyr(i)    = y(i,4);
end

```

```

Lac_in(i) = y(i,5);
Lac_ex(i) = y(i,6);
Ala_in(i) = y(i,7);
Ala_ex(i) = y(i,8);
Gal_ex(i) = y(i,9);
Gal_in(i) = y(i,10);
i/L
end

tgrf=[0:1:tf-1];

ind=find(t>0.5);

for j=ind(1):L-1;
GlcTrns(j) = (F.kfGlcTr*Glc_ex(j)-
(F.kfGlcTr/100)*Glc_in(j))/(1+Glc_ex(j)/F.KGlcTrGlc+Glc_in(j)/F.KGlcTrGlc);
HK(j) = F.eoHK*((F.VmaxfHK*Glc_in(j)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP)-
(F.VmaxrHK*G6P(j)*F.CcADP/F.KHKmG6P/F.KHKiADP))/(1+Glc_in(j)/F.KHKiGlc+F.CcATP
/F.KHKiATP+G6P(j)/F.KHKiG6P+Glc_in(j)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP+G6P(j)*F.CcA
TP/F.KHKmG6P/F.KHKiATP);
PFK(j) = ((F.VPFKmaxf*(F.CcATP*G6P(j)/F.KPFKATP/F.KPFKF6P)-
(F.VPFKmaxf*F.KPFKADP*F.KPFKFBP/F.KPFKATP/F.KPFKF6P)*(F.CcADP*Pyr(j)/2/F.KPFKA
DP/F.KPFKFBP))/(((1+G6P(j)/F.KPFKF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKATP)+F.CcADP/F.KPFKADP+
Pyr(j)/F.KPFKF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKADP)
)))*(1+F.alfaPFK*F.LPFK*(((1+G6P(j)/F.KPFKpF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKpATP)+F.CcA
DP/F.KPFKpADP+Pyr(j)/F.KPFKpF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKpADP)
)))/(((1+G6P(j)/F.KPFKF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKATP)+F.CcADP/F.KPFKADP+Pyr(j)/F.KPF
KF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKADP)
)))^3)/(1+F.LPFK*(((1+G6P(j)/F.KPFKpF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKpATP)+F.CcADP/F.KPF
KpADP+Pyr(j)/F.KPFKpF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKpADP)
)))/(((1+G6P(j)/F.KPFKF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKATP)+F.CcADP/F.KPFKADP+Pyr(j)/F.KPF
KF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKADP)
)))^4));
LDH(j) = ((F.VmaxfLDH*Pyr(j)*F.CcNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH)-
((3*F.VmaxfLDH*F.KLDHLac*F.KLDHNAD/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH/F.KLDHeq)*Lac_in(j)*F.
CcNADH/F.KLDHLac/F.KLDHNAD))/(1+Pyr(j)/F.KLDHPyr+F.CcNADH/F.KLDHNADH+Pyr(j)*F.C
cNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH+Lac_in(j)/F.KLDHLac+F.CcNADH/F.KLDHNAD+Lac_in(j)*F.C
cNADH/F.KLDHLac/F.KLDHNAD));
MCT(j) = ((F.kfMCT*Lac_in(j)/F.KMCTf -
F.kfMCT*F.KrMCT*Lac_ex(j)/F.KMCTf/F.KrMCT)
/(1+Lac_in(j)/F.KMCTf+Lac_ex(j)/F.KMCTf/F.KrMCT));
AlaAT(j) = -(F.kfAlaAT*F.Ncell/F.Vc*Ala_in(j)*F.CcAKG) /
(F.KAlaATAKG*Ala_in(j) + F.KAlaATAla*F.CcAKG +
F.KAlaATiAla*F.KAlaATAKG*F.CcGlu/F.KAlaATiGlu +
F.KAlaATAla*F.KAlaATiAKG*Pyr(j)/F.KAlaATiPyr + Ala_in(j)*F.CcAKG +
F.KAlaATAla*F.KAlaATAKG*Pyr(j)/F.KAlaATiPyr +
F.KAlaATGlu*Ala_in(j)*F.CcGlu/F.KAlaATiGlu)*(F.KAlaATeq/(Pyr(j)*F.CcGlu/Ala_in
(j)/F.CcAKG)-1);
AlaTr(j) = ((F.kA*(Ala_ex(j)-Ala_in(j)) / (1+Ala_ex(j)/F.KAAla +
(Ala_in(j)/F.KAAla))));
GalTrns(j) = ((F.kfGalTr* Gal_ex(j)/F.KGalTrGal-
(F.kfGalTr/100)*Gal_in(j)/F.KGalTrGal) / (1+Glc_in(j)/F.KGalTrGlc +
Gal_ex(j)/F.KGalTrGal+Gal_in(j)/F.KGalTrGal));
GalK(j) = ((F.kGalK*F.Ncell/F.Vc*Gal_in(j)*F.CcATP/F.KGalKGal/F.KGalKATP)
/ (1+Gal_in(j)/F.KGalKGal + F.CcATP/F.KGalKATP ));
JTCA(j) = F.TCA*F.Vsn/3/F.Vc;
eqAla(j) = (F.KAlaATeq/(Pyr(j)*F.CcGlu/Ala_in(j)/F.CcAKG)-1);
end;

```

```

figure(1)
subplot(2,2,1);
plot (texp,C_Glc_ec, '.r');
hold on
plot (tgrf,Glc_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x_p', 'Glc_s_i_m');

subplot(2,2,2);
plot (texp,C_Gal_ec, '-r');
hold on
plot (tgrf,Gal_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Gal_e_x_p', 'Gal_s_i_m');

subplot(2,2,3);
plot (texp,C_Lac_ec, '-r');
hold on
plot (tgrf,Lac_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Lac_e_x_p', 'Lac_s_i_m');

subplot(2,2,4);
plot (texp,C_Ala_ec, '-r');
hold on
plot (tgrf,Ala_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_e_x_p', 'Ala_s_i_m');

figure(2)
subplot(3,5,1);
plot (tgrf,Glc_ex, '.r');
hold on
plot (tgrf,Glc_in, '.g');
hold on
plot (tgrf,Gal_ex, '-r');
hold on
plot (tgrf,Gal_in, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Glc_e_x', 'Glc_i_n', 'Gal_e_x', 'Gal_i_n');

subplot(3,5,2);
plot (tgrf,Glc_in, '.g');
hold on
plot (tgrf,Gal_in, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');

```

```

ylabel('Concentracion');
legend('Glc_i_n', 'Gal_i_n');

subplot(3,5,3);
plot (tgrf,G6P, '.r');
hold on
plot (tgrf,Pyr, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('G6P', 'Pyr');

subplot(3,5,4);
plot (tgrf,Lac_in, '.r');
hold on
plot (tgrf,Lac_ex, '.g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Lac_i_n', 'Lac_e_x');

subplot(3,5,5);
plot (tgrf,Ala_in, '.g');
hold on
plot (tgrf,Ala_ex, '-g');
hold off
xlabel('Tiempo');
ylabel('Concentracion');
legend('Ala_i_n', 'Ala_e_x');

subplot(3,5,6);
plot (tgrf,GlcTrns, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('Glc Transport');

subplot(3,5,7);
plot (tgrf,GalTrns, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('GalTrns');

subplot(3,5,8);
plot (tgrf,HK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('HK');

subplot(3,5,9);
plot (tgrf,GalK, '.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('GalK');

subplot(3,5,10);
plot (tgrf,PFK, '.r');
xlabel('Tiempo');

```



```

ylabel('velocidad');
legend('PFK');

subplot(3,5,11);
plot (tgrf,LDH,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('LDH');

subplot(3,5,12);
plot (tgrf,MCT,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('MCT');

subplot(3,5,13);
plot (tgrf,AlaAT,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaAT');

subplot(3,5,14);
plot (tgrf,AlaTr,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('AlaTr');

subplot(3,5,15);
plot (tgrf,JTCA,'.r');
xlabel('Tiempo');
ylabel('velocidad');
legend('TCA');

```

Función ode_opt_md

```
function dydt = ode_opt_md(t,y,F)
```

```
dydt(1,1) = -F.Vc/F.Vsn*(( F.kfGlcTr*y(1) - (F.kfGlcTr/100)*y(2) )/(1 +
y(1)/F.KGlcTrGlc + y(2)/F.KGlcTrGlc)); %glc extra
```

```
dydt(2,1) = +(( F.kfGlcTr*y(1) - (F.kfGlcTr/100)*y(2) )/(1 + y(1)/F.KGlcTrGlc
+ y(2)/F.KGlcTrGlc))- (F.eoHK*((F.VmaxfHK*y(2)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP)-
(F.VmaxrHK*y(3)*F.CcADP/F.KHKmG6P/F.KHKiADP))/(1+y(2)/F.KHKiGlc+F.CcATP/F.KHKi
ATP+y(3)/F.KHKiG6P+y(2)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP+y(3)*F.CcATP/F.KHKmG6P/F.K
HKiATP)); %Glc intra
```

```
dydt(3,1) = +(F.eoHK*((F.VmaxfHK*y(2)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP)-
(F.VmaxrHK*y(3)*F.CcADP/F.KHKmG6P/F.KHKiADP))/(1+y(2)/F.KHKiGlc+F.CcATP/F.KHKi
ATP+y(3)/F.KHKiG6P+y(2)*F.CcATP/F.KHKiGlc/F.KHKmATP+y(3)*F.CcATP/F.KHKmG6P/F.K
HKiATP)) + (((F.kGalk*F.Ncell/F.Vc*y(10)*F.CcATP/F.KGalkGal/F.KGalkATP) /
(1+y(10)/F.KGalkGal + F.CcATP/F.KGalkATP)))-
((F.VPFKmaxf*(F.CcATP*y(3)/F.KPFKATP/F.KPFKF6P) -
(F.VPFKmaxf*F.KPFKADP*F.KPFKFBP/F.KPFKATP/F.KPFKF6P)*(F.CcADP*y(4)/2/F.KPFKADP
/F.KPFKFBP))/(((1+y(3)/F.KPFKF6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKATP)+F.CcADP/F.KPFKADP+y(4)
/F.KPFKF6P*(1+F.CcADP/F.KPFKADP)
)))*((1+F.alfaPFK*F.LPFK*(((1+y(3)/F.KPFKp6P)*(1+F.CcATP/F.KPFKpATP)+F.CcADP
```

$$\frac{F.KPFKpADP+y(4)}{F.KPFKpF6P} \cdot \frac{1+F.CcADP/F.KPFKpADP}{((1+y(3)/F.KPFKf6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKATP) + F.CcADP/F.KPFKADP+y(4)/F.KPFKf6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKADP))}^3 \cdot \frac{1+F.LPFK \cdot (((1+y(3)/F.KPFKpF6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKpATP) + F.CcADP/F.KPFKpADP+y(4)/F.KPFKpF6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKpADP)) \cdot (1+y(3)/F.KPFKf6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKATP) + F.CcADP/F.KPFKADP+y(4)/F.KPFKf6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKADP)))^4}{\%G6P}$$

$$\begin{aligned} dydt(4,1) = & +2 \cdot ((F.VPFKmaxf \cdot (F.CcATP \cdot y(3)/F.KPFKATP/F.KPFKf6P) - \\ & (F.VPFKmaxf \cdot F.KPFKADP \cdot F.KPFKFBP/F.KPFKATP/F.KPFKf6P) \cdot (F.CcADP \cdot y(4)/2/F.KPFKADP \\ & /F.KPFKFBP)) / (((1+y(3)/F.KPFKf6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKATP) + F.CcADP/F.KPFKADP+y(4) \\ & /F.KPFKf6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKADP))) \cdot ((1+F.alfapFK \cdot F.LPFK \cdot (((1+y(3)/F.KPFKpF6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKpATP) + F.CcADP \\ & /F.KPFKpADP+y(4)/F.KPFKpF6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKpADP)) \cdot (1+y(3)/F.KPFKf6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKATP) + F.CcADP/F.KPFKADP+y(4)/F.KPFKf6P \\ & \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKADP)))^3 / (1+F.LPFK \cdot (((1+y(3)/F.KPFKpF6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKpATP) + F.CcADP/F.KPFKpADP+y(4)/F.KPFKpF6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKpADP)) \\ & / (((1+y(3)/F.KPFKf6P) \cdot (1+F.CcATP/F.KPFKATP) + F.CcADP/F.KPFKADP+y(4)/F.KPFKf6P \cdot (1+F.CcADP/F.KPFKADP)))^4)) + ((F.kfAlaAT \cdot F.Ncell/F.Vc \cdot y(7) \cdot F.CcAKG) / \\ & (F.KalaATAKG \cdot y(7) + F.KalaATAla \cdot F.CcAKG + \\ & F.KalaATiAla \cdot F.KalaATAKG \cdot F.CcGlu/F.KalaATiGlu + \\ & F.KalaATAla \cdot F.KalaATiAKG \cdot y(4)/F.KalaATiPyr + y(7) \cdot F.CcAKG + \\ & F.KalaATAla \cdot F.KalaATAKG \cdot y(4)/F.KalaATiPyr + \\ & F.KalaATGlu \cdot y(7) \cdot F.CcGlu/F.KalaATiGlu) \cdot (1 - \\ & (y(4) \cdot F.CcGlu/y(7)/F.CcAKG)/F.KalaATeq)) - \\ & ((F.VmaxfLDH \cdot y(4) \cdot F.CcNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH) - \\ & ((3 \cdot F.VmaxfLDH \cdot F.KLDHLac \cdot F.KLDHNAD/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH/F.KLDHeq) \cdot y(5) \cdot F.CcNAD \\ & /F.KLDHLac/F.KLDHNAD)) / (1+y(4)/F.KLDHPyr+F.CcNADH/F.KLDHNADH+y(4) \cdot F.CcNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH+y(5)/F.KLDHLac+F.CcNAD/F.KLDHNAD+y(5) \cdot F.CcNADH/F.KLDHLac/F.KLDHNAD)) - F.TCA \cdot F.Vsn/3/F.Vc; \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} dydt(5,1) = & +(((F.VmaxfLDH \cdot y(4) \cdot F.CcNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH) - \\ & ((3 \cdot F.VmaxfLDH \cdot F.KLDHLac \cdot F.KLDHNAD/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH/F.KLDHeq) \cdot y(5) \cdot F.CcNAD \\ & /F.KLDHLac/F.KLDHNAD)) / (1+y(4)/F.KLDHPyr+F.CcNADH/F.KLDHNADH+y(4) \cdot F.CcNADH/F.KLDHPyr/F.KLDHNADH+y(5)/F.KLDHLac+F.CcNAD/F.KLDHNAD+y(5) \cdot F.CcNADH/F.KLDHLac/F.KLDHNAD)) - ((F.kfMCT \cdot y(5)/F.KMCTf - F.KrMCT \cdot F.kfMCT \cdot y(6)/F.KrMCT/F.KMCTf) / (1+y(5)/F.KMCTf+y(6)/F.KrMCT/F.KMCTf)); \%Lac \text{ in} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} dydt(6,1) = & +F.Vc/F.Vsn \cdot ((F.kfMCT \cdot y(5)/F.KMCTf - \\ & F.kfMCT \cdot F.KrMCT \cdot y(6)/F.KMCTf/F.KrMCT) / (1+y(5)/F.KMCTf+y(6)/F.KMCTf/F.KrMCT)); \\ & \% \text{ lac e} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} dydt(7,1) = & - (F.kfAlaAT \cdot F.Ncell/F.Vc \cdot y(7) \cdot F.CcAKG) / (F.KalaATAKG \cdot y(7) + \\ & F.KalaATAla \cdot F.CcAKG + F.KalaATiAla \cdot F.KalaATAKG \cdot F.CcGlu/F.KalaATiGlu + \\ & F.KalaATAla \cdot F.KalaATiAKG \cdot y(4)/F.KalaATiPyr + y(7) \cdot F.CcAKG + \\ & F.KalaATAla \cdot F.KalaATAKG \cdot y(4)/F.KalaATiPyr + \\ & F.KalaATGlu \cdot y(7) \cdot F.CcGlu/F.KalaATiGlu) \cdot (1 - \\ & (y(4) \cdot F.CcGlu/y(7)/F.CcAKG)/F.KalaATeq) + F.kA \cdot (y(8) - \\ & y(7)) / (1+y(8)/F.KAAla+y(7)/F.KAAla); \end{aligned}$$

$$dydt(8,1) = -F.Vc/F.Vsn \cdot F.kA \cdot (y(8) - y(7)) / (1+y(8)/F.KAAla+y(7)/F.KAAla);$$

$$\begin{aligned} dydt(9,1) = & -F.Vc/F.Vsn \cdot (F.kfGalTr \cdot y(9)/F.KGalTrGal - \\ & (F.kfGalTr/100) \cdot y(10)/F.KGalTrGal) / (1+y(2)/F.KGalTrGlc + \\ & y(9)/F.KGalTrGal+y(10)/F.KGalTrGal); \end{aligned}$$

```
dydt(10,1)= + ((F.kfGalTr* y(9)/F.KGalTrGal-(F.kfGalTr/100)*y(10)/F.KGalTrGal)
/ (1+y(2)/F.KGalTrGlc + y(9)/F.KGalTrGal+y(10)/F.KGalTrGal))-
((F.kGalK*F.Ncell/F.Vc*y(10)*F.CcATP/F.KGalKGal/F.KGalKATP) /
(1+y(10)/F.KGalKGal + F.CcATP/F.KGalKATP ));
```

Función calcular_MSE_md

```
function MSE = calcular_MSE_md(var_in)
```

```
global C F texp tint C_Lac_ic C_Lac_ec C_Ala_ic C_Ala_ec C_Glc_ec C_Gal_ec
```

```
n = length(texp);
o = length(tint);
tf = texp(n);
tspan = [0:0.25:tf];
options = odeset('RelTol', 1e-6, 'AbsTol', 1e-9);
c0 = [C.CeGlc C.CcGlc C.CcG6P C.CcPyr C.CcLac C.CeLac C.CcAla C.CeAla C.CeGal
C.CcGal];
```

```
F.eoHK = var_in(1);
F.VPFKmaxf = var_in(2);
F.VmaxfLDH = var_in(3);
F.TCA = var_in(4);
```

```
disp(['Se definió la variable global F']);
```

```
tic;[t c] = ode23tb(@(t,c) ode_opt_md(t,c,F), tspan, c0, options);toc
```

```
m = length(t);
```

```
tsimulacion = t(m);
```

```
if t(m)==(tf);
for j = 1:1:n;
    ind = texp(j)+1;
    residuo_al_cuad_ec(j) = ((c(ind,1)-
C_Glc_ec(j))/C_Glc_ec(j))^2+((c(ind,6)-C_Lac_ec(j))/C_Lac_ec(j))^2+((c(ind,8)-
C_Ala_ec(j))/C_Ala_ec(j))^2+3*((c(ind,9)-C_Gal_ec(j))/C_Gal_ec(j))^2;
end
for i = 1:1:o;
    ind = texp(i)+1;
    residuo_al_cuad_ic(i) = ((c(ind,5)-
C_Lac_ic(i))/C_Lac_ic(i))^2+((c(ind,7)-C_Ala_ic(i))/C_Ala_ic(i))^2;
end
else
```

```

for j = 1:1:n;
    residuo_al_cuad_ec(j) = 1000;
end

for i = 1:1:o;
    residuo_al_cuad_ic(j) = 1000;
end
end
MSE = ((sum(residuo_al_cuad_ec)/n)+(sum(residuo_al_cuad_ic)/n))^0.5

```

Anexo 14: Simulaciones G6 y GG6/14

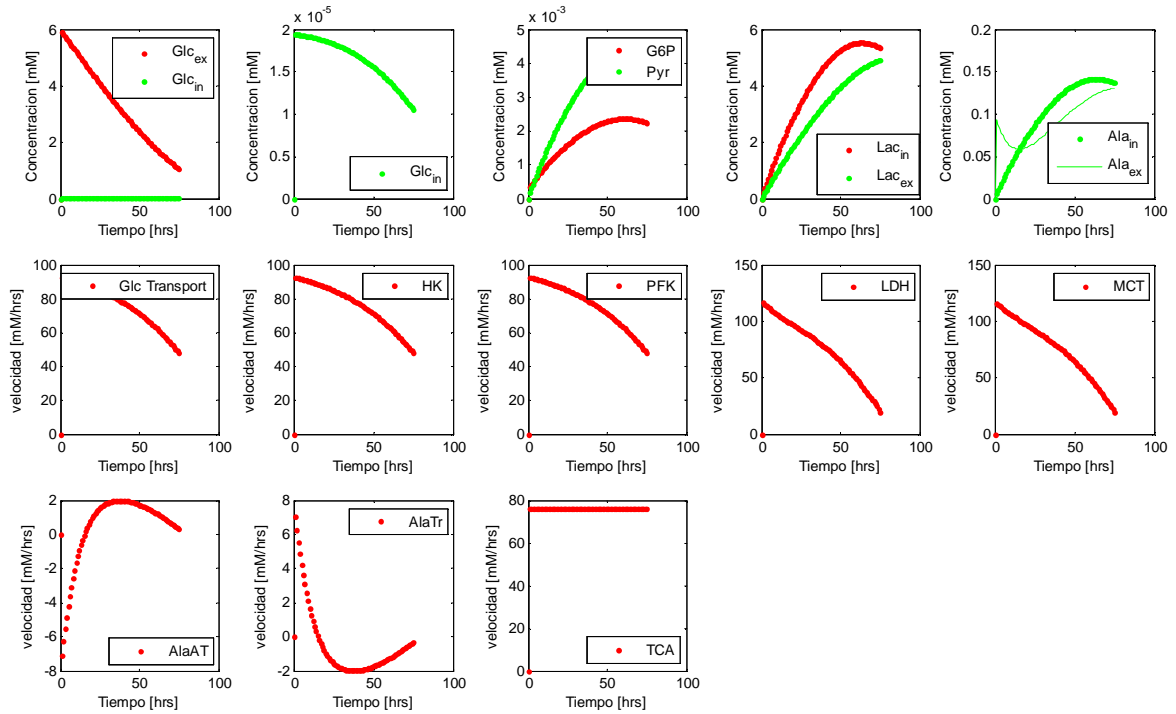


Figura 22: Simulación experimento G6

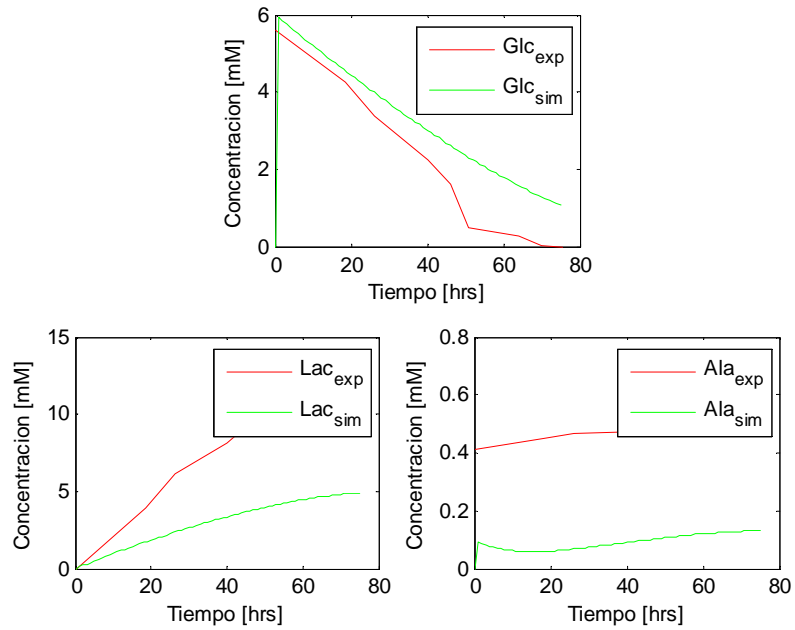


Figura 23: Comparación entre simulación y datos experimentales del experimento G6

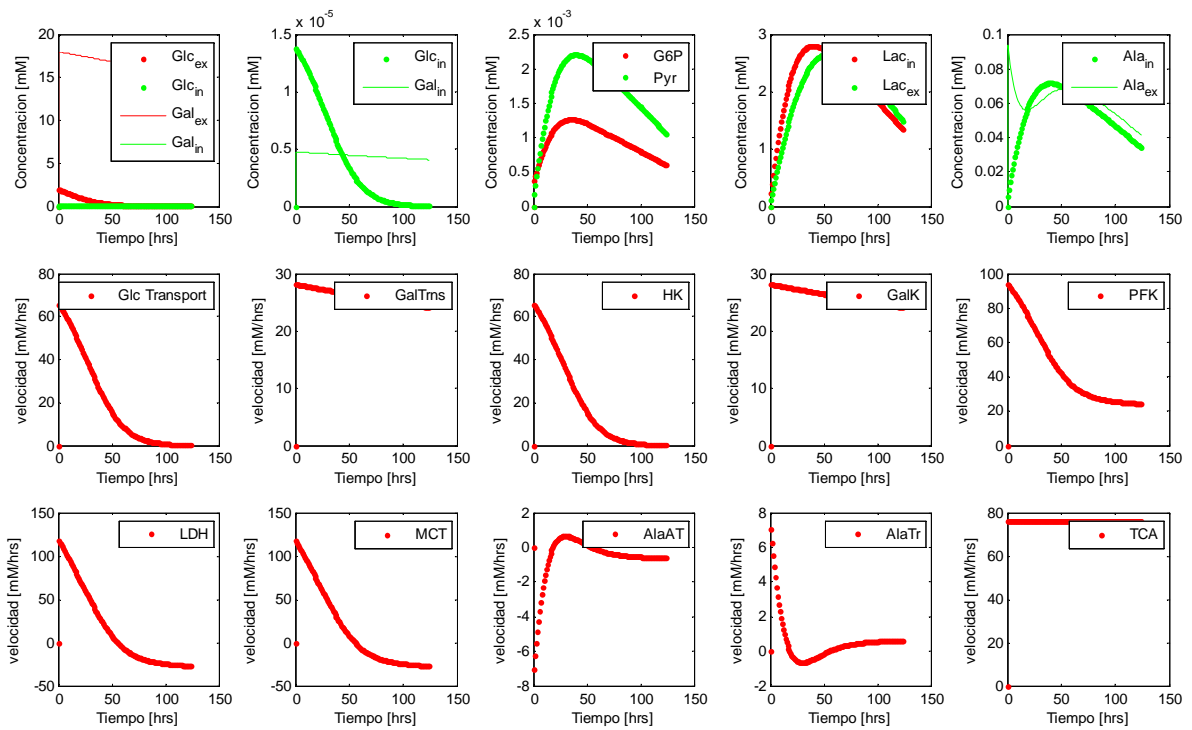


Figura 24: Simulación del experimento GG2/18

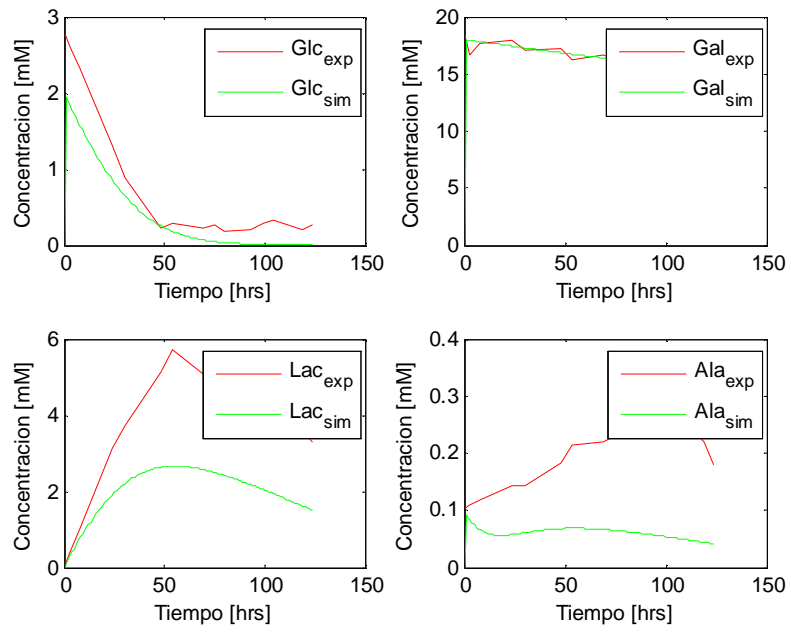


Figura 25: Comparación entre simulación y datos experimentales del experimento GG2/18

Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose

Camila A Wilkens^{1,3}, Claudia Altamirano^{2*}, Ziomara P Gerdtzen^{1,3*§}

¹ Centre for Biochemical Engineering and Biotechnology, Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile.

² Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

³ Millennium Institute for Cell Dynamics and Biotechnology: a Centre for Systems Biology, University of Chile, Santiago, Chile.

*Equal contribution authors

§Corresponding author

Email address: zgerdtze@ing.uchile.cl

Address: Beauchef 850, Santiago, Chile; 8370448

Telephone: 562-978-4712

Fax: 562-699-1084

Aceptado para su publicación el 4 de febrero del 2011 por la revista *Biotechnology and Bioprocess Engineering*

Abstract

t-PA producing CHO cells have been shown to undergo a metabolic shift when the culture medium is supplemented with a mixture of glucose and galactose. This metabolic change is characterized by the reincorporation of lactate and its use as an additional carbon source. The aim of this work is to understand lactate metabolism. To do so, Chinese hamster ovary cells were grown in batch cultures in four different conditions consisting in different combinations of glucose and galactose. In experiments supplemented with glucose, only lactate production was observed. Cultures with glucose and galactose consumed glucose first and produced lactate at the same time, after glucose depletion galactose consumption began and lactate uptake was observed. Comparison of the metabolic state of cells with and without the shift by metabolic flux analysis show that the metabolic fluxes distribution changes mostly in the reactions involving pyruvate metabolism. When not enough pyruvate is being produced for cells to support their energy requirements, lactate dehydrogenase complex changes the direction of the reaction yielding pyruvate to feed the TCA cycle. The slow change from high fluxes during glucose consumption to low fluxes in galactose consumption generates intracellular conditions that allow the influx of lactate. Lactate consumption is possible in cell cultures supplemented with glucose and galactose due to the low rates at which galactose is consumed. Evidence suggests that an excessive production and accumulation of pyruvate during glucose consumption leads to lactate production and accumulation inside the cell. Other internal conditions such as a decrease in internal pH, forces the flow of lactate outside the cell. After metabolic shift the intracellular pool of pyruvate, lactate and H^+ drops permitting the reversal of the monocarboxylate transporter direction, therefore leading to lactate uptake. Metabolic analysis comparing glucose and galactose consumption indicates that after metabolic shift not enough pyruvate is produced to supply energy metabolism and lactate is used for pyruvate synthesis. In addition, MFA indicates that most carbon consumed during low carbon flux is directed towards maintaining energy metabolism.

Keywords

Lactate metabolism; metabolic shift; CHO; MFA

Introduction

In search for lower manufacturing costs of biopharmaceuticals, media design for animal cell culture has been a major target in previous research efforts, both in industry and academia. Several media formulations have been proposed to maximize product synthesis while providing conditions that allow maintaining the products characteristics. Researchers in the field of animal cell culture have regarded the reduction of the two main secondary metabolites, ammonia and lactate, as an important issue to improve product yield, due to evidence that indicates that ammonia restricts cell proliferation [1] while the presence of lactate above a certain threshold coupled with osmolarity rise decreases cell growth and product formation [2; 3].

One of the methods proposed to reduce ammonia production is to generate clones transfected with the *Glutamine synthetase* gene in order to replace glutamine in the medium for glutamate [4]. The latter is consumed at a much lower rate and produces less ammonia. With this simple change it is possible to extend the culture's lifespan. To reduce lactate production and therefore increase the heterologous protein production, manipulation of lactate formation pathway was performed in hybridoma by partially disrupting the LDH-A gene by homologous recombination [5]. This modification allowed achieving low lactate concentrations in high glucose cultures and a superior product yield.

Not only the presence of lactate affects cell cultures, but also the rate at which it is produced in comparison to the rate at which glucose is consumed has an impact over cell proliferation and product synthesis. During culture, due to its progression, different media compositions or feeding regimes, cells can reach different metabolic states. These distinct states may be characterized by the stoichiometric ratio of lactate produced versus glucose consumed ($\Delta L/\Delta G$). Often in cultures changes from high to low $\Delta L/\Delta G$ are observed but negative values can also be achieved when lactate consumption takes place. Europa et al. achieved different metabolic states through controlled feeding and showed that it is possible to observe higher cell density, protein production and a lower concentration of ammonia and lactate in cultures where cells reach low levels $\Delta L/\Delta G$ [6]. A study by Korke et al. showed that there is a change in the expression levels of key enzymes in the central metabolism after metabolic shift. Lower fluxes through the glycolytic pathway and TCA cycle are correlated to a reduction in gene expression of the enzymes involved [7].

A shift in metabolism can also take place when lactate is consumed. Several authors have studied metabolic shift towards lactate utilization under different conditions. Studies with human and CHO cells have shown that metabolic shift could be achieved when cells are cultured with a mixture of glucose and galactose [8;10]. In these cultures glucose is consumed first followed by galactose. During glucose consumption lactic acid is produced, but in the second phase in which galactose is consumed, lactate concentration is reduced as cells re-metabolize it as an additional carbon source. As a direct result of the reduced lactate concentration the culture's duration is extended. Kuwae et al. investigated the effect of pH and amino acid supplementation on cultures with a metabolic shift with negative values of $\Delta L/\Delta G$ and its relevance over the production of human recombinant antithrombin and cell metabolism [11]. Experimental evidence indicated that the metabolic shift takes place earlier in cultures with lower pH. Pascoe et al. approached the issue by studying proteomic differences between cells in different metabolic states. Experiments showed that the amount of enolase enzyme present inside the cell drops after metabolic shift, a result that is consistent with the decline of the glucose consumption rate [12]. These works suggest that both external conditions and internal changes are related to the metabolic changes that cells undergo during metabolic shift.

In this work we aim at gaining a better understanding of lactate metabolism. Specifically we investigate the intracellular conditions that allow lactate uptake in a culture supplemented with mixed carbon sources and evaluate flux distribution under lactate consumption conditions.

Material and Methods

Cell line and culture conditions

The t-PA producing CHO TF 70R cell line was used. Hyclone's protein and serum free media SFM4CHO™ (HyClone, USA) without glutamine was employed, supplemented with glucose (Sigma, USA, G5146), galactose (Sigma, USA, G5388) and glutamate (Sigma, USA, G8415) to define four different culture conditions. The control experiment for high glucose concentration was performed with 20 mM glucose (G20), while a low glucose control experiment had 6 mM of glucose (G6). Two combined carbon conditions with a final concentration of 20 mM of hexose were considered, the first with 6 mM glucose and 14 mM galactose (GG6/14) and the second with 2 mM glucose and 18 mM galactose (GG2/18). Since the cells have the GS gene 6 mM glutamate was present in all experiments.

Spinner flasks (400 mL) stirred at 80 rpm in a CO₂ incubator (Shel Lab, USA) at 37.0 °C, with 96% relative humidity in a 5% CO₂ enriched air atmosphere were inoculated at 0.20x10⁶ cells mL⁻¹ with cells from the mid exponential phase of growth. Oxygen consumption rate was measured once every 24 hours by withdrawing a 20 ml homogeneous sample of supernatant and cells from the spinner flask and transferring it into a 20 ml flask with a magnetic stirrer. This flask was kept at 37° and tightly sealed with a dissolved oxygen probe (Mettler Toledo, Spain) so no oxygen would be exchanged by the flask and the environment. The rate at which the dissolved oxygen concentration decreased was taken as the oxygen uptake rate (OUR). Intracellular metabolites were extracted once a day using the acid extraction method described by Lu et al., [13] with an additional cold PBS wash step added to the protocol; intracellular concentration of metabolites was estimated considering the cellular volume to be 1.44x10⁻⁹ mL as indicated by the authors. This protocol ensures, with proper storage, stability of citrate, lactate and alanine; oxalacetate is less stable in aqueous solution but measurable. The methodology allows comparing intracellular concentrations in time, regardless systematic errors.

Cell number and viability were determined by the trypan blue exclusion method. After cell counting the supernatant was frozen for further analysis.

Metabolite determinations

Glucose, galactose, glutamate and lactate concentrations were determined with a YSI 2700 automated analyzer (YSI Inc, USA). Ammonium ion concentration and amino acids were measured by HPLC with a Perkin Elmer (USA) equipment using a reverse phase column (AccQ.Tag Column, Waters, USA) and AccQ.Fluor reagent Kit (Waters, USA). Organic acids concentration was also determined by HPLC in a Perkin Elmer equipment with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, USA). t-PA concentration was quantified by an ELISA test.

Specific rate determination

To determine the specific rates of metabolite production or consumption a cumulative curve was generated by adding the difference of amount of the metabolite present in the culture between two consecutive time points. Afterwards, a polynomial regression was fitted to the curve. The specific rates were calculated as derivative of the curve divided by cell density evaluated in each time point. This method ensures small fluctuations in the results due to measurement errors. The

value of $\Delta L/\Delta G$ was defined as $-q_{Lac}/q_{Glc}$ so its value is the quotient between the two specific rates.

Metabolic Flux analysis

Metabolic flux analysis (MFA) was used to study the distribution of metabolic fluxes during the different metabolic stages observed for the cultures performed. In the analysis a total of 31 reactions and 33 species from the central carbon metabolism, including glycolysis, the TCA cycle and metabolism of amino acids, were considered as shown in Figure 1 and Table 1, and 24 specific rates were measured. For correct implementation of the model's energy and carbon requirements, a molecule named CE (carbon equivalent) was considered to be produced from glucose and galactose and consumed in the reactions of biomass and tPA synthesis. This molecule represents energy and carbon contributions from the main carbon source in these two reactions.

The biomass synthesis reaction was obtained from the average elementary composition of an animal cell proposed by Gambhir et al. where glucose, glutamine and amino acids are necessary for production of biomass [14]. The t-PA synthesis reaction was developed from the amino acid sequence of the protein. From OUR measurements carbon dioxide evolution rate (CER) was estimated assuming that the respiration quotient ($RQ = CER/OUR$) is 1, which means that for every mole of O_2 consumed 1 mole of CO_2 is released [15].

A list of all species whose specific rates were measured during culture is given in Table 3. Glucose and galactose are the main carbon source; glutamate due to its high concentration is the mayor supply of nitrogen and a secondary carbon resource. Since the culture was supplemented with glutamate, glutamine concentration was not measured as it goes directly towards cell metabolism, biomass or tPA synthesis. The aminoacids measured represent over 95% of the total pool of aminoacids supplemented in the culture media.

Estimation of intracellular fluxes was done by solving the equation system $Ax(t) = r(t)$ using Microsoft Excell. A corresponds to the stoichiometric matrix of 33x31 that represents the 31 reactions that compose the metabolic network, the vector $x(t)$ represents the 31 intracellular fluxes and $r(t)$ is a vector containing the accumulation rates of 24 of the species considered in the system. To solve the overdetermined system the least-square method was used [16; 17].

The matrix A that describes the metabolic network is non singular and well posed, with condition number of the order of 10^1 which indicates that the error propagation is very low. Furthermore, results of a sensitivity analysis over the stoichiometric matrix indicated that only the fluxes of reactions 4, 5, 6, 9 and 14 in Table 1 are more sensitive to measurement errors in the specific rates of leucine, lysine and methionine. The consumption rate of these aminoacids is very low and given accuracy of the chromatographic technique we expect that the amplification of the error to be minimum.

Results and Discussion

Cultures' performance

Four batch experiments were carried out with different concentrations of glucose or a combination of glucose and galactose as described in the Materials and Methods section. The purpose of these experiments is to study the metabolic behaviour when cells undergo a metabolic shift towards lactate consumption.

Figure 2.(a) shows a comparison of the cell densities of the four experimental conditions proposed. G20 reaches a maximum cell density of 1.3×10^6 [cells mL⁻¹] after 120 hours of culture having consumed approximately 60% of the initial glucose (Figure 2.(d)) and the death phase begins before reaching inhibitory levels of lactate and ammonia (Figures 2.(e) and 2.(g)). On the other hand, G6 maintained high viability for 75 hours until total glucose depletion. The extension was significantly less than that of G20 and achieved only half of G20's cell density. Even though the same amount of carbon was available at the beginning of G20 and combined-hexose experiments (GG2/18 and GG6/14), differences in cell growth are evident. GG2/18's extension is similar to G20's while its maximum cell density is much lower, and GG6/14 lasted for a time period significantly longer than G20 reaching a similar cell density.

G20 and G6 exhibit only one growth phase sustained by glucose, while in GG6/14 and GG2/18 two phases can be distinguished. During the first one, glucose is used as the main carbon source (Figure 2.(d)). After glucose depletion a second stage is observed characterized by consumption of galactose along with lactate (Figures 2.(d) and (e)). Cell proliferation in the different cultures and stages is characterized by their maximum cell growth rate μ_{\max} which is achieved during exponential phase in and shown in Table 2. While glucose was consumed, similarly high values of μ_{\max} were achieved despite the differences in the initial concentration of glucose and a significantly inferior rate was achieved in the galactose growth phase. The lower μ_{\max} in the second phase was expected, and can be attributed to the slower rate at which galactose was consumed compared to glucose (Figures 3.(a) and 3.(b)). As shown in a previous study due to lack of activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase linked to the gluconeogenesis pathway these cells are not able to grow on lactate [10; 18]. Due to this, only carbons that come from glycolysis are able to go through the Pentose Phosphate Pathway to provide precursors for nucleic acids synthesis. Once glucose is depleted in mixed carbon experiments, galactose is the single carbon source to maintain cell proliferation.

Comparing tPA production profiles in 2.(c) it is possible to see that product synthesis depends mainly on two culture parameters: biomass and lifespan. Comparing Figures 2.(a) and 2.(c), G20 and GG6/14 achieve the same amount of biomass and similar quantities of product. This shows that product formation is strongly related to the culture's viable cell concentration. On the other hand even though G6 and GG2/18 reach similar cell densities the latter produces more tPA due to its prolonged lifespan. G6 and GG2/18 show equal concentrations of tPA at 75 hours of culture, but G6 does not extend any further; during galactose consumption tPA production continues in GG2/18 even though biomass production has dropped. A previous study by Fusseneger et al. and Tereda et al. showed that when proliferation is inhibited cells increase their recombinant protein productivity because cellular resources that would have been directed towards biomass production are diverted towards protein synthesis [19; 20]. GG2/18's extended duration is governed by a low proliferation rate associated with galactose consumption. This low proliferation would also have an a consequence an enhanced yield in tPA production.

In each culture it is possible to observe one or two metabolic stages. We characterized the first phase by the quotient between produced lactate and glucose consumed ($\Delta L/\Delta G$) (as defined in the Material and Methods section) since there is little or no galactose consumption. The second phase, reached only after glucose depletion, is described by the ratio between produced lactate and galactose consumed ($\Delta L/\Delta Gal$). Average values in each phase of $\Delta L/\Delta G$ and $\Delta L/\Delta Gal$ obtained presented in Table 2. The values of $\Delta L/\Delta G$ obtained in all four experiments are as expected. Other authors have shown that values of 1.4 for $\Delta L/\Delta G$ can be obtained during high glucose cultures, indicating that most of the glucose consumed is directed towards lactate production [7; 14]. The $\Delta L/\Delta G$ value of G6 and GG6/14 during glucose consumption is 1.3, because both cultures have the same initial glucose concentration it was expected to observe a similar metabolic state. The higher $\Delta L/\Delta G$ achieved by GG2/18 may be explained by the lower

rate of glucose consumption. Negative values of $\Delta L/\Delta Gal$ are associated to the consumption of lactate during the second metabolic stage of GG6/14 and GG2/18; the high absolute value of these $\Delta L/\Delta Gal$ is explained by much higher consumption of lactate than galactose.

Lactate profiles are shown in Figure 2.(e). An overall analysis suggests that cultures supplemented with glucose show a constant increase in lactate concentration, while those with combined carbon source exhibit an increase in lactate concentration only when glucose is consumed. During galactose consumption, extracellular lactate drops as seen in previous works [8; 21]. Further analysis shows that a higher concentration of glucose at the beginning of the culture translates into a more elevated lactate concentration by the time glucose consumption ends. During the last hours of G20 and G6 a small amount of lactate is consumed but it is not enough to support cell growth, explaining the acute death phase.

Alanine concentration was measured over time (Figure 2.(h)). Comparing this profile to the lactate profile (Figure 2.(e)) as expected similarities arise. Like lactate, alanine is produced from pyruvate. When the carbon flux entering the glycolytic pathway and reaching the pyruvate node surpasses the metabolic capabilities of the cell for this flux towards TCA cycle, the excess is channelled either towards lactate or alanine production. Because of this, alanine concentration and specific rate profiles over time are very similar to lactate's.

Glutamate is not only the main nitrogen source and but also, apart from glucose and galactose, the most abundant carbon source present in the media. A previous study shows evidence that catabolism of glutamine, feeds the TCA cycle and acts as a source of energy even in presence of high glucose concentrations or other sugars [22]. Comparing Figures 3.(a) and 3.(b) glutamate's uptake rate decreases over time just as glucose and galactose's does. This means that there is a general reduction of carbon uptake to maintain metabolism. Deamination is one of the pathways involved in glutamate metabolism and it leads to ammonia production. Figures 2.(f), 2.(g), 3.(b) and 3.(c) suggest that about 13% of the consumed glutamate would go through this pathway.

The evidence above indicates that when glucose and galactose are supplemented in culture it is possible to observe a second metabolic stage during which lactate is consumed. The reason for this change may be explained by the fact that the rate at which galactose transporters introduce galactose into the cell is much slower than glucose transport [23]. The slow uptake of galactose is not enough to maintain cells viability and energy requirements. The use lactate as a second carbon source in the culture's media allows a sufficient amount of carbons into the cells' metabolism that prevent culture's death. When lactate is consumed a H^+ is cotransported with it [24], this should allow the pH of the media to rise after the acidification suffered from lactate transport outside the cells, therefore reducing the negative effect of pH over the culture.

Intracellular metabolites

Figure 4 shows the relationship between extracellular glucose, galactose, lactate, alanine and intracellular lactate, alanine, citrate and oxalacetate. An overall reduction of almost every intracellular metabolite is observed as the culture progresses and glucose uptake decreases. Intracellular concentrations of TCA cycle intermediates under these conditions have a less pronounced drop than in G20 and G6 experiments. Interestingly, intracellular lactate follows a similar trend to the extracellular profile. During glucose consumption, lactate accumulates within the cell as a consequence of a rapid conversion from pyruvate. When galactose is consumed intracellular lactate drops in cultures GG6/14 and GG2/18 even though extracellular lactate is being transported into the cell. The reduction in the intracellular lactate levels may be explained by its use as a source of pyruvate in order to sustain the TCA cycle.

Metabolic flux analysis

Metabolic analysis was performed for experiments G20 and GG6/14 for two different time points belonging to the exponential phase of each culture stage (data shown in Table 3). Fluxes involved in the simplified metabolic network considered in this work were calculated in $\text{mmol C}/10^9 \text{ cells/hr}$ as described in the Material and Methods section. Results are presented in Figure 5. The first two columns in dark gray correspond to two different time points during exponential phase of G20; the second two columns in light gray represent main metabolic fluxes of culture GG6/14 during the glucose consumption phase and during the galactose consumption stage respectively.

During glucose consumption in both cultures the magnitude of the Glc-Pyr flux is greater than the Pyr-AcCoA flux. The carbons that are not converted from pyruvate to acetyl CoA are channelled through the reactions that yield lactate and alanine. Due to the low uptake rate of galactose in the second metabolic phase of experiment GG6/14, there is a low flux from the hexose towards pyruvate, but a higher flux from pyruvate to acetyl CoA is observed. The inversion of the reaction Pyr-Lac allows the additional production of pyruvate to maintain energy metabolism.

During the first hours of G20 and G6/14 cultures extracellular concentration of glucose and amino acids is high, translating into high consumption rates leading to high intracellular fluxes. As the culture G20 progresses extracellular concentration of glucose and other nutrients drop and reduce their uptake rate. After metabolic shift GG6/14 exhibits a slow uptake of galactose, which leads to a metabolism with low intracellular fluxes. Fluxes from the central carbon metabolism are reduced several times from high to low metabolism, except for the Pyr-AcCoA step. The reaction catalyzed by the pyruvate dehydrogenase complex has a central role in the regulation of mammalian metabolism as it irreversibly connects glycolysis with the TCA cycle. Regulation of the carbon flux in this step is expected as it helps maintaining a steady flow towards TCA cycle despite changes in carbon uptake by the cell. This is observed in the MFA when flux towards pyruvate production is reduced over 60% but Pyr-AcCoA's decline is below 40%.

Regulation of fluxes in the TCA cycle is not only controlled by the PDH enzyme. As observed in Figure 4, during high metabolism an important fraction of the molecules in the TCA cycle are diverted from the cycle through the Malate-Pyruvate shunt. But when cells have low fluxes only a very small amount of carbons leave the TCA through the shunt. This indicates that this pathway helps regulate carbon flux in the Krebs cycle avoiding excessive flux and conserving it when the cell faces low carbon uptake.

Glutamate is an important energy source due to its conversion to α -ketoglutarate, as seen in Figure 4. Other amino acids however also feed into the TCA cycle on different steps of the pathway. Even though carbons from glycolysis are the main source for TCA cycle intermediates the contribution of amino acids is still important to sustain the cycle, representing about 10% of the total carbon input.

Low biomass production during late stages of G20 and galactose consumption in GG6/14 correlates to low flux of hexose towards biomass synthesis because carbon molecules exit the glycolytic pathway for production of the necessary macromolecules that generate biomass. It is observed that pyruvate production through glycolysis in G20 drops 2.5 times from high to low flux metabolism while the amount of glucose that is diverted towards biomass production has a 22.5 fold change (see Figure 5). GG6/14's pyruvate synthesis during galactose consumption is very low and in this scenario, the amount of hexose that goes to biomass production is almost

null. This evidence suggests that maintenance of the energy metabolism comes first over proliferation when carbon uptake is limited.

During glucose consumption most carbons consumed are not able to enter the TCA cycle due to PDH limitations and are therefore diverted towards lactate. When not enough pyruvate is produced to sustain minimum flow towards the TCA cycle lactate becomes a source for pyruvate production. When the metabolism load is low, the network focuses on maintaining TCA cycle fluxes to maintain energy needs.

Effect of intracellular pH and RedOx state on lactate production and transport

Monocarboxylate transporters (MCT) are capable of transporting lactate and pyruvate among other monocarboxylates across the cell membrane. Evidence suggests that the activity of the transporter is linked through H^+ cotransport mechanism, and transport rates depend on the substrate gradient between the cellular membrane [24; 26].

During the first stage of GG6/14 and GG2/18 there is glucose consumption, therefore an increase of intracellular lactate and pyruvate. It has been shown that that phosphorylation of sugars in the glycolytic pathway translates into a reduction of the intracellular pH [24] increasing the H^+ pool. These conditions would create a favourable condition for the outwards direction of the MCT leading to the transport of lactate outside the cell. In the second phase, after a constant reduction of the MCT substrates an inwardly directed gradient is generated. The difference between the inside and outside concentration of lactate, pyruvate and H^+ with respect to the transporter's equilibrium condition would favour lactate uptake.

A culture with 6 mM galactose and 14 mM of lactate was performed (data not shown) where no cell proliferation was observed and cell viability dropped dramatically after a few hours. In this case the external lactate concentration was significantly higher than the intracellular one, but no consumption of the monocarboxylate was observed. This confirms that media conditions alone do not determine the transport of lactate into the cell, but also specific intracellular conditions are required for the phenomenon to occur.

NAD^+ and $NADH$ pool is strongly regulated in the cell. Under physiological conditions cytosolic $NAD^+/NADH$ ratio is approximately 700 to 1. $NADH$ is provided by the oxidative reactions while supply of NAD^+ is provided through a shuttle system which oxidizes cytosolic $NADH$ transferring reducing equivalents to the mitochondria [27]. Evidence indicates that any alteration of this equilibrium may have negative effects over the cell [28], cytosolic $NADH$ depletion is observed in early apoptosis, high levels of $NADH$ contribute to oxidative damage and an increase in NAD^+ levels translates into a lower reducing potential in the cell.

Cultures GG6/14 and GG2/18 did not face sugar or amino acid depletion but began death phase nonetheless. Observing the changes of intracellular flux distribution of many reactions that yield $NADH$ in GG6/14 these changes in the $NAD^+/NADH$ equilibrium may have contributed to the end of cultures. NAD^+ and $NADH$ are also important for the regulation of pathways in the metabolism, acting as cofactors in glycolysis in the lactate/pyruvate conversion and other reactions. During high flux metabolic stages $NADH$ is being produced through glycolysis and other oxidative reactions; later this molecule is oxidized to NAD^+ through the shuttle system or the reaction catalyzed by the lactate dehydrogenase complex (LDH). Due to the slow galactose uptake, during the second metabolic stage of GG2/18 and GG6/14 cultures, the cell shows low fluxes in the central carbon metabolism pathway and, therefore has a low production of $NADH$. The inversion of the LDH enzyme provides a new source of $NADH$ to the cell, allowing it to maintain the $NAD^+/NADH$ ratio.

Conclusions

High glucose cultures usually exhibit a high production rate of lactate due to excessive glucose uptake. Once glucose depletion is achieved cells are not able to sustain proliferation with lactate only. When CHO cells are cultured with a combination of glucose and galactose it is possible to achieve extended high viability cultures. Along the extension of the culture's lifespan a metabolic shift towards lactate consumption is triggered when the second hexose is used. Galactose transporters incorporate this hexose at a very low rate and carbon uptake is supplemented by the consumption of lactate. Lactate's transport into the cell permits an alleviation of pH's negative effect over cultures, due to the cotransport of H⁺ with lactate, therefore providing a more stable extracellular environment for cell proliferation.

Intracellular metabolite analysis indicates a general reduction in the concentration of intracellular species during the culture. However, lactate does not follow this trend showing an accumulation inside the cell as glucose is consumed. This is due to an excessive synthesis which surpasses the transporters capacity. In combined carbon source experiments when galactose is consumed intracellular lactate drops. The simultaneous decrease of extracellular and intracellular lactate suggests the use of lactate for pyruvate production during galactose consumption. Finally, results indicate slower metabolism in the TCA cycle is associated with the beginning of death phase in the cultures.

Metabolic flux analysis indicates that when not enough pyruvate is produced to supply energy metabolism lactate is used for pyruvate synthesis. This is possible due to the reversibility of the LDH enzyme and lactate transporter. Studying the overall behavior of metabolism it is possible to observe that during low carbon uptake, lactate consumption is not the only way the cell compensates for the lack of carbons in the TCA cycle. Flux through the malate-pyruvate shunt drops considerably minimizing the amount of carbon diverted from the Krebs cycle, and biomass production is diminished several times. Evidence suggests that most carbon uptake during low carbon flux goes towards maintaining energy metabolism.

Lactate flux through the MCT depends on the direction of the gradients of its substrates, but lactate gradient alone does not determine lactate flux. Several conditions are involved in the MCT's flux course. In conditions of high intracellular pH, low lactate and pyruvate, MCT reverses its flux direction permitting the incorporation of lactate. A possible drop on the NADH pool also favours the use of lactate as an additional carbon source. Therefore the intracellular state of the cell is the key that defines whether lactate uptake is capable of sustaining the energy metabolism of the cell.

In conclusion, cells are capable of consuming lactate after a reduction in intracellular metabolic fluxes that lead to a decrease of intracellular pyruvate, lactate, pH and NADH. This drop allows the inversion of the gradients that determine MCT and LDH's reaction direction. The importance of lactate uptake lies on its effect on extracellular pH and as an additional carbon source to maintain cells viability by providing.

List of abbreviations

AcCoA:	Acetyl CoA
αKGT:	α-ketoglutarate
ATP:	Adenosine-5'-triphosphate
CER:	Carbon dioxide evolution rate
Fum:	Fumarate
Gal:	Galactose
Glc:	Glucose

Lac:	Lactate
LDH:	Lactate dehydrogenase
Mal:	Malate
MCT:	Monocarboxylate transporter
OUR:	Oxygen uptake rate
PDH:	Pyruvate dehydrogenase
Pyr:	Pyruvate
RQ:	Respiration quotient
SucCoA:	Succinyl-CoA
tPA:	Tissue Plasminogen Activator

Competing interests:

The authors have declared no conflict of interest.

Authors' contributions

CW performed the experiments, results analysis and interpretation and drafted the manuscript. CA designed the experiments performed result analysis and interpretation and drafted the manuscript. ZGH designed the experiments performed result analysis and interpretation and drafted the manuscript. All authors participated in the development of the methods and preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

C.W. was supported by Fondecyt Grant 1061119.

This work was funded by Grant 1070337 and Initiation Grant 11090268 from Fondecyt, Chile.

References

- [1] Cruz, H. J., C. M. Freitas, P. M. Alves, J. L. Moreira, and M. J. Carrondo (2000) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol.* 27: 43-52.
- [2] Glacken, M. W., R. J. Fleischaker, and A. J. Sinskey (1986) Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 28: 1376-1389.
- [3] Kurano, N., C. Leist, F. Messi, S. Kurano, and A. Fiechter (1990) Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *J Biotechnol.* 15: 101-111.
- [4] Zhang, F., X. Sun, X. Yi, and Y. Zhang (2006) Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology.* 51: 21-28.
- [5] Chen, K., Q. Liu, L. Xie, P. A. Sharp, and D. I. Wang (2001) Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 72: 55-61.
- [6] Europa, A. F., A. Gambhir, P. C. Fu, and W. S. Hu (2000) Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 67: 25-34.
- [7] Korke, R., L. Gatti Mde, A. L. Lau, J. W. Lim, T. K. Seow, M. C. Chung, and W. S. Hu (2004) Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *J Biotechnol.* 107: 1-17.
- [8] Altamirano, C., A. Illanes, S. Becerra, J. J. Cairo, and F. Godia (2006) Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J Biotechnol.* 125: 547-556.
- [9] Marquis, C. P., J. P. Barford, C. Harbour, and A. Fletcher (1996) Carbohydrate and amino acid metabolism during batch culture of a human lymphoblastoid cell line, BTSN6. *Cytotechnology.* 121-132.
- [10] Neermann, J., and R. Wagner (1996) Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol.* 166: 152-169.
- [11] Kuwae, S., T. Ohda, H. Tamashima, H. Miki, and K. Kobayashi (2005) Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng.* 100: 502-510.
- [12] Pascoe, D. E., D. Arnott, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller, and D. C. Andersen (2007) Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnol Bioeng.* 98: 391-410.
- [13] Lu, S., X. Sun, C. Shi, and Y. Zhang (2003) Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection. *J Chromatogr A.* 1012: 161-168.
- [14] Gambhir, A., R. Korke, J. Lee, P. C. Fu, A. Europa, and W. S. Hu (2003) Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *J Biosci Bioeng.* 95: 317-327.
- [15] Bonarius, H. P., C. D. de Gooijer, J. Tramper, and G. Schmid (1995) Determination of the respiration quotient in mammalian cell culture in bicarbonate buffered media. *Biotechnol Bioeng.* 45: 524-535.
- [16] Bonarius, H. P., V. Hatzimanikatis, K. P. Meesters, C. D. de Gooijer, G. Schmid, and J. Tramper (1996) Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol Bioeng.* 50: 299-318.

- [17] Vallino, J. J., and G. Stephanopoulos (1993) Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol Bioeng.* 41: 633-646.
- [18] Faik, P., and M. J. Morgan (1977) A method for the isolation of Chinese hamster cell variants with an altered ability to utilise carbohydrates. *Cell Biol Int Rep.* 1: 555-562.
- [19] Fussenegger, M., X. Mazur, and J. E. Bailey (1997) A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 55: 927-939.
- [20] Terada, S., E. Suzuki, H. Ueda, and F. Makishima (1996) Cytokines involving gp130 in signal transduction suppressed growth of a mouse hybridoma cell line and enhanced its antibody production. *Cytokine.* 8: 889-894.
- [21] Altamirano, C., C. Paredes, A. Illanes, J. J. Cairo, and F. Godia (2004) Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *J Biotechnol.* 110: 171-179.
- [22] Reitzer, L. J., B. M. Wice, and D. Kennell (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 254: 2669-2676.
- [23] Plagemann, P. G., R. M. Wohlhueter, J. Graff, J. Erbe, and P. Wilkie (1981) Broad specificity hexose transport system with differential mobility of loaded and empty carrier, but directional symmetry, is common property of mammalian cell lines. *J Biol Chem.* 256: 2835-2842.
- [24] Poole, R. C., and A. P. Halestrap (1993) Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* 264: C761-782.
- [25] Cheeti, S., B. K. Warriar, and C. H. Lee (2006) The role of monocarboxylate transporters in uptake of lactic acid in HeLa cells. *Int J Pharm.* 325: 48-54.
- [26] Dubinsky, W. P., and E. Racker (1978) The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. *J Membr Biol.* 44: 25-36.
- [27] Dawson, A. G. (1979) Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells *Trends in Biochemical Sciences.* 4: 171-176.
- [28] Ying, W. (2006) NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci.* 11: 3129-3148.

Figures

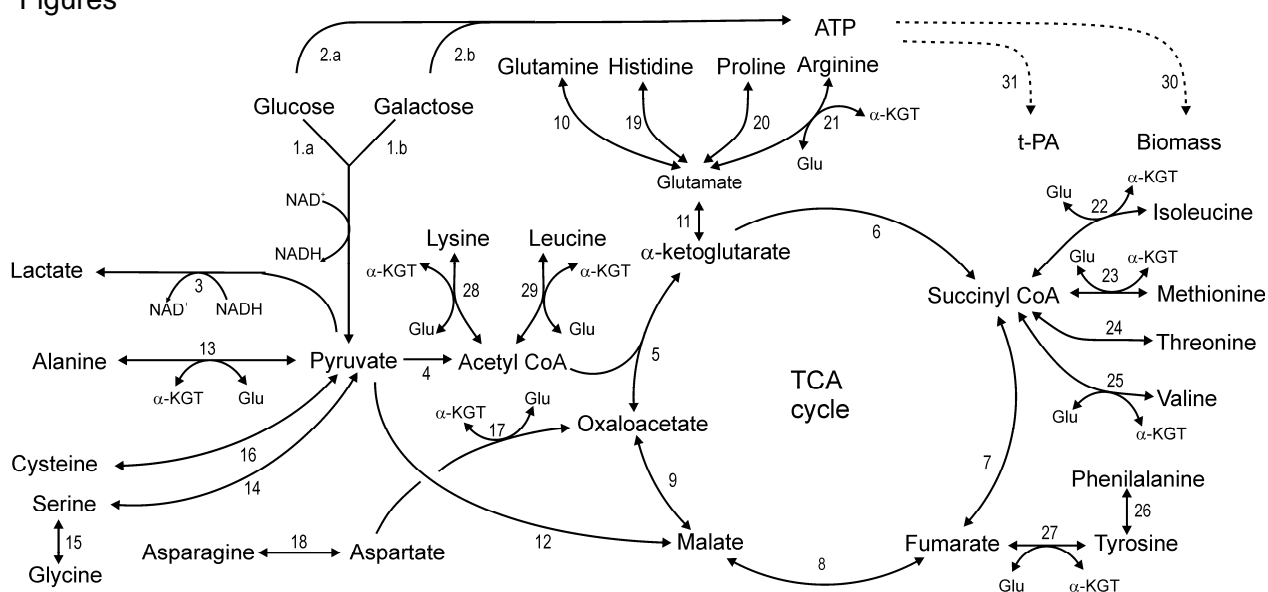


Figure 1 - Metabolic network.

The figure illustrates the metabolic network considered for the MFA.

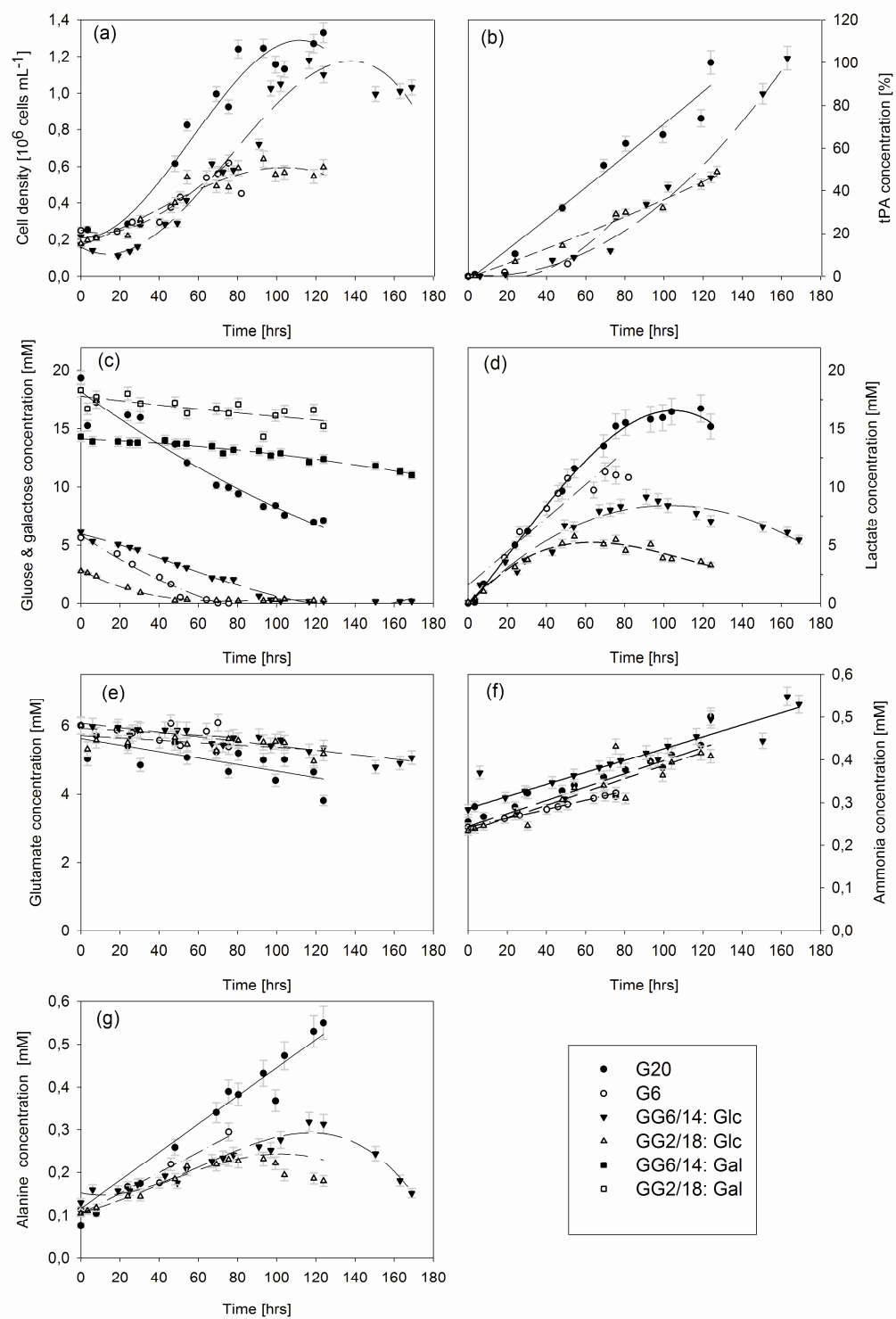


Figure 2 - Batch cultures of CHO cells, using glutamate and different sugar concentrations G20 (●), G6 (○), GG6/14 (▼) and GG2/18 (△). (a) Viable cells concentration; (b) t-PA concentration; (c) glucose and galactose concentration; (d) lactate concentration; (e) glutamate concentration; (f) ammonia concentration; (g) alanine concentration. See Material and Methods for cultures conditions.

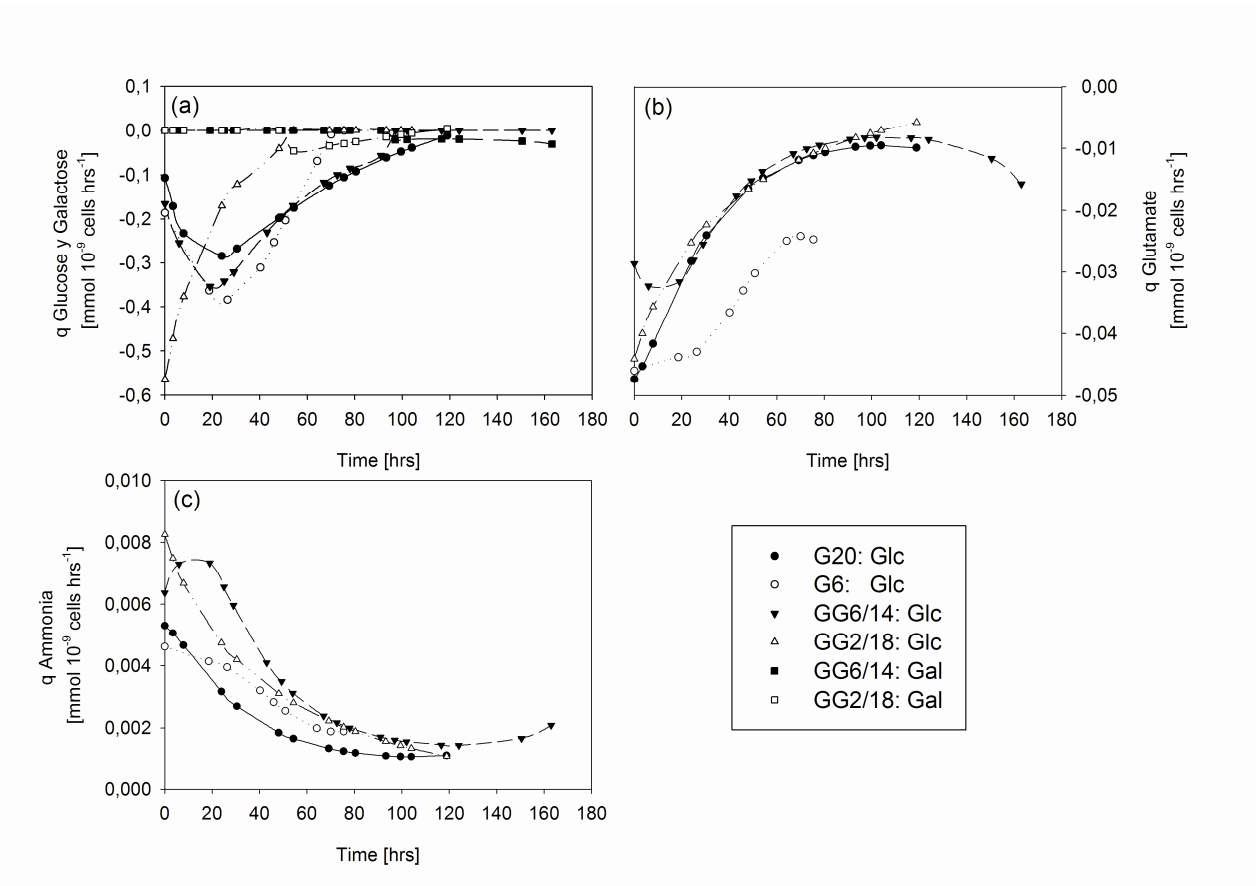


Figure 3 - Specific rates that characterize the different batch cultures of CHO cells (a) glucose and galactose; (b) glutamate; (c) ammonium.

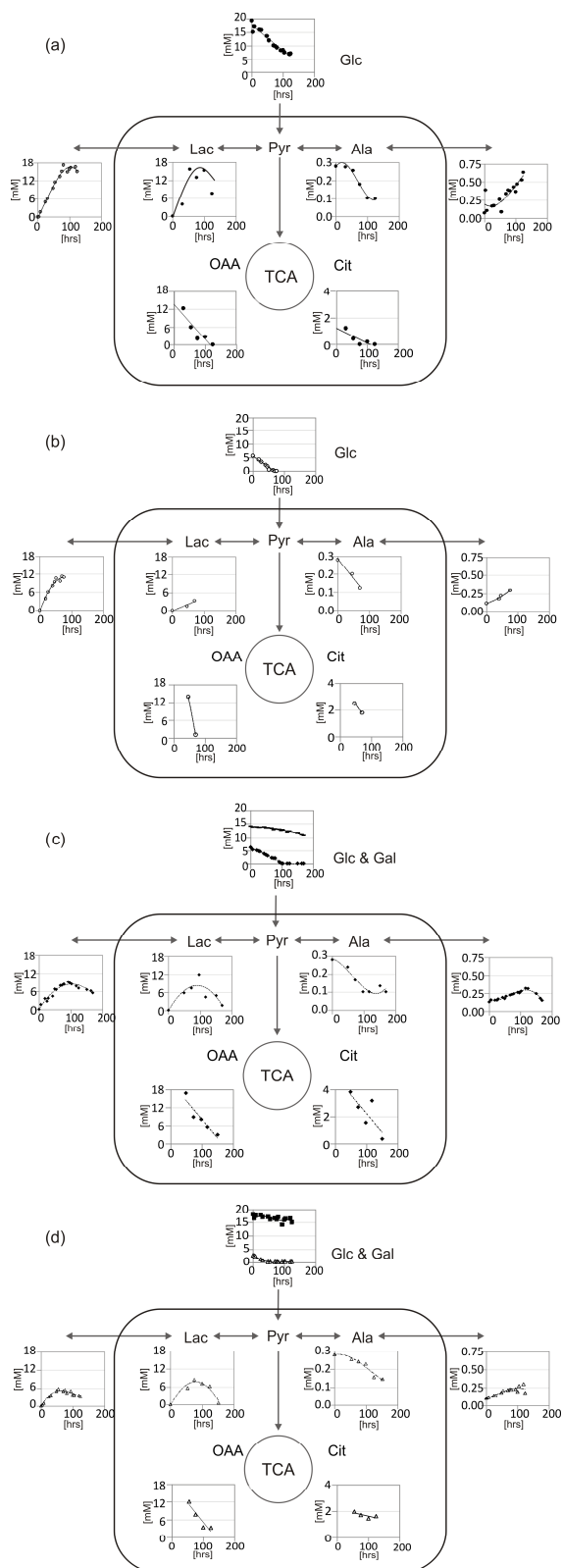


Figure 4 - Intracellular metabolites concentration versus time (a) G20, (b) G6, (c) GG6/14, (d) GG2/18.

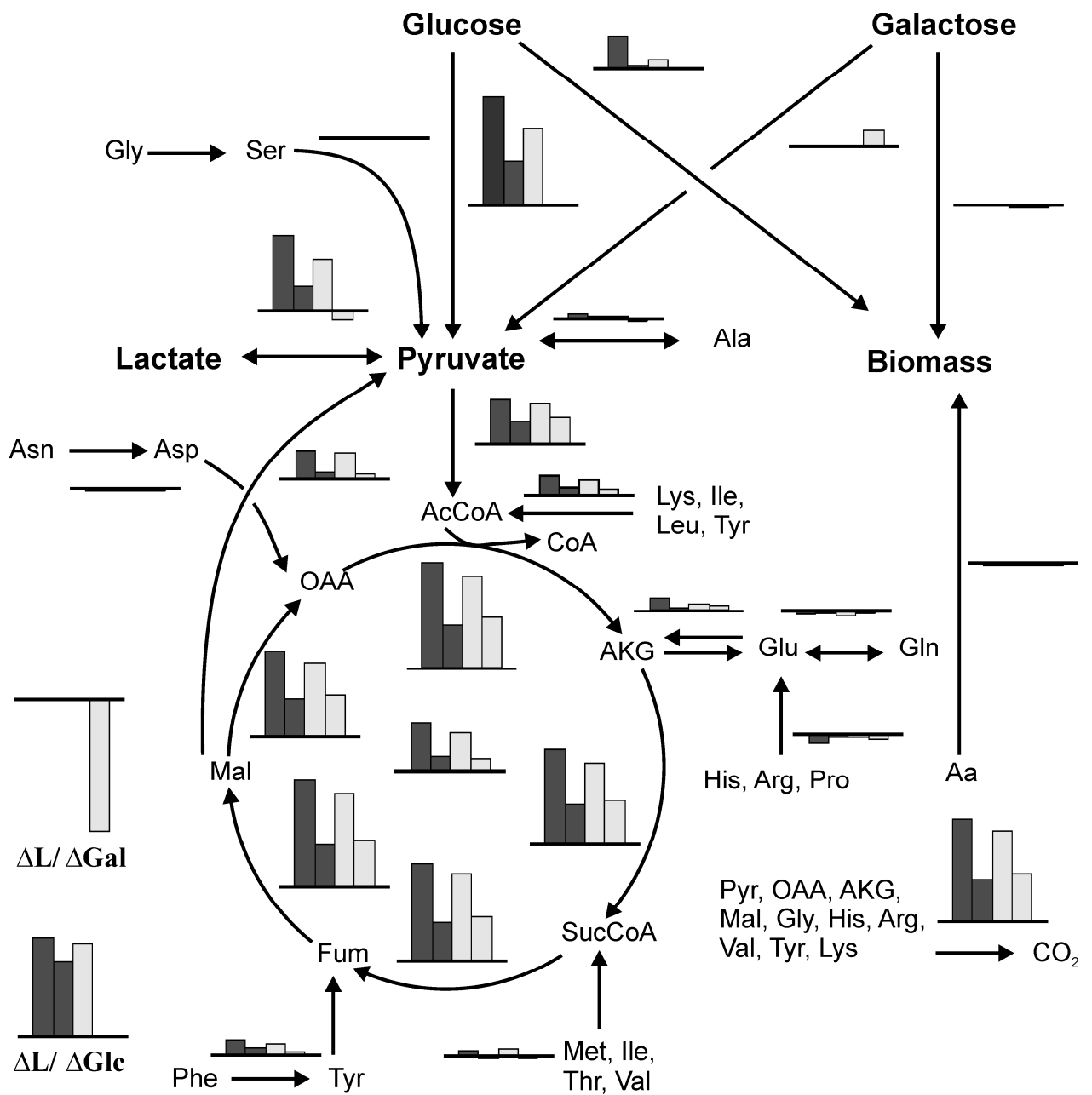


Figure 5 - Comparison of metabolic flux distribution between G20 and GG6/14

■: G20. The two columns represent flux at 51 and 80 hours of culture, during exponential phase.
 ▒: GG6/14. The first column represents metabolic fluxes at 51 hours with glucose consumption, the second column represents the culture at 124 hours during galactose. Fluxes' units are carbon mmol/10⁹ cells/hr, the scale is the same in all graphs.

Tables

Table 1 - Biochemical network for carbon central metabolism in CHO cells

N°	Reaction
1.a	Glc → 2Pyr
1.b	Gal → 2Pyr
2.a	Glc → 1CE
2.b	Gal → 1CE
3	Pyr → Lac
4	Pyr → AcCoA+CO ₂
5	AcCoA + OAA → αKGT + CO ₂
6	αKGT → SucCoA + CO ₂
7	SucCoA → Fum
8	Fum → Mal
9	Mal → OAA
10	Gln → Glu + NH ₃
11	Glu → αKGT + NH ₃
12	Mal → Pyr + CO ₂
13	Pyr + Glu → αKGT + Ala
14	Ser → Pyr + NH ₃
15	2Gly → Ser + NH ₃ + CO ₂
16	Cys → Pyr + NH ₃
17	Asp + αKGT → Glu + OAA
18	Asn → Asp + NH ₃
19	His → Glu + NH ₃ + CO ₂
20	Pro → Glu
21	Arg + αKGT → 2Glu + NH ₃ + CO ₂
22	Ile + αKGT → Glu + SucCoA + AcCoA
23	Met + Ser + αKGT → Glu + Cys + SucCoA
24	Thr → SucCoA + NH ₃
25	Val+ αKGT → Glu + SucCoA + CO ₂
26	Phe→Tyr
27	Tyr + αKGT → Glu + Fum + 2AcCoA + CO ₂
28	Lys + 2αKGT → 2Glu + 2AcCoA + CO ₂
29	Leu + αKGT → Glu + 3AcCoA
30	0.038 Gln + 0.013 Ala + 0.007 Arg + 0.026 Asp + 0.001 Cys + 0.001 Glu + 0.017 Gly + 0.003 His + 0.008 Ile + 0.013 Leu + 0.010 Lys + 0.003 Met + 0.006 Phe + 0.008 Pro + 0.009 Ser + 0.008 Thr + 0.004 Tyr + 0.009 Val + 0.0213 CE → Biomass
31	0.010 Gln + 0.013 Ala + 0.015 Arg + 0.009 Asp + 0.011 CYS + 0.010 Glu + 0.017 Gly + 0.006 His + 0.007 Ile + 0.015 Leu + 0.147 Arg + 0.008 Lys + 0.002 Met + 0.006 Phe + 0.011 Pro + 0.019 Ser + 0.009 Thr + 0.009 Tyr + 0.009 Val + 0.0055 CE → t-PA

Table 2 - Parameters for cell growth and $\Delta L/\Delta G$.

Experiment	μ_{\max} [10^{-2} hrs $^{-1}$]		$\Delta L/\Delta H^a$	
	Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
G20	2.60	-	1.5	-
G6	1.93	-	1.3	-
GG6/14	2.44	0.74	1.3	-2.5
GG2/18	2.58	0.59	1.8	-2.5

^a H stands for hexose, depending on the culture's phase it can be either glucose and/or galactose.

Table 3 – Specific rates used in metabolic flux analysis (mmol/ 10^9 cell/hr).

Measured species	G20		GG6/14	
	51	80	51	124
tPA	1.39×10^{-4}	7.90×10^{-5}	1.09×10^{-4}	1.14×10^{-4}
Biomass	1.74×10^{-1}	7.86×10^{-2}	2.40×10^{-1}	4.39×10^{-2}
Glc/Gal	-2.00×10^{-1}	-8.19×10^{-2}	-1.40×10^{-1}	-1.93×10^{-2}
Lac	3.16×10^{-1}	9.40×10^{-2}	2.16×10^{-1}	-4.15×10^{-2}
CO ₂	7.75×10^{-1}	3.17×10^{-1}	6.80×10^{-1}	3.55×10^{-1}
NH ₃	1.86×10^{-3}	1.06×10^{-3}	4.00×10^{-3}	8.81×10^{-4}
Ala	5.73×10^{-3}	3.27×10^{-3}	2.68×10^{-3}	-2.56×10^{-3}
Arg	-8.41×10^{-4}	-4.80×10^{-4}	-5.79×10^{-3}	1.29×10^{-3}
Asn	6.65×10^{-4}	3.79×10^{-4}	7.79×10^{-4}	-7.81×10^{-5}
Asp	-1.33×10^{-3}	-7.59×10^{-4}	-4.30×10^{-3}	9.18×10^{-4}
Cys	-1.97×10^{-4}	-1.12×10^{-4}	-1.07×10^{-3}	-2.77×10^{-5}
Glu	-3.39×10^{-2}	-1.19×10^{-2}	-2.24×10^{-2}	-1.02×10^{-2}
Gly	-4.82×10^{-3}	-2.74×10^{-3}	-9.90×10^{-3}	-1.14×10^{-3}
His	5.77×10^{-3}	3.29×10^{-3}	5.77×10^{-3}	2.43×10^{-3}
Ile	-1.83×10^{-4}	-1.04×10^{-4}	-1.61×10^{-3}	-9.69×10^{-6}
Leu	-2.01×10^{-3}	-4.30×10^{-4}	-3.71×10^{-3}	-1.64×10^{-3}
Lys	-3.65×10^{-3}	-8.14×10^{-4}	-5.25×10^{-3}	-1.72×10^{-3}
Met	-1.05×10^{-3}	-2.27×10^{-4}	-8.00×10^{-4}	-3.49×10^{-4}
Phe	-1.25×10^{-2}	-1.19×10^{-2}	-9.15×10^{-5}	-1.92×10^{-4}
Pro	4.32×10^{-4}	2.46×10^{-4}	-4.81×10^{-3}	2.06×10^{-3}
Ser	6.65×10^{-4}	3.79×10^{-4}	7.79×10^{-4}	-7.81×10^{-5}
Thr	-1.38×10^{-4}	-3.99×10^{-5}	-1.08×10^{-3}	-2.41×10^{-4}
Tyr	-2.31×10^{-4}	-8.39×10^{-5}	-1.07×10^{-3}	-2.77×10^{-5}