



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

**IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CÉLULAS
HEPÁTICAS COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDIOS
METABÓLICOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA E INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

CAMILO ANDRÉS ACUÑA LEPPE

**PROFESOR GUÍA:
Dra. ZIOMARA GERDTZEN HAKIM**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
Dra. MARÍA ELENA LIENQUEO
Dr. ARNALDO GATICA BELLO**

**ESTE TRABAJO HA SIDO PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL PROYECTO
FONDECYT INICIACIÓN 11090268**

**SANTIAGO DE CHILE
MARZO, 2013**

RESUMEN

Debido a que el hígado posee funciones únicas, es de gran interés desarrollar herramientas que permitan conseguir un mejor entendimiento global del comportamiento de las células hepáticas bajo cambios de las condiciones de crecimiento causado por agentes externos, tales como cambios en la suplementación de la fuente de carbono o la utilización de drogas en el medio de cultivo. El objetivo de esta memoria es establecer una metodología que permita realizar estudios metabólicos en células de origen hepático, con herramientas *in silico* que complementen los trabajos de investigaciones *in vitro*. Para ello, se utilizará la línea celular HepG2, ya que presenta ventajas frente a otras células de origen hepático, como su alta capacidad proliferativa y su fenotipo estable. Junto a esto se diseñó un modelo hepático para describir el metabolismo intracelular, que considera 37 metabolitos y 32 reacciones, abarcando las principales vías metabólicas de una célula hepática.

En un primer estudio experimental se analizó como afecta en el metabolismo de las células la aplicación de agente nocivo acetaminofén (APAP), y si el daño es contrarrestable utilizando N-acetilcisteína (NAC) como agente protector. Como resultado se obtuvo que la concentración utilizada de APAP en el medio (1 [mM]) es altamente tóxica ya que frena de inmediato el crecimiento celular, entrando a una fase de muerte celular. Del análisis de flujo metabólico aplicado a este caso se obtuvo que existe una alta tasa específica de producción de lactato, y por ende, los flujos son redireccionados para que aumenten los niveles de piruvato intracelular a partir de diversa fuentes de carbono además de la glucosa (triptófano y triglicéridos), y sea utilizado en la síntesis de lactato. Con respecto a la protección, sólo fue posible obtener una curva de crecimiento comparable al control cuando se utilizó NAC (5 [mM]) 3 horas después que se administrara APAP. La aplicación previa tuvo el mismo resultado que el caso en que sólo se utiliza APAP. El análisis de flujo metabólico del único caso en que hubo una protección efectiva está sujeto a errores de cálculos de tasas específicas, al igual que el caso control. Grandes desbalances de carbono y nitrógeno, junto con una distribución de flujos internos con comportamientos no esperados, no permiten comparar los resultados entre los casos. Sin embargo, este hecho refleja lo importante que es tener mediciones precisas y un buen diseño experimental para calcular las tasas específicas de consumo/producción, para así obtener un correcto funcionamiento del modelo hepático planteado.

En el segundo estudio, se analizaron los cambios metabólicos que se generan al utilizar diferentes suplementaciones del carbohidrato en el medio. Los casos fueron una suplementación pura de glucosa, una pura de fructosa y una mezcla de ellas (en una razón 1:1). Al realizar las curvas de crecimiento, se obtuvieron parámetros de crecimiento similares, siendo el caso de fructosa pura en donde las células crecen a menor velocidad, dado que están acostumbradas a crecer en un medio con glucosa. Este hecho se ratifica al realizar el análisis de flujo metabólico, donde el caso de mayor consumo de hexosa, producción de lactato y síntesis de triglicéridos fue el caso en que se suplementó exclusivamente con glucosa. En los casos en que existía fructosa en el medio, las células presentaron una tasa menor de consumo de azúcar, y por consiguiente una menor producción de triglicéridos. Además en estos dos casos, los flujos hacia síntesis de lactato y síntesis de triglicéridos son más bajo, pero con un flujo permanente en el ciclo TCA cercano al doble que el caso de suplementación con glucosa pura.

El modelo hepático fue capaz de representar el metabolismo de la línea celular HepG2 en ambos estudios. Sin embargo, debido a los resultados del primero, es necesario realizar más ensayos de toxicidad de sustancias, para validar el modelo y la metodología empleada en este trabajo, con el fin de caracterizar y mejorar funciones hepáticas en sistemas de cultivo *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar, quiero agradecer a mis padres, Gimena y Guillermo, y a mis hermanos, Ignacio y Felipe. No me canso de decir que ustedes son los pilares importantes en mi vida. Orgulloso de pertenecer a esta familia que hemos formado. Muchas gracias por el apoyo y las palabras de aliento que me han brindado, juntos con mis tías, tíos y primos.

Agradezco a la profesora Ziomara por la oportunidad de trabajar con ella. Una excelente profesora guía. Gracias a sus consejos es que hoy me considero un mejor profesional. De la misma forma, no puedo dejar de mencionar a toda la gente que me enseñó y ayudó durante estos dos años en mi memoria: a las chicas del grupo de trabajo, Camila, Natalia y Alessandra; a las encargadas de laboratorio, Nancy y Débora; y a los integrantes de la comisión, profesora María Elena y el profesor Arnaldo.

A los compañeros de viaje de estos siete años. Como varios dicen, uno no viene solo a estudiar, y fueron innumerables los buenos momentos desde los primeros días en la B112, hasta los últimos años con la gente del departamento y del laboratorio. Muchas gracias por hacerme parte de los grupos. Obviamente no los nombraré a todos, pero espero que sepan que si alguna vez conversamos más de 30 minutos, es porque siento un gran cariño por ustedes, y valoro cada palabra dichas en aquellos diálogos.

Por último, a Dios, por permitirme vivir esta experiencia de siete años, aprendiendo grandes lecciones en lo profesional y personal, junto a personas de todo tipo de personalidad y que enriquecieron mi pasar por esta facultad.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción y Antecedentes Generales	1
1.1	Introducción	1
1.2	Antecedentes Generales	2
1.2.1	El hígado: Estructura y Funciones.....	2
1.2.2	Hígado como modelo <i>in vitro</i>	3
1.2.3	Primer caso de Estudio: Acetaminofén	3
1.2.3.1	Mecanismo de Eliminación del APAP	4
1.2.3.2	Mecanismo Hepatotóxico del APAP.....	4
1.2.3.3	N-acetilcisteína como Agente Protector	5
1.2.4	Segundo Caso de Estudio: Fructosa	6
1.2.4.1	Metabolismo de Fructosa	6
1.2.4.2	Efectos del aumento del consumo de Fructosa.....	7
1.3	HepG2 como modelo <i>in vitro</i>	9
1.3.1	HepG2 en estudios toxicológicos con APAP.....	10
1.3.2	HepG2 en estudios metabólicos con Fructosa.....	11
1.4	Análisis de Flujo Metabólico	11
1.4.1	Alcances Teóricos	11
1.4.2	MFA en modelos hepáticos.....	13
1.5	Objetivos	14
1.5.1	Objetivo General	14
1.5.2	Objetivos Específicos	14
2	Materiales y Métodos.....	15
2.1	Metodología General.....	15
2.2	Materiales	16
2.3	Caracterización del Crecimiento Celular	17
2.4	Estudio I: Toxicidad del APAP y Protección con NAC.....	19
2.4.1	Hipótesis.....	19
2.4.2	Diseño Experimental	19
2.5	Estudio II: Diferencias en el Crecimiento Celular en Glucosa y Fructosa	20
2.5.1	Hipótesis.....	20
2.5.2	Diseño Experimental	20
3	Resultados y Discusiones	21
3.1	Crecimiento Celular Caso Control	21
3.2	Modelo Hepático Propuesto	22
3.2.1	Presentación del Modelo	22
3.2.2	Ecuación de Formación de Biomasa	24
3.2.3	Supuestos del Modelo Planteado.....	26

3.2.4	Análisis de Matriz Estequiométrica	26
3.2.5	Parámetros Estimados	29
3.3	Estudio I: Toxicidad del APAP y Protección con NAC.....	31
3.3.1	Análisis del Crecimiento I.....	31
3.3.2	Análisis Metabólico I.	34
3.3.2.1	Caso 1.1: 0 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (0A/0N).....	35
3.3.2.2	Caso 1.2: 1 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (1A/0N).....	36
3.3.2.3	Caso 1.3: 1 [mM] de Acetaminofén y 5 [mM] de N-acetilcisteína (1A/5N).....	37
3.3.3	Análisis de Flujos Metabólicos I.....	39
3.3.3.1	Caso 1.1: 0 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (0A/0N).....	42
3.3.3.2	Caso 1.2: 1 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (1A/0N).....	45
3.3.3.3	Caso 1.3: 1 [mM] de Acetaminofén y 5 [mM] de N-acetilcisteína (1A/5N).....	49
3.3.4	Discusiones Generales del Estudio I	51
3.4	Estudio II: Diferencias en el Crecimiento Celular en Glucosa y Fructosa	54
3.4.1	Análisis del Crecimiento II.....	54
3.4.2	Análisis Metabólico II.....	55
3.4.2.1	Caso 2.1: Glucosa 10 [mM] (G10)	56
3.4.2.2	Caso 2.2: Glucosa 5 [mM] y Fructosa 5 [mM] (G5F5).....	57
3.4.2.3	Caso 2.3: Fructosa 10 [mM] (F10)	58
3.4.3	Análisis de Flujos Metabólico II	60
3.4.3.1	Caso 2.1: Glucosa 10 [mM] (G10).....	63
3.4.3.2	Caso 2.2: Glucosa 5 [mM] y Fructosa 5 [mM] (G5F5).....	66
3.4.3.3	Caso 2.3: Fructosa 10 [mM] (F10).....	69
3.4.4	Discusiones Generales del Estudio II.....	71
4	Conclusiones	74
5	Bibliografía	77
Anexos	82
Anexo A:	Cultivo de Células Animales.....	82
Anexo B:	Modelos Hepáticos	85
Anexo C:	Medios de Cultivo	87
Anexo D:	Protocolos.....	89
Anexo E:	Resultados Preliminares.....	100
Anexo F:	Nomenclatura	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición másica porcentual de endulzantes.....	6
Tabla 2: Técnicas para medir tasas de consumo/producción para MFA.....	18
Tabla 3: Resumen de parámetros de crecimiento de caso control.....	22
Tabla 4: Reacciones del modelo hepático propuesto.	22
Tabla 5: Metabolitos del modelo hepático propuesto.	23
Tabla 6: Reacciones y masa molar de macromoléculas en HepG2.....	25
Tabla 7: Composición másica , molar y aportes de C, H, O y N en HepG2.	25
Tabla 8: Matriz pseudo inversa	28
Tabla 9: Resumen de parámetros de crecimiento del estudio I.	32
Tabla 10: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio	35
Tabla 11: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos.	36
Tabla 12: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio	37
Tabla 13: Caso 1.2. Tasas específicas de aminoácidos de intercambio	37
Tabla 14: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio	38
Tabla 15: Caso 1.3. Tasas específicas de aminoácidos de intercambio	38
Tabla 16: Resumen de parámetros de crecimiento en el Análisis Metabólico I.....	39
Tabla 17: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente.....	42
Tabla 18: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	44
Tabla 19: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	44
Tabla 20: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	45
Tabla 21: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente.....	46
Tabla 22: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	47
Tabla 23: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	48
Tabla 24: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	48
Tabla 25: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente.....	49
Tabla 26: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	50
Tabla 27: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	51
Tabla 28: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	51
Tabla 29: Resumen de balances de carbono y nitrógeno en Estudio I.	52
Tabla 30: Resumen de parámetros de crecimiento del Estudio II.	55
Tabla 31: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio	57

Tabla 32: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos	57
Tabla 33: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio	58
Tabla 34: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos	58
Tabla 35: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio	59
Tabla 36: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos	59
Tabla 37: Resumen de parámetros de crecimiento en el Análisis Metabólico II.	60
Tabla 38: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente	63
Tabla 39: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	64
Tabla 40: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	65
Tabla 41: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	65
Tabla 42 : Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente	66
Tabla 43: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	67
Tabla 44: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	68
Tabla 45: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	68
Tabla 46: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente.	69
Tabla 47: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas.....	70
Tabla 48: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos.....	71
Tabla 49: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares.....	71
Tabla 50: Resumen de balances de carbono y nitrógeno en Estudio II.....	72
Tabla 51: Áreas de aplicación de cultivos celulares.....	82
Tabla 52: Comparación de medios de cultivo.	88
Tabla 53: Composición de <i>buffers</i> de la fase móvil para HPLC.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de eliminación del Acetaminofén.....	4
Figura 2: Estructura y metabolismo de GSH.....	5
Figura 3: Estructura de glucosa, fructosa y sacarosa.....	6
Figura 4: Metabolismo de fructosa.....	7
Figura 5: Imágenes de cultivo de HepG2, a baja y alta densidad.....	9
Figura 6: Comparación expresión de enzimas fase 1 y 2, entre cultivo primario y HepG2.....	10
Figura 7: Diagrama de bloques del trabajo de título.	15
Figura 8: Curva de crecimiento estándar.....	17
Figura 9: Diseño experimental del Estudio I.....	19
Figura 10: Diseño experimental del Estudio II.	20
Figura 11: Cinética de crecimiento basal.	21
Figura 12: Red metabólica para MFA.....	24
Figura 13: Flujos internos con mayor sensibilidad.	27
Figura 14: Estimación para tasa de GSH.....	29
Figura 15: Estimación para tasa de úrea.....	30
Figura 16: Planificación de ensayo de efecto mixto de APAP y NAC.	31
Figura 17: Ensayo de efecto mixto de APAP (A) y NAC (N)..	31
Figura 18: Nomograma de Rumack-Matthew.....	32
Figura 19: Análisis Metabólico de Estudio 1.....	34
Figura 20: Distribución de flujos internos de carbono del Estudio I.....	40
Figura 21: Distribución de flujos internos de nitrógeno del Estudio I.....	41
Figura 23: Caso 1.1. Balance de masa de glutamato.....	43
Figura 22: Caso 1.1. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	43
Figura 24: Caso 1.2. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	46
Figura 25: Caso 1.2. Balance de masa de glutamato.....	47
Figura 26: Caso 1.3. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	49
Figura 27: Caso 1.3. Balance de masa de glutamato.....	50
Figura 28: Cinética de Crecimiento del Estudio II.....	54
Figura 29: Análisis Metabólico del Estudio II.	56
Figura 30: Distribución de flujos internos de carbono del Estudio II.	61
Figura 31: Distribución de flujos internos de nitrógeno del Estudio II.....	62

Figura 32: Caso 2.1. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	63
Figura 33: Caso 2.1. Balance de masa de glutamato.	64
Figura 34: Caso 2.2. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	66
Figura 35: Caso 2.2. Balance de masa de glutamato.	67
Figura 36: Caso 2.3. Balance de masa de piruvato y acetil CoA.	69
Figura 37: Caso 2.3. Balance de masa de glutamato.	70
Figura 38: Botón <i>Mobile Phase Setup</i>	95
Figura 39: Ventana <i>Autopurge</i>	96
Figura 40: Botón <i>Autopurge</i>	96
Figura 41: Cambio de bomba A a bomba B.	97
Figura 42: Ilustración de la llave del equipo abierta y cerrada.	97
Figura 43: Botón <i>Shutdown</i>	98
Figura 44: Diseño Experimental de ensayos de efectos de APAP y NAC.	100
Figura 45: Planificación de ensayos de efectos de APAP y NAC.	100
Figura 46: 1 ^{er} ensayo de efecto mixto.	101
Figura 47: 2 ^{do} ensayo de efecto mixto.	102

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Introducción

Los sistemas de cultivos celulares han generado un gran impacto en la comunidad científica, debido a las diversas líneas de investigación que complementan el desarrollo de áreas como ingeniería metabólica, genómica, etc. A pesar de las estrictas condiciones de trabajo, es posible establecer un ambiente adecuado que permite el crecimiento celular, a través de los medios suplementados con nutrientes y del control de las condiciones ambientales (ver Anexo A: Cultivo de Células Animales, para un mejor entendimiento del trabajo con células animales).

El hígado es uno de los órganos de mayor interés, funcionalmente hablando, debido a los estudios metabólicos y toxicológicos que es posible realizar con sistemas celulares hepáticos. El principal objetivo del presente trabajo es el análisis del comportamiento de la línea HepG2 frente a perturbaciones externas, utilizando una herramienta *in silico* que permite describir su metabolismo interno, con el fin de establecer una metodología de estudios metabólicos a nivel de laboratorio utilizando estas células. La ventaja de esta línea celular radica en su disponibilidad, su ilimitada vida útil, su fenotipo estable y manejo sencillo en el laboratorio, comparado con otros sistemas de cultivos hepáticos (ver Anexo B: Modelos Hepáticos).

Se realizarán dos diseños experimentales, que representan mecanismos extracelulares de perturbación que afectan las condiciones de crecimiento normal de las células y la biosíntesis de metabolitos extracelulares: El primer estudio consiste en el uso de este modelo hepático para estudiar la acción de Acetaminofén (conocido como Paracetamol) sobre el metabolismo celular. Se han reportado desde ya varias décadas grandes intoxicaciones debido a altas dosis ingeridas, por lo que su acción patológica ha sido estudiada ampliamente, con fin de contrarrestar los efectos nocivos (Heard, 2008; Bin Nor Aripin et al., 2009; Schilling et al., 2010). El fundamento radica en que estos modelos permiten un mejor entendimiento de la cinética y dinámica de nuevas drogas, convirtiéndose en una herramienta factible a la hora de evaluar la toxicidad de estas nuevas sustancias.

El segundo estudio corresponde al análisis del efecto sobre el metabolismo de las células HepG2 bajo una suplementación de fructosa como fuente de carbono, basado en la inquietud reciente por el alto consumo de este carbohidrato como endulzante. Se ha estipulado que el uso de fructosa por parte de las células conlleva al desarrollo de daños hepáticos, llegando a producir altos niveles de resistencia a la insulina y de dislipidemia (alteración del metabolismo de lípidos), entre otras alteraciones. El interés en los modelos hepáticos *in vitro* radica en el desarrollo de nuevos métodos de *screening* que permitan identificar estas irregularidades del metabolismo celular, y evitar la extensión de estos síntomas que podrían terminar en enfermedades como obesidad, diabetes, hígado graso, etc (Gaby, 2005).

Realizando una rigurosa revisión bibliográfica se busca en primer lugar entender las consecuencias nocivas que producen por un lado la intoxicación con acetaminofén, y por el otro, la alimentación en base a fructosa. Además, en base a esta búsqueda bibliográfica se diseñará un modelo que describe el metabolismo interno de las células HepG2. El desarrollo del trabajo experimental contemplado, junto con la aplicación del modelo planteado, se evaluará el potencial uso del modelo hepático planteado para estudios *in vitro*, identificando las diferencias metabólicas que se originan en las células HepG2.

1.2 Antecedentes Generales

1.2.1 El hígado: Estructura y Funciones.

El hígado es la glándula de mayor tamaño del organismo, pesando en un adulto alrededor de 1,5 [Kg]. Representa entre el 2 y 3 % de la masa corporal, de color rojizo oscuro, y se sitúa en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma, protegido por la caja torácica. El hígado posee una doble circulación aferente. La primera es la arteria hepática que contiene el torrente sanguíneo oxigenado, mientras que la segunda corresponde a la vena porta, y cuyo flujo corresponde a los nutrientes asimilados en la digestión. Junto con los conductos biliares, esta triplete de conductos forma la triada porta. La sangre aferente se distribuye a través de los hepatocitos a través de capilares, para finalmente ser drenados a la vena hepática o central. En general, posee dos grupos de células: las parenquimales y las no parenquimales. El primer grupo es comúnmente conocido como hepatocitos, y corresponden al 60% de total de las células hepáticas, ocupando un 80% del volumen de este órgano. Dado que son la unidad funcional del hígado, están a cargo de las principales operaciones de síntesis, metabolismo y desintoxicación del organismo. El segundo grupo, las células no parenquimales corresponden al 35% de las células del hígado, pero sólo ocupan un 6% de su volumen. Corresponde a 4 tipos de células: i) Células epiteliales biliares, las cuáles se encuentran formando la red que forma el tracto biliar; ii) Células estelares, conocidos como lipocitos, y son células de cuerpos lipídicos (retinil ésteres, colesterol, fosfolípidos y triglicéridos); iii) Células de Kupffer, macrófagos que forman parte del sistema inmune, con un alto contenido lisosomal y actividad enzimática; iv) Células endoteliales sinusoidales, que corresponden al endotelio del hígado e interactúan con su medio externo (Monga, 2011).

Sus funciones pueden ser sintetizadas en tres principalmente:

Secretora

El hígado es el encargado de producir la bilis, mezcla de pigmentos y sales biliares. La función de esta mezcla está relacionada con el sistema digestivo, dado que emulsiona los ácidos grasos para su posterior degradación y absorción. Por otra parte, el hígado produce además heparina, la cual ayuda a prevenir la coagulación de la sangre en su transcurso por el cuerpo.

Metabólica

El hígado es el principal responsable de la utilización de los compuestos orgánicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) desde su degradación, almacenamiento y la posterior síntesis de nuevos compuestos, con el fin de mantener la homeostasis en el organismo. Dentro de los procesos implicados en el metabolismo de proteínas, se encuentran la síntesis de la mayor parte de las proteínas plasmáticas (albúmina, globulina y fibrinógeno), la formación de urea a partir de amoníaco, la desaminación de aminoácidos, la síntesis de factores de coagulación y el metabolismo de hormonas polipeptídicas. Por otro lado, el metabolismo de lípidos incluye procesos de formación de ácido grasos y lipoproteínas, síntesis de colesterol, y su posterior conversión en sales biliares, la biotransformación de proteínas e hidratos de carbono en grasas, y el metabolismo y excreción de hormonas esteroideas. Finalmente, con respecto al metabolismo de los carbohidratos, el hígado es el encargado de mantener estables los niveles de glucosa en la sangre, mediante la transformación de este en metabolitos, o a través de su almacenaje en forma de glicógeno.

Protectora

Dentro de las funciones hepáticas, la biotransformación de fármacos y toxinas es una de las más importantes. Tradicionalmente, esta acción es dividida en dos fases. La primera, Fase I, consiste principalmente en reacciones enzimáticas de la familia de citocromos P450 (CYP, forma abreviada), flavinas que contienen monooxigenasas y dehidrogenasas, las cuales realizan principalmente reacciones de hidrólisis, oxidación y reducción. La fase II consiste en reacciones de conjugación, catalizadas por transferasas, e incluyen gluconidación, sulfatación, metilación, acetilación y conjugación con glutatión y aminoácidos. Sin embargo, el hígado tiene una capacidad limitada para estas reacciones, por lo que está expuesto al daño que producen ciertos metabolitos secundarios. Estas reacciones tienen como objetivo la formación de metabolitos solubles capaces de ser eliminados por excreción renal o biliar (Monga, 2011).

1.2.2 Hígado como modelo *in vitro*

El principal uso de cultivos celulares hepáticos ha sido en el área de la toxicología, en el estudio del metabolismo y los efectos que podrían tener ciertas drogas, considerando que más de mil ejemplares de estos tipos de compuestos son potencialmente hepatotóxicos (Guillouzo, 1998). Es así como el estudio de la biotransformación de drogas, los modelos hepáticos cobran cada vez más importancia a la hora de realizar la validación de nuevas drogas.

El daño en el hígado se produce debido a la formación de metabolitos (quinonas, quinona iminas, epóxidos, etc.) por parte de la acción enzimática CYP, los cuales presentan una alta reactividad, modificando covalentemente ciertas proteínas. Este daño es la principal razón de la retirada del mercado de algún medicamento aprobado. Cabe destacar que en los estudios de validación, alrededor del 50% de los productos químicos que presentan efectos nocivos no causan daño alguno en los estudios con animales, lo que deja ver la pobre correlación entre la toxicidad animal y humana (Guillouzo et al., 2008).

Existen cuatro líneas de investigación dentro del área de la toxicología: i) Toxicidad Celular, es decir, estudiar las consecuencias nocivas de ciertos compuestos a nivel celular; ii) Toxicología Genética, la cual permite identificar la actividad mutagénica y carcinogénica de ciertos químicos, su genotoxicidad; iii) Estrategias de *Screening*, referido a la producción de sistemas miniaturizados y automatizados de células que permitan reconocer los efectos dañinos de drogas mediante ensayos rápidos y eficientes; iv) Enfoque Toxicogenómico, encargada de la identificación de la respuesta celular en su totalidad, abarcando transcriptómica, proteómica y metabolómica. (Guillouzo et al., 2008). En el Anexo B: Modelos Hepáticos, es posible encontrar una descripción de los diferentes modelos hepáticos que se han utilizados para estudios *in vitro*.

1.2.3 Primer caso de Estudio: Acetaminofén

El acetaminofén (APAP), conocido globalmente como paracetamol, es el analgésico y antipirético más utilizada hoy en día. Es un fármaco disponible sin receta, con antecedentes terapéuticos que reflejan su extensa seguridad y eficacia. A pesar de esto, es considerado una de las causas más comunes de envenenamiento. De acuerdo a reportes de la US Food and Drug Administration (FDA), en US se registran más de 400 muertes anuales, por intoxicación con paracetamol. Un serio daño hepático puede ser producido debido principalmente a una fuerte sobredosis (en el caso de intentos suicidas) o de dosis repetitivas como parte de un tratamiento terapéutico. Cada paciente evoluciona de distinta forma frente a la toxicidad, sin embargo, es posible definir 4 fases según el tiempo transcurrido desde la ingesta y los síntomas que presenta. La dosis mínima no ha sido establecida concretamente, pero se ha establecido que una dosis

mayor a 4 [g/día] causa un gran daño, y de 2 [g/día] en caso de tener problemas hepáticos como los que beben una alta cantidad de alcohol, malnutridos y los que toman drogas capaces de inducir enzimas. Se ha estimado que el daño hepatocelular en niños está asociado a una dosis cercana a los 150 [mg/Kg] de peso corporal (Heard, 2008; Bin Nor Aripin et al., 2009; Schilling et al., 2010).

1.2.3.1 Mecanismo de Eliminación del APAP

El hígado es el órgano encargado del metabolismo del APAP, a través del sistema de fases I y II descritas anteriormente (ver Figura 1). Del total del compuesto que llega, el 85% es procesado a través de las reacciones de sulfatación y glucoridación, formando compuestos conjugados excretados por el sistema renal (Bessems et al., 2001). Sin embargo, existe una tercera vía en donde actúa el sistema enzimático CYP. Estudios en varias especies han determinado que las enzimas P450 más influyentes son las CYP 1A2 y 2E1, pero además, en el caso particular de humano, existe una tercera enzima, CYP 3A4. De forma general, estas enzimas (principalmente CYP 2E1) actúan de manera que oxidan el APAP formando el compuesto denominado N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), el cual, por medio de la reacción de conjugación con glutatión (GSH), es posible su posterior eliminación (McClain et al., 1999; Bessems et al., 2001; James et al., 2003). En dosis terapéuticas, la eliminación tarda alrededor de 2 horas, teniendo un peak de concentración en el plasma entre 30 a 60 minutos después de haberlo consumido (Schilling et al., 2010).

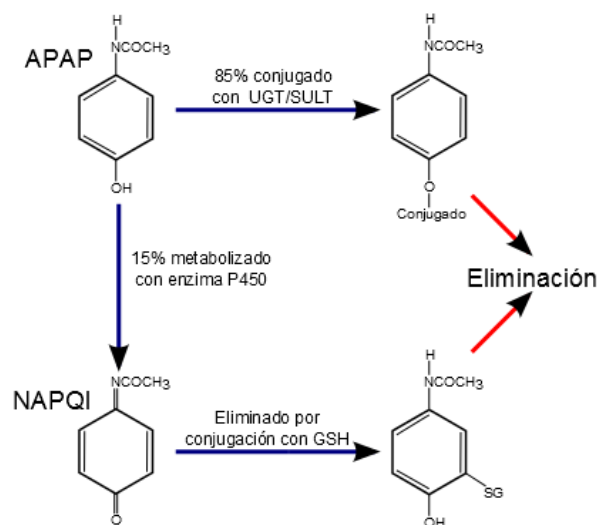


Figura 1: Mecanismo de eliminación del Acetaminofén.

1.2.3.2 Mecanismo Hepatotóxico del APAP

Existen varios acontecimientos que ocurren en presencia de altas dosis de APAP y conllevan a un desorden hepático de grandes proporciones. La principal razón es el consumo de gran cantidad de GSH almacenado, produciendo una alta acumulación del metabolito NAPQI, un compuesto es altamente reactivo. Tomando en cuenta que la conjugación con GSH se realiza a nivel del residuo de cisteína de éste (ver estructura de GSH en Figura 2), el NAPQI es capaz de unirse a otras unidades proteicas con el grupo tiol expuesto (-SH), produciendo inactivaciones de ciertas proteínas. Esta unión también ocurre por la unión a grupos aminos de residuos de histidina y lisina (Bessems et al., 2001; James et al., 2003).

Por otra parte, la presencia de NAPQI es capaz de desencadenar un estado de estrés oxidativo a nivel celular. Esta reacción en cadena es catalizada por la formación de compuestos oxidados altamente reactivos, partiendo por la oxidación del grupo tiol de GSH y de residuos proteicos. Además, la intoxicación con APAP aumenta los niveles celulares de superóxido, lo que conlleva a más reacciones de oxidación, como la nitración de tirosina y la peroxidación de lípidos (Bessems et al., 2001). Este hecho se reflejó en los altos niveles de síntesis de intermediarios reactivos de oxígenos (ROS), comparado con el caso base, medidos en cultivos primarios de

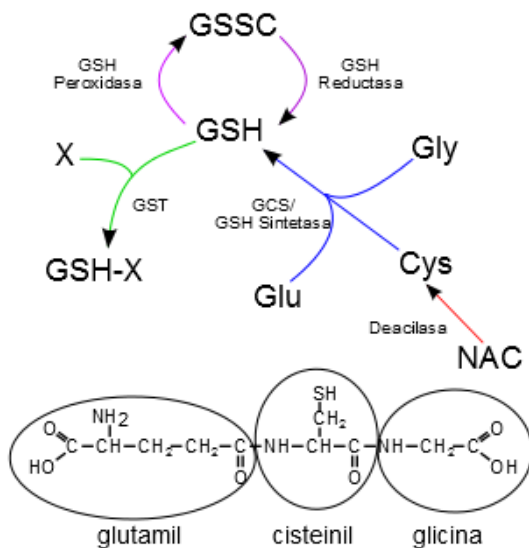


Figura 2: Estructura y metabolismo de GSH. Rojo: incorporación de NAC; azul: síntesis de GSH; verde: conjugación con drogas; violeta: par redox.

(James et al., 2003).

Finalmente, cabe destacar que la hepatotoxicidad es también incrementada por factores como alcoholismo y ayuno crónico, induciendo la activación de enzimas CYP y disminuyendo los niveles de glutatión y antioxidantes disponibles, evitando la desintoxicación de NAPQI (McClain et al., 1999).

1.2.3.3 N-acetilcisteína como Agente Protector

Como su nombre lo indica, el N-acetilcisteína (NAC) es un derivado del aminoácido, el cual actúa como agente mucolítico y precursor de L-cisteína y glutatión reducido (Zafarullah et al., 2003). Actualmente, constituye uno de los antídotos aprobados por la FDA, suministrados vía oral o a través de infusión intravenosa (McClain et al., 1999). Evidencia histórica ha mostrado una disminución de la mortalidad y de la hepatotoxicidad gracias al tratamiento con NAC (Bin Nor Aripin et al., 2009).

El principal efecto protector del uso de este químico está relacionado con el aumento del nivel de glutatión (Corcoran et al., 1986). La actividad biológica se debe al grupo tiol presente en su estructura, mientras que el radical de acetil mejora su condición hidrosoluble y confiere protección a su estructura contra procesos oxidativos y metabólicos. En términos generales, el mecanismo directo de antitoxicidad incluye el aumento del flujo de sangre en el hígado, reposición de los niveles de cisteína y glutatión, y el barrido de radicales libres, dada la fuente de grupos tioles que interactúan con especies oxidantes como $\text{OH}\cdot$ y H_2O_2 . Es así como el NAC posee un potencial terapéutico para el tratamiento del hígado contra estrés oxidativo, daño relacionado con trasplantes, fibrosis, intoxicación con acetaminofén, entre otras enfermedades (Zafarullah et al., 2003). Además, se comprobó que los efectos del NAC en células de cultivo primario, pre y post tratamiento con APAP, mejoran la viabilidad celular y la disminución de síntesis de ROS (Bajt et al., 2004).

hepatocitos tratados con APAP (Bajt et al., 2004). El estado redox intracelular está controlado en gran parte por el par 2GSH/GSSG, por lo que la utilización de glutatión en el mecanismo de eliminación de APAP deja de cierta forma desprotegida a la célula, permitiendo un aumento del estrés oxidativo intracelular (Schafer et al., 2001; Martinovich et al., 2005). En la Figura 2 se esquematiza las principales vías del metabolismo de glutatión (Lu, 1999; Wu et al., 2004).

Sumando a los efectos tóxicos del APAP, se han reportado desbalances iónicos en el núcleo y mitocondrias, lo que conduce a incrementos de Ca^{+2} citosólico, transporte cíclico de Ca^{+2} mitocondrial, activación de proteasas, endonucleasas y DNAasas. Por otro lado, las células de Kupffer participan de forma activa frente a altas dosis de APAP, liberando mediadores citotóxicos como citosinas IL-1, IL-6 y TNFalfa, las que pueden llegar a inducir apoptosis

1.2.4 Segundo Caso de Estudio: Fructosa

La fructosa corresponde a una unidad monomérica de las cetosas, es decir, carbohidratos que poseen el grupo funcional cetona dentro de su estructura. Posee una columna vertebral de 6 carbonos, al igual que la glucosa, con la diferencia de que este último posee el grupo carbonil en el extremo de las cadenas de carbono (aldosa). Ambas estructuras se ilustran en la Figura 3. Como todo monosacárido, es incoloro, dulce y de estructura cristalina soluble en agua, e insoluble en solventes no polares. La fructosa se encuentra en la mayoría de las frutas y en la miel, como también, en menor cantidad, en vegetales y legumbres. Es posible encontrar este compuesto como monosacárido o en forma de sacarosa, unión de un monómero de fructosa con uno de glucosa por enlace glucosídico (ver Figura 3) (Nelson et al., 2005).

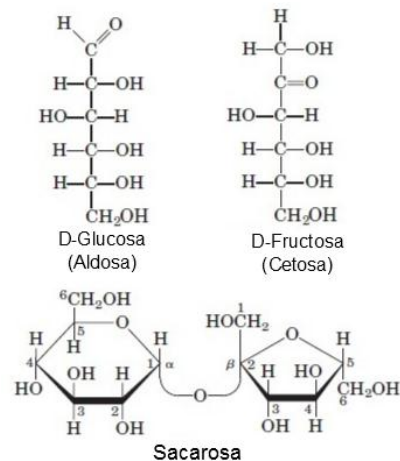


Figura 3: Estructura de glucosa, fructosa y sacarosa.

A lo largo de la historia, la sacarosa (conocido como el azúcar de mesa) ha sido el principal endulzante de las comidas y las bebidas azucaradas, hasta la década del 60 cuando se sintetiza el jarabe de maíz con alta contenido de fructosa (high fructose corn syrup, HFCS) (Hallfrisch, 1990; Gaby, 2005). Como el nombre lo dice, este endulzante es obtenido del almidón del maíz, el cual, a través de un proceso de isomerización, es posible enriquecerlo en fructosa (Hallfrisch, 1990). En la Tabla 1 se observa la composición másica porcentual de carbohidratos de los principales endulzantes. Se puede apreciar que la relación glucosa/fructosa es bastante similar entre lo que es sacarosa, HFCS-42 y HFCS-55 (que corresponde al jarabe con 42 y 55% de fructosa, respectivamente) (White, 2008).

Tabla 1: Composición másica porcentual de endulzantes.

Componentes	Sacarosa	Corn Syrup	HFCS-42	HFCS-55	Fructosa
Fructosa	50	0	42	55	100
Glucosa	50	100	53	42	0

Por un lado, estudios han revelado efectivamente que una dieta a base de fructosa trae como consecuencia el desarrollo de desórdenes metabólicos, como la sobre generación y secreción de lípidos, disminución de la sensibilidad de insulina y aumento de adiposidad visceral (Stanhope et al., 2009). Algunos investigadores sostienen que estos problemas se deben al incremento del consumo de HFCS por parte de la comunidad. Hasta la fecha, el consumo per cápita de este endulzante ha aumentado desde 0.5 [gr/día], hasta un 43,3 [gr/día] en el 2010 (U.S. Department of Agriculture, 2011). Sin embargo, otros investigadores, indican que no existe una directa relación, dado que HFCS posee la misma distribución de carbohidratos que la azúcar de mesa normal, por lo que el aumento en el consumo más bien corresponde a un remplazo de la sacarosa como endulzante. Además, establecen que los desórdenes son generados más bien por el aumento calórico, consecuencia del aumento del consumo de endulzante en forma general (White, 2008).

1.2.4.1 Metabolismo de Fructosa

La principal incorporación de la fructosa en el organismo se da a nivel de hígado. Luego de la ingesta de ésta, es absorbida y transportada a través del epitelio intestinal, hacia la vena porta hepática. Es sabido que por lo menos el 50% de la fructosa consumida es metabolizada en el hígado, dado que contiene un alto nivel de expresión de las enzimas involucradas en el

catabolismo de este carbohidrato. Pero además, un 20% es usada en el riñón y en la mucosa intestinal, mientras que un porcentaje mucho menor es utilizada en tejido adiposo y muscular. (Hallfrisch, 1990; Mayes, 1993)

Los hepatocitos poseen un mecanismo único de asimilación de fructosa, que las diferencian del resto de las células de cuerpo. Como todo carbohidrato de 6 carbonos, el primer paso corresponde a la fosforilación de la molécula, la cual es catalizada por hexokinasas, si se incorpora a lo largo del cuerpo. Sin embargo, en hepatocitos, esta fosforilación sobre el carbono 1 de la fructosa es llevada a cabo por la enzima fructokinasa, hexokinasa específica de cetosas. Posteriormente, la acción de la fructosa 1 fosfato aldolasa (o aldolasa B) separa el azúcar fosforilado en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato (DAP). Como dato, el déficit de esta enzima es la principal razón de intolerancia a la fructosa. Por un lado, una de las vías que toma el gliceraldehído es catalizada por la enzima triosakinas, la cual produce gliceraldehído 3 fosfato (G3P), un metabolito intermedio de la glicólisis, mientras que existen otras enzimas que son capaces de aumentar los niveles de glicerol y glicerato en el hígado a partir de este compuesto, lo que también conlleva un aumento indirecto de metabolitos intermediarios. En cambio, DAP sigue dos vías importantes de acción: la primera es la misma glicólisis, dado que es un intermediario de ésta. Pero además, la reducción de este compuesto por acción de la glicerol 3 fosfato dehidrogenasa, aumenta los niveles de glicerol 3 fosfato, uno de los compuestos claves para la producción de triglicéridos. En la Figura 4 es posible ver el resumen del metabolismo completo de la incorporación de fructosa (Hallfrisch, 1990; Mayes, 1993).

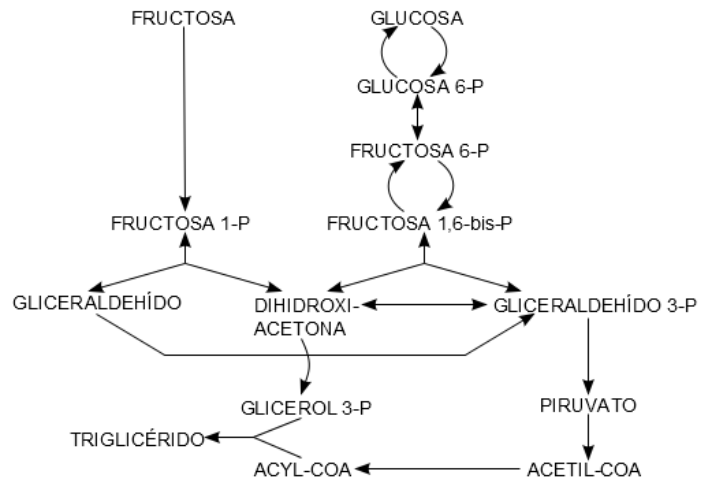


Figura 4: Metabolismo de fructosa.

La diferencia entre el metabolismo de los diferentes carbohidratos es que para la glucosa se genera un control negativo de la fosfofructokinasa, la cual fosforila la fructosa 6 fosfato (F6P) a fructosa 1,6 bifosfato (F1,6BP) en la vía de la glicólisis, mientras que para el caso de la fructosa, esta es capaz de by-pasear este control, entrando de forma constitutiva a la vía de la glicólisis como fue descrito en el párrafo anterior. Así, los niveles de sustratos internos de la mayoría de las principales vía metabólicas (glicólisis, glicogénesis, gluconeogénesis, lipogénesis y esterificación de ácidos grasos) se ven aumentado en cantidad, produciendo inestabilidades en el sistema (Basciano et al., 2005).

1.2.4.2 Efectos del aumento del consumo de Fructosa

Como se mencionó anteriormente, el principal efecto del ingreso constitutivo de fructosa es el aumento de compuestos intermedios de distintas vías metabólicas que ocurren en el interior de la célula. Se han reportado aumento de glucosa 1 fosfato, glicerol 3 fosfato, fructosa 2,6 bifosfato (F2,6BP), lactato, ATP, fosfato inorgánico entre otros. Se describirán los principales efectos descritos en la literatura sobre los metabolismos de carbohidratos y lípidos. Sin embargo, cabe destacar que existen también problemas de sobreproducción de ácido láctico y úrico (Hallfrisch, 1990; Mayes, 1993).

Metabolismo de Carbohidratos

Dado que el ingreso directo de la fructosa es a nivel de glicólisis, es claro que aumenta el flujo a lo largo de la vía, evidenciado con el aumento de lactato liberado. Por lo general, la acción de la piruvato kinasa está regulada positivamente por los niveles de F1,6BP. Sin embargo, frente a la incorporación de fructosa, lo altos niveles de fructosa 1 fosfato (F1P) aumentan aún más la actividad de esta enzima, facilitando la formación de piruvato.

En condiciones en que los niveles de azúcar intracelular son normales, la fructosa es capaz de aumentar la síntesis de glucógeno, debido a que el incremento en los niveles de F1P, inhibe la glucógeno fosforilasa. Sin embargo, para que sea efectivo este aumento en el flujo debe estar presente la glucosa, ya que la célula no puede ocupar la fructosa como precursor de glucógeno. Esto se debe principalmente a que lo altos niveles de F1,6BP inhibe la síntesis de F6P a partir de este mismo. No obstante, esta condición cambia en condiciones de ayuno, en donde los niveles de F2,6BP, otro inhibidor de la fructosa 1,6 Bifosfatasa, juega un rol importante. Durante una baja de los niveles de azúcar intracelular, los niveles de F1,6BP y F2,6BP serán bajos, por lo que esta vez la fructosa que entre sí podrá ser metabolizada en glucógeno, ya que la fructosa 1,6 Bifosfatasa no estaría siendo inhibida (Mayes, 1993; Basciano et al., 2005).

Dado que el páncreas no posee receptores de fructosa, existe una secreción mucho menor de insulina frente a las concentraciones de azúcar en la sangre (Elliott et al., 2002). Los reportes manifiestan que efectivamente existe una alteración en la regulación de la glicemia, en que la sensibilidad a glucosa e insulina varían frente a la presencia de fructosa. Dada la variación en los resultados, no está claro aún de que estas modificaciones en la regulación implique un beneficio en casos de pacientes con diabetes tipo 1 o 2 (Hallfrisch, 1990; Elliott et al., 2002; Basciano et al., 2005; Gaby, 2005).

En el largo plazo, las células sufren un proceso adaptación, que incluye un aumento en la actividad de las enzimas relacionadas con la incorporación de la fructosa e utilización como fuente de carbono. Por otro lado, se reduce la captación de glucosa, debido principalmente a la baja actividad de las glucocinasas (Mayes, 1993; Elliott et al., 2002). Además, la fructosa como fuente energética produce otros efectos nocivos en órganos, síntomas característicos de diabetes, como la glicosilación de proteínas de algunos tejidos, acumulación intracelular de sorbitol y estrés oxidativo (Gaby, 2005).

Metabolismo de Lípidos

La síntesis de lípidos se ve aumentada por el consumo de fructosa, debido principalmente a que es metabolizada en ambos sustratos que formaran las moléculas de triglicéridos: Por un lado, la DAP que se forma de la hidrólisis de la F1P está en equilibrio con glicerol 3 fosfato; Además, como se mencionó en la parte anterior, el incremento de los flujos en la vía glicolítica conlleva a una sobreproducción de acetyl CoA (AcCoA). Cabe destacar que esta sobreproducción se debe principalmente por el aumento de la actividad de la piruvato deshidrogenasa, afectada por el aumento de la concentración de piruvato intracelular.

La glucosa cumple con la función de ser precursor de triglicéridos y de regular los niveles de éstos. Sin embargo, la fructosa no posee la misma función de regulación en el organismo (Basciano et al., 2005). Si bien, muchos intermediarios lipogénicos se ven incrementados por la presencia de fructosa, se tiene poca evidencia de que este efecto se genera con solamente esta

azúcar en el medio, si no que con una administración de ambos carbohidratos (glucosa y fructosa).

El metabolismo de lípidos se ve afectado de la misma forma que la de los carbohidratos, en donde existe una adaptación y un aumento de la actividad de enzimas lipogénicas a largo plazo. Además, se generan alteraciones en otras proteínas involucradas en lipogénesis, como el factor de transcripción SREPB y tirosina fosfatasa, quienes participan en la señalización mediada por la insulina, como también en el aumento de la actividad de ácidos grasos sintetasas (Basciano et al., 2005). Otra hormona que se ve afectada es la leptina, cuya secreción es generada por altos niveles de insulina, y está encargada de regular la acumulación de lípidos en los tejidos, a través de la inhibición de la ingesta de comida y aumentando el gasto energético (Elliott et al., 2002). Como se mencionó antes, dado que la fructosa no es inductora de insulina, se genera esta reacción en cadena donde el organismo no es capaz de disminuir la saciedad. Además, la presencia de grasas en la dieta, junto con la de fructosa, produce un efecto sinérgico de aumentar aún más la producción de triglicéridos (Hallfrisch, 1990).

1.3 HepG2 como modelo *in vitro*

El uso de líneas celulares de hígado como modelo *in vitro* permite contrarrestar los problemas de trabajar y preservar cultivos primarios, dado que presentan una mayor estabilidad fenotípica, con una mayor facilidad a la hora de trabajar en laboratorio. El gran problema de todas las líneas celulares hepáticas es su muy limitada actividad biotransformadora, debida a la pérdida de los niveles enzimáticos, especialmente las enzimas referentes al citocromo P450. A pesar de esto, una de las líneas celulares más utilizadas como modelo hepático es la HepG2, debido a que muestra una gran cantidad de funciones hepáticas y de expresión enzimática (Gomez-Lechon et al., 2007). Esta línea, descubierta en 1980, proviene de un adolescente caucásico que sufría de cáncer hepático o hepatocarcinoma, y su crecimiento es de tipo epitelial formando pequeños agregados (Sahu, 2007), como se puede apreciar en la Figura 5, obtenidas del proveedor (ATCC).

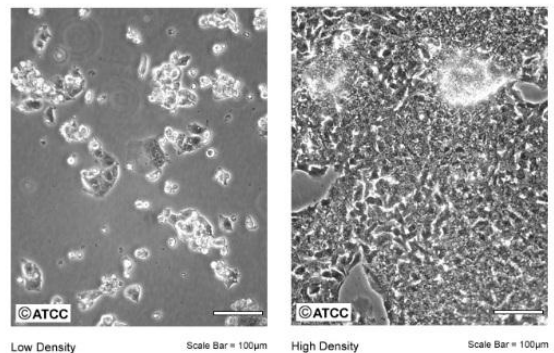


Figura 5: Imágenes de cultivo de HepG2, a baja y alta densidad.

Desde su descubrimiento, las células HepG2 se han utilizado como modelo *in vitro* en varias líneas de investigación, de las cuáles se pueden destacar: estudios que buscan una mejor representación de células hepática a través del crecimiento en soportes, en biorreactores o a través de la formación de esferoides (Rahman et al., 2004; Zang et al., 2006; Hoess et al., 2007; Zhang et al., 2008; Guzzardi et al., 2009; Rago et al., 2009; Wu et al., 2010); evaluación de diferentes compuestos que afecten el metabolismo hepáticos, protegiéndolo o dañándolo, como glucosa, metales, nanopartículas, drogas o algún agente genotóxico (Knasmuller et al., 2004; Gomez-Lechon et al., 2007; Iyer et al., 2010; Yuan et al., 2011; Yuan et al., 2011); entendimiento de ciertos procesos que involucren anomalías menores, como fosfolipidosis, o de mayor magnitud, como hígado graso o diabetes, caracterizando algunos marcadores que permitan identificarlas (Thome-Kromer et al., 2003; Atienzar et al., 2007; Collison et al., 2009; Liu et al., 2011; Wang et al., 2011); utilización de estas células para la producción de hígado bioartificiales (Omasa et al., 2005; Mavri-Damelin et al., 2008; Nibourg et al., 2010).

1.3.1 HepG2 en estudios toxicológicos con APAP

La similitud entre células hepáticas humanas y HepG2 fue estudiada comparando el nivel de expresión basal de genes de tres donantes con la línea celular. Estos donantes poseen en común 867 genes, de los cuales el 96% fue también expresado en HepG2. Del total de transcriptomas detectados en la línea (2974), 920 (31%) son exclusivos de HepG2, referentes a los cambios funcionales por la transformación fenotípica, y que afectarían la expresión de genes involucrados en procesos de desintoxicación (Harris et al., 2004). Este último hecho corresponde a un punto de quiebre para el desarrollo de modelos de laboratorio que permitan caracterizar el efecto de alguna droga, como es el caso de APAP. Como se mencionó anteriormente en este trabajo, las enzimas de fase I y fase II son de crucial importancia para eliminar los intermediarios formados a partir de este compuesto.

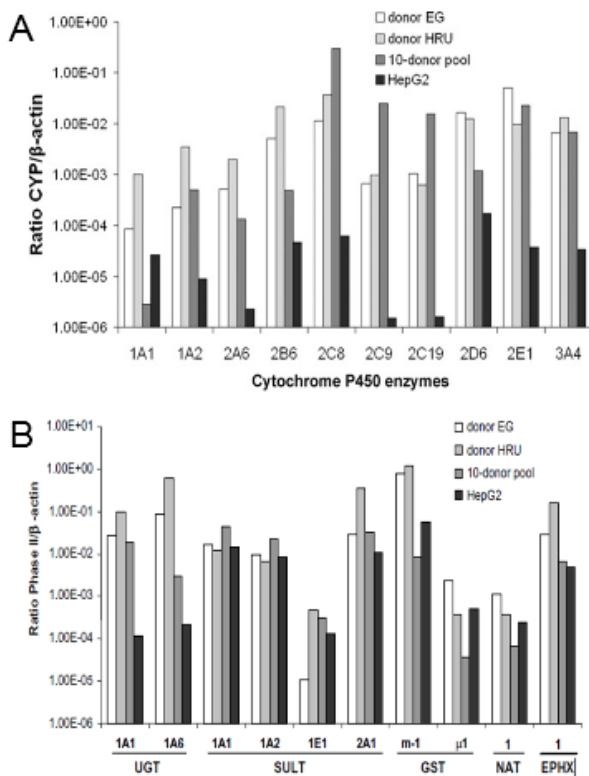


Figura 6: Comparación expresión de enzimas fase 1 (A) y 2 (B), entre cultivo primario y HepG2 (Westerink et al., 2007; Westerink et al., 2007).

Se han postulado tres razones de esta baja en la expresión de enzimas, y que tienen que ver con los cambios genotípicos y fenotípicos que implica la transformación a líneas celulares: i) existieron alteraciones de los factores de transcripción, o simplemente, la disminución de sus niveles intracelulares; ii) hubo un aumento de represores/corepresores de transcripción o de malformaciones de las mismas enzimas CYP; iii) la cromatina sufrió de compactaciones anormales y silenciamiento de genes debido a metilaciones de ADN, deacetilaciones de histonas y/o disminución de coactivadores de la actividad de acetiltransferasas (Gomez-Lechon et al., 2007).

Para contrarrestar estos niveles bajos de expresión enzimática, se han desarrollado alternativas de transformación de las HepG2. Las sublíneas E47 y MVh22E-1, corresponde a células HepG2 que sobreexpresan CYP 2E1, con las cuales han permitido mejoras en el metabolismo del glutatión, aumentando los niveles de síntesis y acumulación (Mari et al., 2000; Cederbaum, 2006). Además, se determinó que existen dos efectos del APAP sobre las células: el efecto tóxico

Se comparó los niveles de expresión de mRNA de enzimas del metabolismo de eliminación de agentes nocivo, entre células de cultivo primario de donadores humanos y HepG2. En el gráfico A de la Figura 6 es posible apreciar que las enzimas participantes en la eliminación de APAP, CYP 1A2, 2E1 y 3A4, se encuentran en un nivel bajo de expresión, comparado con el de los donadores. Con respecto a las enzimas de fase II, se indica en el gráfico B de la Figura 6 que los niveles de SULT y GST (de interés para el tratamiento de APAP) son bastante similares que en cultivo primario, pero que UGT entregó valores desde diez a mil veces menores. En síntesis, se propone que el uso de HepG2 tiene un potencial como indicadores de toxicidad, pero con efectos subestimados debido a la baja expresión de enzimas de fase I y II (Westerink et al., 2007; Westerink et al., 2007).

Se han postulado tres razones de esta baja en la expresión de enzimas, y que tienen que ver con los cambios genotípicos y fenotípicos que implica la transformación a líneas celulares: i) existieron alteraciones de los factores de transcripción, o simplemente, la disminución de sus niveles intracelulares; ii) hubo un aumento de represores/corepresores de transcripción o de malformaciones de las mismas enzimas CYP; iii) la cromatina sufrió de compactaciones anormales y silenciamiento de genes debido a metilaciones de ADN, deacetilaciones de histonas y/o disminución de coactivadores de la actividad de acetiltransferasas (Gomez-Lechon et al., 2007).

mediado por las enzimas CYP y la acción antiproliferativa, que no requiere de la disminución de glutatión (Dai et al., 1995).

Por otra lado, se ha evaluado el uso de NAC como agente protector frente a apoptosis inducida por cadmio y a la intoxicación con nitrato de plomo en células HepG2 (Zang et al., 2006; Yedjou et al., 2007). Adicionalmente, se determinó que NAC es capaz de disminuir el estrés oxidativo provocado por APAP, pero no evita la activación de mecanismos de apoptosis (Manov et al., 2004).

1.3.2 HepG2 en estudios metabólicos con Fructosa

A pesar de que ha cobrado gran interés en los últimos años el estudiar los efectos adversos del consumo de fructosa, sus estudios *in vitro*, y particularmente en HepG2, son reducidos. No obstante, es posible destacar trabajos realizados recientemente que involucran el metabolismo de fructosa como predecesor de daño hepático. Se ha reportado que el consumo fructosa aumenta la acumulación de triglicéridos (oleato y palmitato), como también afecta la acción de la enzima Acetil CoA carboxilasa fosforilada, la lipasa sensible a hormonas fosforilada y la lipasa de triglicéridos de tejido adiposo. Todas correspondientes a enzimas del metabolismo de lípidos, aumentando su acumulación, y por consecuencia, la probabilidad de obesidad y problemas cardiovasculares (Huang et al., 2011).

Existen discrepancias en los efectos que produce sobre las células HepG2 la suplementación del medio de cultivo con HFCS-55 como fuente de carbono. Por un lado, estudios reflejan que el consumo de HFCS-55 produce síntomas críticos que desencadenan el desarrollo de hígado graso asociado con obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Para ello se utilizó la línea HepG2 para determinar que efectivamente aumenta los niveles de triglicéridos, junto con la expresión de mRNA de Acetil CoA carboxilasa (ACC), y las mismas proteínas ACC y apolipoproteínas (Collison et al., 2009). Sin embargo, en otro reporte se manifiesta que trabajando con concentraciones fisiológicas de HFCS-55 los niveles de expresión de genes de enzimas lipogénicas no aumentan, si no que la sobreproducción se debe exclusivamente al aumento de precursores de lípidos. Este hecho se explica debido a que las enzimas ácidos grasos sintetasa y ACC son reguladas y activadas por metabolitos de la vía de formación de hexoamina, pero que esta línea celular no es capaz de inducir. Sin embargo, se valida el uso de células HepG2, ya que poseen la capacidad enzimática de incorporación y rápido metabolismo de fructosa en los mismos niveles que un hepatocito común (Hirahatake et al., 2011).

1.4 Análisis de Flujo Metabólico

1.4.1 Alcances Teóricos

El Análisis de Flujo Metabólico (MFA) es una metodología que permite estimar la distribución de flujos intracelulares en una red metabólica, a partir de dos factores principales: modelos estequiométricos de las reacciones de la vía metabólica y del balance de masa de metabolitos extracelulares. Un mapa de flujo metabólico es capaz de ilustrar la contribución de varias rutas metabólicas a los procesos de utilización de sustratos y formación de productos, bajo las condiciones específicas de cada caso en estudio (Stephanopoulos et al., 1998).

Para un balance de masa de un metabolito intracelular M (Ec. 1), la acumulación de éste está determinado por la suma de los flujos internos de formación o consumo debido a reacciones

químicas (v_M), y por el intercambio del metabolito con el medio exterior, definiendo tasas de consumo o producción (r_M).

$$\frac{dM}{dt} = \sum v_M + r_M \quad \text{Ec. 1}$$

En un sistema de I metabolitos intracelulares, los cuales se relacionan a través de J reacciones químicas, el balance de masa se ajusta de forma matricial:

$$\frac{dM}{dt} = S \cdot V + R \quad \text{Ec. 2}$$

En esta última expresión, M corresponde en este caso a un vector columna que posee cada uno de los I metabolitos en una fila. La matriz S contiene los coeficientes estequiométricos de las reacciones contempladas en el estudio, en donde cada fila representa a cada uno de los I compuestos del sistema, mientras que las columnas corresponden a cada una de las J reacciones, es decir, la componente s_{ij} , corresponde al coeficiente del sustrato i -ésimo en la reacción j -ésima. El vector columna V es el de las tasas de reacción, y contiene cada uno de los flujos v_j , característico de cada reacción. Por definición, la tasa de reacción específica que un compuesto i que posee un coeficiente estequiométrico s_{ij} , es transformado (formado o consumido) a una tasa de $s_{ij} \cdot v_j$. Finalmente, el vector R contiene las tasas de consumo o producción de los metabolitos que se intercambian con el medio de cultivo.

En base a que existe una alta rotación de los *pools* de metabolitos, es decir, los niveles intracelulares se ajustan rápidamente en niveles fijos, incluso después de grandes perturbaciones en el ambiente, es posible definir un estado pseudo-estacionario en el interior de las células (Stephanopoulos et al., 1998). Por lo tanto, la expresión de la Ec. 2 queda de la forma:

$$\frac{dM}{dt} = 0 \Rightarrow S \cdot V = R \quad \text{Ec. 3}$$

Para despejar el vector V en la Ec. 3, en un caso de un sistema sobredeterminado, es necesario multiplicar en ambos lados por su matriz pseudo inversa. Así, el vector de los flujos internos V queda determinado según la siguiente expresión:

$$V = (S^T \cdot S)^{-1} \cdot S^T \cdot R \quad \text{Ec. 4}$$

El MFA es una de las técnicas más útil para caracterizar el metabolismo del carbono al interior de las células. En particular, las células mamíferas han sido utilizadas en diversas áreas: i) Con el objetivo de entender los mecanismos intracelulares, los MFA han sido utilizados en la búsqueda de modelos confiables para estudios toxicológicos, que permitan reducir la necesidad de organismos vivos (Boghigian et al., 2010; Quek et al., 2010); ii) La ingeniería metabólica es otra área en donde, gracias a la distribución de flujos intracelulares usando MFA, se han modificado vías metabólicas con el fin de reducir la síntesis de factores inhibitorios de crecimiento celular, y aumentar la producción de químicos puros y fármacos de origen biológico (Niklas et al., 2009).

1.4.2 MFA en modelos hepáticos

En la última década, se ha utilizado esta técnica para la caracterización de cultivos hepáticos bajo condición anormales, tanto en animales como en humanos, analizando cambios metabólicos en casos de insuficiencia hepática fulminante, quemaduras, fibrosis hepáticas y en condiciones hipermetabólicas de suplementación de medios de cultivos (Calik et al., 2000; Arai et al., 2001; Yokoyama et al., 2005; Banta et al., 2007; Chang et al., 2009).

Existe registro reciente en la literatura del uso de la técnica de MFA aplicado a cultivos de HepG2. Se mencionan dos publicaciones científicas, las cuales serán utilizadas como ejemplo para el diseño del modelo hepático y el desarrollo del MFA en el presente trabajo. En el primer estudio, MFA fue aplicado para identificar los cambios metabólicos que se generan como respuesta al crecimiento de la línea celular en un medio suplementado con ácidos grasos saturados e insaturados, durante 3 días. Se pudo observar que el palmitato es oxidado de un mayor grado que el oleato, y que conduce a una menor acumulación de triglicéridos y un menor consumo de cisteína, lo que deriva en una menor síntesis de GSH. Se destaca además que el uso de NAC para restablecer los niveles de cisteína, y posteriormente de GSH, permiten reducir la toxicidad inducida por palmitato (Srivastava et al., 2007).

El segundo trabajo consiste en la evaluación de crecimiento de HepG2 y los cambios metabólicos que se producen frente a la exposición a tres componentes hepatotóxicos (amiodarona, diclofenaco y tacrina). Con un modelo reducido de 34 reacciones intracelulares, se determinó que el principal efecto es el aumento en la actividad del ciclo TCA. Además, a través del ensayo de respiración cinética, se pudo apreciar un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Estos dos hechos serían marcadores de hepatotoxicidad a largo plazo. Se enfatiza que el uso de MFA es una herramienta poderosa, que sumado a otras técnicas, permitirá un mejor entendimiento de los cambios a nivel metabólico que sufren las células hepáticas bajo la exposición de sustancias tóxicas (Niklas et al., 2009).

1.5 Objetivos

Los objetivos planteados para este trabajo de título serán:

1.5.1 Objetivo General

ESTABLECER una metodología base de estudios metabólicos en células hepáticas *in vitro*, analizando el comportamiento de la línea celular HepG2 frente a la acción de agentes externos y evaluando su metabolismo interno con un modelo *in silico*.

1.5.2 Objetivos Específicos

ESTUDIAR las alteraciones en el metabolismo de las células HepG2 debido al efecto nocivo del Acetaminofén, y si es contrarrestable mediante el uso de N-acetilcisteína como agente protector, por medio de curvas de crecimiento en un ensayo toxicológico.

ESTUDIAR los cambios que se producen en el metabolismo al utilizar diferentes fuentes de carbono, suplementadas en el medio de cultivo (glucosa, fructosa y una mezcla de ellos), por medio de curvas de crecimientos y la cuantificación de lípidos intracelulares.

EXAMINAR las variaciones en los flujos metabólicos internos, en ambos casos de estudio, a través del diseño e implementación de un modelo hepático *in silico* y de la realización de Análisis de Flujo Metabólico.

ANALIZAR la consistencia del modelo hepático planteado para complementar estudios metabólicos *in vitro* utilizando la línea celular HepG2.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología General

Este trabajo de título se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo Animal, ubicado en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIByB). La línea celular que se utilizó corresponde al hepatocarcinoma humano HepG2, cuyo proveedor es el centro de recursos biológicos *American Type Culture Collection* (HB-8065).

El medio base para la propagación de estas células es Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), agregando un 10% de suero fetal bovino (FBS), incubando a una temperatura de 37 [°C] y una atmósfera con 5% de CO₂, de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Sin embargo, según lo encontrado en la literatura, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) de Gibco, es uno de los medios más utilizados para el cultivo de HepG2, por lo que se utilizará este último durante este proyecto. A modo de comparación, en el Anexo C: Medios de Cultivo, es posible encontrar la descripción y la composición de cada uno de ellos. El medio DMEM/F12 que se utilizó es preparado bajo campana, para evitar contaminación de éste, y posee las siguientes características: se encuentra suplementado de fábrica con 17,5 [mM] de glucosa (*High Glucose*); posee una concentración de glutamina de 2,5 [mM], la cual debe ser ajustada a 4 [mM]; se suplementó con 10% de FBS y con un 1% de antibiótico Pen-Strep. En los casos en que se suplementó con concentraciones diferentes de glucosa, o simplemente se requirió otra fuente de carbono (como fructosa), se usó medio DMEM/F12 preparado sin fuentes de carbono, suplementándolos con suero y antibióticos, como se describió anteriormente. Adicionalmente, se preparó un banco de células, es decir, un stock de alrededor de 24 viales de células congeladas en nitrógeno líquido, a una concentración mínima de 10⁷ [cel/ml], para ser utilizados en los ensayos experimentales de este proyecto.

En la Figura 7 se encuentra el diagrama de bloques propuesto para esta memoria. Por un lado, se realizó un ensayo que permitió construir una curva de crecimiento de las células HepG2 y obtener las condiciones basales de este crecimiento. En forma paralela, a través de la búsqueda del estado del arte, se confeccionó el modelo hepático que describe el metabolismo interno de la línea celular. Se realizó dos estudios que permiten evaluar el comportamiento de las células bajo perturbaciones externas (éstos se detallan más adelante, en sección 2.4 y 2.5). En ambos estudios, se comparó los parámetros de crecimiento con el caso base. Junto a esto, se obtuvo las tasas específicas de consumo/producción de los metabolitos que realizan intercambio con el medio extracelular, para luego, utilizando el modelo planteado, realizar el Análisis de Flujo Metabólico de cada caso estudiado. Finalmente, con todos los resultados obtenidos, se discutió sobre el potencial uso de la línea HepG2 como modelo *in vitro* para estudios metabólicos.

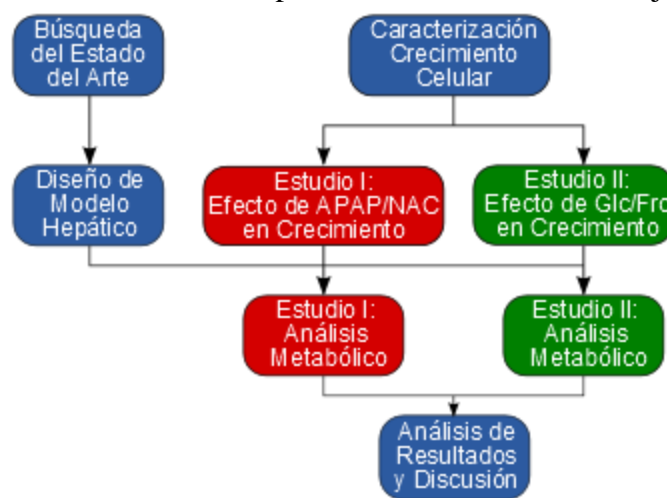


Figura 7: Diagrama de bloques del trabajo de título.

2.2 Materiales

Reactivos

- Acetaminofén (Sigma, A7085)
- Brij-35(Sigma, P1254)
- Cloroformo (Merk, 1.02445)
- Etanol (Merk, 1.00983)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Hipoclorito de Sodio (Equilab, 750SODIOHIP0001)
- Metanol (Merk, 1.06009)
- o-Phthaldialdeído (Sigma, P0657)
- Sulfato de Potasio (K_2SO_4) (Merck, 1.05153)
- Ácido Acético (Merk, 1.00063)
- Buffer Fosfato Salino (PBS), (Gibco, 21600)
- Cloruro de Amonio (NH_4Cl) (Merk, 1.01145)
- Fenol (Merk, 1.00206)
- Glutamina (Gibco, 21051)
- Medio de Cultivo DMEM/F12 (Gibco, ME090283)
- N-acetilcisteína (Sigma, A9165)
- Penicilina/Estreptomina (Gibco, 15140)
- Tripsina EDTA 0,5% (Gibco, 15400)
- Ácido Bórico (H_2BO_3) (Merk, 1.00165)
- Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (Merk, 1.06392)
- Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma, P2650)
- Fructosa (Sigma, F3510)
- Hidróxido de Sodio (NaOH) (Merk, 1.06498)
- Mercaptoetanol (Sigma, M3148)
- Nitroprusiato de Sodio
- Suero Fetal Bovino (FBS) (HyClone, SH30910.03)

Equipos

- Baño Térmico, Lab Tech
- Centrífuga de Tubos (Boeco,C28)
- *Freezer* -80 °C (Haier)
- Microscopio (Olympus, CK2)
- Cámara de Flujo Laminar (Nuaire, UN-201330E)
- Cromatógrafo de Líquido de Alta Eficiencia (HPLC) (Shimadzu)
- Incubadora (Shel Lab)
- Sonicador de Vástago
- Centrífuga de Microtubos (Eppendorf, 5403)
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000)
- Lector de Placas (Asys, UVM 340)

Material de Laboratorio

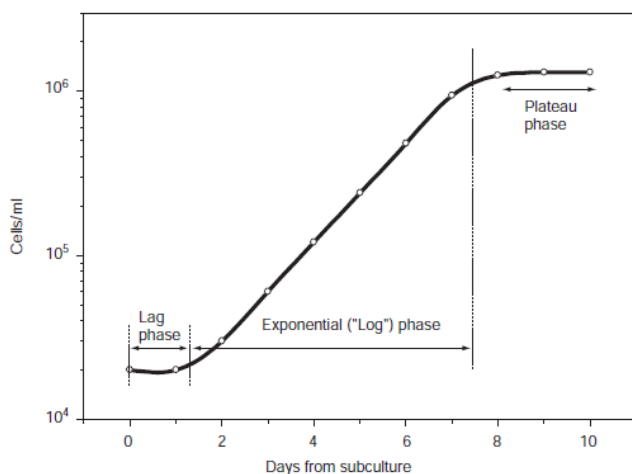
- Agua Desionizada
- Cámara de Neubauer
- Contador
- Friopacks
- Microtubos 1,5 y 2 [ml] (Axygen)
- Placas de cultivo de 100 [mm] (Greiner Bio-One)
- Pipetas plásticas estériles 1, 2, 5, 10 y 25 [ml] (SPL)
- Tubos de Vidrio
- Agua Destilada
- Cilindro de CO_2
- Crioviales 2 [ml] (Corning)
- Jeringas 5, 10 y 20 [ml]
- Nitrógeno Líquido
- Placas de cultivo T-Flask de 25 y 75 [cm²] (SPL)
- Propipeta (Drummond)
- Botellas de 250 y 500 [ml]
- Cilindro de N_2
- Filtros de 0,2 [nm] (Advantec)
- Micropipetas
- Placas de 6, 12 y 96 pocillos (SPL)
- Pipetas Pasteur
- Tubos Centrifugación 15 y 50 [ml] (Axygen)

Kit Comerciales

- Glucose GLUC-PAP (Randox, GL364)
- Fructose Assay Kit (BioVision, K619-100)
- L-Lactate Kit (Randox, LC2389)
- EnzyChrom Triglyceride Assay Kit (BioAssay Systems, ETGA-200)

2.3 Caracterización del Crecimiento Celular

Se estudió el crecimiento celular en adherencia, buscando definir las condiciones de crecimiento basales. El método para realizar esta caracterización es a través de la construcción de curvas de crecimiento. En la Figura 8 es posible apreciar una curva de crecimiento estándar, en la cual es posible identificar tres fases de crecimiento: i) Fase de retardo (*Lag Phase*); ii) Fase de crecimiento exponencial (*Exponential Phase*); y iii) Fase estacionaria (*Plateau Phase*).



Los cultivos son inoculados a una concentración entre $0,25$ y $0,3 \times 10^6$ [cel/ml] en placas (de 6 o 12 pocillos), y durante un periodo de 8 días aproximadamente se cuantifica la concentración celular. Esta medición se realiza aproximadamente cada 12 horas, y en duplicado, lo que permite analizar la reproducibilidad de los resultados. Por lo tanto, cada punto de la curva corresponde al promedio de las concentraciones de dos de los pocillos inoculados.

Figura 8: Curva de crecimiento estándar.

Concentración y Viabilidad Celular

Para monitorear el correcto crecimiento de las células se determina la concentración de células vivas a través de la tinción por *Trypan Blue*, sustancia que logra entrar en las células muertas, entregándoles un color azul oscuro. Así es posible obtener la concentración de células vivas, muertas, totales y el porcentaje de viabilidad, en cada punto de la curva de crecimiento.

Velocidad Máxima de Crecimiento

Este parámetro indica que tan rápido fue el crecimiento de la línea celular en la fase exponencial del cultivo. Como se puede ver en la Figura 8, esta tasa de cambio se calcula como la derivada de la curva de concentración obtenida durante esta etapa exponencial (en un gráfico semi logarítmico). Este valor será tomado como base para comparar el crecimiento de las células HepG2 en condiciones normales y bajo perturbaciones.

Tasas Específicas de Consumo/Producción

Otra alternativa para caracterizar el crecimiento celular es a través del cálculo de tasas específicas extracelulares de consumo/producción de metabolitos de interés. Las fórmulas que permiten su cálculo se señalan a continuación:

$$Xv = X \cdot V \quad \text{Ec. 5}$$

$$q_c = \frac{-1}{Xv} \frac{dC}{dt} \quad \text{Ec. 6}$$

$$q_p = \frac{1}{Xv} \frac{dP}{dt} \quad \text{Ec. 7}$$

donde, X es concentración celular, en [cel/ml]; V es volumen de cultivo, en [ml]; C es la cantidad de metabolito consumido, en [moles]; y P es la cantidad de metabolitos producido, en [moles]. En la práctica, las 26 tasas de consumo/producción se obtienen graficando la acumulación de metabolito en el tiempo, es decir, la diferencia de moles de metabolito entre dos tiempos consecutivos. Luego de un ajuste polinomial de los datos, las tasas corresponden a la derivadas de esta aproximación evaluadas en los tiempo de medición, dividido por la cantidad de células en los tiempos respectivos.

Debido a que altas concentraciones de lactato en el medio de cultivo inhibe el crecimiento, uno de los parámetros utilizados para caracterizar el crecimiento de un cultivo es la razón entre la tasa de producción de lactato versus la tasa de consumo de glucosa (u otra fuente de carbono). Estequiométricamente, de cada mol de azúcar que entra a la vía de la glicólisis se generan 2 moles de piruvato, y por consiguiente, 2 moles de lactato, definiéndose un valor teórico de $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 2 (considerando un estado pseudo estacionario). Sin embargo, en la realidad este valor no se alcanza ya que dado que parte del flujo de carbono que entra a la célula es distribuida además en las vías de formación de biomasa y del ciclo TCA.

Además, para realizar el análisis de flujos metabólicos es necesaria la cuantificación de las tasas de consumo/producción de todos los metabolitos que sean intercambiados con el medio extracelular. La Tabla 2 detalla las técnicas a utilizar para el cálculo de cada una de las tasas consideradas para este trabajo. Dado que la tasa de producción de triglicéridos es a nivel intracelular, se utilizó placas de 100 [mm] para cada punto de muestreo, para obtener una cantidad suficiente y poder cuantificarlo utilizando el kit comercial. Todas las demás tasas restantes se calcularon a partir de las muestras separadas de sobrenadante. Debido a la alta cantidad de células y de medio para usar en placas de 100 [mm], sólo se realizaran dos puntos de muestreo por curva, en uniplicado. Por lo tanto, dado que son sólo dos puntos de acumulación, las tasas de consumo/producción (no específicas) serán constantes a lo largo del tiempo.

Tabla 2: Técnicas para medir tasas de consumo/producción para MFA.

Metabolito	Técnica
Biomasa	Cuantificación con <i>Trypan Blue</i>
Glucosa, Fructosa, Lactato, Triglicéridos	Kit Comercial Enzimático de cuantificación por colorimetría
Aminoácidos	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)
Amonio	Reacción de Berthelot para producir compuesto coloreado.

Todas las técnicas mencionadas son descritas en el Anexo D: Protocolos.

2.4 Estudio I: Toxicidad del APAP y Protección con NAC

Este estudio tiene la finalidad de evaluar el efecto protector del N-acetilcisteína (NAC) frente al daño hepatotóxico que provoca altas dosis de acetaminofén (APAP). Como se mencionó en la introducción, la alta concentración de APAP en el medio produce una acumulación de intermediarios altamente reactivos que desencadena un fulminante estado de estrés oxidativo. NAC permite contrarrestar este efecto nocivo ya que eleva los niveles de glutatión intracelular, compuesto utilizado para la eliminación de APAP por conjugación y para regular el estado redox dentro de las células. Es así como se plantea la hipótesis para este estudio:

2.4.1 Hipótesis

N-acetilcisteína tiene un efecto como agente protector, que permite reducir el daño causado por la exposición a altas dosis de acetaminofén, estabilizando el estado redox intracelular.

2.4.2 Diseño Experimental

Siendo el APAP uno de los fármacos más estudiados de hace décadas, se ha encontrado durante la revisión bibliográfica un gran rango de concentración utilizada en los experimento con este compuesto. Sin embargo, se tiene que hasta 5 [mM] de APAP en el medio es suficiente para producir un daño celular sin causar cambios morfológicos en las células HepG2 (Iguchi et al., 2005). Por lo tanto, se realizaran pruebas preliminares a diferentes concentraciones de APAP para seleccionar la que se ocupará en los experimentos finales.

Para el caso del protector NAC, se debe hacer el mismo procedimiento experimental utilizando sólo este compuesto, para encontrar hasta que concentración de NAC es posible la protección sin que afecte la viabilidad de la línea celular. Finalmente, se realizarán los ensayos en que se evalúa por un lado el carácter tóxico del APAP y el efecto protector del NAC en conjunto (ver diseño experimental en Figura 9).

Para encontrar las concentraciones a utilizar, se verá cómo afecta en el crecimiento el uso de APAP, comparando además tres condiciones del protector en el medio: i) sin el uso de éste, ii) con la incorporación del NAC previo al suministro de APAP (3 horas antes), y iii) el empleo del NAC después de la aplicación (3 horas después).

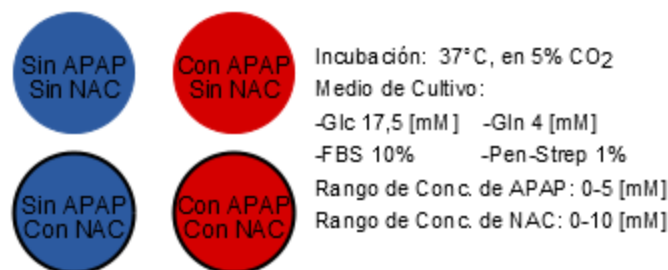


Figura 9: Diseño experimental del Estudio I.

2.5 Estudio II: Diferencias en el Crecimiento Celular en Glucosa y Fructosa

Este estudio tiene como objetivo de evaluar la actividad metabólica de las células HepG2 frente a diferentes fuentes de carbono. La gran diferencia con el caso anterior radica en la poca experimentación que se ha tenido con la línea celular HepG2 en este tema. Se ha establecido que una suplementación del medio con 5,5 [mM] de glucosa y 5 [mM] de fructosa es una condición representativa si se consumiera una dieta a base de HFCS (Hirahatake et al., 2011). Se utilizarán concentraciones que permitan comparar la generación triglicéridos bajo la exposición de diferentes fuentes de carbono. La hipótesis planteada para este ensayo será:

2.5.1 Hipótesis

Altos niveles de fructosa producen alteraciones en la actividad metabólica de las células hepáticas, cuyo principal efecto recae en el incremento de la síntesis y la secreción de triglicéridos.

2.5.2 Diseño Experimental

Está establecido que la concentración de glucosa en la sangre que se alcanza después de alguna comida no sobrepasa los 7,8 [mM] (Ceriello et al., 2008). En estudios *in vitro*, se ha trabajado con concentraciones cercanas a 10 [mM] como condición de alta concentración de azúcar (Hirahatake et al., 2011; Huang et al., 2011). Esta última será la concentración base del estudio, generando tres casos: i) considerando como caso control una dieta a base de endulzantes hecho de glucosa, se suplementará el medio con 10 [mM] de glucosa; ii) para el caso en que se considera una dieta a base de sacarosa o HFCS, se utilizará un medio con 5 [mM] de glucosa y 5 [mM] de fructosa; iii) finalmente, como existe discrepancia acerca de la síntesis de triglicéridos el HepG2, se considerará el caso extremo de una dieta a base de endulzantes hecho 100% de fructosa, suplementando el medio con 10 [mM] de esta azúcar (diseño experimental ilustrado en Figura 10).

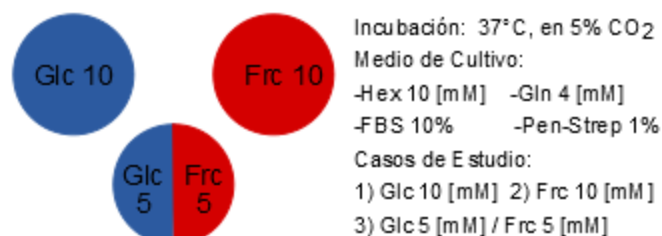


Figura 10: Diseño experimental del Estudio II.

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Crecimiento Celular Caso Control

A través de la realización de una curva de crecimiento se determinaron los parámetros basales sin la existencia de perturbaciones externas. Este crecimiento comenzó desde un inóculo de $0,25 \times 10^6$ [cel/ml], durante un período de evaluación de 8 días (180 horas aproximadamente) En la Figura 11 A, se observa la variación de la concentración de células vivas (datos de color azul) y el porcentaje con respecto al total de células (datos de color rojo), reflejando que las células HepG2 mantuvieron una buena viabilidad durante en tiempo de cultivo, sin descender del 90%.

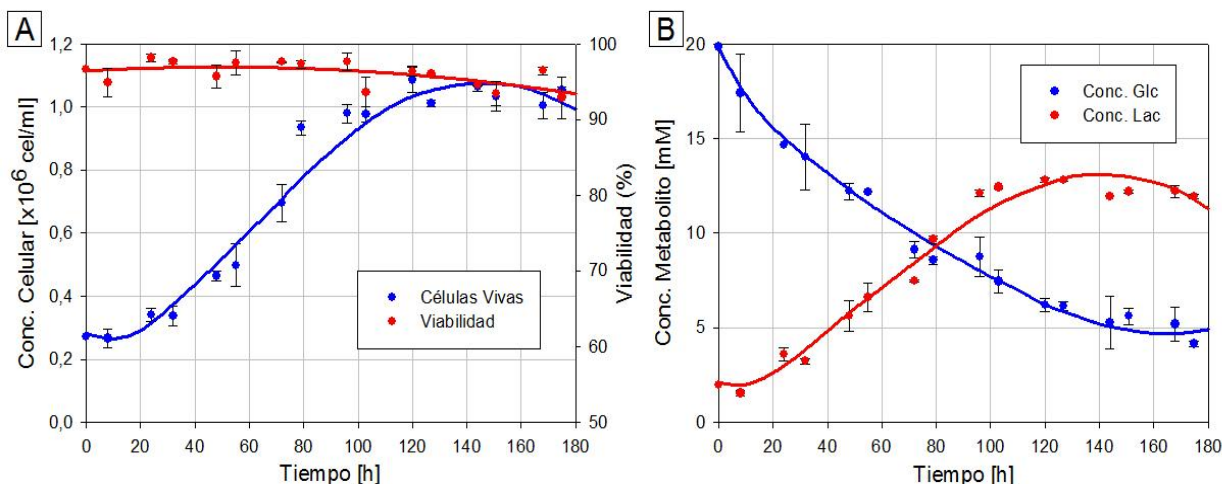


Figura 11: Cinética de crecimiento basal. Variación a lo largo del tiempo de: A) células vivas (azul) y viabilidad (roja); B) conc. de glucosa (azul) y conc. de lactato (rojo) (datos representan al promedio de dos muestreos \pm desv. estándar).

De la curva azul del gráfico A, se puede desprender que las células alcanzan una densidad celular máxima cercana a $1,1 \times 10^6$ [cel/ml]. El período de fase exponencial se encuentra en el rango entre las 30 y 80 horas de cultivo. Realizando una regresión lineal entre los datos de crecimiento celular (en escala logarítmica) y el tiempo de cultivo, se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento de $0,021$ [h^{-1}]. En rango para este parámetro en la literatura varía entre $0,018$ y $0,024$ [h^{-1}], por lo que el valor de velocidad obtenido se encuentra dentro de lo esperado (Burley et al., 2007; Zhang et al., 2008; Chang et al., 2009).

Por otra parte, en la Figura 11 B se observa la variación del consumo de glucosa (de color azul) y producción de lactato (de color rojo), obtenidas de las muestras de los sobrenadantes recolectados durante la confección de la curva. De la curva de glucosa es posible rescatar que no se consume toda la glucosa durante el período de cultivo, llegando a una concentración mínima de 5 [mM]. Las tasas de ambos compuestos, evaluadas en la mitad de la fase exponencial (55 [h]), son de $0,24$ y $0,25$ [mmol/ 10^9 cell/h] para glucosa y lactato, respectivamente, generando un Δ Lac/ Δ Glc de 1,04, indicando que existe una relación aproximada de 1:1 entre los moles de glucosa que se consumen y los moles de lactatos producidos por la célula. En la literatura, para este mismo parámetro se halló un rango entre 1,5 y 1,9, valores por sobre al calculado. Es importante mencionar que las condiciones de cultivo pueden ser la razón de las diferencias entre estos valores (Maier et al., 2007; Srivastava et al., 2007; Niklas et al., 2009). La Tabla 3 resume los parámetros de crecimiento mencionados.

Tabla 3: Resumen de parámetros de crecimiento de caso control.

Máxima densidad celular [$\times 10^6$ cel/ml]	Máxima velocidad de crecimiento μ_{\max} [h^{-1}]	$\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$
1,1 \pm 0,04	0,021	1,04

3.2 Modelo Hepático Propuesto

3.2.1 Presentación del Modelo

El modelo planteado ha sido diseñado a partir de lo expuesto en sus trabajos por parte de varios científicos que han trabajado con células hepáticas (Calik et al., 2000; Srivastava et al., 2007; Chang et al., 2009; Niklas et al., 2009), como también con otros sistemas celulares (Zamorano et al., 2010; Wilkens et al., 2011). Se consideran 32 reacciones, las cuales han sido revisadas con la base de datos de KEGG. Las vías metabólicas consideradas son: glicólisis, síntesis de lactato, reacción anaplerótica, ciclo TCA, metabolismo aminoácidos, ciclo de urea, síntesis de triglicéridos y formación de biomasa.

Glicólisis, vía por la cuál es incorporado los átomos de carbonos provenientes de la glucosa en el sistema, contempla 10 reacción enzimáticas. Sin embargo, es posible reducirla a 3 reacciones, donde Glucosa 6 fosfato (G6P) y Gliceraldehído 3 fosfato (G3P) representan 2 nodos que conectan otras vías. El primero, con la síntesis de carbohidratos y ácidos nucleicos, mientras que el segundo con la síntesis de lípidos. La entrada de fructosa es bastante similar. Primero se metaboliza en fructosa 1 fosfato y luego en 2 moléculas de G3P. Por esta razón, se utilizará estas tres ecuaciones para generalizar la entrada de cualquier de las dos hexosas (Hex), glucosa o fructosa. Además de la glicólisis, también se redujeron las vías de reacciones anapleróticas, ciclo TCA y ciclo de urea. Con respecto a los triglicéridos, la síntesis de éstos está representada por la unión de una molécula de glicerol 3 fosfato (que en el modelo sería un derivado de G3P) con tres cadenas de ácidos grasos de 8 carbono cada uno (palmitato). La formación de biomasa corresponde a una ecuación, cuya deducción será descrita más adelante. En la Tabla 4 se listan las 32 reacciones del modelo hepático, en las cuales, solo se muestran las especies que contienen carbono y/o nitrógeno en su estructura.

Tabla 4: Reacciones del modelo hepático propuesto.

Glicólisis
1. $Hex \rightarrow G6P$
2. $G6P \rightarrow 2G3P$
3. $G3P \rightarrow Pyr$
Síntesis de Lactato
4. $Pyr \rightarrow Lac$
Reacción Anaplerótica
5. $Pyr + CO_2 \rightarrow OAA$
Ciclo TCA
6. $Pyr \rightarrow AcCoA + CO_2$
7. $AcCoA + OAA \rightarrow \alpha KG + CO_2$
8. $\alpha KG \rightarrow SucCoA + CO_2$
9. $SucCoA \rightarrow Fum$
10. $Fum \rightarrow OAA$
Metabolismo de Aminoácidos
11. $Gln \rightarrow Glu + NH_4^+$
12. $Asp + \alpha KG \rightarrow OAA + Glu$
13. $2Gly \rightarrow Ser + CO_2 + NH_4^+$
14. $Glu + Cys + Gly \rightarrow GSH$
15. $Ser \rightarrow Pyr + NH_4^+$

16. $Orn \rightarrow Glu + NH_4^+$
17. $Ala + \alpha KG \rightarrow Pyr + Glu$
18. $Thr \rightarrow Gly + AcCoA$
19. $Val + \alpha KG \rightarrow Glu + SucCoA + CO_2$
20. $Leu + \alpha KG \rightarrow Glu + 3 AcCoA$
21. $Ile + \alpha KG \rightarrow Glu + AcCoA + SucCoA$
22. $Lys + 2\alpha KG \rightarrow 2Glu + 2CO_2 + 2AcCoA + 3NADH + 3H^+ + FADH_2$
23. $Pro \rightarrow Glu$
24. $His \rightarrow Glu + 2NH_4^+ + CO_2$
25. $Tyr + \alpha KG \rightarrow Glu + Fum + 2AcCoA + CO_2$
26. $Phe \rightarrow Tyr$
27. $Trp + \alpha KG \rightarrow 3AcCoA + 5CO_2 + NH_4^+ + Glu$
28. $Asn \rightarrow Asp + NH_4^+$
Ciclo Urea
29. $Arg \rightarrow Urea + Orn$
30. $Orn + Asp + CO_2 + NH_4^+ \rightarrow Arg + Fum$
Síntesis de Triglicéridos
31. $G3P + 24AcCoA \rightarrow TG$
Formación de Biomasa
32. $0,1039AcCoA + 0,0125Ala + 0,0070Arg + 0,0079Asn + 0,0137Asp + 0,0039Cys + 0,0044G3P + 0,0091G6P + 0,0166Gln + 0,0015Glu + 0,0210Gly + 0,0020His + 0,0036Ile + 0,0106Leu + 0,0177Lys + 0,0019Met + 0,0042Phe + 0,0068Pro + 0,0137Ser + 0,0055Thr + 0,0011Trp + 0,0039Tyr + 0,0049Val \rightarrow Biomasa + 0,0011Fum$

Se utilizará este único modelo para ambos ensayos, dado que el objetivo de este trabajo de tesis es la presentación de un modelo que permita el estudio metabólico en células HepG2, tanto para análisis de toxicidad de compuestos, como también para efectos en el metabolismo celular debido a suplementaciones diferentes. Los 37 metabolitos considerados, los cuales se listan en Tabla 5.

Tabla 5: Metabolitos del modelo hepático propuesto.

Metabolitos			
• Acetil CoA (AcCoA)	• Gliceraldehído 3P (G3P)	• Leucina (Leu) *	• Succinil CoA (SucCoA)
• α Cetoglutarato (α KT)	• Glucosa 6P (G6P)	• Lisina (Lys) *	• Triglicéridos (TG) *
• Alanina (Ala) *	• Glutamina (Gln) *	• Metionina (Met) *	• Treonina (The) *
• Arginina (Arg) *	• Glutamato (Glu) *	• Amonio (NH_4^+) *	• Triptofano (Trp) *
• Asparagina (Asn) *	• Glicina (Gly) *	• Oxaloacetato (OAA)	• Tirosina (Tyr) *
• Aspartato (Asp) *	• Glutación (GSH) *	• Ornitina (Orn)	• Urea *
• Biomasa *	• Hexosa (Hex) *	• Fenilalanina (Phe) *	• Valina (Val) *
• CO_2 *	• Histidina (His) *	• Prolina (Pro) *	
• Cisteína (Cys) *	• Isoleucina (Ile) *	• Piruvato (Pyr)	
• Fumarato (Fum)	• Lactato (Lac) *	• Serina (Ser) *	

En la Figura 12 se ilustra la red de flujos internos del modelo planteado. Cada flujo v_j corresponde a la tasa interna de cambio, que representa cada una de las reacciones presentadas en la Tabla 4 (enumeradas correlativamente). La forma de resolución del MFA será por medio del método de regresión lineal de mínimos cuadrados, con el cual, el vector V de los flujos intracelulares es despejado del trabajo matricial mostrado en la Ec. 8.

$$V = S^* \cdot R \text{ con } S^* = (S^T \cdot S)^{-1} \cdot S^T \quad \text{Ec. 8}$$

donde, R corresponde al vector de las tasas de consumo/producción de todos los metabolitos y S^* es la matriz pseudoestequiométrica.

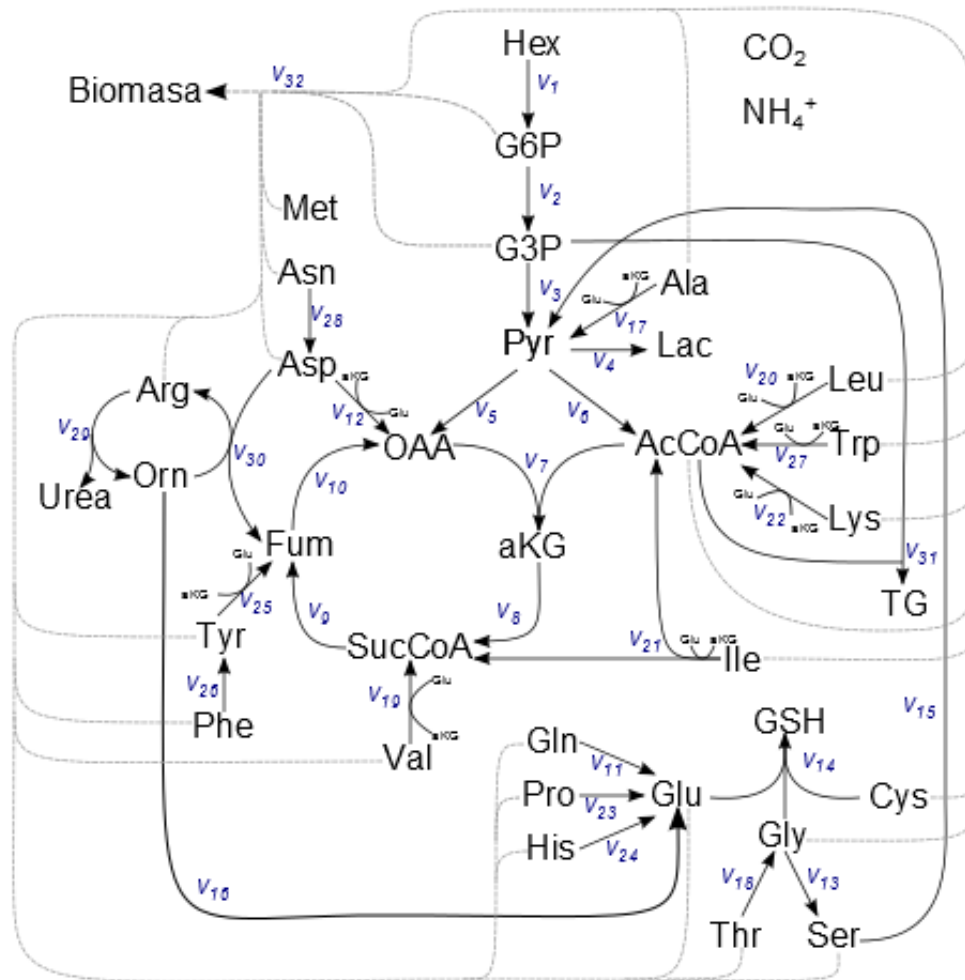


Figura 12: Red metabólica para MFA.

3.2.2 Ecuación de Formación de Biomasa

Uno de los pasos más complejos a la hora de definir un modelo que refleje el metabolismo de las células es precisamente definir la reacción de síntesis de biomasa. Utilizando las ecuaciones de formación de macromoléculas, reportadas en un trabajo en que se utiliza células HepG2 como modelo hepático (Niklas et al., 2009), se deducirán los coeficientes estequiométricos de las especies que participan en la reacción. En estas ecuaciones, dado que todos los compuestos son conocidos, es posible determinar la composición y la masa molar estimada de las macromoléculas, a través del balance de masa por especie en cada reacción: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (ver Tabla 6).

Tabla 6: Reacciones y masa molar de macromoléculas en HepG2.

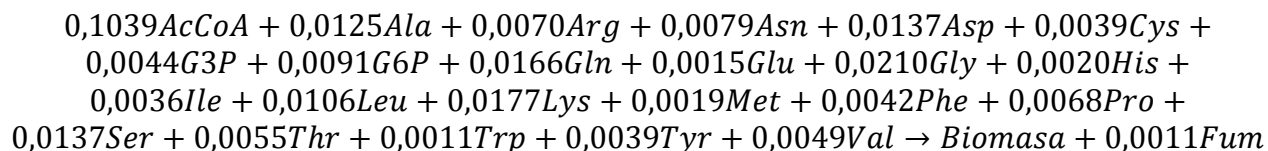
Macromolécula	Reacción	Masa Molar [gr/mol]
DNA	$1,295Asp + G6P + 1,41Gln + 0,5 Gly \rightarrow DNA + 0,205Fum + 1,41Glu$	413,55
RNA	$1,24Asp + G6P + 1,76Gln + 0,5 Gly \rightarrow RNA + 0,26Fum + 1,76Glu$	399,50
Carbohidrato	$G6P \rightarrow CH$	229
Lípido	$17,8AcCoA + 0,756G3P + 0,695Ser \rightarrow Lípidos$	925,66
Proteína	$0,0846Ala + 0,0471Arg + 0,0532Asn + 0,0532Asp + 0,0263Cys + 0,0613Gln + 0,0613Glu + 0,1265Gly + 0,0136His + 0,0245Ile + 0,0716Leu + 0,1196Lys + 0,0127Met + 0,0283Phe + 0,0459Pro + 0,0655Ser + 0,0374Thr + 0,0076Trp + 0,0263Tyr + 0,0333Val \rightarrow Proteína$	124,74

Además, en trabajo mencionado se especifica el contenido másico de las macromoléculas de una célula de HepG2. Al no considerar la masa de residuos obtenidos, los porcentajes de composición másica se redefinen como se muestra en la segunda columna de la Tabla 7 (Niklas et al., 2009). Lo que se busca estimar es la masa molar de la línea HepG2 tal que, utilizando la información de distribución másica, las reacciones de síntesis de macromoléculas, y las masa molares de éstas que se derivan de estas ecuaciones, se obtenga una composición elemental de una molécula de biomasa de la forma $C H_{\beta} O_{\gamma} N_{\delta}$. El valor final obtenidos para la masa molar que cumple con estas condiciones es de 26,725 [gr/mol], con una composición elemental final de $CH_{1,84}O_{0,61}N_{0,23}$. En la Tabla 7 se encuentra el detalle del cálculo de la composición por elementos que se obtiene al utilizar el valor de masa molar indicado.

Tabla 7: Composición másica , molar y aportes de C, H, O y N en HepG2.

Macromolécula	Porcentaje de masa (%)	Masa en 1 mol de célula	Moles en 1 mol de célula	Aporte de C	Aporte de H	Aporte de O	Aporte de N
DNA	2,70	0,689	0,002	0,020	0,044	0,023	0,006
RNA	4,34	1,105	0,003	0,032	0,072	0,035	0,010
Carbohidrato	3,78	0,962	0,004	0,026	0,057	0,040	0,000
Lípido	20,22	5,151	0,006	0,233	0,267	0,143	0,004
Proteína	68,96	17,567	0,148	0,689	1,401	0,365	0,208
Total				1,000	1,842	0,605	0,228

Con estos valores, la ecuación balanceada que se utiliza en el modelo queda de la siguiente manera:



A modo de comparación, sólo se han encontrados reportes de masa molares y/o composición elemental de otros sistemas de cultivo: para una célula CHO (*chinese hamster ovary*), la estimación es de 25,474 [gr/mol], con una composición elemental $\text{CH}_{1,98}\text{O}_{0,26}\text{N}_{0,49}$ (Hu, 2011); en otro reporte se indica que la composición promedio de microorganismos es $\text{CH}_{1,79}\text{O}_{0,50}\text{N}_{0,20}$ y una masa molar de 24,59 [gr/mol] (Doran, 1995). A pesar de corresponder a diferentes tipos de células, las masas molares difieren en menos de un 8% con respecto al valor encontrado, mientras que las composiciones elementales son bastante similares entre sí.

3.2.3 Supuestos del Modelo Planteado

Como se mencionó previamente, este modelo de flujos metabólicos fue diseñado a partir de los ejemplos encontrados en la literatura, por lo que muchos de los supuestos mencionados en las publicaciones, fueron adaptados en este modelo. A continuación, se listan todas las consideraciones utilizadas en la confección de modelos de vías metabólicas a utilizar:

- Existe un estado pseudo estacionario dentro de las células (Stephanopoulos et al., 1998; Calik et al., 2000; Srivastava et al., 2007).
- Los metabolitos están distribuidos homogéneamente en el interior de la célula (Stephanopoulos et al., 1998).
- No existe formación de cisteína a partir de metionina en células HepG2, debido a la baja actividad de la enzima S-adenosil-metionina sintetasa (Srivastava et al., 2007).
- No se incluyen ecuaciones de fosforilación oxidativa (Calik et al., 2000).
- La vía de las pentosas fosfato sólo son consideradas en la síntesis de ácidos nucleicos (Calik et al., 2000).
- Sólo se considera la degradación de aminoácidos como precursores de intermediarios de las vías principales (Calik et al., 2000).
- La secreción de TG en el caso de HepG2 es mucho menor que la acumulación de éstos en droplets lipídicos. La medición de la concentración de TG intracelular se considera como el flujo extracitosólico de estos compuestos (Srivastava et al., 2007).
- No se incorporan las reacciones de síntesis de cuerpos cetónicos, dado que, al no haber suplementado el medio con ácidos grasos, las síntesis de estos es ínfima (Srivastava et al., 2007).
- La acumulación de GSH se considera como flujo externo, dado a que es un producto final, al igual que los TG.
- La producción de CO_2 , está ligada al consumo de O_2 de las células, en una razón 1:1 (Wilkens et al., 2011).

3.2.4 Análisis de Matriz Estequiométrica

La matriz estequiométrica del modelo posee 37 filas, correspondientes a los 37 metabolitos del sistema, y 32 columnas de las 32 reacciones mencionadas previamente. Como existen más filas que columnas, el rango de la matriz se define como el máximo de columnas linealmente independiente. En este caso, el rango es de 32, indicando que corresponde a una matriz de rango completo, es decir, que la matriz multiplicada por su transpuesta es invertible, y el sistema de ecuaciones posee solución única.

El número de condicionamiento permite evaluar la sensibilidad del cálculo de los flujos internos frente a pequeñas perturbaciones en las mediciones de las tasas de consumo y producción. La fórmula para el cálculo de este parámetro es:

$$C(S) = \|S\| \cdot \|S^*\| \quad \text{Ec. 9}$$

donde, S es la matriz estequiométrica y S* su matriz pseudo inversa. Dado que es una matriz no cuadrada, se utiliza norma dos para el cálculo del número C(S). El valor entregado es de 171,04. Una matriz bien condicionada (*well-conditioned*) posee un número de condicionamiento entre 1 y 100, mientras que si supera este valor máximo, se habla de una matriz mal condicionada (*ill-conditioned*) (Stephanopoulos et al., 1998). Para reducir este valor, se dividió en un factor de 10 la columna 31, de la síntesis de triglicéridos, ya que AcCoA posee un coeficiente estequiométrico alto (ver ecuación en Tabla 4), lo que se traduce en un alto número de condicionamiento. Con esta modificación, el nuevo valor es 64,87, quedando la matriz como bien condicionada.

Siendo más específicos, es posible identificar cuales tasas externas y a que flujos afectan con una mayor sensibilidad, a través del análisis de la matriz pseudo inversa de la matriz estequiométrica (mostrada en la Tabla 8). Para ayudar al entendimiento de la matriz, se puede ver en esta tabla que las casillas han sido coloreadas de acuerdo a su grado de sensibilidad: i) Las no coloreadas tienen una sensibilidad entre]-0,7; 0,7[; ii) La de color azul, están dentro de los rangos [-1; -0,7] y [0,7 y 1]; iii) Finalmente, el color rojo será para los valores que sean menor a -1 o mayor a 1. Dado a que es la matriz pseudo inversa, las filas y las columnas hacen alusión a las reacciones y metabolito, respectivamente.

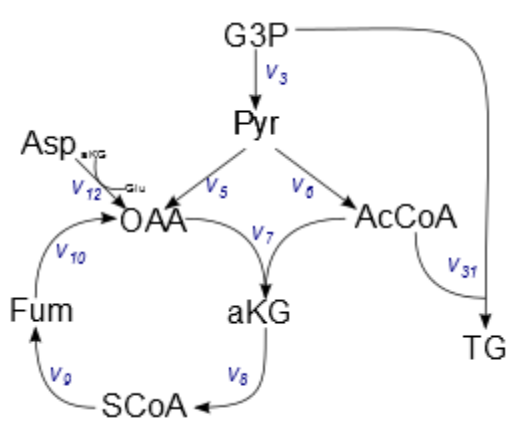


Figura 13: Flujos internos con mayor sensibilidad.

internos de AcCoA. Las mediciones de estos cinco metabolitos son las que se deben hacer con mayor cuidado y precisión, dado que son las que más afectan al sistema.

De la matriz es posible desprender que las filas 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 31 son las que presentan una mayor sensibilidad a las mediciones, al momento de calcular las tasas internas. Estas reacciones corresponden al paso de G3P a piruvato, reacción anaplerótica, ciclo TCA, paso de aspartato a oxaloacetato y formación de TG (mostradas en Figura 13). Analizando a que metabolitos poseen los valores altos de sensibilidad, se determinan que los que más se repiten a lo largo de estas reacciones son hexosa, leucina, lisina, triptófano y TG. Exceptuando por la entrada de carbohidrato, todos los demás metabolitos mencionados corresponden a tasas de intercambio externas que tienen directa relación con los niveles

Tabla 8: Matriz pseudo inversa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0		
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,0	0	0	0	0	-1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0		
3	0	0,1	0	-0,1	0	0	0	0	0	0,1	-0,9	-1,8	0	0	0	0	-1,8	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0,1	0,4	0	0,2	0,1	-0,1	0	0		
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	1,0	-0,5	-0,2	0,4	0,5	0	0	-0,2	1,0	0	0	0,4	0,5	0	0,2	0	0,3	0,4	0	-0,6	-1,1	0	0	1,0	0,4	0,4	0,5	0	-0,1	1,0	-0,4	-0,1	-0,7	0,4	-0,6	0,5		
6	0	-0,8	-0,5	0,3	-0,3	-0,5	0	0	0,3	-0,8	-0,9	-1,8	-0,3	-0,5	-0,2	-0,3	-1,8	0	-0,4	-0,9	0,6	0,9	0	0,2	-0,8	-0,3	-0,3	-0,5	-0,9	-0,7	-0,8	1,0	-0,2	1,0	-0,3	0,6	-0,5		
7	0	1,4	-0,4	-0,5	-0,3	0,1	0	0,5	-0,3	0,9	0,4	0,8	0,2	0,6	0	0,3	0,8	0,3	0	0,4	-1,0	-0,7	0	-0,4	0,9	0,2	0,5	0,6	0,4	0	0,9	-1,0	0	1,0	0,5	-0,7	0,6		
8	0	0,4	-0,2	-0,6	0,2	0,3	0	0,5	0	0,9	0,4	0,8	-0,4	-0,2	0,3	0	0,8	0	0,2	0,4	-0,8	-0,3	0	-0,1	0,9	-0,4	0,7	-0,2	0,4	0,3	0,9	-0,9	0,2	1,5	0,7	-0,3	0,8		
9	0	0,4	0	-0,5	0,2	0,4	0	0,5	0	0,9	0,4	0,8	-0,3	-0,1	0,2	0	0,8	0	-0,6	0,4	-0,6	0	0	-0,2	0,9	-0,3	0,8	-0,1	0,4	0,2	-0,1	-0,8	0,2	1,5	0,8	-0,2	-0,1		
10	0	0,4	0	0,1	0	0,5	0	0,5	0	0	0,4	0,9	-0,5	0	0	0	0,9	-0,4	-0,5	0,4	-0,5	0	0	-0,4	0,9	-0,5	-0,1	0	0,4	0	0	-0,4	0	1,4	-0,1	0,6	0		
11	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	0	0	0,2	-0,4	-0,7	-0,8	0	0	-0,1	0	0	0	0,3	0,1	0,1	0,1	0	0,4	0,1	0	0,1	0,3	0	0,1	0	0,3	0,1	0,1	0	0,1	0	-0,2	0,1	0,3	0,1	-0,7	0,1		
13	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	-0,4	-0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0	-0,4	0	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,5	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0	0,2	0	0	0	0,1	0	-0,3	-0,2	0	0,3	0	0	0	-0,2	0	0,2	0	0,1	0	0	0	-0,8	0	0	-0,3	0,1	0	0,1	0	0	
16	0	0	0	-0,6	0,2	0	0	0	-0,1	0	0	0	0,2	0	0,1	0,1	0	0,3	0	0	0	0,1	0	0,1	0	-0,8	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0,2	0	0,2	0	0	
17	0	0	-0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,9	
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1	0	0,1	-0,7	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0,1
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	-0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1	0
25	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0,2	0	0	0	0	-0,9	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0	-0,9	0	0,1	0	
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0,1	-0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	0
30	0	0	0	0,6	-0,2	0	0	0	0,1	0	0	0	-0,2	0	-0,1	-0,1	0	-0,3	0	0	0	-0,1	0	-0,1	0	-0,2	0	0	0	-0,1	0	0,1	-0,1	-0,2	0	0,8	0	0	
31	-0,3	-0,9	0,2	0,7	0,2	0	0	-0,2	0,2	-0,7	-0,5	-1,0	0	-0,1	-0,2	-0,2	-1,0	0	-0,3	-0,5	-0,3	0,5	0	0,1	-0,7	0	-0,8	-0,1	-0,5	-0,4	-0,7	1,1	-0,6	-1,0	-0,8	0,7	-0,1	0	
32	0	0	0	0	0	0	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.2.5 Parámetros Estimados

Peso seco de células HepG2.

La tasa de producción de biomasa se obtiene a partir del gráfico de acumulación de biomasa, el cuál entrega la velocidad de crecimiento punto a punto. Dado que las dimensiones de ésta son [h^{-1}], es necesario multiplicar este valor por el inverso de la masa molar y por el peso seco de las células HepG2. El primero es 26,725 [gr/mol]. El segundo se obtuvo de bibliografía, en donde se indica que para una célula animal promedio, una buena estimación del peso seco es 450 [gr/ 10^9 cel] (Hu, 2011). Al hacer estas conversiones, se tiene un valor de tasa específica de biomasa en [mmol BM/ 10^9 cel/h].

Por otra parte, de los 37 metabolitos presentados en la Tabla 5, sólo 28 realizan intercambio con el medio extracelular (o son productos terminales como el caso de triglicéridos y glutatión), señalados con un * en la tabla mencionada. Sin embargo, sólo 25 tasas externas de intercambio se medirán, a través de los métodos señalados en Tabla 2. Lo que respecta a las tasas de producción de CO_2 , glutatión y úrea, a continuación se detalla la forma de estimar cada una.

Tasa de producción de CO_2

Se obtuvo de la literatura un valor de tasa específica de consumo de oxígeno para HepG2 de $3,72 \times 10^{-16}$ [mol O_2 /cel/s] (Corstorphine et al., 2011), lo que es equivalente a decir $2,23 \times 10^{-2}$ [mmol O_2 / 10^9 cel/h]. Se multiplicó este valor por 0,014 [$\times 10^9$ cel], que corresponde a la cantidad células obtenidas para el caso G10 del estudio II (escogido arbitrariamente), para así obtener una tasa de producción de oxígeno de $9,41 \times 10^{-3}$ [mmol O_2 /h]. Dado que el consumo de oxígeno está ligada a la producción de CO_2 es una relación 1:1, esta tasa será utilizada para todos los casos de estudio como la de producción de CO_2 .

Tasa de producción de Glutatión

No se cuenta con un mecanismo de cuantificación de este metabolito, por lo que se utilizará la aproximación ilustrada en la Figura 14. Tomando en cuenta el supuesto de pseudoestado estacionario en el modelo planteado, toda la cisteína que entra a la célula es metabolizada en GSH o utilizada para la síntesis de proteica. Haciendo un balance de masa de cisteína, la tasa de formación de glutatión queda determinada como se muestra a continuación:

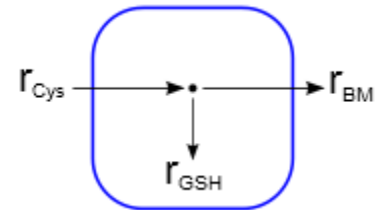


Figura 14: Estimación para tasa de GSH.

$$r_{GSH} = r_{Cys} - r_{Cys_protein} \quad \text{Ec. 10}$$

El último término corresponde a un factor de 0,0037 de la tasa de formación de Biomasa (ver ecuación de formación de Biomasa), por lo que la ecuación 6 queda de la forma:

$$r_{GSH} = r_{Cys} - 0,0037 \cdot r_{BM} \quad \text{Ec. 11}$$

Tasa de producción de Úrea

La tasa de producción de úrea se obtiene a partir del cálculo de la tasa de formación de ornitina, ya que provienen de la hidrólisis de arginina (en una razón de 1:1). Al igual que el caso anterior, se realiza un balance de masa de los compuestos que participan en el ciclo de la urea, arginina (Arg) y ornitina (Orn) (ver Figura 15), bajo el estado de pseudo estacionario.

$$\frac{d[Arg]}{dt} = 0 = r_{Arg_in} + r_{Orn \rightarrow Arg} - r_{Arg \rightarrow Orn} \quad \text{Ec. 12}$$

$$\frac{d[Orn]}{dt} = 0 = r_{Arg \rightarrow Orn} - r_{Orn \rightarrow Arg} - r_{Orn \rightarrow Glu} \quad \text{Ec. 13}$$

La piedra de tope en estas dos últimas ecuaciones es la tasa de cambio de ornitina a glutamato. Hacer un balance de masa de glutamato es acomplejar este sistema, debido a que éste participa en una gran cantidad de reacciones. Del trabajo de Srivastava (2008), en donde realizan MFA con células HepG2, se obtuvo como resultado que del flujo total consumo de ornitina, entre un 2% y un 4% es destinado a la arginina como parte del ciclo, mientras que el resto es enviado a formación de glutamato (más adelante se discutirá la validez de este supuesto). Utilizando este dato, puedo aproximar $r_{Orn \rightarrow Glu}$:

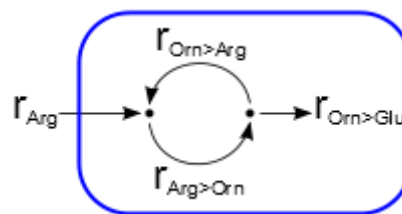


Figura 15: Estimación para tasa de úrea.

$$\frac{r_{Orn \rightarrow Arg}}{r_{Orn \rightarrow Glu}} = \frac{3\%}{97\%} \rightarrow r_{Orn \rightarrow Glu} = \frac{97}{3} \cdot r_{Orn \rightarrow Arg} \quad \text{Ec. 14}$$

Al cambiar esto último en la Ec. 13, es posible despejar la tasa de producción de arginina a partir de ornitina.

$$\frac{100}{3} \cdot r_{Orn \rightarrow Arg} = r_{Arg \rightarrow Orn} \rightarrow r_{Orn \rightarrow Arg} = 0,03 r_{Arg \rightarrow Orn} \quad \text{Ec. 15}$$

Finalmente, cambio esta tasa en la Ec. 12, y despejo la tasa de cambio de arginina a ornitina.

$$0 = r_{Arg_in} + 0,03 r_{Arg \rightarrow Orn} - r_{Arg \rightarrow Orn} \quad \text{Ec. 16}$$

$$r_{urea} = r_{Arg \rightarrow Orn} = \frac{100}{97} r_{Arg_in} \quad \text{Ec. 17}$$

Cabe destacar que en base al ajuste de estas 3 últimas tasas de producción se busca cerrar los balances de carbono y nitrógeno global en cada caso a estudiar. La tasa de producción de CO_2 sólo contribuye con átomos de carbono producidos, y es altamente incidente en los flujos del ciclo TCA, mientras que la tasa de úrea es la encargada de regular la salida de nitrógeno, y por ende, los flujos internos del ciclo de urea, junto con la transaminación de oxaloacetato a aspartato (flujo v_{12}) son altamente sensibles a los ajustes de esta tasa. Finalmente, GSH corresponde a un flujo de salida tanto de carbono como de nitrógeno, por lo que permite regular ambos balances, a pesar de que su efecto sólo se ve reflejado en su flujo de síntesis (flujo v_{14}).

3.3 Estudio I: Toxicidad del APAP y Protección con NAC

3.3.1 Análisis del Crecimiento I

Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, a pesar de que existen antecedentes del uso de APAP y de NAC en la literatura, es necesario realizar ensayos previos que permitan visualizar el efecto tóxico y el efecto protector de los compuestos mencionados, respectivamente. Estos resultados se encuentran detallados en el Anexo E: Resultados Preliminares.

Las concentraciones de APAP y NAC seleccionadas del trabajo previo son 1 y 5 [mM], respectivamente. Este último, siendo aplicado 3 horas antes y 3 horas después de la incorporación del APAP en el medio. El esquema de la Figura 16 muestra la planificación de este ensayo, el cuál duró un período de cultivo de 7 días, realizando dos muestreos diarios (cada 12 horas aproximadamente), en duplicado, partiendo de un inóculo de $0,25 \times 10^6$ [cel/ml].

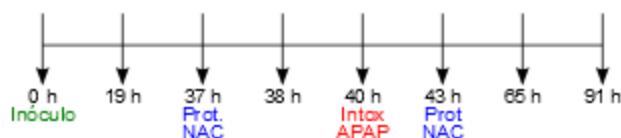


Figura 16: Planificación de ensayo de efecto mixto de APAP y NAC (las fechas indican los muestreos).

En el gráfico de la Figura 17 se observa los 4 casos de combinación de reactivos evaluados en este ensayo: i) Crecimiento celular en ausencia de APAP y NAC (caso control, color azul); ii) Crecimiento sólo con APAP en el medio (color verde); iii) Crecimiento con APAP y protección previa (color rojo); y iv) Crecimiento con APAP y protección posterior (color violeta).

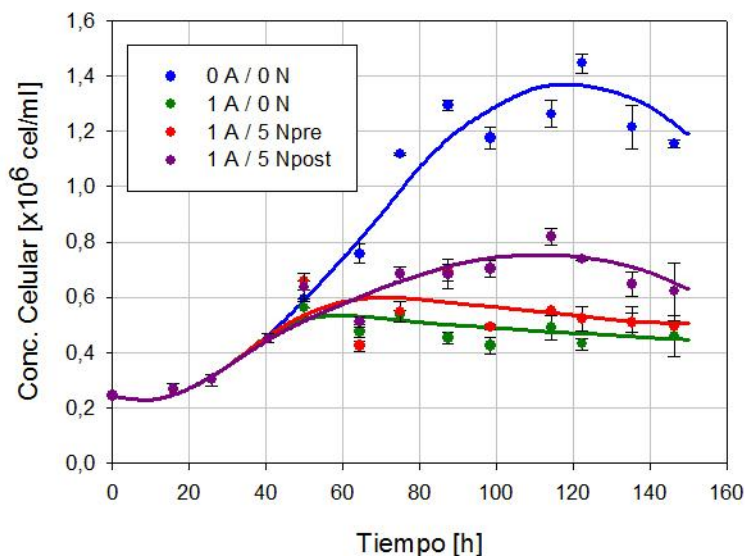


Figura 17: Ensayo de efecto mixto de APAP (A) y NAC (N). Cinética de Crecimiento en: 0 A y 0 N (azul), 0 A y 1 N (verde), 1 A y 5 Npre (rojo) 1 A y 5 Npost (violeta) (datos representan al promedio de 2 muestras \pm desv. estándar).

En este ensayo, la curva control alcanza una mayor densidad celular (11%) que los demás casos, cercana a $1,23 \times 10^6$ [cel/ml], y levemente mayor al reportado en la Figura 11. La fase

exponencial se extiende desde las 30 a las 80 horas de cultivo, aproximadamente. La velocidad de crecimiento máxima obtenida durante este período fue de $0,024 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, con una diferencia del 13% del control de la Figura 11. El daño que produce el APAP sobre el crecimiento es inmediato. La curva verde de la Figura 17, refleja como la concentración celular comienza a disminuir desde el instante en que se aplicó APAP en el medio (a partir de las 40 [h]). El caso de protección previa no mostró mejorar el crecimiento de una manera efectiva, dado que existe una disminución en la concentración celular, similar al caso sin protección. En cuanto a la protección posterior, hubo un mejor comportamiento de las células HepG2, alcanzando una densidad celular máxima de $0,7 \times 10^6 \text{ [cel/ml]}$ (58% del control). La velocidad de crecimiento máxima en fase exponencial (entre 30 y 80 [h]) para este caso fue de $0,012 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, correspondiente a un 50% más lento que el caso control (ver resumen de estos parámetros en Tabla 9).

Tabla 9: Resumen de parámetros de crecimiento del estudio I.

Caso	Máxima densidad celular [$\times 10^6 \text{ cel/ml}$]	Máxima velocidad de crecimiento μ_{max} [h^{-1}]
0 APAP / 0 NAC	$1,23 \pm 0,11$	0,024
1 APAP / 0 NAC	$0,49 \pm 0,04$	-
1 APAP / 5 NAC pre	$0,52 \pm 0,08$	-
1 APAP / 5 NAC post	$0,70 \pm 0,06$	0,012

Es necesario señalar las diferencias que se obtuvieron en los ensayos experimentales de este estudio con los hechos expuestos en la literatura. De acuerdo al nomograma de Rumack-Matthew (Figura 18), con que se estima en que condición se encuentra el hígado de pacientes que han sufrido una intoxicación por sobredosis, a las 4 horas de exposición al APAP, si tiene una concentración en el plasma entre 1 y 1,3 [mM] se habla de una posible intoxicación, mientras que si supera los 1,3 [mM] lo más probable es que el hígado se encuentre en un estado de toxicidad alta (Schilling et al., 2010). Más aún, de acuerdo al trabajo realizado en células HepG2, se establece que para obtener un mismo daño hepáticos *in vitro* es necesarios utilizar una mayor concentración de APAP en el medio, utilizando en ese trabajo una concentración de 5 y 10 [mM] del compuesto (Manov et al., 2004). De forma contraria, en este estudio se obtuvo que las células HepG2, bajo estas condiciones de cultivo, son mucho más sensibles a lo esperado.

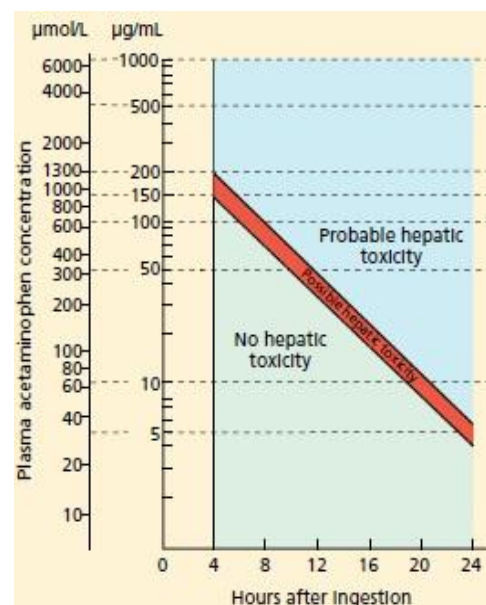


Figura 18: Nomograma de Rumack-Matthew (Schilling et al., 2010)

Por un lado, el efecto de APAP sobre las células en cultivo fue inmediato. En el primer ensayo (ver en Anexo E: Resultados Preliminares) la presencia del APAP en el medio de cultivo interfiere con el período de adhesión de las células en las placas, causando un daño fulminante. Fue crucial la mejora en el diseño experimental de esperar a que las células lleguen a fase estacionaria. Como se observa en la Figura 17, inmediatamente luego de aplicar el APAP a las 40 horas del inóculo, la concentración celular se estanca, y comienza su decaimiento. Por otro lado, la alta sensibilidad mostrada por la línea HepG2 también se ve reflejada en los valores de concentraciones de APAP utilizados. En el segundo ensayo (ver Anexo E: Resultados Preliminares), cuando se utiliza una concentración de $0,5 \text{ [mM]}$ se obtuvo que el crecimiento fue

más lento, es decir, que sí existió un grado de toxicidad, a pesar de que la concentración utilizada se encuentra por debajo del rango de posible toxicidad. Además, utilizando una concentración de 1 [mM], hubo esta inmediata disminución del crecimiento mencionada anteriormente.

De acuerdo a la literatura, se ha reportado que las células tumorales sobreexpresan proteínas transportadoras de membrana, como la Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1), disminuyendo la sensibilidad por las drogas de estas células (Roelofsen et al., 1997). Además, en otro reporte se obtuvo como resultados que la inhibición de la expresión de estas proteínas, tanto en HepG2 como en Hep3B, produce un aumento en la afinidad de las células por el APAP (Manov et al., 2004). Por lo tanto, en el caso particular de este estudio, las células HepG2 con las que se realizaron los ensayos pueden tener ciertas diferencias a nivel de proteínas de membrana con las de los trabajos mencionados, como producto del almacenamiento y/o condiciones de cultivo, y que trae como consecuencia un aumento en los flujos de entrada del APAP a la célula.

Por otro lado, además de las diferencias en cuanto al transporte de APAP, existe también la alternativa de que a nivel intracelular los efectos de este compuesto se hayan visto incrementados por esta alta sensibilidad. Como se mencionó en la introducción, la intoxicación con APAP produce un efecto dependiente de las enzimas CYP, y otros independientes a éste. En el primer caso, la actividad de las enzimas de fase I y fase II son las encargadas de eliminar los compuestos a través de la formación de metabolitos intermediarios y su posterior conjugación. Durante la intoxicación con APAP, la sobreproducción NAPQI, reduce los niveles de GSH intracelular, tanto por su utilización en las reacciones de conjugación, como también en su oxidación para contrapesar el estrés oxidativo originado estos compuesto intermediarios altamente reactivos como el NAPQI (Dai et al., 1995). Como fue mencionado en la introducción, las células HepG2, como toda línea celular hepática, tiene un bajo nivel de expresión de enzimas de fase 1 y fase 2 (Westerink et al., 2007; Westerink et al., 2007), y por lo tanto, no están capacitadas molecularmente para eliminar los residuos derivados de APAP con una alta eficiencia. No es errado pensar que existe la opción de que debido a la alta sensibilidad presentada por las células en este ensayo, se haya generado un alto nivel de estrés oxidativo, utilizando las reservas de GSH disponible para contrarrestar este efecto. Además, hay que considerar el efecto independiente a las enzimas de desintoxicación, y que corresponde al efecto antiproliferativo generado por las desestabilizaciones a nivel de mitocondria, homeostasis de ion calcio, supresión de la fosforilación oxidativa y deficiencia en las síntesis de ATP, afectando en los mecanismos de procesos involucrados en el crecimiento de las células HepG2 (Dai et al., 1995).

En cuanto a la protección, en el hígado se almacena gran capacidad de GSH, manteniendo el balance entre su síntesis y su exportación hacia el plasma, bilis y al interior de las mitocondrias. Este elevado nivel de GSH se debe principalmente a que los hepatocitos son capaces de convertir metioninas en cisteínas (Lu, 1999). Frente a una fuerte intoxicación con APAP, el NAC es el tratamiento más utilizado, ya que aumenta los niveles de cisteína disponible en la sangre. En estudios in vitro con células HepG2, es crucial la incorporación de NAC para elevar los niveles de cisteína intracelular, dado a que, a diferencia de los hepatocitos, esta línea celular no puede metabolizar cisteína a partir de metionina, por la falta de la enzima encargada de esta reacción (Lu, 1999).

Una teoría que explicaría estas diferencias de los resultados de protección es que el efecto preventivo, a pesar de que permite que las células se encuentren mejor preparadas frente a una intoxicación con APAP, el NAC, y en particular la cisteína que aporta, puede ser metabolizada en otras proteínas, y no precisamente en GSH. En cambio, en el segundo caso, las células se

encuentran en un estado de estrés, por lo que las cisteína entregada por el NAC tiene prioridad por restablecer los niveles de GSH, constituyéndose así su efecto curativo.

3.3.2 Análisis Metabólico I.

El análisis del metabolismo de las células se hará en base al cambio en la concentración de los metabolitos externos, para luego obtener las tasas de consumo/producción para cada uno, las cuales serán utilizadas para desarrollar el MFA. Dado los resultados mostrados en la Figura 17, para este ensayo se evaluaron tres caso: i) caso control, sin APAP ni NAC (0A/0N); ii) caso con presencia de APAP en el medio (1A/0N); iii) el único caso en que NAC fue efectivo (protección post) (1A/5N). Se escogieron dos tiempos dentro de la fase exponencial (entre 30 y 80 horas de cultivo) para realizar las mediciones. Como se explicó anteriormente, la tasa de producción de triglicéridos (TG) será obtenida a partir de la cuantificación de la concentración intracelular, por lo que este ensayo se realizó en placas de 100 [mm] para juntar una cantidad suficiente, medible con el kit de triglicéridos. En síntesis, en este ensayo se evaluó para cada uno de los casos mencionados, los metabolitos en dos tiempos, 58 y 70 [h], en uniplicado. A continuación, se analiza caso a caso los resultados obtenidos. En la Figura 19, se ilustran las variaciones de la concentración celular, glucosa y lactato obtenidas para los casos mencionados. Cabe destacar que las barras de error mostradas en los gráficos se construyeron en base a que se repitió las mediciones por lo menos dos veces, de una misma muestra.

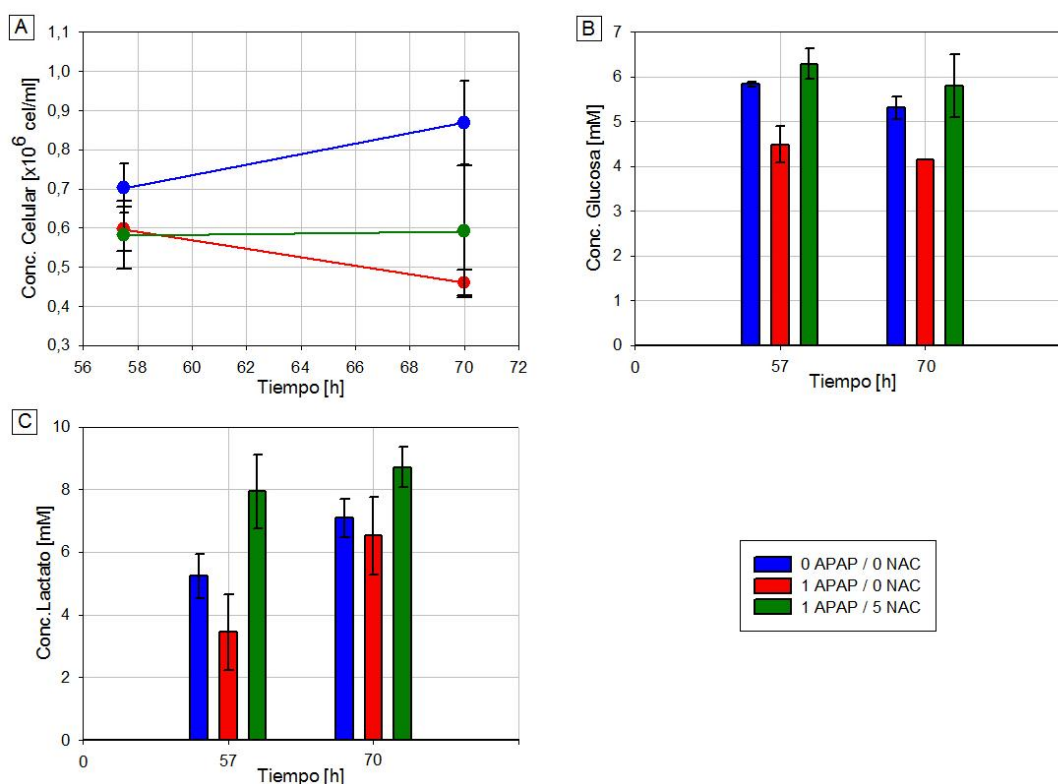


Figura 19: Análisis Metabólico de Estudio 1. Variación a lo largo del tiempo de: A) densidad celular, B) glucosa, C) lactato (datos representan al promedio de dos mediciones de una misma muestra \pm desv. estándar).

3.3.2.1 Caso 1.1: 0 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (0A/0N)

En la Figura 19 A es posible ver la variación de la concentración celular durante el período de cultivo (de color azul). De los datos obtenidos, es posible calcular una velocidad de crecimiento de $0,017 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, un 30% menor al obtenido de la curva control de la Figura 17. La diferencia radica en que, de acuerdo al ensayo anterior, se esperaba una densidad celular mayor a las 70 horas, por sobre los $0,9 \times 10^6 \text{ [cel/ml]}$. Una explicación de este hecho es que al trabajar con un volumen mayor de células, pueden presentarse problemas de distribución homogénea en la placa de cultivo, produciéndose algún tipo de inhibición por contacto entre ellas. Además, la medición de la concentración celular fue más dificultosa, hecho que se ve reflejado en lo ancho de la barra de error del segundo punto.

Existe una gran diferencia en la medición de la concentración de glucosa, comparándola con los datos de la Figura 11 B. En este caso se obtuvo que en los dos tiempos evaluados, la concentración de glucosa se encuentra por debajo de los 6 [mM], mientras que para en el caso anterior, a las mismas horas, las concentración no habían bajado de los 10 [mM]. Existe una contradicción entre los valores obtenidos, ya que no debería haberse consumido la fuente de carbono más rápido, siendo que hubo un crecimiento más lento. Las mediciones de lactato también se encuentran por debajo de las mediciones mostradas en la Figura 11. El $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ para este caso es de 3,3, tres veces mayor al control de la Figura 11. En la Tabla 10 se muestran las tasas específicas de glucosa y lactato de este ensayo. A las 57 [h], la tasa de producción de lactato es un 20% menor, mientras que la de glucosa es un 75% menor que la del control mencionado, lo que explicaría el elevado valor de $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$, indicando que existió un error en las mediciones de este último, subestimando su valor real.

Tabla 10: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio, en $[\text{mmol}/10^9 \text{ cel/h}]$.

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Biomasa	$3,13 \times 10^{-1}$	$2,54 \times 10^{-1}$
Glucosa	$-6,26 \times 10^{-2}$	$-5,08 \times 10^{-2}$
Lactato	$2,07 \times 10^{-1}$	$1,68 \times 10^{-1}$
Triglicéridos	$5,16 \times 10^{-4}$	$4,19 \times 10^{-4}$
Amonio	$4,96 \times 10^{-3}$	$4,02 \times 10^{-3}$

Además, la Tabla 10 muestra los valores de las tasas específicas de intercambio de triglicéridos y amonio (el signo negativo corresponden a tasas de consumo, mientras que el positivo serán tasas de producción), indicando que existió una producción de TG y de amonio. Se observa también que las tasas de producción de TG son tres órdenes de magnitud menores que las tasas de producción de biomasa y de lactato, indicando que la síntesis de TG es una salida de carbono menos importante en este caso.

Tabla 11: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos, en [mmol/10⁹cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo		Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Histidina	-4,36 x10 ⁻⁴	-3,54 x10 ⁻⁴	Alanina	-1,86 x10 ⁻⁴	-1,51 x10 ⁻⁴
Isoleucina	-3,63 x10 ⁻³	-2,94 x10 ⁻³	Arginina	-1,18 x10 ⁻²	-9,62 x10 ⁻³
Leucina	-9,84 x10 ⁻⁴	-7,99 x10 ⁻⁴	Asparagina	-8,34 x10 ⁻⁴	-6,77 x10 ⁻⁴
Lisina	-1,30 x10 ⁻³	-1,05 x10 ⁻³	Aspartato	-2,2 x10 ⁻⁴	-1,79 x10 ⁻⁴
Metionina	-5,61 x10 ⁻⁴	-4,55 x10 ⁻⁴	Cisteína	-3,55 x10 ⁻³	-2,88 x10 ⁻³
Fenilalanina	-9,68 x10 ⁻⁴	-7,85 x10 ⁻⁴	Glutamina	-2,94 x10 ⁻²	-2,38 x10 ⁻²
Treonina	-7,77 x10 ⁻⁴	-6,30 x10 ⁻⁴	Glutamato	5,42 x10 ⁻³	4,4 x10 ⁻³
Triptofano	1,73 x10 ⁻¹	1,40 x10 ⁻¹	Glicina	1,79 x10 ⁻¹	1,45 x10 ⁻¹
Valina	-4,55 x10 ⁻³	-3,70 x10 ⁻³	Prolina	-1,48 x10 ⁻³	-1,20 x10 ⁻³
			Serina	2,37 x10 ⁻³	1,92 x10 ⁻³
			Tirosina	-2,27 x10 ⁻³	-1,84 x10 ⁻³

Viendo la magnitud de las tasas de la Tabla 11 de los 20 aminoácidos, es posible indicar que las tasas son mayores a las 57 [h] de cultivos. Los aminoácidos que presentan una alta tasa de intercambio son arginina, glicina, glutamina, glutamato y triptófano, en dos o tres órdenes de magnitud por sobre los demás aminoácidos. Cabe destacar que en los trabajos en que se calculan tasas específicas de aminoácidos en células HepG2, se han reportado tasas de producción de alanina y serina como vía de eliminación de flujos de carbono y nitrógeno, en respuesta a los altos niveles de piruvato intracelular, como también de glutamato y prolina por causa del alto flujo de glutamina que estaría entrando a la célula (Srivastava et al., 2007; Niklas et al., 2009). Bajo este contexto, en este caso las tasas de producción calculadas son de triptófano, glutamato, glicina y serina. Tomando en cuenta que triptófano es un aminoácido esencial, y la magnitud de tasa específica, es posible que esta medición esté sujeta a un error. En la siguiente sección se analizará como cierran los balances de carbono y nitrógeno a partir de estas tasas de intercambio obtenidas, para luego realizar el MFA correspondiente.

3.3.2.2 Caso 1.2: 1 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (1A/0N)

Como era de esperarse, la aplicación individual del acetaminofén en el medio produce la disminución de la densidad celular en el cultivo, bajando de 0,6 a 0,46 [x10⁶ cel/ml] (Figura 19 A), lo que se traduce en una tasa de consumo de biomasa negativa, como se ve en la Tabla 12. Por otra parte, en la misma tabla se observan las tasas de consumo y producción de glucosa y lactato, respectivamente. A diferencia del caso 1.1, tanto las tasas específica de glucosa como de lactato crecen después de las 13 horas de cultivo, debido a la disminución de la biomasa del cultivo. En cuanto a las magnitudes, la tasa de producción aumenta en más de un 100% con respecto al caso 1.1, lo que se traduce en un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 7,1, valor por sobre el esperado teórico. Una explicación de este fenómeno sería que las células, por encontrarse en etapa de muerte celular, no sólo están utilizando la glucosa como fuente de carbono, sino que también algún otro compuesto dentro de su metabolismo. Como se puede ver en la Tabla 12, además de la glucosa, también se está consumiendo triglicéridos a una tasa menor (en un orden de magnitud), pero con la probabilidad que se estén utilizando estas moléculas como fuente de carbono alternativa.

Tabla 12: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Biomasa	-3,29 x10 ⁻¹	-4,35 x10 ⁻¹
Glucosa	-5,57 x10 ⁻²	-7,37 x10 ⁻²
Lactato	3,96 x10 ⁻¹	5,24 x10 ⁻¹
Triglicéridos	-2,63 x10 ⁻³	-3,48 x10 ⁻³
Amonio	-6,42 x10 ⁻⁴	-8,50 x10 ⁻⁴

En la Tabla 13 es posible ver las tasas de consumo/producción calculadas para los aminoácidos. Al igual en la Tabla 12, la baja en la densidad celular produjo un aumento de las tasas específicas a las 70 horas. Comparando los valores con el caso anterior, por lo menos 14 aminoácidos presentan tasas de consumo mayor, incluso en un orden de magnitud, lo que de alguna forma es consistente con la teoría de que las células están ocupando otras fuentes de carbono además de glucosa. Continuando con la comparación, para este caso hubo consumo de arginina, serina y triptofano, y producción de glutamato. Además, la tasa de producción glicina disminuyó en un orden de magnitud.

Tabla 13: Caso 1.2. Tasas específicas de aminoácidos de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo		Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Histidina	-2,47 x10 ⁻³	-3,27 x10 ⁻³	Alanina	-9,07 x10 ⁻⁴	-1,20 x10 ⁻³
Isoleucina	-5,35 x10 ⁻³	-7,08 x10 ⁻³	Arginina	-2,11 x10 ⁻²	-2,79 x10 ⁻²
Leucina	-7,63 x10 ⁻³	-1,01 x10 ⁻²	Asparagina	-1,03 x10 ⁻³	-1,37 x10 ⁻³
Lisina	-9,29 x10 ⁻³	-1,23 x10 ⁻²	Aspartato	-1,24 x10 ⁻³	-1,63 x10 ⁻³
Metionina	-1,54 x10 ⁻³	-2,03 x10 ⁻³	Cisteína	-5,07 x10 ⁻³	-6,71 x10 ⁻³
Fenilalanina	-3,79 x10 ⁻³	-5,01 x10 ⁻³	Glutamina	-7,11 x10 ⁻²	-9,40 x10 ⁻²
Treonina	-6,55 x10 ⁻⁴	-8,67 x10 ⁻⁴	Glutamato	-6,35 x10 ⁻³	-8,41 x10 ⁻³
Triptofano	-4,89 x10 ⁻²	-6,46 x10 ⁻²	Glicina	1,97 x10 ⁻²	2,60 x10 ⁻²
Valina	-1,87 x10 ⁻³	-2,48 x10 ⁻³	Prolina	-2,40 x10 ⁻³	-3,18 x10 ⁻³
			Serina	-2,79 x10 ⁻³	-3,69 x10 ⁻³
			Tirosina	-2,45 x10 ⁻³	-3,24 x10 ⁻³

3.3.2.3 Caso 1.3: 1 [mM] de Acetaminofén y 5 [mM] de N-acetilcisteína (1A/5N)

Para este caso, los resultados obtenidos en este ensayo no fueron los esperados, y la variación de concentración celular difieren de la curva de crecimiento obtenida en la Figura 17 para el mismo caso (color violeta). Como se puede ver en la Figura 19 A, la densidad celular se mantuvo prácticamente sin variar durante el período de tiempo de cultivo, con una velocidad de crecimiento de 0,001 [h⁻¹], un 90% de la calculada en el mismo caso en el ensayo anterior (Tabla 9). La diferencia entre los ensayos es el volumen de cultivo con que se trabajó. Como se mencionó anteriormente, al utilizar placas de 100 [mm], cabe la posibilidad de que no se haya obtenido un cultivo homogéneo en toda la superficie de la placa, presentando problemas de inhibición por contacto entre células. Por otro lado, las barras de error de los datos de concentración celular son anchas, por lo que no se descarta que los valores obtenidos no sean reales.

A pesar de que no hubo un crecimiento considerable, de la Figura 19 B se puede calcular una tasa de consumo de glucosa 50% mayor que el caso 1.1, mientras que de consumo de lactato su obtuvo una tasa de producción de lactato 50% menor que el control. El $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ calculado para

este caso es de 1,2. Si bien este parámetro se encuentra dentro del rango esperado, el alto consumo de glucosa se contradice con las bajas tasas de producción de biomasa y lactato, indicando que existe la posibilidad de que el flujo de carbono que esté entrando esté siendo dirigido hacia algún otro metabolito.

De la Tabla 14, es posible indicar que al igual que la tasa de producción de biomasa, las tasas específicas de glucosa, lactato, triglicéridos y amonio permanecen sin variar entre los tiempos de cultivos evaluados. En cuanto a la magnitud, la tasa específica de síntesis de triglicéridos es similar al caso 1.1, mientras que la de amonio es un orden de magnitud mayor.

Tabla 14: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Biomasa	$7,04 \times 10^{-3}$	$7,01 \times 10^{-3}$
Glucosa	$-7,54 \times 10^{-2}$	$-7,50 \times 10^{-2}$
Lactato	$9,27 \times 10^{-2}$	$9,22 \times 10^{-2}$
Triglicéridos	$5,88 \times 10^{-4}$	$5,85 \times 10^{-4}$
Amonio	$3,13 \times 10^{-2}$	$3,11 \times 10^{-2}$

En cuanto a las tasas intercambio de aminoácidos, al igual que la tabla anterior, es posible ver que no varían entre los dos tiempos de cultivo. Además la gran diferencia con el caso 0A/0N es que de los 20 aminoácidos, 14 corresponden a una tasa de producción. Los únicos 6 aminoácidos que se consumen son arginina, aspartato, cisteína, glutamina, lisina y tirosina. En cuanto a las magnitudes, las tasas de intercambio leucina y treonina presentan aumento de un orden de magnitud con respecto al obtenido en 0A/0N, mientras que las tasas de cisteína, glutamato y tirosina se reducen en un orden. En primera instancia, el cambio de las tasas de intercambio de la mayoría de aminoácidos (de consumo a producción) sería consistente con la alta entrada de fuente de carbono presentada.

Tabla 15: Caso 1.3. Tasas específicas de aminoácidos de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo		Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Histidina	$6,59 \times 10^{-4}$	$6,56 \times 10^{-4}$	Alanina	$2,95 \times 10^{-4}$	$2,93 \times 10^{-4}$
Isoleucina	$1,26 \times 10^{-3}$	$1,26 \times 10^{-3}$	Arginina	$-4,23 \times 10^{-2}$	$-4,21 \times 10^{-2}$
Leucina	$8,81 \times 10^{-3}$	$8,76 \times 10^{-3}$	Asparagina	$2,27 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-4}$
Lisina	$-2,81 \times 10^{-4}$	$-2,80 \times 10^{-4}$	Aspartato	$-2,82 \times 10^{-4}$	$-2,80 \times 10^{-4}$
Metionina	$9,83 \times 10^{-4}$	$9,78 \times 10^{-4}$	Cisteína	$-6,01 \times 10^{-4}$	$-5,98 \times 10^{-4}$
Fenilalanina	$9,62 \times 10^{-4}$	$9,57 \times 10^{-4}$	Glutamina	$-2,67 \times 10^{-2}$	$-2,66 \times 10^{-2}$
Treonina	$4,87 \times 10^{-3}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Glutamato	$7,11 \times 10^{-4}$	$7,07 \times 10^{-4}$
Triptofano	$1,92 \times 10^{-1}$	$1,91 \times 10^{-1}$	Glicina	$2,57 \times 10^{-1}$	$2,56 \times 10^{-1}$
Valina	$8,24 \times 10^{-3}$	$8,20 \times 10^{-3}$	Prolina	$4,94 \times 10^{-3}$	$4,92 \times 10^{-3}$
			Serina	$6,82 \times 10^{-3}$	$6,78 \times 10^{-3}$
			Tirosina	$-5,03 \times 10^{-4}$	$-5,00 \times 10^{-4}$

En el caso particular de cisteína, se esperaba que hubiera sido mayor la tasa de intercambio que el control, debido a la presencia de NAC en el medio. Sin embargo, de acuerdo a las especificaciones del HPLC, NAC es utilizado para mejorar la lectura de los aminoácidos, ya que reacciona con el o-Ftaldialdehído (OPA). Es necesario comprobar a través de otro método de cuantificación la variación de NAC en el medio y si efectivamente NAC es utilizado para el incremento de los niveles de cisteína.

En síntesis, en este ensayo se obtuvieron tres comportamientos metabólicos diferentes en cada caso estudio: el caso 0A/0N (control) que corresponde al comportamiento base de estas células en pleno crecimiento; el caso 1A/0N, donde las células se encuentran en una fase de muerte celular, y la alta producción de lactato, junto con el aumento del consumo de ciertos metabolitos, serían un indicador de apoptosis celular; y finalmente el caso 1A/5N, donde no hubo una protección efectiva que haya permitido el crecimiento celular bajo el estado de estrés generado por APAP, sino que más bien, hubo un estancamiento del crecimiento, con un gran número de tasas específicas de producción que no varían entre las 57 y las 70 [h]. La Tabla 16 resume los parámetros obtenidos para este ensayo. En la sección siguiente se realizará el análisis de flujo metabólico utilizando las tasas de consumo/producción calculadas, obteniendo una perspectiva intracelular del metabolismo de cada caso.

Tabla 16: Resumen de parámetros de crecimiento en el Análisis Metabólico I.

Caso	Velocidad de crecimiento μ [h ⁻¹]	$\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$
1.1: 0 APAP / 0 NAC	0,017	3,3
1.2: 1 APAP / 0 NAC	-	7,1
1.3: 1 APAP / 5 NAC	0,001	1,2

Cabe destacar que los parámetros de crecimiento obtenidos indican que no fue posible reproducir los resultados del ensayo anterior en que solo se analizó el crecimiento celular. No es erróneo pensar que existieron problemas en la metodología de este ensayo. Como se expuso en párrafos anteriores, el trabajo con volúmenes más grandes de cultivo, que dificulta el desarrollo del ensayo, y sumándole el hecho que las mediciones están hechas en uniplicado biológico, el error asociado a la metodología es mayor que la del ensayo anterior. La principal recomendación para realizar un análisis metabólico es considerar más tiempos de evaluación de los metabolitos, con el objetivo de abarcar en su totalidad el período de fase exponencial, y siempre trabajando con duplicado biológico.

3.3.3 Análisis de Flujos Metabólicos I

El análisis de flujos metabólicos permitirá obtener la distribución de los flujos intracelulares de los casos considerados en este estudio, utilizando las tasas de intercambio obtenidas. Al igual que en la sección anterior, se analizará caso a caso el cierre del balance de carbono y nitrógeno por medio de las estimaciones de las tasas pendientes (CO₂, GSH y úrea), para luego interpretar los resultados que se obtienen al aplicar el modelo hepático planteado. El balance se encuentra expresado en la razón porcentual de moles de carbono/nitrógeno producidos sobre los consumidos. Mediante la ponderación de las tres tasas mencionadas se buscará cerrar los balances, dentro de un rango del 10% de error. Con el objetivo de apoyar el análisis, la Figura 20 muestra la distribución de flujos internos considerando los átomos de carbonos involucrados en cada reacción, normalizado al flujo de carbono de la primera reacción del sistema (v_1). De la misma forma, en la Figura 21 se ilustra la distribución de flujos internos de nitrógeno, normalizada a la entrada de glutamina. Por lo tanto, los datos entre cada metabolito corresponde al porcentaje relativo de los flujos mencionados, en cada caso estudiado.

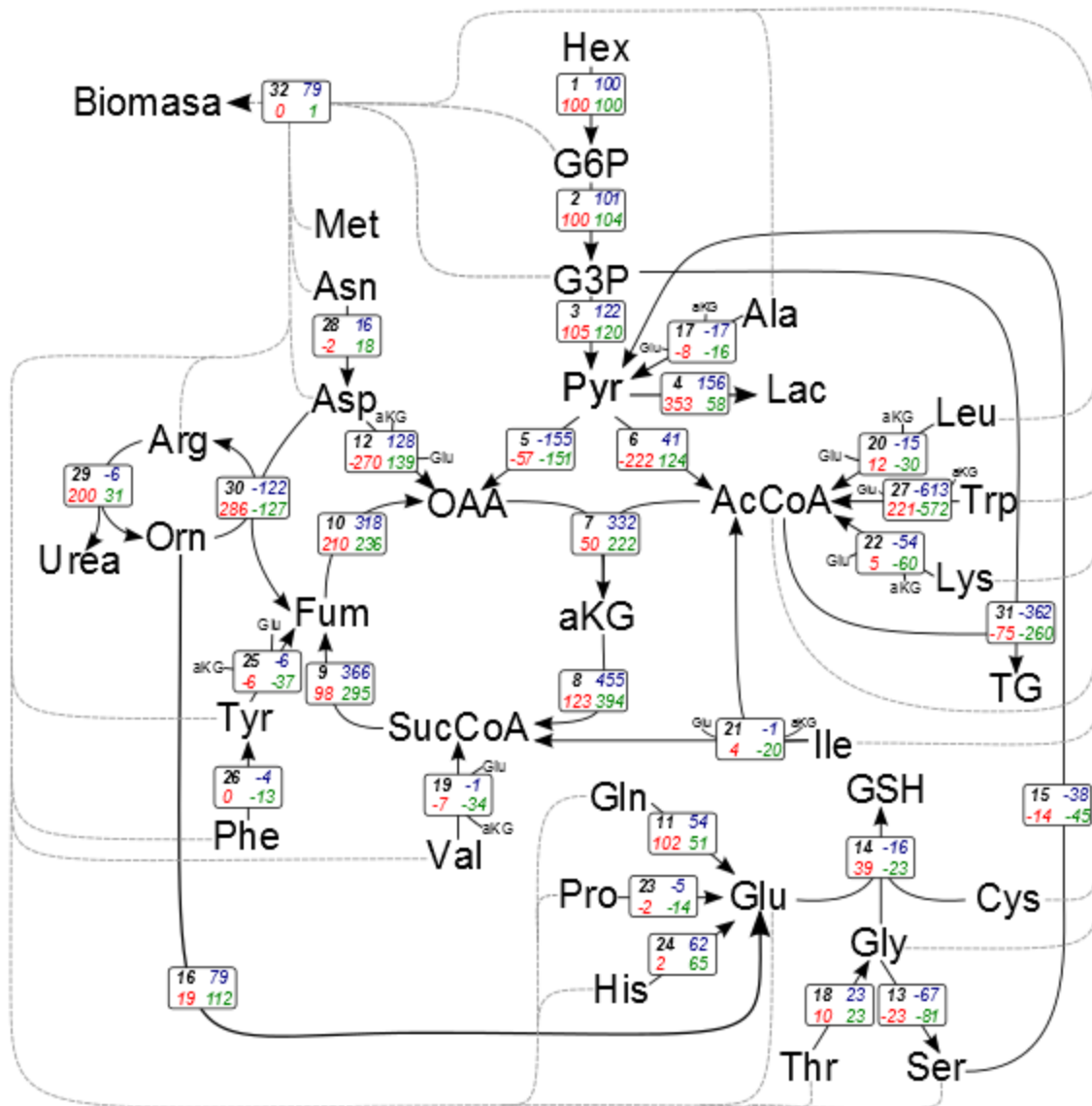


Figura 20: Distribución de flujos internos de carbono del Estudio I. Casos: 0A/0N (azul), 1A/0N (rojo), 1A/5N (verde).

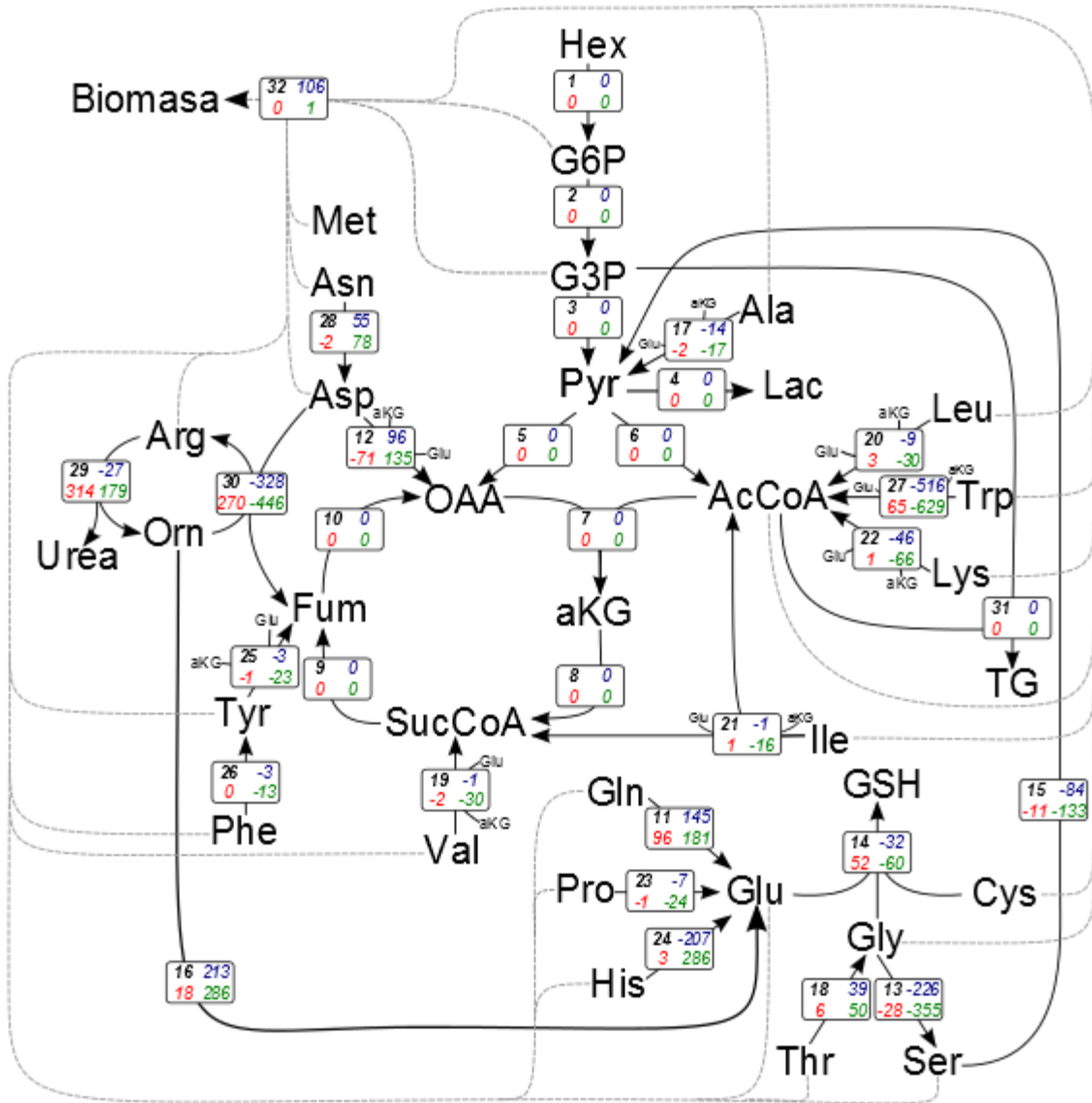


Figura 21: Distribución de flujos internos de nitrógeno del Estudio I. Casos: 0A/0N (azul), 1A/0N (rojo), 1A/5N (verde).

3.3.3.1 Caso 1.1: 0 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (0A/0N)

La Tabla 17 muestra las tasas de producción de CO₂, GSH y úrea obtenidas por medio de las estimaciones mencionadas en la sección 3.2.5. Con estos valores, el balance de carbono cierra en un 468%, es decir, se está produciendo 4 veces más moles de carbono de lo que se consume. El balance de nitrógeno resultado similar, con un cierre de 495%, 5 veces más nitrógeno producido que lo que se consume. Si se reducen las tasas de producción de la Tabla 17, los balances no bajan más de un 20%.

Tabla 17: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
CO ₂	2,30 x10 ⁻²	1,87 x10 ⁻²
GSH	4,71 x10 ⁻³	3,82 x10 ⁻³
Úrea	1,22 x10 ⁻²	9,91 x10 ⁻³

Este hecho refleja dos teorías: i) el modelo está incompleto, dado que no es posible cerrar el balance con las mediciones y estimaciones consideradas, y por consiguiente, está la posibilidad de que no se esté considerando algún metabolito importante; ii) el set de datos de tasas de intercambio tiene un error de medición y existen tasas de consumo subestimadas, o tasas de producción sobreestimadas. En base a esto último, viendo la Tabla 10 y la Tabla 11, los metabolitos que presentan una mayor magnitud de tasa de producción son lactato, glicina y triptófano. Cabe la posibilidad de que las tasas de estos dos aminoácidos estén erradas, y que su cuantificación en alguno de los dos tiempos esté mal medida. En la literatura, se han encontrado casos en que existe una tasa de producción de glicina, pero no con una magnitud tan alta. Para triptófano, siendo un aminoácido esencial, no se ha reportado ejemplos de producción, sino que siempre de consumo. Además, hay que destacar que el triptófano es uno de las mediciones que más afectan al modelo, como se mencionó durante el análisis de sensibilidad de la matriz estequiométrica, por lo que la distribución de flujos intracelulares se verá afectada por este tipo de error.

En la Figura 20 se muestra el perfil metabólico de flujos internos de carbono generado para este caso 1.1 (datos de color azul). De la figura es posible indicar que es coherente con lo expuesto en el párrafo anterior, ya que existen situaciones anormales a lo largo de las vías metabólicas consideradas: en la vía de la glicólisis, el flujo hacia piruvato aumenta, recibiendo el flujo de carbono de glucosa y de triglicéridos (v₃₁). En este nodo, además de lo proveniente de glicólisis, se tiene un gran aporte de carbono por las reacciones anapleróticas, desde oxaloacetato (OAA) (v₅). De estas dos entradas, el 65% es destinado a la producción de lactato (v₄), mientras que sólo el 17% es trasladado hacia un segundo nodo, acetil CoA (AcCoA) (v₆). Este punto también recibe su mayor aporte de carbono desde el consumo de triglicéridos (v₃₁), mientras que las salidas mayores son la entrada al ciclo TCA (v₇) y la salida de triptófano (v₂₇), consistente con la alta tasa de producción de triptófano obtenida (ver resumen de balances de masa en Figura 23). Existe un alto flujo, 3 veces mayor que el flujo de entrada de glucosa, en el ciclo TCA. Además, existe un equilibrio entre los flujos v₁₂ y v₃₀, referidos al metabolismo del aspartato, pero en sentido contrario al esperado dado que se tiene un ciclo invertido de úrea. Al ser v₂₉ negativo indica que la tasa de urea estimada no es suficiente para que este ciclo tenga el sentido que corresponde.

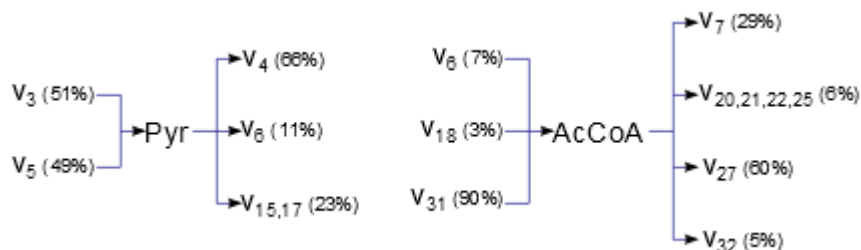


Figura 23: Caso 1.1. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

En la Figura 21 está el mismo perfil metabólico del caso 0A/0N, pero mostrando la distribución de flujos de nitrógeno, siendo el 100% la entrada de glutamina a la célula. La reacción de glutaminólisis (v_{11}) es el primer indicio de que existen problemas, dado que el flujo de nitrógeno es 45% mayor al que entra. Debido a que glutamato es el aminoácido más utilizado para las reacciones de transaminación dentro de las células, el estudio de su metabolismo es un indicador de lo que está pasando con los flujos de nitrógeno. Haciendo un balance de este aminoácido (ver Figura 22), es posible indicar que los altos flujos provenientes de glutamina (v_{11}), aspartato (v_{12}), ornitina (v_{16}) e histidina (v_{24}) son para satisfacer el requerimiento que se necesita para la formación de triptófano, siendo un 73% del glutamato utilizado para su síntesis. Otro punto destacable es con respecto al metabolismo de la glicina. Dado que también se obtuvo una alta tasa de producción, los flujos alrededor de ésta son direccionados a su formación (v_{13} , v_{14} , v_{15} y v_{18}), razón por la cual a pesar de que se tiene una tasa de producción de GSH, el flujo interno de síntesis de éste (v_{14}) se encuentra hacia el otro sentido.

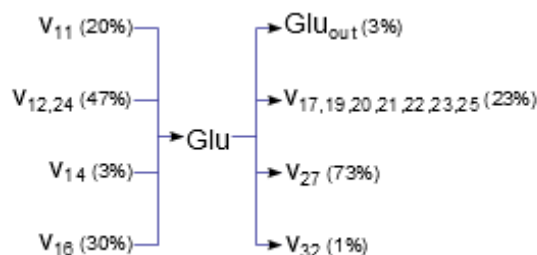


Figura 22: Caso 1.1. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Por último, es posible calcular nuevamente las tasas de intercambio extracelular, pero en base a los flujos internos obtenidos y la matriz estequiométrica, resolviendo el sistema original, mencionado anteriormente en la Ec. 3.

$$S \cdot V = R \quad \text{Ec. 18}$$

Con esta evaluación es posible identificar que tasas de consumo/producción necesitan variar para generar la distribución de flujos internos señalada en la Figura 20 y Figura 21, y que permitan cerrar los balances, tanto de carbono como de nitrógeno. En las tablas a continuación, se encuentran las nuevas tasas calculadas, junto con el porcentaje relativo de diferencia con respecto al obtenido experimentalmente. El signo negativo en los porcentajes indica no solo un cambio de magnitud, sino que también un cambio de sentido, es decir, si antes era una tasa de consumo, ahora debiese ser de producción para cerrar el balance del sistema, y viceversa.

Tabla 18: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$3,11 \times 10^{-1}$	$2,53 \times 10^{-1}$	100%
Glucosa	$-6,60 \times 10^{-2}$	$-5,36 \times 10^{-2}$	105%
Lactato	$2,05 \times 10^{-1}$	$1,67 \times 10^{-1}$	99%
Triglicéridos	$-2,81 \times 10^{-2}$	$-2,28 \times 10^{-2}$	-5445%
Amonio	$-1,69 \times 10^{-2}$	$-1,37 \times 10^{-2}$	-341%
CO ₂	$2,25 \times 10^{-2}$	$1,82 \times 10^{-2}$	98%
GSH	$-6,22 \times 10^{-3}$	$-5,05 \times 10^{-3}$	-132%
Úrea	$-3,92 \times 10^{-3}$	$-3,18 \times 10^{-3}$	-32%

De esta primera tabla, es posible indicar que las tasas de biomasa, glucosa, lactato y CO₂ permanecen prácticamente iguales. Sin embargo, existe un gran cambio en las tasas de TG, amonio, GSH y úrea, no sólo en 1 y 2 órdenes de magnitud, sino que también en su sentido. Viendo nuevamente la Figura 20, el ciclo TCA demanda una alta cantidad de carbono, por lo que el sistema debe consumir TG para suplir los requerimientos de carbono del ciclo, como también de las tasas de producción de lactato, y triptofano. De la misma forma, el cambio de sentido de la tasa de GSH es debido a la alta tasa de producción de glicina, mientras que el cambio en la tasa de úrea es debido al alto flujo que se mantiene a nivel de ciclo de la úrea.

Tabla 19: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo
His	$-4,12 \times 10^{-2}$	$-3,35 \times 10^{-2}$	9450%	Ala	$4,43 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-3}$	-2378%
Ile	$-6,93 \times 10^{-4}$	$-5,63 \times 10^{-4}$	19%	Arg	$-4,46 \times 10^{-2}$	$-3,72 \times 10^{-2}$	391%
Leu	$1,95 \times 10^{-3}$	$1,58 \times 10^{-3}$	-198%	Asn	$-1,86 \times 10^{-2}$	$-1,51 \times 10^{-2}$	2236%
Lys	$7,94 \times 10^{-3}$	$6,44 \times 10^{-3}$	-611%	Asp	$3,84 \times 10^{-3}$	$3,11 \times 10^{-3}$	-1742%
Met	$-5,84 \times 10^{-4}$	$-4,74 \times 10^{-4}$	104%	Cys	$5,01 \times 10^{-3}$	$4,07 \times 10^{-3}$	-141%
Phe	$2,84 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-4}$	29%	Gln	$-4,77 \times 10^{-2}$	$-3,88 \times 10^{-2}$	163%
Thr	$-2,49 \times 10^{-2}$	$-2,02 \times 10^{-2}$	3205%	Glu	$8,91 \times 10^{-3}$	$7,23 \times 10^{-3}$	165%
Trp	$1,51 \times 10^{-1}$	$1,23 \times 10^{-1}$	87%	Gly	$1,56 \times 10^{-1}$	$1,26 \times 10^{-1}$	87%
Val	$-1,06 \times 10^{-3}$	$-8,60 \times 10^{-4}$	23%	Pro	$2,01 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-3}$	-136%
				Ser	$-2,12 \times 10^{-2}$	$-1,72 \times 10^{-2}$	-893%
				Tyr	$-1,02 \times 10^{-3}$	$-8,29 \times 10^{-4}$	45%

En cuanto a los aminoácidos, las tasas de intercambio de la mayoría de ellos son modificadas en magnitud, como también en signo. Histidina, treonina, alanina, asparagina y aspartato poseen tasas que necesitan aumentar en dos órdenes de magnitud, y de éstas, alanina y aspartato deben pasar a ser tasas de consumo. Además de éstas dos, las tasas de leucina, lisina, cisteína, prolina y serina deben cambiar el sentido del flujo de intercambio para cerrar el balance. Por último, esta estimación también considera que los metabolitos intracelular poseen tasas de intercambio con el medio extracelular. La Tabla 20 señala estas tasas mencionadas, de la que se puede desprender que todas corresponden a tasas de consumo, con una magnitud comparable con alguna de la tasas como de GSH, úrea y algunos aminoácidos. Este hecho nuevamente indica que existe un déficit de entrada de átomos, sobre todo en lo que respecta a glicólisis y ciclo TCA, mientras que la alta tasa de ornitina obtenida ayudaría mantener el equilibrio a nivel de ciclo de la úrea

Tabla 20: Caso 1.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Acetil CoA	-1,12x10 ⁻³	-9,11 x10 ⁻⁴
α Cetogluturato	-2,81 x10 ⁻³	-2,28 x10 ⁻³
Fumarato	-2,25 x10 ⁻³	-1,82 x10 ⁻³
Gliceraldehído 3P	-1,68 x10 ⁻³	-1,37 x10 ⁻³
Glucosa 6P	-3,37 x10 ⁻³	-2,73 x10 ⁻³
Oxaloacetato	-2,25 x10 ⁻³	-1,82 x10 ⁻³
Ornitina	-1,84 x10 ⁻²	-1,49 x10 ⁻²
Piruvato	-1,68 x10 ⁻³	-1,37 x10 ⁻³
Succinil CoA	-2,25 x10 ⁻³	-1,82 x10 ⁻³

En síntesis, el análisis de flujo metabólico entregó una distribución de flujos internos con comportamientos no esperados, como excesos de flujos en ciertas vías, o sentido opuestos de ciertos flujos y ciclos. El modelo plantea que las tasas de consumo/producción calculadas de manera experimental están sujetas a un error, debido a que presentan un desbalance alto de carbono y nitrógeno, siendo la cantidad producido de moles 4 veces mayor a lo que se consume en ambos casos. Este hecho refleja que para obtener un buen resultado a partir del modelo hepático planteado, es necesario tener un set de datos de tasas de intercambio preciso, con el fin de determinar si el modelo es capaz de representar el metabolismo interno de las células, o se está obviando alguna tasa importante de consumo. Al final de ambos estudios se podrá resolver sobre la efectividad del modelo.

3.3.3.2 Caso 1.2: 1 [mM] de Acetaminofén y 0 [mM] de N-acetilcisteína (1A/0N)

Utilizando las tasas específicas de consumo/producción se determina el balance por especie, siendo un 61% para el carbono y un 16% para el nitrógeno. En este caso tiene una situación contraria al caso 1.1, dado que el desbalance existente se debe a que se está consumiendo más de lo que se está produciendo, sobretodo en el caso del nitrógeno. Por lo tanto, para el caso 1.2 sí se podrá realizar la ponderación de las tasas de producción CO₂, GSH y úrea para poder cerrar los balances. Hay que destacar un cambio que se hizo en la realización del MFA para este caso, antes de indicar cuales fueron estas modificaciones. Como se ha dicho antes, la presencia de APAP en el medio de cultivo produce una disminución de la concentración celular, es decir, las células se encuentran en una fase de muerte celular, y no de crecimiento. Se han reportado estudios donde se realiza MFA en la fase exponencial, estacionaria y de muerte para un mismo cultivo. En esta última, se ha suprimido la tasa de producción de biomasa con el fin de evitar que este metabolito sea utilizado como precursor de otro (Provost et al., 2006; Zamorano, 2012). Para este caso, se igualará a cero la tasa de producción de biomasa, y así obtener una distribución de flujos internos sin utilizar esta tasa como fuente de carbono y nitrógeno. Con este cambian los balances levemente, siendo un 73% para carbono y un 20% para nitrógeno. La mejor opción de ponderación son multiplicar por 10 la tasa de producción de GSH, por 5 la tasa de úrea, y dejando intacta la tasa CO₂. Las tasas finales se muestran en la Tabla 21. Con esta modificación, los balances cierran de manera casi perfecta, con un 103% para carbono y un 97% para nitrógeno. En la Figura 20 y Figura 21 se muestra la distribución de flujos intracelulares, generadas a partir de las tasas de intercambio calculadas (datos de color rojo).

Tabla 21: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
CO ₂	2,67 x10 ⁻²	3,53 x10 ⁻²
GSH	5,07 x10 ⁻²	6,71 x10 ⁻²
Úrea	1,09 x10 ⁻¹	1,44 x10 ⁻¹

Primero, en la vía de la glicólisis es posible ver que el flujo de carbono se mantiene hasta G3P, y en este punto recibe un 5% más desde la fuente de TG, para llegar luego a piruvato. En este primer nodo, del total de carbonos que llegan en forma de piruvato, el 95% es metabolizado en lactato, debido a su alta tasa de producción, en comparación a la baja tasa de glucosa obtenida. Cabe recordar que este fue el caso en que se obtuvo un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 7,1. De acuerdo a este modelo hepático, dado que solo el 28% llega desde la glicólisis, el resto de las tasas de carbono deben venir desde las reacciones anapleróticas (v_5) y principalmente desde AcCoA (v_6), siendo un 12% y un 60% del flujo de carbono que llega a este nodo, respectivamente (ver Figura 24). Realizando ahora un balance de masa en AcCoA, el principal flujo de salida es precisamente hacia piruvato en un 89%. A diferencia del caso 0A/0N, se obtuvo una tasa de consumo de triptófano, el cual ayuda a satisfacer la demanda de carbono por parte de piruvato, siendo un 49% del flujo de carbono que llega. Además, un 42% proviene del consumo de triglicéridos, mientras que sólo un 9% viene de procesos de degradación de otros aminoácidos (ver Figura 24). En el ciclo TCA, la primera reacción (flujo v_7) es bajo, en congruencia a que la mayor cantidad de flujo de OAA y AcCoA son destinados a piruvato. Sin embargo, aumenta al doble desde αKG a SucCoA (flujo v_8) debido a las reacciones de transaminación del par αKG -Glu. Luego vuelve a duplicarse en la reacción de fumarato a OAA (flujo v_{10}), debido al equilibrio del metabolismo de aspartato. Con respecto al este último, y a diferencia con el caso control, los flujos poseen el sentido esperado (v_{12} negativo y v_{30} negativo), pero poseen un alto flujo estancado, el doble de magnitud del flujo que entra.

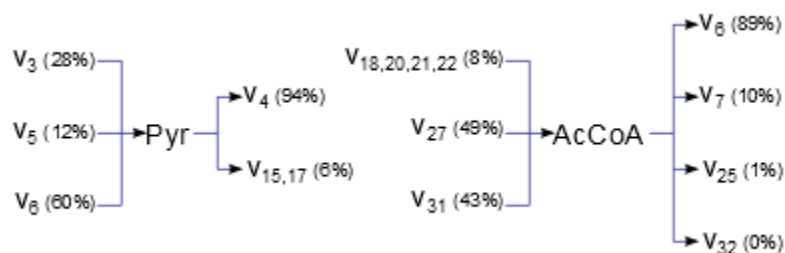


Figura 24: Caso 1.2. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Con respecto la distribución de nitrógeno mostrada en la Figura 21, es posible indicar primero que del total de glutamina que entra, el 96% es dirigido hacia glutamato, por la reacción de glutaminólisis. Realizando un balance de masa de nitrógeno de este aminoácido, se tiene que tal como pasó con el carbono, la entrada de triptófano es capaz de satisfacer los requerimientos de glutamato en un 32% (v_{27}), mientras que lo que viene desde ornitina es solamente un 9% (v_{16}) (ver Figura 25). Esto constituye una diferencia con el caso control, ya que primero el triptófano requería del glutamato para su síntesis, y el flujo desde ornitina era el que aumentaba los niveles de glutamato disponible. Del ciclo de la úrea, como se dijo en el párrafo anterior, posee el sentido correcto, pero contiene un alto nivel de moles de nitrógeno estancado.

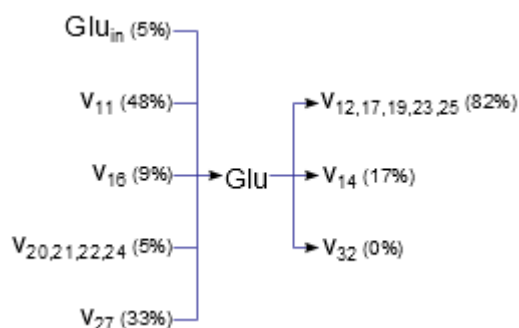


Figura 25: Caso 1.2. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Finalmente, se obtuvieron las tasas estimadas de consumo/producción extracelular a partir de la distribución de flujos internos, utilizando al Ec. 18. Debido a que los balances por especies pudieron cerrar, no se obtuvieron caso extremos de cambios de tasa como pasó en el caso control, donde hubo porcentajes de diferencias por sobre el 1000%. La primera tabla que muestra estas tasas recalculadas (Tabla 22) muestra que la mayoría de los flujos debiesen mantenerse. Sólo en el caso de amonio debiese aumentar 3 veces el flujo de producción, mientras que para GSH, la tasa de producción debiese disminuir a la mitad. Además, el modelo entrega como resultado que debiese existir una mínima tasa de biomasa para poder cerrar el balance, pero este hecho no corresponde al caso en estudio, ya que se está realizando MFA para un período de muerte celular.

Tabla 22: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$3,40 \times 10^{-4}$	$4,50 \times 10^{-4}$	-
Glucosa	$-5,60 \times 10^{-2}$	$-7,41 \times 10^{-2}$	100%
Lactato	$3,96 \times 10^{-1}$	$5,24 \times 10^{-1}$	100%
Triglicéridos	$-4,91 \times 10^{-3}$	$-6,50 \times 10^{-3}$	187%
Amonio	$-2,06 \times 10^{-3}$	$-2,73 \times 10^{-3}$	321%
CO ₂	$2,66 \times 10^{-2}$	$3,52 \times 10^{-2}$	100%
GSH	$2,92 \times 10^{-2}$	$3,86 \times 10^{-2}$	58%
Úrea	$1,12 \times 10^{-1}$	$1,48 \times 10^{-1}$	103%

En la Tabla 23, se muestra las estimaciones para las tasas de intercambio de aminoácidos. Refiriéndose a los aminoácidos esenciales es posible indicar que histidina, isoleucina, leucina, lisina debiesen bajar sus tasas de consumo más de la mitad, mientras que treonina debiese aumentar un 25% y triptófano mantenerse. Valina fue el único caso en que la tasa debiera cambiar de sentido, y ser de producción. Caso curioso son los de fenilalanina y metionina, dado que el modelo indica que estas tasas debiesen ser muy bajas (casi despreciable), por su baja participación en el metabolismo. De los aminoácidos no esenciales, alanina, asparagina y aspartato debiesen aumentar su magnitud y cambiar el sentido a tasas de producción. Arginina y glutamato debiesen reducir su consumo, mientras que glutamina, glicina y tirosina debiesen mantenerse con las mismas tasas de intercambio. Cisteína debiese aumentar 5 veces su consumo, siendo la tasa de mayor cambio, con el objetivo de mantener el equilibrio entre este aminoácido y GSH.

Tabla 23: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo
His	-1,29 x10 ⁻³	-1,70 x10 ⁻³	52%	Ala	3,25 x10 ⁻³	4,29 x10 ⁻³	-358%
Ile	-1,43 x10 ⁻³	-1,77 x10 ⁻³	25%	Arg	-1,57 x10 ⁻²	-2,07 x10 ⁻²	74%
Leu	-3,61 x10 ⁻³	-4,78 x10 ⁻³	47%	Asn	1,66 x10 ⁻³	2,19 x10 ⁻³	-161%
Lys	-9,84 x10 ⁻⁴	-1,30 x10 ⁻³	11%	Asp	2,87 x10 ⁻³	3,80 x10 ⁻³	-233%
Met	-6,39 x10 ⁻⁷	-8,45 x10 ⁻⁷	0%	Cys	-2,92 x10 ⁻²	-3,86 x10 ⁻²	575%
Phe	9,51 x10 ⁻⁵	1,26 x10 ⁻⁴	-3%	Gln	-6,84 x10 ⁻²	-9,05 x10 ⁻²	96%
Thr	-8,51 x10 ⁻³	-1,08 x10 ⁻²	124%	Glu	-2,29 x10 ⁻³	-3,03 x10 ⁻³	36%
Trp	-4,65 x10 ⁻²	-6,15 x10 ⁻²	95%	Gly	1,81 x10 ⁻²	2,40 x10 ⁻²	92%
Val	2,19 x10 ⁻³	2,90 x10 ⁻³	-117%	Pro	1,66 x10 ⁻³	2,20 x10 ⁻³	-69%
				Ser	-4,34 x10 ⁻³	-5,75 x10 ⁻³	156%
				Tyr	1,43 x10 ⁻³	1,90 x10 ⁻³	103%

Por último, la Tabla 24 muestra la tasa de los metabolitos internos que son necesarias para cerrar los balances. Como se puede ver en la tabla, todas las tasas son de consumo, exceptuando la de ornitina que debiese ser una tasa de producción para contrarrestar el elevado flujo de nitrógeno en el ciclo de la úrea. No obstante, todas las tasas presentadas en esta tabla son muy pequeñas, del orden del 10⁻⁴ (un orden de magnitud menor al caso 1.1), indicando que no son realmente relevantes para el cálculo de las tasas internas, sino que son necesarias para cerrar perfectamente los balances.

Tabla 24: Caso 1.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Acetil CoA	-8,97x10 ⁻⁵	-1,94 x10 ⁻⁴
α Cetoglutarato	-2,24 x10 ⁻⁴	-2,97 x10 ⁻⁴
Fumarato	-1,79 x10 ⁻⁴	-2,37 x10 ⁻⁴
Gliceraldehído 3P	-1,35 x10 ⁻⁴	-1,78 x10 ⁻⁴
Glucosa 6P	-2,69 x10 ⁻⁴	-3,56 x10 ⁻⁴
Oxaloacetato	-1,79 x10 ⁻⁴	-2,37 x10 ⁻⁴
Ornitina	2,64 x10 ⁻³	3,50 x10 ⁻³
Piruvato	-1,35 x10 ⁻⁴	-1,78 x10 ⁻⁴
Succinil CoA	-1,79 x10 ⁻⁴	-2,37 x10 ⁻⁴

En resumen, para el caso 1.2, se logró obtener una representación de los flujos internos del metabolismo de las células, del cual es posible indicar que los flujos cercanos a piruvato se redireccionan hacia este metabolito, con el fin de satisfacer los requerimiento de carbono por parte de la alta tasa de producción de lactato. Además, se tienen sectores en donde existe acumulación de flujos, como en el ciclo de úrea y metabolismo de aspartato. Si bien podría ser un indicador del estado de muerte celular en que se encuentran las células debido a la presencia de APAP, no es posible asegurarlo debido a que no se puede comparar con los resultados del control, por los problemas de desbalances mencionados.

3.3.3.3 Caso 1.3: 1 [mM] de Acetaminofén y 5 [mM] de N-acetilcisteína (1A/5N)

Siguiendo el mismo procedimiento, en la Tabla 25 están las tasas específicas calculadas para CO₂, GSH y úrea, las cuáles se mantienen prácticamente constante a los largo del tiempo debido a que hubo un crecimiento celular casi nulo durante el tiempo de cultivo.

Tabla 25: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
CO ₂	2,78 x10 ⁻²	2,78 x10 ⁻²
GSH	6,27 x10 ⁻⁴	6,24 x10 ⁻⁴
Úrea	4,36 x10 ⁻²	4,34 x10 ⁻²

Ocurre un hecho similar al caso 1.1, donde se produce un gran desbalance. En este caso, los porcentajes son de 379% y 358%, para carbono y nitrógeno respectivamente, es decir, se tiene que las tasas de producción son 3 veces mayores a las de consumo, Si se disminuyera en 2 órdenes de magnitud las tasas de la Tabla 25, sólo se reduce el desbalance a 369% y 319%. Tal como se mencionó para el caso control, o es el modelo el que no se ajuste debido a que falta alguna tasa específica de consumo, o es el set de datos que se le entrega al modelo y que poseen errores de medición.

Con respecto a la distribución de flujos internos, en la Figura 20 se muestran los flujos de carbono para el caso 1.3 (datos de color verde). Es posible ver que el consumo de TG es muy importante dado que aporte con un 20% más del flujo de carbono que llega hasta piruvato por la vía de la glicólisis (v₃). Aproximadamente la misma cantidad de carbono llega a este punto por la vía de las reacciones anapleróticas (v₅). Desde aquí el 53% de los moles de carbono son destinados hacia AcCoA (v₆), mientras que sólo el 25% es direccionado a la síntesis de lactato (v₄). Cabe recordar, que este fue el único caso en que se calculó un ΔLac/ΔGlc menor a 2, lo que se traduce en que la mayor cantidad de carbono sea metabolizado en AcCoA (ver Figura 26). En este segundo nodo, se tiene que debido a la alta tasa de triptófano obtenida, la mayor parte de carbono (63%) es utilizada para su síntesis (v₂₇), mientras que sólo el 22% es enviado al ciclo TCA (v₇) y el 15% para reacciones de síntesis de otros aminoácidos (ver Figura 26). A diferencia del caso 1.1, la fuente de carbono que llega a AcCoA es un 72% proveniente de TG, y no un 90% con el caso control. Se tiene un alto flujo en el ciclo TCA, más del doble que el flujo que entra por concepto de glucosa. Además en el metabolismo de aspartato se tiene nuevamente los flujos con el sentido no esperado (v₁₂ y v₃₀), generando problemas en el ciclo de la úrea.

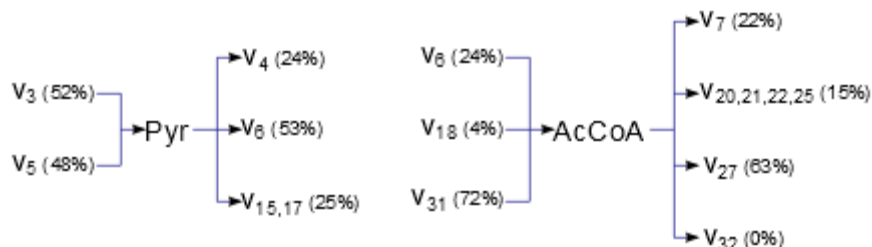


Figura 26: Caso 1.3. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

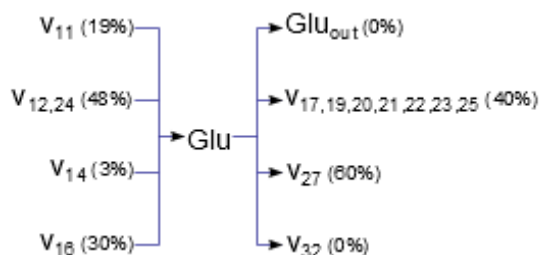


Figura 27: Caso 1.3. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Viendo la distribución de flujos de nitrógeno en la Figura 21, el modelo indica que es necesario una mayor entrada de glutamina, dado que el flujo de la reacción de glutaminólisis (v_{11}) es el doble de la cantidad de glutamina que entra. Con respecto al metabolismo de glutamato, dado que para este caso se obtuvieron una gran cantidad de tasas de producción de aminoácidos, se tiene que el 60% es utilizado solo para la síntesis de triptófano (v_{27}), mientras que el otro 40% es para las reacciones de transaminación en la formación de otros aminoácidos. Las fuentes de nitrógeno para satisfacer esta demanda, además de la entrada de glutamina, son la degradación de aspartato (v_{12}), histidina (v_4), y desde el ciclo de úrea (v_{16}) (ver Figura 27). Con respecto a este último, se obtuvo un comportamiento anormal de este ciclo, dado que no se comporta como tal, sino que los flujos (v_{29} y v_{30}) son direccionados hacia ornitina, debido al alto flujo de nitrógeno que va por v_{16} . Por último, a pesar de que se obtuvo una tasa específica estimada de GSH, el modelo indica que este compuesto debe ser degradado en sus tres aminoácidos, para satisfacer la demanda de éstos, principalmente de glutamato y glicina.

Con respecto a la estimación de tasas de consumo/producción que entrega el modelo, se puede mencionar que para obtener las distribuciones de flujos intracelulares mostradas, es necesario que las tasas de TG y GSH aumenten en magnitud y sean tasas específicas de consumo, para ayudar a cerrar el balance de carbono y nitrógeno, mientras que la tasa de producción de amonio debiese disminuir a un 6% de la calculada. Otra tasa específica de producción que debiese disminuir es la de úrea, pero no más de la mitad (ver Tabla 26). Con respecto a la tasa de biomasa, a pesar de que hubo un crecimiento mínimo, el modelo sugiere que esta tasa sea aún más baja, siendo un 80% de la calculada para poder cerrar el balance por elementos.

Tabla 26: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$5,57 \times 10^{-3}$	$5,54 \times 10^{-3}$	79%
Glucosa	$-7,82 \times 10^{-2}$	$-7,78 \times 10^{-2}$	104%
Lactato	$9,12 \times 10^{-2}$	$9,08 \times 10^{-2}$	98%
Triglicéridos	$-2,39 \times 10^{-2}$	$-2,38 \times 10^{-2}$	-4065%
Amonio	$1,81 \times 10^{-3}$	$1,80 \times 10^{-3}$	6%
CO ₂	$2,73 \times 10^{-2}$	$2,73 \times 10^{-2}$	98%
GSH	$-1,07 \times 10^{-2}$	$-1,06 \times 10^{-2}$	-1702%
Úrea	$2,39 \times 10^{-2}$	$2,38 \times 10^{-2}$	55%

En cuanto a las tasas específicas estimadas para los aminoácidos, mostradas en la tabla siguiente, es posible indicar que todas debiesen modificarse en gran magnitud para poder obtener una distribución como la señalada con un balance de carbono y nitrógeno cerrado. Existen casos en que debiesen pasar de tasas de producción a consumo, como histidina, treonina, metionina,

asparagina y serina, mientras que con otras ocurre el efecto contrario, como lisina, aspartato, cisteína y tirosina.

Tabla 27: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 57 [h]	Tasa específica 70 [h]	Porcentaje Relativo
His	-5,09 x10 ⁻²	-5,06 x10 ⁻²	-7717%	Ala	9,14 x10 ⁻³	9,09 x10 ⁻³	3096%
Ile	8,66 x10 ⁻³	8,62 x10 ⁻³	685%	Arg	-8,36 x10 ⁻²	-8,31 x10 ⁻²	198%
Leu	1,62 x10 ⁻²	1,61 x10 ⁻²	184%	Asn	-2,09 x10 ⁻³	-2,08 x10 ⁻³	-9215%
Lys	1,74 x10 ⁻²	1,73 x10 ⁻²	-6192%	Asp	8,08 x10 ⁻³	8,04 x10 ⁻³	-2865%
Met	-1,05 x10 ⁻⁵	-1,04 x10 ⁻⁵	-1%	Cys	1,07 x10 ⁻²	1,06 x10 ⁻²	-1772%
Phe	6,92 x10 ⁻³	6,89 x10 ⁻³	720%	Gln	-4,83 x10 ⁻²	-4,80 x10 ⁻²	181%
Thr	-2,65 x10 ⁻²	-2,64 x10 ⁻²	-544%	Glu	8,59 x10 ⁻³	8,55 x10 ⁻³	1208%
Trp	1,68 x10 ⁻¹	1,67 x10 ⁻¹	87%	Gly	2,27 x10 ⁻¹	2,26 x10 ⁻¹	88%
Val	1,61 x10 ⁻²	1,60 x10 ⁻²	196%	Pro	1,28 x10 ⁻²	1,28 x10 ⁻²	259%
				Ser	-2,41 x10 ⁻²	-2,40 x10 ⁻²	-354%
				Tyr	5,46 x10 ⁻³	5,43 x10 ⁻³	-1085%

Finalmente, con respecto a las tasas estimadas extracelulares estimadas para metabolitos intracelulares, se ve en la Tabla 28 que todas corresponde a tasas de consumo, en los mismos órdenes de magnitud que en el caso 1.1, y en consecuencia a la búsqueda de fuentes de carbono y nitrógeno para obtener un sistema en equilibrio.

Tabla 28: Caso 1.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 57 [h] de cultivo	Tasa específica a 70 [h] de cultivo
Acetil CoA	-9,60x10 ⁻⁴	-9,55 x10 ⁻⁴
α Cetogluturato	-2,40 x10 ⁻³	-2,39 x10 ⁻³
Fumarato	-1,92 x10 ⁻³	-1,91 x10 ⁻³
Gliceraldehído 3P	-1,44 x10 ⁻³	-1,43 x10 ⁻³
Glucosa 6P	-2,88 x10 ⁻³	-2,87 x10 ⁻³
Oxaloacetato	-1,92 x10 ⁻³	-1,91 x10 ⁻³
Ornitina	-2,16 x10 ⁻²	-2,15 x10 ⁻²
Piruvato	-1,44 x10 ⁻³	-1,43 x10 ⁻³
Succinil CoA	-1,92 x10 ⁻³	-1,91 x10 ⁻³

En síntesis, nuevamente se obtuvo un caso en que el desbalance del set inicial de tasas específicas calculadas produjo una distribución de flujos internos con resultados no esperados e inconsistentes, como elevados flujos en ciertos sectores, ciclos con sentido errado y redireccionamiento de flujos para satisfacer la demanda de tasas de producción.

3.3.4 Discusiones Generales del Estudio I

En este primer estudio se buscó comprender como afecta en el crecimiento celular y en el metabolismo la aplicación de acetaminofén en el medio de cultivo (APAP), y analizar el efecto protector de N-acetilcisteína (NAC) El APAP es conocido por generar grandes daños sobre las células hepáticas, debido al fulminante estado de estrés oxidativo que genera. Para realizar esta evaluación se hizo un trabajo previo para encontrar las concentraciones a utilizar, principalmente debido a que las células utilizadas poseen mecanismos de protección menos activos que un

hepatocito normal, sobre todo a nivel de enzimas de fase I y II. Bajo este contexto, sólo se pudo conseguir una protección de las células utilizando NAC después de la aplicación de APAP, en donde las células HepG2 alcanzaron un 58% de la densidad celular del control, a una velocidad de crecimiento igual a la mitad del control. Los resultados obtenidos indican que la línea celular en este trabajo fue más sensible a los efectos del APAP, comparándolos con los reportados en la literatura. Dado que el principal efecto de este tipo de compuesto sobre el comportamiento de las células es la alteración del estado redox intracelular, una primera recomendación es precisamente agregar al diseño experimental un método para describir cómo cambia este estado en el interior de las células, a través de la cuantificación de un metabolito intracelular como glutatión (GSH) u alguna otra alternativa.

En cuanto al análisis del metabolismo, se calcularon las tasas específicas de producción/consumo de los 37 metabolitos que se consideraron para la confección del modelo hepático planteado. Se obtuvo que en los casos 1.1 (control) y 1.3, estas tasas calculadas no cierran los balances de carbono y nitrógeno, y que el flujo neto de salida es por lo menos 3 veces mayor al de entrada (ver Tabla 29). Por un lado, este hecho reflejaría que no se están considerando todas las tasas específicas de consumo de metabolitos en este sistema de cultivo. Si bien el modelo pudo entregar una distribución de flujos intracelulares, ésta está sujeta a ciertas inconsistencias, como excesivos flujos o corrientes con sentido opuestos. Como producto del desbalance presentados en cada caso, las tasas específicas de intercambio estimadas a partir de esta distribución, presentaron un alto grado de diferencia con respecto a las obtenidas experimentalmente, con casos extremos de más de 1000% de diferencia y con el cambio en el sentido de ciertos flujos. La realización del ensayo y el cálculo de las tasas específicas por segunda vez permitiría resolver la interrogante de que si el modelo está incompleto. En ese caso, se podría considerar una tasa específica de consumo X_c a nivel de glicólisis la que aporta exclusivamente con moléculas de carbono al sistema. De la misma forma, debería existir una tasa específica de consumo de nitrógeno X_n a nivel de ciclo de úrea. Esta modificación permitiría la corrección del modelo en caso de que existiese un error en la estimación de la ecuación de formación de biomasa o que una vía metabólica no fue considerada.

Tabla 29: Resumen de balances de carbono y nitrógeno en Estudio I.

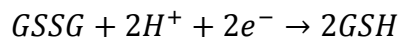
Caso	Balace de Carbono	Balace de Nitrógeno
1.1: 0 APAP / 0 NAC	468%	495%
1.2: 1 APAP / 0 NAC	103%	97%
1.3: 1 APAP / 5 NAC	379%	358%

El caso 1.2 fue el único en que se obtuvo un set de tasas específicas calculadas cuyos balances cerraban en 100%, considerando además que corresponde a un caso de muerte celular, y no de crecimiento como en los otros dos. Si bien, de acuerdo a lo expuesto en el párrafo anterior, los resultados obtenidos no son concluyentes, es importante mencionar también que la razón de esto no sea un modelo mal planteado, sino que un error asociado al cálculo de las tasas específicas en este ensayo. Siendo insistente, el hecho que este ensayo se haya realizado considerando dos puntos de la curva de crecimiento, en uniplicado, no permite una evaluación precisa del comportamiento de las células. Como se mencionó, las densidades celulares para los casos estudiados difieren de las obtenidas en el primer ensayo del cual se obtuvieron las curvas de crecimiento. Más aún, para el caso de protección, en el ensayo para realizar MFA, la densidad celular no varió, lo que indica que hubo un problema al trabajar con un volumen mayor de cultivo. Este hecho revela que es importante un tener un buen diseño experimental, junto con

mediciones precisas de la variación de metabolitos en el medio de cultivo, para obtener un buen set de tasas específicas de intercambio extracelular.

A pesar de lo mencionado anteriormente, es posible indicar ciertas conclusiones de los resultados obtenidos al utilizar el modelo hepático, y que permite validarlo por su similitud con lo encontrado en la bibliografía: Primero que todo, las vías metabólicas más activas dentro de la célula son la de glicólisis y ciclo TCA, ya que poseen los flujos de carbono mayores, superando a los demás en por lo menos 2 órdenes de magnitud; las reacciones anapleróticas, representadas por la el flujo v_5 , es la forma que tiene la célula para obtener flujos de carbono que no consigue desde el consumo de azúcar por glicólisis; la producción de lactato es el principal flujo de salida de la célula, pero existen flujo menores para eliminar excesos como la tasa de producción de alanina; existen aminoácidos cuyo metabolismo es bastante bajo, pero necesario para cuadrar los balances, como el caso de tirosina, fenilalanina, metionina, valina, isoleucina, prolina y leucina; existe relaciones de equilibrio necesarias para el sistema como la síntesis y degradación de aspartato de ornitina u oxaloacetato, y el consumo de cisteína junto con la síntesis de glutatión; la glutaminólisis es la principal entrada de nitrógeno a la célula, mientras que el ciclo de úrea es la forma de eliminación de nitrógeno. De éste último, es importante indicar que la tasa específica de producción de úrea posee como supuesto que del total del flujo que llega hasta el nodo de ornitina, el 3% se mantiene en el ciclo, mientras que el 97% es destinado hacia glutamato, hecho que no se ve en los resultados de ninguno de los casos considerado, lo que refleja que la estimación no es la más adecuada.

Finalmente, como última sugerencia para este estudio, se plantea la opción de agregar una reacción más al modelo hepático, con el objetivo de encontrar un modelo más general que incluye el análisis de estado redox utilizando esta herramienta computacional. Esta corresponde a la cuantificación de las tasas específicas de consumo/producción de los estados reducido y oxidado del glutatión. Siendo uno de los pares redox más importante, estas mediciones permitirían agregar al modelo un indicador del estado redox intracelular, y su evaluación a través de la ecuación de Nerst (Schafer et al., 2001).



3.4 Estudio II: Diferencias en el Crecimiento Celular en Glucosa y Fructosa

3.4.1 Análisis del Crecimiento II

En este estudio se evaluó el comportamiento de la línea celular frente a una suplementación del medio con glucosa, fructosa y una mezcla de ambos (en una relación 1:1). Antes de realizar las curvas de crecimiento se realizó un pretratamiento a las células, cultivándola en un medio compuesto de 15 [mM] de fructosa:glucosa (2:1), por lo menos un pasaje previo, para inducir la sobreproducción de enzimas transportadoras y asimiladoras de fructosa. Esto se realizó para que las células, acostumbradas a crecer en un ambiente de sólo glucosa, posean la maquinaria metabólica suficiente para crecer en cualquiera de las fuentes de carbono. Las curvas de crecimiento mostradas en la Figura 28 fueron realizadas durante un período de 8 días, comenzando de un inóculo de $0,23 \times 10^6$ [cel/ml], realizando dos muestreos por día y en duplicado.

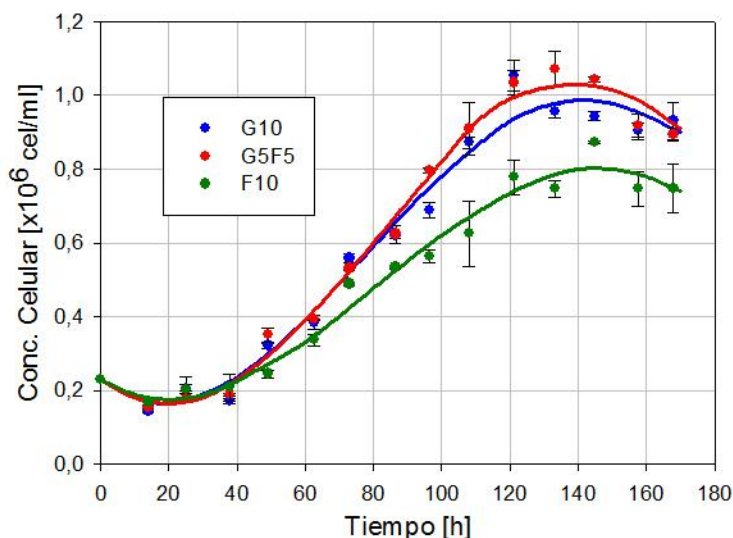


Figura 28: Cinética de Crecimiento del Estudio II. Crecimiento en 10 [mM] de: Glucosa (G10, azul), Glucosa y Fructosa 1:1 (G5F5, roja) y Fructosa (F10, verde) (datos representan al promedio de dos muestras \pm desv. estándar).

De la Figura 28 se observa que el crecimiento en el caso del medio con glucosa 10 [mM] (G10) se alcanzó un valor máximo de concentración celular de $0,94 \times 10^6$ [cel/ml] aproximadamente, un 15% menor que el caso base de la Figura 11. Se ha reportado que cuando se tiene una menor cantidad de glucosa suplementada en el medio, el cultivo alcanzaría una densidad máxima menor, junto con una velocidad de crecimiento más lenta (Glacken et al., 1986). De la fase exponencial de la curva, la cual ocurre entre las 50 y 100 horas de cultivo, se extrae una velocidad de crecimiento de $0,0164$ [h^{-1}], un 22% más bajo que el caso base. Para la suplementación con sólo fructosa 10 [mM] (F10) ambos parámetros de crecimiento fueron menores. Por un lado, los datos en color verde de la Figura 28 alcanzan un valor de densidad celular cercano a $0,78 \times 10^6$ [cel/ml], un 29% de diferencia con el caso base y un 17% de diferencia con el caso G10. La velocidad máxima de crecimiento fue de $0,0154$ [h^{-1}], lo que corresponde a un 27% más bajo que el caso base, pero sólo un 8% con respecto a G10. Finalmente, se obtuvo que para la suplementación mixta (G5F5) los valores de concentración celular y velocidad celular fueron más altos que el caso G10, pero no superan el 4% de

diferencias en ambos parámetros. La similitud de estos dos casos se debe principalmente a que las células tienen un comportamiento diauxico frente a la entrada de diferentes fuentes de carbono. Las células usarán fructosa como fuente de carbono sólo después de que no existe glucosa disponible en el medio (Johnsen et al., 2001). Por lo tanto, durante la primera mitad de cultivo, ambos casos (G10 y G5F5) se encuentran en la fase de consumo de glucosa, y sus valores de concentración celular son similares. Los parámetros mencionados se encuentran resumidos en la Tabla 30.

Tabla 30: Resumen de parámetros de crecimiento del Estudio II.

Caso	Máxima densidad celular [$\times 10^6$ cel/ml]	Máxima velocidad de crecimiento μ_{\max} [h^{-1}]
Glucosa 10	$0,94 \pm 0,06$	0,0167
Glucosa 5 / Fructosa 5	$0,98 \pm 0,08$	0,0171
Fructosa 10	$0,78 \pm 0,05$	0,0154

El consumo de fructosa como fuente de carbono está limitado por la cantidad de proteínas transportadoras a nivel de membrana disponible en las células HepG2. Esta línea celular posee niveles de expresión similares a un hepatocito, en cuanto a las dos proteínas de membrana encargadas de captar fructosa del medio, GLUT2 y GLUT5 (Hirahatake et al., 2011). La primera es la principal proteína transportadora de carbohidratos en el hígado, a pesar de tener una baja afinidad por estos ($K_{m_{\text{Glc}}} = 17$ [mM] y $K_{m_{\text{Frc}}} = 76$ [mM]) (Wu et al., 2010). Para contrarrestar este hecho, los hepatocitos sintetizan una gran cantidad de esta proteína (mayor a cualquier otra célula del cuerpo), lo que les permite cumplir con su función de homeostasis glicémico (Bell et al., 1990). En cambio, la proteína GLUT5 es exclusiva de fructosa, con una afinidad de 6 [mM], pero su nivel de expresión en hígado es casi nulo (Bell et al., 1990; Wu et al., 2010). Existen dos teorías que explicarían el crecimiento más lento de las células en F10 en este ensayo: la primera consiste en que el pretratamiento no fue totalmente efectivo y las células tienen una deficiencia en transportadores específicos de fructosa, lo que produce un crecimiento levemente menor a los otros casos; o por otro lado, las células están preparadas para un crecimiento en fructosa, pero utilizan el flujo de carbono para la producción de triglicéridos y no para proliferación, lo cual, concordaría con la hipótesis planteada para este ensayo. En las siguientes secciones, el cálculo de tasas específicas de intercambio junto con el MFA permitirá aclarar si esta última teoría es cierta.

3.4.2 Análisis Metabólico II

A través de la medición de concentraciones en el medio de cultivo, se obtuvieron las tasas de consumo/producción de los metabolitos considerados en el modelo. De acuerdo a las curvas de crecimiento mostradas en la Figura 28, la fase exponencial comprende entre las 50 y 100 horas de cultivo. Para este ensayo, se inocularon células HepG2 en placas de 100 [mM] y se realizaron las mediciones en los tiempos 58 y 78 horas de cultivo. Se analizaron los tres casos de suplementación del medio (G10, G5F5 y F10), con dos muestras por caso, en uniplicado. En la Figura 29, se muestran los gráficos de concentración celular, hexosa (dependiendo del caso) y lactato. Dado que en este estudio es de interés comparar el nivel de síntesis de triglicéridos (TG), también se muestra la variación de su concentración, normalizada a la concentración de proteínas totales para compararlos con reportes de literatura. A continuación, se realiza el análisis caso a caso de las tasas de intercambio obtenidas.

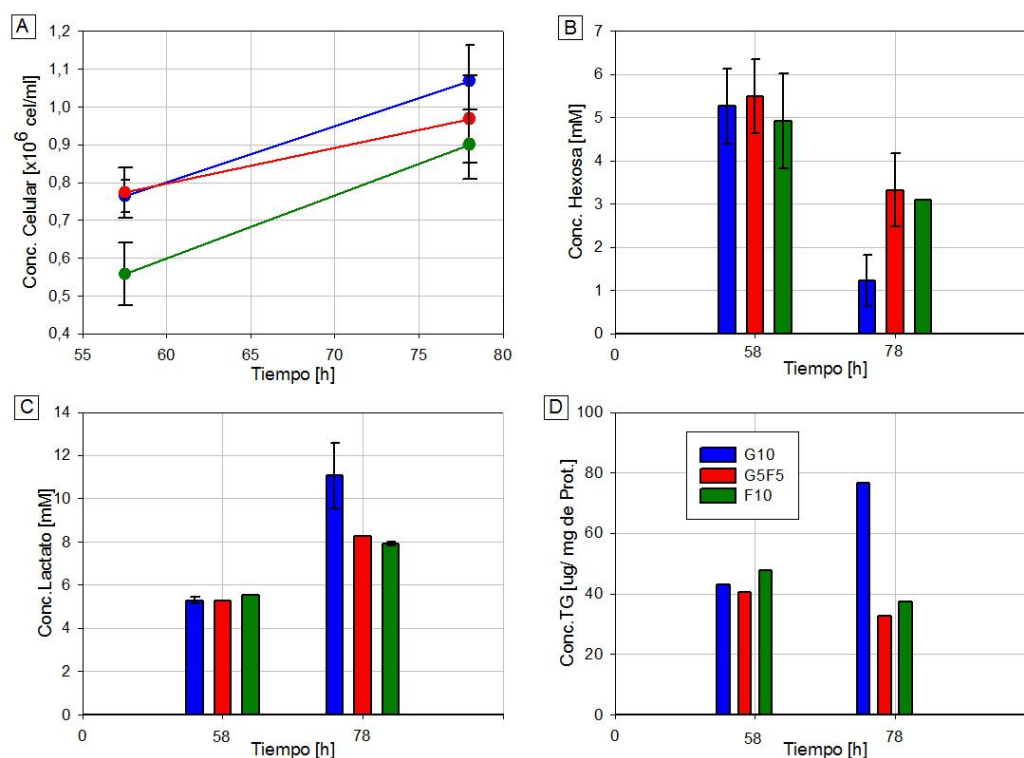


Figura 29: Análisis Metabólico del Estudio II. Variación a lo largo del tiempo de: A) densidad celular, B) glucosa, C) lactato, D) triglicéridos (datos representan al promedio de dos mediciones de una misma muestra \pm desv. estándar).

3.4.2.1 Caso 2.1: Glucosa 10 [mM] (G10)

Para el caso de suplementación exclusiva de glucosa, de la curva azul de la Figura 29 A, se obtiene una velocidad de crecimiento de $0,0164 \text{ [h}^{-1}\text{]}$, levemente menor al ensayo anterior. Sin embargo, en este ensayo se obtuvo una densidad celular mayor, con valores de concentración por sobre los $0,7 \times 10^6 \text{ [cel/ml]}$ a las 58 horas, y por sobre 10^6 [cel/ml] a las 78 horas, mientras que para el ensayo de la curva de crecimiento, en los mismos tiempos se obtuvo una concentración de $0,4$ y $0,6 \times 10^6 \text{ [cel/ml]}$, respectivamente. Dado que crecieron a la misma velocidad en ambos ensayos, la razón de la diferencia puede ser que simplemente se inoculó una mayor cantidad de células. Viendo los gráficos B y C de la Figura 29 se indica que este caso fue en el que hubo un mayor consumo de glucosa, pero a la vez, una mayor producción de lactato, siendo el $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 1,4, dentro del margen esperado y un 40% mayor al generado de la curva de crecimiento de la Figura 11. Además, fue el único caso en que la concentración de TG (normalizada a la conc. de proteínas) aumenta con el tiempo (Figura 29 D), llegando cercano a $80 \text{ [}\mu\text{g/mg de proteína]}$. Es necesario indicar que este valor se encuentra por debajo al encontrado en reportes científicos, siendo los de éstos mayores en por lo menos un orden de magnitud (Gibbons et al., 1994; Zang et al., 2006; Gomez-Lechon et al., 2007). La Tabla 31 muestra las tasas específicas obtenidas para biomasa, glucosa, lactato, TG y amonio, las cuales son altas con magnitudes por sobre los 10^{-2} , a excepción de TG. Para este caso, las tasas específicas disminuyen entre las 20 horas de cultivo, indicando que a las 78 [h] hubo un mayor crecimiento, por encontrarse cercano a la máxima velocidad de crecimiento.

Tabla 31: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Biomasa	$3,22 \times 10^{-1}$	$2,31 \times 10^{-1}$
Hexosa	$-2,58 \times 10^{-2}$	$-1,85 \times 10^{-2}$
Lactato	$3,66 \times 10^{-1}$	$2,63 \times 10^{-1}$
Triglicéridos	$9,63 \times 10^{-4}$	$6,29 \times 10^{-4}$
Amonio	$2,72 \times 10^{-2}$	$1,95 \times 10^{-2}$

Con respecto a las tasas de intercambio de aminoácidos, mostradas en la Tabla 32, todas corresponden a tasas de consumo, siendo las más altas las de leucina y triptófano para el caso de los esenciales, y arginina, glutamina y glicina para los no esenciales. Al igual que las tasas de la tabla anterior, éstas disminuyen a las 78 horas de cultivo.

Tabla 32: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo		Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Histidina	$-2,63 \times 10^{-3}$	$-1,69 \times 10^{-3}$	Alanina	$-8,06 \times 10^{-4}$	$-5,79 \times 10^{-4}$
Isoleucina	$-5,63 \times 10^{-3}$	$-4,05 \times 10^{-3}$	Arginina	$-1,88 \times 10^{-2}$	$-1,35 \times 10^{-2}$
Leucina	$-1,11 \times 10^{-2}$	$-8,01 \times 10^{-3}$	Asparagina	$-1,29 \times 10^{-3}$	$-9,30 \times 10^{-4}$
Lisina	$-5,98 \times 10^{-3}$	$-4,29 \times 10^{-3}$	Aspartato	$-1,13 \times 10^{-3}$	$-8,14 \times 10^{-4}$
Metionina	$-1,50 \times 10^{-3}$	$-1,08 \times 10^{-3}$	Cisteína	$-4,96 \times 10^{-3}$	$-3,57 \times 10^{-3}$
Fenilalanina	$-3,35 \times 10^{-3}$	$-2,40 \times 10^{-3}$	Glutamina	$-6,68 \times 10^{-2}$	$-4,80 \times 10^{-2}$
Treonina	$-7,56 \times 10^{-3}$	$-5,43 \times 10^{-3}$	Glutamato	$-2,70 \times 10^{-3}$	$-1,94 \times 10^{-3}$
Triptofano	$-1,39 \times 10^{-2}$	$-1,00 \times 10^{-2}$	Glicina	$-2,84 \times 10^{-2}$	$-2,04 \times 10^{-2}$
Valina	$-2,16 \times 10^{-3}$	$-1,55 \times 10^{-3}$	Prolina	$-3,27 \times 10^{-3}$	$-2,35 \times 10^{-3}$
			Serina	$-3,74 \times 10^{-3}$	$-2,69 \times 10^{-3}$
			Tirosina	$-9,56 \times 10^{-4}$	$-6,87 \times 10^{-4}$

3.4.2.2 Caso 2.2: Glucosa 5 [mM] y Fructosa 5 [mM] (G5F5)

En este caso, de la Figura 29 A, se observa que hubo un crecimiento menor que el caso anterior, alcanzando un nivel de concentración celular por debajo de los 10^6 [cel/ml]. Esto constituye la primera diferencia con el ensayo anterior, dado que en la curva de crecimiento obtenida para G5F5 las densidades celulares fueron casi iguales que las de G10 durante la fase exponencial (Figura 28). Sin embargo, las obtenidas en este ensayo también se encuentran muy por sobre las que se alcanzaron en esa curva, en los mismos tiempos de evaluación. Para este caso, la velocidad de crecimiento que se desprende de los datos fue de $0,0109$ [h⁻¹], un 34% menor que el caso 2.1, y un 36% menor que el obtenido en la curva de crecimiento para el caso 2.2.

El $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ para este caso fue de 1,2, valor que se encuentra dentro del rango esperado ($\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc} < 2$). Además, de la Figura 29 B, el cual muestra la concentración de azúcar total, ésta tiene un valor cercano a 5 [mM] a las 57 [h] y de 3 [mM] a las 78[h]. Dado que existe un comportamiento diauxico, a esta altura del crecimiento la glucosa ya fue consumida, y la evaluación se está haciendo durante un período de consumo de fructosa. Viendo la tasa específica de consumo de azúcar (Tabla 33), este consumo fue más lento que el de glucosa para el caso 2.1. Este hecho refleja que, si bien la fructosa se metabolizaría de forma más rápida que la glucosa en el interior, esto no implica que su ingreso a través de las proteínas transportadoras sea igual de rápido, sino que los resultados obtenidos muestran lo contrario.

Tabla 33: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Biomasa	$1,67 \times 10^{-1}$	$1,39 \times 10^{-1}$
Hexosa	$-1,45 \times 10^{-1}$	$-1,20 \times 10^{-1}$
Lactato	$1,67 \times 10^{-1}$	$1,38 \times 10^{-1}$
Triglicéridos	$1,31 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-4}$
Amonio	$5,65 \times 10^{-2}$	$4,69 \times 10^{-2}$

Con respecto al metabolismo de triglicéridos, es posible ver en la Figura 29 D, que la concentración relativa de triglicéridos disminuye, a diferencia del caso anterior, siendo consistente con el hecho de que está entrando una menor cantidad de fuente de carbono. Cabe destacar que a pesar de que disminuye la concentración relativa, esto no indica que se produzca un consumo de TG. En la Tabla 33 se muestra que la tasa específica de intercambio de TG es de producción, pero menos del 20% de la obtenida para el caso 2.1. Por último, todas las tasas de intercambio de aminoácidos calculadas son de consumo, con magnitudes similares al caso 2.1 (Tabla 34).

Tabla 34: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo		Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Histidina	$-2,17 \times 10^{-3}$	$-1,80 \times 10^{-3}$	Alanina	$-8,24 \times 10^{-4}$	$-6,84 \times 10^{-4}$
Isoleucina	$-5,88 \times 10^{-3}$	$-4,88 \times 10^{-3}$	Arginina	$-1,52 \times 10^{-2}$	$-1,26 \times 10^{-2}$
Leucina	$-1,08 \times 10^{-2}$	$-8,95 \times 10^{-3}$	Asparagina	$-1,12 \times 10^{-3}$	$-9,33 \times 10^{-4}$
Lisina	$-9,15 \times 10^{-3}$	$-7,60 \times 10^{-3}$	Aspartato	$-1,02 \times 10^{-3}$	$-8,64 \times 10^{-4}$
Metionina	$-1,50 \times 10^{-3}$	$-1,25 \times 10^{-3}$	Cisteína	$-5,47 \times 10^{-3}$	$-4,54 \times 10^{-3}$
Fenilalanina	$-3,10 \times 10^{-3}$	$-2,58 \times 10^{-3}$	Glutamina	$-6,29 \times 10^{-2}$	$-5,22 \times 10^{-2}$
Treonina	$-7,92 \times 10^{-3}$	$-6,58 \times 10^{-3}$	Glutamato	$-1,77 \times 10^{-3}$	$-1,47 \times 10^{-3}$
Triptofano	$-1,19 \times 10^{-2}$	$-9,92 \times 10^{-3}$	Glicina	$-1,84 \times 10^{-2}$	$-1,53 \times 10^{-2}$
Valina	$-1,77 \times 10^{-3}$	$-1,47 \times 10^{-3}$	Prolina	$-1,77 \times 10^{-3}$	$-1,47 \times 10^{-3}$
			Serina	$-2,31 \times 10^{-3}$	$-1,92 \times 10^{-3}$
			Tirosina	$-2,50 \times 10^{-3}$	$-2,08 \times 10^{-3}$

3.4.2.3 Caso 2.3: Fructosa 10 [mM] (F10)

Utilizando solo una suplementación del medio de cultivo con 10 [mM] de fructosa, se obtuvo que la densidad celular alcanzada a los 58 horas es menor que la de los dos casos anteriores, con un valor de $0,55 \times 10^6$ [cel/ml]. Sin embargo, a las 78 horas, la concentración celular llega a los $0,9 \times 10^6$ [cel/ml] (Figura 29 A). Dado este gran salto durante el tiempo de cultivo es que la velocidad de crecimiento para F10 es de $0,0234$ [h⁻¹], un 42% mayor que G10 y un 52% que la velocidad calculada de la curva de crecimiento de la Figura 28 para el mismo caso. Debido a esta gran variación, las tasas específicas de los metabolitos disminuyen en un mayor rango que ambos casos anteriores. Es posible que el segundo punto se encuentre sobrevalorado, y según las curva de crecimiento del ensayo anterior, para que creciera a la velocidad esperada, este valor de densidad celular debiese ser menor. El consumo de glucosa y la producción de lactato fueron similares al caso 2.2, generando un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 1,1, valor dentro del margen esperado ($\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc} < 2$). Nuevamente, con estos resultados se sostiene la teoría comentada en el caso 2.2, donde un bajo nivel de proteínas de membrana para fructosa produce una entrada de ésta más lenta. Todas estas tasas específicas, junto con la de TG y amonio se encuentran en la Tabla 35.

Tabla 35: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Biomasa	4,62 x10 ⁻¹	2,96 x10 ⁻¹
Hexosa	-1,70 x10 ⁻¹	-1,09 x10 ⁻¹
Lactato	1,86 x10 ⁻¹	1,19 x10 ⁻¹
Triglicéridos	2,89 x10 ⁻⁴	1,85 x10 ⁻⁴
Amonio	7,95 x10 ⁻²	5,09 x10 ⁻²

Los resultados de concentración relativa de TG (Figura 29 D) también fueron similares al caso 2.2, donde a pesar de tener una tasa específica de producción de TG, la baja cantidad de flujo de carbono que entra por concepto de hexosa, no permite un gran incremento de la producción de TG. Finalmente, los aminoácidos presentaron el mismo comportamiento que los otros dos casos, pero con algunas tasas de consumo con mayor de magnitud. En los esenciales, además de leucina y triptófano, también son grandes las tasas de lisina y treonina. En cambio, para los no esenciales se obtuvo una tasa mayor para arginina, aspartato, glutamina y glicina.

Tabla 36: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales			Aminoácido no esenciales		
	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo		Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Histidina	-2,93 x10 ⁻³	-1,87 x10 ⁻³	Alanina	-1,91 x10 ⁻³	-1,22 x10 ⁻³
Isoleucina	-1,02 x10 ⁻²	-6,53 x10 ⁻³	Arginina	-1,30 x10 ⁻²	-8,31 x10 ⁻³
Leucina	-1,28 x10 ⁻²	-8,17 x10 ⁻³	Asparagina	-1,56 x10 ⁻³	-9,98 x10 ⁻⁴
Lisina	-1,20 x10 ⁻²	-7,66 x10 ⁻³	Aspartato	-3,80 x10 ⁻²	-2,43 x10 ⁻²
Metionina	-2,20 x10 ⁻³	-1,41 x10 ⁻³	Cisteína	-5,79 x10 ⁻³	-3,70 x10 ⁻³
Fenilalanina	-5,64 x10 ⁻³	-3,61 x10 ⁻³	Glutamina	-9,50 x10 ⁻²	-6,08 x10 ⁻²
Treonina	-1,23 x10 ⁻²	-7,85 x10 ⁻³	Glutamato	-3,74 x10 ⁻³	-2,39 x10 ⁻³
Triptofano	-1,03 x10 ⁻²	-6,57 x10 ⁻³	Glicina	-2,63 x10 ⁻²	-1,69 x10 ⁻²
Valina	-5,00 x10 ⁻³	-3,20 x10 ⁻³	Prolina	-5,02 x10 ⁻³	-3,21 x10 ⁻³
			Serina	-4,25 x10 ⁻³	-2,72 x10 ⁻³
			Tirosina	-2,90 x10 ⁻³	-1,86 x10 ⁻³

En síntesis, los tres casos analizados mediante el cálculo de las tasas específicas de consumo/producción presentaron un comportamiento general bastantes similares, con ciertos factores que identifica a cada uno. Para el caso 2.1, su crecimiento fue bastante alto, pero a una velocidad similar a la registrada en el ensayo anterior. Además, fue el de mayor consumo de fuente de carbono y producción de lactato. El caso 2.2 y 2.3 presentaron un consumo más lento de la fuente de carbono, debido principalmente a que ambos casos se están alimentando de fructosa. La diferencia entre estos dos casos es que en el segundo se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento durante el tiempo de cultivo evaluado. La Tabla 37 resume los parámetros de crecimiento obtenidos en este ensayo.

Tabla 37: Resumen de parámetros de crecimiento en el Análisis Metabólico II.

Caso	Velocidad de crecimiento μ [h ⁻¹]	$\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$
2.1: Glucosa 10	0,016	1,4
2.2: Glucosa 5 / Fructosa 5	0,011	1,2
2.3: Fructosa 10	0,023	1,1

En cuanto a la síntesis de TG, se obtuvo una relación directa donde a mayor cantidad de moléculas de azúcar consumida, mayor será la concentración de TG generada. Esto contradice en cierta medida a la hipótesis planteada para este estudio, ya que un consumo mixto o exclusivo de fructosa no produjo una elevada síntesis de TG. En la sección a continuación, utilizando las tasas de consumo/producción calculadas y el modelo hepático planteado, se podrá ver si existen diferencias más notorias en la distribución de flujos internos debido a suplementaciones diferentes.

3.4.3 Análisis de Flujos Metabólico II

Siguiendo el mismo procedimiento de análisis del estudio anterior, para cada caso se indicará las tasas específicas de producción de CO₂, GSH y úrea, y las ponderaciones que se utilizarán para cerrar los balances de carbono y nitrógeno, dentro de un rango del 10%. Luego, se obtendrá las distribuciones de flujos internos para un análisis del metabolismo interno, y las tasas estimadas de intercambio que permitirá ver si existen diferencias considerables entre éstas y las obtenidas de las mediciones. En la Figura 30 se muestra la distribución de flujos de carbono normalizados al flujo v_1 (primera reacción del Glc a G6P), mientras que en la Figura 31 se ve la distribución de flujos de nitrógenos normalizados al flujo de entrada de glutamina. La discusión de estas figuras se realiza en cada caso correspondiente.

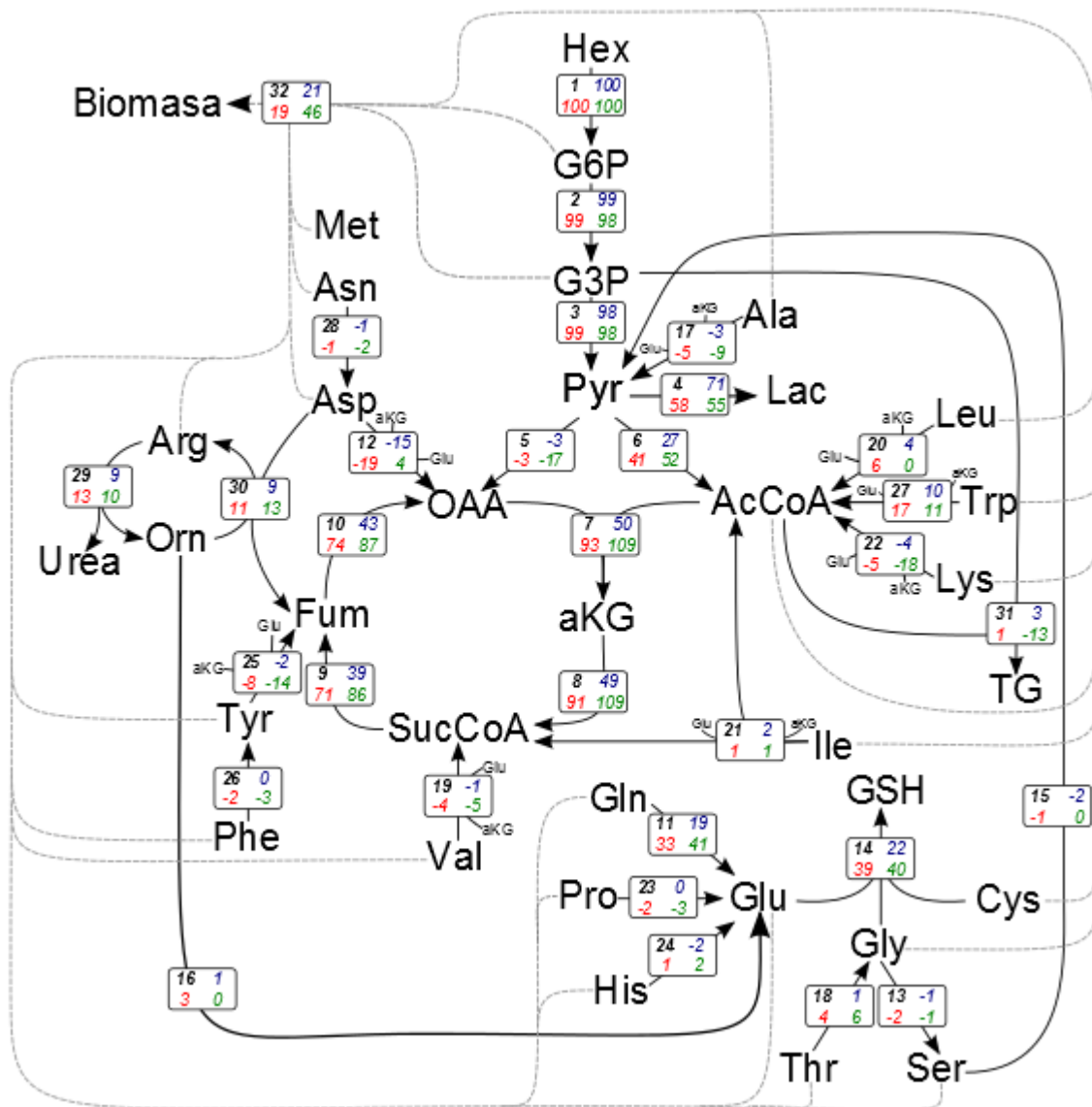


Figura 30: Distribución de flujos internos de carbono del Estudio II. Casos: G10 (azul), G5F5 (rojo), F10 (verde).

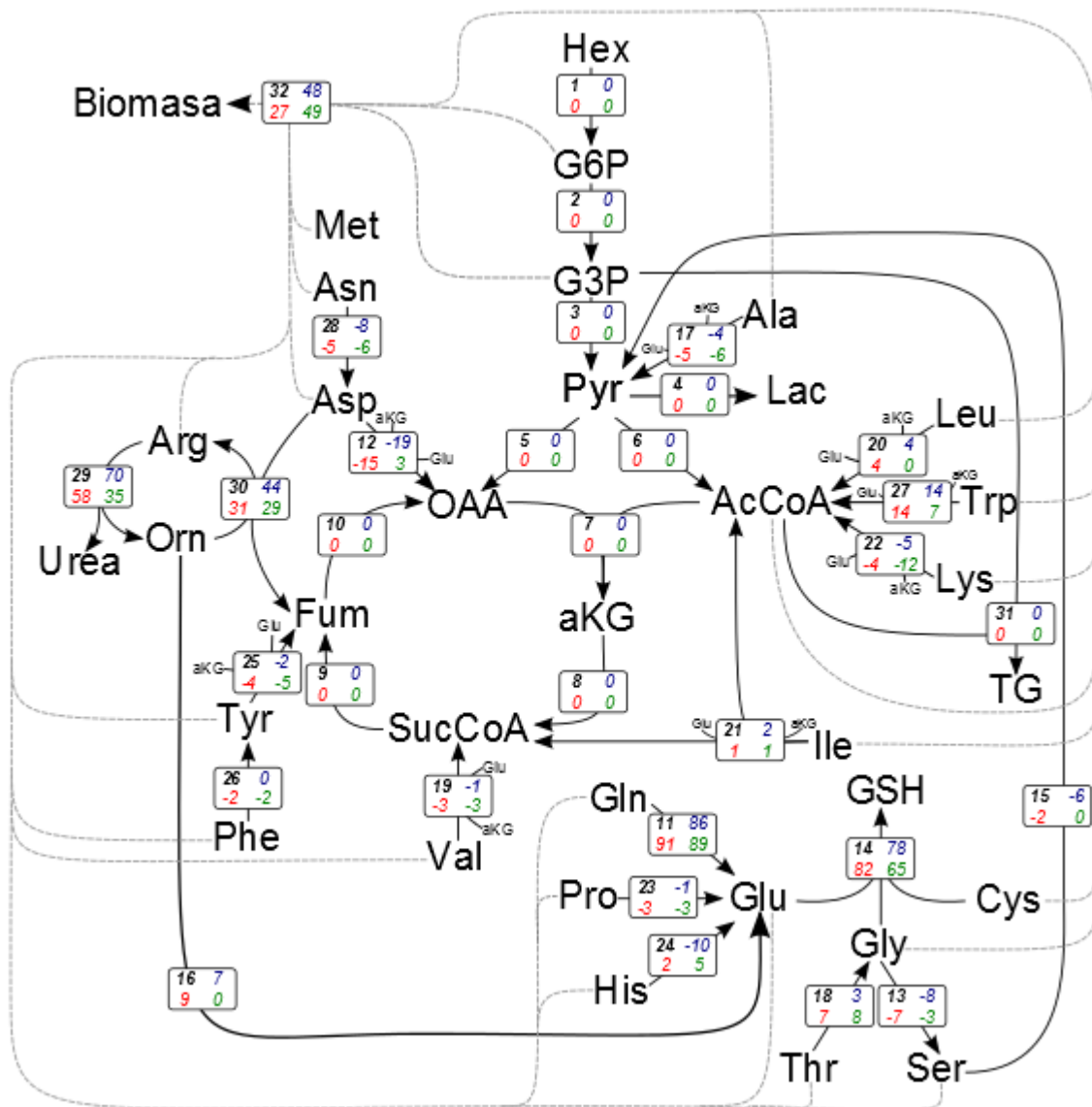


Figura 31: Distribución de flujos internos de nitrógeno del Estudio II. Casos: G10 (azul), G5F5 (rojo), F10 (verde).

3.4.3.1 Caso 2.1: Glucosa 10 [mM] (G10)

En la Tabla 38 es posible ver las tasas específicas de producción faltantes para el modelo, recordando que la tasa de oxígeno es constante para todos los casos, y proporcional entre ella de acuerdo al número de células en cada uno de los tiempo. En cambio, el GSH y úrea corresponden a una estimación a partir de cisteína y arginina, respectivamente. Dado que este último fue una de las tasas específicas de consumo más alta, la tasa de producción de úrea también será alta. El balance de carbono cierra con un 63%, mientras que el de nitrógeno lo hace con 47%, indicando precisamente que las tres tasas de producción de la Tabla 38 debiesen aumentar para satisfacer los requerimientos en ambos casos. Para cerrar los balances se ponderó las tasas de producción de CO₂ y GSH en 20 y 10, respectivamente. Con esto el balance queda en 101% para carbono y 97% para nitrógeno.

Tabla 38: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
CO ₂	4,46 x10 ⁻¹	3,21 x10 ⁻¹
GSH	6,16 x10 ⁻²	4,42 x10 ⁻²
Úrea	1,93 x10 ⁻²	1,39 x10 ⁻²

Teniendo el set de tasas específicas de intercambio se obtuvo la distribución de flujos de carbono internos de la Figura 30 (datos de color azul). De ésta es posible decir el 98% de la glucosa que entra pasa directamente hacia piruvato a través de la glicólisis, mientras que el 2% es destinado a formación de biomasa (v_{32}) y de triglicéridos (v_{31}) a partir de G6P y G3P. El primer nodo para el flujo de carbono es piruvato, donde del total del flujo que llega a este punto, el 98% proviene de la fuente de carbono (v_3), mientras que sólo el 2% viene por concepto de reacciones anapleróticas (v_5) (ver Figura 32). Desde aquí, el 3% es utilizado para síntesis de serina y alanina (v_{15} y v_{17}), el 27% para la formación de lactato (v_4) y el 70% continua hacia AcCoA. En este segundo nodo, el 72% del flujo total de carbono que llega proviene precisamente de piruvato, mientras que el 28% restante es producto de la degradación de aminoácidos. En cuanto a las reacciones que utilizan AcCoA como precursor se tiene que el 8% es utilizado para síntesis de lisina y tirosina, 13% para TG y 3% para biomasa. El resto es direccionado (71%) es direccionado hacia ciclo TCA, el cual posee flujos cuya magnitud se mantiene entre un 40% y 50% del flujo de entrada (ver Figura 32). Además, otra salida importante es la síntesis de GSH con un porcentaje relativo de un 22%.

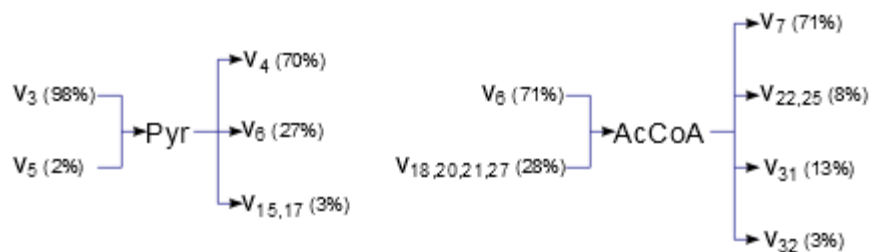


Figura 32: Caso 2.1. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Por otra parte, de la distribución de flujos internos de nitrógeno, mostrados en la Figura 31, es posible indicar que el 86% de la glutamina que entra es destinado para el aumento de los niveles de amonio y glutamato intracelular (v_{11}). Viendo el metabolismo de glutamato, el 73% de flujos

de entradas proviene de las tasas específicas de consumo de glutamina y glutamato, mientras que el 20% es producto de reacciones de transaminación en la degradación de algunos aminoácidos. El 7% restante proviene del ciclo de la úrea (v_{16}). Con respecto a éste es posible indicar que los flujos involucrados poseen los sentidos esperados (v_{29} y v_{30}), con un flujo constante de nitrógeno del 35% relativo. Volviendo al metabolismo del glutamato, de las reacciones de transaminación en que se utiliza glutamato como fuente de grupo amonio, el 32% del flujo de salida es exclusivamente utilizado en la reacción de síntesis de aspartato (v_{12}), para mantener el equilibrio con el ciclo de la úrea. El 25% es utilizado para la síntesis de otros aminoácidos, mientras que el 43% es para la formación de GSH (v_{14}). El aporte hacia la formación de biomasa, comparándola con los otros flujos de salida, es prácticamente nulo (ver Figura 33).

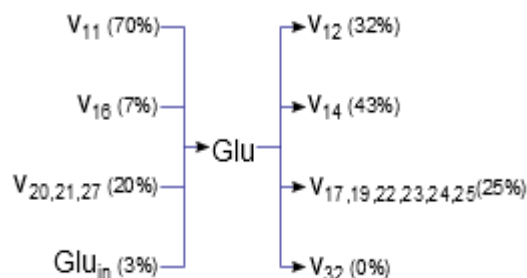


Figura 33: Caso 2.1. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

A través de la Ec. 18, se obtuvieron las tasas específicas estimadas que entrega el modelo. En la Tabla 39 se observa que las tasas para biomasa, glucosa, lactato y CO_2 , no sufren ninguna modificación al hacer cuadrar los balances. Además, la tasa de TG debiese ser un 12% menor, la de amonio un 8% mayor y la de úrea un 21% mayor. La tasa con un mayor cambio debiese ser la de producción de GSH, siendo casi un 50% menor que la calculada.

Tabla 39: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas, en $[\text{mmol}/10^9 \text{ cel}/\text{h}]$.

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$3,22 \times 10^{-1}$	$2,32 \times 10^{-1}$	100%
Hexosa	$-2,58 \times 10^{-2}$	$-1,85 \times 10^{-2}$	100%
Lactato	$3,66 \times 10^{-1}$	$2,63 \times 10^{-1}$	100%
Triglicéridos	$8,45 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-4}$	88%
Amonio	$2,92 \times 10^{-2}$	$2,10 \times 10^{-2}$	108%
CO_2	$4,46 \times 10^{-1}$	$3,21 \times 10^{-1}$	100%
GSH	$3,46 \times 10^{-2}$	$2,49 \times 10^{-2}$	56%
Úrea	$2,33 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-2}$	121%

En cuanto a los aminoácidos, a diferencia de la tabla anterior, la estimación de sus tasas sufre mayores cambios, para que exista un balance del 100% del sistema. Para el caso de los aminoácidos esenciales, el modelo señala que existe un exceso de histidina, y esta debiese ser producida por la célula a una tasa 55% mayor a la calculada. Los demás aminoácidos de este grupo se mantienen como tasas específicas de consumo, pero con una menor magnitud, siendo lisina, metionina, fenilalanina y valina las que se reducen en más del 50%. Para los no esenciales, los casos de alanina, asparagina, aspartato y tirosina debiesen ser tasas de producción de aminoácidos, con asparagina con el mayor aumento (el doble de la tasa calculada). Además, de las tasas de consumo, la de cisteína sufre un cambio extremo, con una tasa estimada 7 veces mayor, indicando que existe un gran requerimiento de éste compuesto para el cierre del balance,

y para que exista un equilibrio entre lo que entra como cisteína y lo que sale como GSH. Las demás tasas de consumo debiesen disminuir en magnitud.

Tabla 40: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo
His	3,65 x10 ⁻³	2,62 x10 ⁻³	-155%	Ala	1,10 x10 ⁻³	7,91 x10 ⁻⁴	-137%
Ile	-3,73 x10 ⁻³	-2,68 x10 ⁻³	66%	Arg	-1,08 x10 ⁻²	-7,78 x10 ⁻³	58%
Leu	-9,24 x10 ⁻³	-6,64 x10 ⁻³	83%	Asn	2,67 x10 ⁻³	1,91 x10 ⁻³	-206%
Lys	-2,16 x10 ⁻³	-1,55 x10 ⁻³	36%	Asp	7,72 x10 ⁻⁴	5,55 x10 ⁻⁴	-68%
Met	-6,05 x10 ⁻⁴	-4,34 x10 ⁻⁴	40%	Cys	-3,59 x10 ⁻²	-2,58 x10 ⁻²	722%
Phe	-1,45 x10 ⁻³	-1,04 x10 ⁻³	43%	Gln	-6,28 x10 ⁻²	-4,51 x10 ⁻²	94%
Thr	-5,52 x10 ⁻³	-3,96 x10 ⁻³	73%	Glu	-7,93 x10 ⁻⁴	-5,70 x10 ⁻⁴	29%
Trp	-9,98 x10 ⁻³	-7,17 x10 ⁻³	72%	Gly	-2,64 x10 ⁻²	-1,90 x10 ⁻²	93%
Val	-2,56 x10 ⁻⁴	-1,84 x10 ⁻⁴	12%	Pro	-1,37 x10 ⁻³	-9,85 x10 ⁻⁴	42%
				Ser	-1,70 x10 ⁻³	-1,22 x10 ⁻³	45%
				Tyr	9,37 x10 ⁻⁴	6,73 x10 ⁻⁴	-98%

Finalmente, el modelo entrega una estimación de las tasas específicas de metabolitos intermedios, los cuales habían sido asumidos como nulos. Se obtuvo que a excepción de ornitina, todos estos flujos son de consumo y muy pequeños, del orden de 10⁻⁶, por lo que no son muy influyentes en el sistema. Sin embargo, la tasa de producción de ornitina es comparable con algunos casos de aminoácidos, indicando que existe la posibilidad de que las células si realicen intercambio de ornitina con el medio extracelular, y que éste sea necesario para poder regular los flujos pertenecientes al ciclo de la úrea.

Tabla 41: Caso 2.1. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Acetil CoA	-4,65x10 ⁻⁶	-3,34 x10 ⁻⁶
α Cetoglutarato	-1,16 x10 ⁻⁵	-8,36 x10 ⁻⁶
Fumarato	-9,31 x10 ⁻⁶	-6,69 x10 ⁻⁶
Gliceraldehído 3P	-6,98 x10 ⁻⁶	-5,01 x10 ⁻⁶
Glucosa 6P	-1,40 x10 ⁻⁵	-1,00 x10 ⁻⁵
Oxaloacetato	-9,31 x10 ⁻⁶	-6,69 x10 ⁻⁶
Ornitina	3,96 x10⁻³	2,84 x10⁻³
Piruvato	-6,98 x10 ⁻⁶	-5,01 x10 ⁻⁶
Succinil CoA	-9,31 x10 ⁻⁶	-6,69 x10 ⁻⁶

En síntesis, el set de tasas específicas calculadas permitió generar una distribución de flujos sin situaciones anormales como en el estudio anterior. El flujo total de carbono que proviene de la fuente de azúcar es utilizado principalmente para la producción de lactato, y el restante es direccionado hacia el ciclo TCA. Por el lado de los flujos de nitrógeno, el principal uso de lo que entra por el consumo de glutamina es utilizado para la formación de GSH y de aspartato. Sin embargo, cabe señalar que si bien fue posible calzar los balances por especie, las tasas estimadas que entrega el modelo indican que no es factible que todas las tasas específicas de aminoácidos sean de consumo, sino que deben existir de producción de manera que permita disminuir la carga de carbono y nitrógeno en ciertas vías. Además, se señala que ornitina es un flujo que debiese

considerarse como tasa de producción importante, al igual que los demás aminoácidos del modelo.

3.4.3.2 Caso 2.2: Glucosa 5 [mM] y Fructosa 5 [mM] (G5F5)

Para la suplementación mixta, con las tasas específicas de producción de CO₂, GSH y úrea junto con las tasas de la sección anterior, el balance de carbono para éstas es de 49%, mientras que el balance de nitrógeno es de 54%. Nuevamente se presenta el caso en donde falta prácticamente la mitad de flujos de salida. Con el objetivo de cerrar bien el balance, se ponderó por los mismos factores que el caso 2.1, es decir, se multiplicó por 20 la tasa específica de CO₂ y por 10 la tasa específica de GSH, logrando cerrar el balance de carbono y nitrógeno en un 102% y 101%, respectivamente. Las tasas específicas de CO₂, GSH y úrea consideradas se muestran en la Tabla 42, a continuación.

Tabla 42 : Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
CO ₂	4,36 x10 ⁻¹	3,62 x10 ⁻¹
GSH	6,09 x10 ⁻²	5,06 x10 ⁻²
Úrea	1,56 x10 ⁻²	1,30 x10 ⁻²

Con este set de tasas específicas se elaboró la distribución de flujos de carbono mostradas en la Figura 30, pero ahora los datos de este caso son los de color rojo. Esta distribución de flujos es bastante similar que el caso 2.1, a pesar de no tener las mismas tasas de consumo de hexosa. Del total de carbonos que entra a la célula como fructosa (se recuerda que debido al comportamiento diauxico, las células se encuentran en un crecimiento bajo fructosa), el 99% es llevado a formar piruvato, mientras que el 1% es utilizado para la síntesis de TG (v₃₁) y biomasa (v₃₂). Siendo reiterativo, la distribución porcentual de los flujos que llegan y salen de piruvato es semejante al caso 2.1, donde el 98% proviene de la glicólisis (v₃), mientras que sólo el 2% es por reacciones anapleróticas (v₅). Desde piruvato, el 3% es dirigido para síntesis de alanina y serina (v₁₅ y v₁₆), el 56% para la síntesis de lactato (v₄) y el 41% sigue hacia AcCoA (v₆) (ver Figura 34). En este segundo punto importante, el mayor flujo proviene desde piruvato (71%), lo demás proviene de la degradación de aminoácidos (29%). Los flujos de salida de carbono desde AcCoA se dividen en un 84% hacia ciclo TCA (v₇), 8% para síntesis de lisina y tirosina (v₂₂ y v₂₅), 3% para la de TG (v₃₁) y 5% para biomasa (v₃₂) (ver Figura 34). Aquí existe una diferencia entre los casos. El efecto de la menor producción de TG para el caso 2.2 se ve reflejado en el aumento del flujo hacia el ciclo TCA, siendo un 13% mayor que el caso 2.1. Esto produce que el flujo de carbono que se mantiene en el ciclo TCA corresponda a un rango de porcentaje relativo entre 70 y 90.

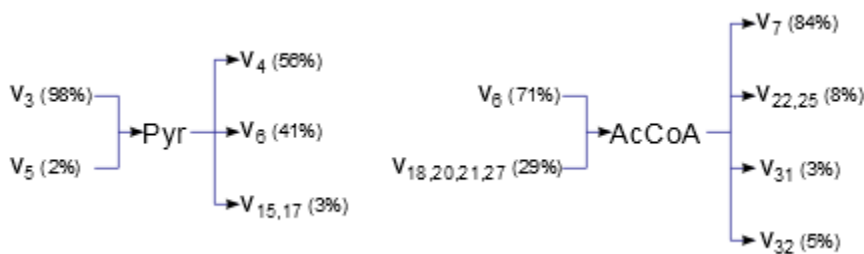


Figura 34: Caso 2.2. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Adicionalmente, la Figura 31 muestra la distribución de flujos de nitrógeno, normalizadas a la entrada de glutamina (datos de color rojo), de las cual se puede decir que la reacción de glutaminólisis (v_{11}) se lleva el 91% del total de glutamina disponible. La diferencia de la distribución porcentual de flujos de nitrógeno que llegan hacia glutamato entre los casos 2.1 y 2.2 son despreciables. Se obtuvo que el 71% proviene de glutamina (v_{11}), el 8% desde el ciclo de úrea (v_{16}), el 20% de la desaminación de los mismos aminoácidos que en el caso 2.1, y sólo 1% proviene del consumo de glutamato desde el medio extracelular (ver Figura 35). Del flujo total de nitrógeno que sale desde este nodo, un 44% es destinado a GSH (v_{16}), un 25% (7% menor que el caso 2.1) se utiliza en el paso de OAA a aspartato, mientras que el resto de reacciones de síntesis de aminoácidos se lleva el 31% restante. Con respecto al ciclo de la úrea, éste posee un flujo permanente que se mantiene en un rango de porcentaje relativo entre 30 y 60, límites 10% menor a los del caso 2.1. Además, se obtuvo que las reacciones que involucran aspartato (v_{12} y v_{30}) se encuentran en equilibrio.

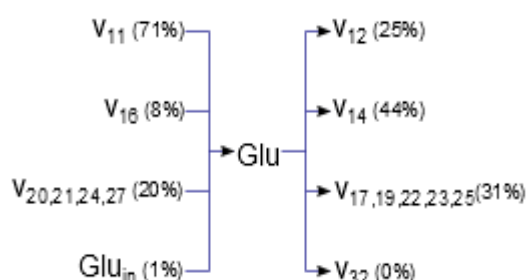


Figura 35: Caso 2.2. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

De las tasas específicas estimadas por el modelo, al igual que el caso 2.1, se obtuvo que las tasas de biomasa, hexosa, lactato, amonio y CO_2 no deben variar para un cierre de los balances, mientras que las de TG y GSH debiesen disminuir en un 35% y 44% respectivamente (ver Tabla 43). Además, la tasa de producción de úrea debe aumentar en un 17%.

Tabla 43: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas, en $[\text{mmol}/10^9\text{cel/h}]$.

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$1,68 \times 10^{-1}$	$1,39 \times 10^{-1}$	100%
Glucosa	$-1,45 \times 10^{-1}$	$-1,20 \times 10^{-1}$	100%
Lactato	$1,67 \times 10^{-1}$	$1,38 \times 10^{-1}$	100%
Triglicéridos	$8,56 \times 10^{-5}$	$7,11 \times 10^{-5}$	65%
Amonio	$5,47 \times 10^{-2}$	$4,54 \times 10^{-2}$	97%
CO_2	$4,36 \times 10^{-1}$	$3,62 \times 10^{-1}$	100%
GSH	$3,42 \times 10^{-2}$	$2,84 \times 10^{-2}$	56%
Úrea	$1,83 \times 10^{-2}$	$1,52 \times 10^{-2}$	117%

De las tasas estimadas de intercambio de aminoácidos (mostradas en Tabla 44), el modelo indica que en el caso de los esenciales, fenilalanina y valina debiesen ser de producción. Esta última además debe aumentar en un 50%, mientras que el consumo de treonina sólo un 20%. Todas las demás tasas de este grupo deben disminuir, siendo el más notorio la tasa de lisina que debiera llegar a un 2%. De los aminoácidos no esenciales existen cambios más grandes: alanina y aspartato deben ser de producción, con una tasa 4 y 3 veces más grandes, respectivamente; las tasas que también necesitan cambiar de sentido son asparagina, glutamato, prolina y tirosina, todas a excepción de la última, con una magnitud de flujo mayor al calculado. Cisteína, glicina y

serina continúan siendo de consumo, pero con una mayor magnitud, siendo la primera la que debe aumentar 6 veces su valor.

Tabla 44: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo
His	-1,26 x10 ⁻³	-1,04 x10 ⁻³	58%	Ala	3,64 x10 ⁻³	3,02 x10 ⁻³	-441%
Ile	-1,42 x10 ⁻³	-1,18 x10 ⁻³	24%	Arg	-9,79 x10 ⁻³	-8,13 x10 ⁻³	65%
Leu	-6,32 x10 ⁻³	-5,25 x10 ⁻³	59%	Asn	1,56 x10 ⁻³	1,30 x10 ⁻³	-139%
Lys	-2,27 x10 ⁻⁴	-1,89 x10 ⁻⁴	2%	Asp	3,44 x10 ⁻³	2,86 x10 ⁻³	-338%
Met	-3,15 x10 ⁻⁴	-2,62 x10 ⁻⁴	21%	Cys	-3,48 x10 ⁻²	-2,89 x10 ⁻²	637%
Phe	1,35 x10 ⁻³	1,12 x10 ⁻³	-44%	Gln	-6,02 x10 ⁻²	-5,00 x10 ⁻²	96%
Thr	-9,70 x10 ⁻³	-8,06 x10 ⁻³	122%	Glu	2,69 x10 ⁻³	2,23 x10 ⁻³	-152%
Trp	-9,26 x10 ⁻³	-7,69 x10 ⁻³	78%	Gly	-2,02 x10 ⁻²	-1,68 x10 ⁻²	110%
Val	2,69 x10 ⁻³	2,23 x10 ⁻³	-152%	Pro	2,69 x10 ⁻³	2,24 x10 ⁻³	-152%
				Ser	-4,09 x10 ⁻³	-3,40 x10 ⁻³	177%
				Tyr	1,96 x10 ⁻³	1,63 x10 ⁻³	-78%

Por último, siendo reiterativo, las tasas específicas de metabolitos intracelulares son similares a las obtenidas en el caso 2.1, con un orden de magnitud bastante bajo (10⁻⁶), por lo que se pueden considerar que no influyen en el sistema. Nuevamente, ornitina fue el único caso que se destaca, siendo una tasa específica de producción, bajo la misma teoría de que es necesaria para la regulación de los flujos de nitrógeno en el ciclo de la úrea.

Tabla 45: Caso 2.2. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Acetil CoA	-1,79 x10 ⁻⁶	-1,48 x10 ⁻⁶
α Cetoglutarato	-4,47 x10 ⁻⁶	-3,71 x10 ⁻⁶
Fumarato	-3,57 x10 ⁻⁶	-2,97 x10 ⁻⁶
Gliceraldehído 3P	-2,68 x10 ⁻⁶	-2,23 x10 ⁻⁶
Glucosa 6P	-5,36 x10 ⁻⁶	-4,45 x10 ⁻⁶
Oxaloacetato	-3,57 x10 ⁻⁶	-2,97 x10 ⁻⁶
Ornitina	2,69 x10⁻³	2,23 x10⁻³
Piruvato	-2,68 x10 ⁻⁶	-2,23 x10 ⁻⁶
Succinil CoA	-3,57 x10 ⁻⁶	-2,97 x10 ⁻⁶

En términos generales, comparando las distribuciones de los flujos es posible indicar que para este tipo de suplementación los flujos internos son bastantes similares a los obtenidos en el caso 2.1 en cuanto a magnitud, a pesar de que en este caso se analiza la alimentación de fructosa. El único efecto que se ve reflejado por el menor consumo fuente de carbono es que los flujos internos disminuirán, pero al normalizarlos por el flujo v1 se concluye que el metabolismo interno es el mismo que presentó el caso 2.1. La diferencia entre los casos radica que hubo una menor cantidad de carbono destinado hacia biomasa y lactato, lo que se traduce en un aumento en el ciclo TCA, y no en la síntesis de TG como se indica en la hipótesis de este estudio.

3.4.3.3 Caso 2.3: Fructosa 10 [mM] (F10)

En este último caso de estudio, utilizando las tasas específicas calculadas para CO₂, GSH y úrea, los balances para el caso de suplementación con solo fructosa en el medio son de 49% para carbono y 54% para nitrógeno. Se realizó la misma modificación que se hizo en los casos anteriores, ponderar la tasa de producción de CO₂ por 20 y la de GSH por 10, con el objetivo de estandarizar la metodología de estimación de estas tasas. Esto dio como resultado un cierre de balance de carbono en un 102% y de nitrógeno en un 101%. Las tasas se muestran en la Tabla 46 y es posible señalar que al igual que las tasas mostradas en la Tabla 35 y Tabla 36, sufren una gran variación entre los tiempos de cultivo debido al gran crecimiento presentado en este ensayo.

Tabla 46: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio de metabolitos no medidos experimentalmente, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
CO ₂	6,11 x10 ⁻¹	3,91 x10 ⁻¹
GSH	7,50 x10 ⁻²	4,80 x10 ⁻²
Úrea	1,34 x10 ⁻²	8,57 x10 ⁻³

La distribución de flujo generada para esta suplementación se muestran en las mimas Figura 30 y Figura 31, siendo para este caso los datos de color verde. Para comenzar, la distribución de flujos de carbono (Figura 30) señala que el 98% que entra por concepto de fructosa es metabolizado hasta piruvato a través de la glicólisis, y sólo un 2% es para la síntesis de TG y biomasa (v₃₁ y v₃₂). En este primer nodo, el 88% del flujo que se recibe proviene de glicólisis (v₃), mientras que el 12% viene por reacciones anapleóticas (v₅), un 10% mayor que el caso 2.1. De los flujos de salida, el 50% se convierte en lactato, mientras que el 47% es enviado hacia AcCoA, y al igual que los dos casos anteriores, el 3% es para la síntesis de alanina y serina (ver Figura 36). Realizando ahora el balance a nivel de AcCoA, el flujo que proviene de piruvato corresponde a un 65% de total que entra, mientras que el 13% es recibido desde la degradación de aminoácidos y el 22% desde triglicéridos. Las salidas comprenden un 18% como precursor para síntesis de aminoácidos, 10% para formación de biomasa y un 72% destinado a ciclo TCA (ver Figura 36). Éste último se diferencia de los dos casos estudiado anteriormente. Debido a la alta tasa de producción de CO₂ obtenida luego de la ponderación, el rango porcentual relativo de los flujos dentro del ciclo es entre un 70 y 100%, el doble al obtenido en el caso 2.1. Como resultado de este efecto, se obtuvo que la tasa de TG tenga el sentido contrario por los requerimientos de AcCoA, y no existe un equilibrio entre los flujos v₁₂ y v₃₀, sino que ambos flujos se orientan hacia el ciclo TCA.

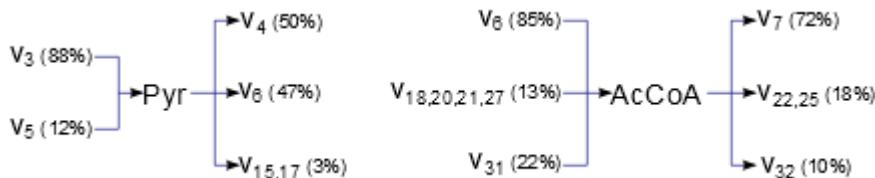


Figura 36: Caso 2.3. Balance de masa de piruvato y acetil CoA. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

Revisando la distribución de flujos de nitrógeno en la red metabólica (Figura 31), se obtuvo que le 89% de la glutamina que entra se degrada en amonio y glutamato (v₁₁). Esto corresponde al 79% de flujos de nitrógeno que llega hacia glutamato. El 4% de entrada es los que la célula toma desde el medio y el 17% de la transaminación en la degradación de aminoácidos. El aporte

desde úrea es casi nulo (v_{16}) (ver Figura 37). Esta reserva de glutamato es utilizado en un 43% para la síntesis de GSH y 57% para transaminación para síntesis de aminoácidos. El ciclo de úrea posee un flujo porcentual relativo de 30%, mucho más bajo que los otros casos estudiados, razón por la cual no es enviado nitrógeno desde este ciclo hacia glutamato.

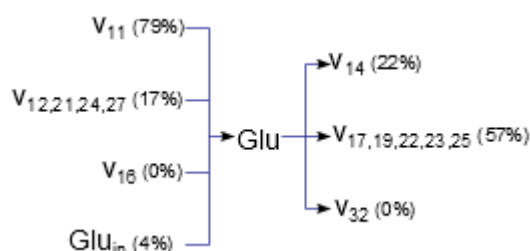


Figura 37: Caso 2.3. Balance de masa de glutamato. Distribución porcentual de los flujos de entrada y salida.

De las tasas específicas estimadas por el modelo y mostradas en la Tabla 47, se tiene que para obtener un balance de masa cerrado, es necesario que la tasa de triglicéridos sea de consumo y aumente su magnitud 8 veces, debido al requerimiento de carbono para el ciclo TCA explicados en los párrafos anteriores. Por tercera vez se indica que la tasa de producción de GSH debe disminuir a la mitad, mientras que la de úrea debe aumentar un 25%. Las demás tasas señaladas no muestran cambios.

Tabla 47: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo	Porcentaje Relativo
Biomasa	$4,63 \times 10^{-1}$	$2,96 \times 10^{-1}$	100%
Glucosa	$-1,70 \times 10^{-1}$	$-1,09 \times 10^{-1}$	100%
Lactato	$1,85 \times 10^{-1}$	$1,19 \times 10^{-1}$	100%
Triglicéridos	$-2,54 \times 10^{-3}$	$-1,62 \times 10^{-4}$	-879%
Amonio	$7,51 \times 10^{-2}$	$4,81 \times 10^{-2}$	95%
CO ₂	$6,11 \times 10^{-1}$	$3,91 \times 10^{-1}$	100%
GSH	$4,10 \times 10^{-2}$	$2,62 \times 10^{-2}$	55%
Úrea	$1,68 \times 10^{-2}$	$1,08 \times 10^{-2}$	126%

En los aminoácidos esenciales, las tasas de lisina, fenilalanina y valina pasan a ser de producción, con una magnitud menor al 50% de la medida. Sólo histidina y treonina deben aumentar su magnitud no más de un 40% para el cierre de balance, mientras que las demás tasas específicas de consumo disminuyen su valor. De los 11 aminoácidos no esenciales, 5 pasan a ser tasas de producción, en donde, la tasa de alanina debiese aumentar al triple, la de tirosina un 50% y la de arparagina y glutamato no más del 10%. Al igual que el caso G5F5, la tasa específica de consumo de cisteína aumenta 7 veces. También aumentan la de glicina y de serina, mientras que las tasas restantes disminuyen su magnitud.

De las tasas de intercambio de metabolitos intracelulares, para este caso la magnitud de las tasas son de 2 órdenes de magnitud mayor que la de los casos anteriores, indicando que existen desbalances producto de tasas específicas medidas asociadas a un gran error, por lo que es necesario que exista consumo de éstos metabolitos internos con mayores magnitudes que los obtenidos en los casos 2.1 y 2.2. Por tercera vez la tasa de ornitina alcanza valores similares a algunos aminoácidos.

Tabla 48: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de aminoácidos, en [mmol/10⁹ cel/h].

Aminoácidos esenciales				Aminoácidos no esenciales			
	Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo		Tasa específica 58 [h]	Tasa específica 78 [h]	Porcentaje Relativo
His	-4,14 x10 ⁻³	-2,65 x10 ⁻³	141%	Ala	5,76 x10 ⁻³	3,68 x10 ⁻³	-301%
Ile	-2,70 x10 ⁻³	-1,73 x10 ⁻³	26%	Arg	-6,36 x10 ⁻³	-4,07 x10 ⁻³	49%
Leu	-5,26 x10 ⁻³	-3,37 x10 ⁻³	41%	Asn	1,70 x10 ⁻³	1,09 x10 ⁻³	-109%
Lys	3,38 x10 ⁻³	2,16 x10 ⁻³	-28%	Asp	-3,04 x10 ⁻²	-1,94 x10 ⁻²	80%
Met	-8,68 x10 ⁻⁴	-5,56 x10 ⁻⁴	39%	Cys	-4,28 x10 ⁻²	-2,74 x10 ⁻²	740%
Phe	1,69 x10 ⁻³	1,08 x10 ⁻³	-30%	Gln	-9,18 x10 ⁻²	-5,87 x10 ⁻²	97%
Thr	-1,68 x10 ⁻²	-1,08 x10 ⁻³	137%	Glu	3,82 x10 ⁻³	2,45 x10 ⁻³	-102%
Trp	-7,40 x10 ⁻³	-4,74 x10 ⁻³	72%	Gly	-3,08 x10 ⁻²	-1,97 x10 ⁻²	117%
Val	2,56 x10 ⁻³	1,64 x10 ⁻³	-51%	Pro	2,54 x10 ⁻³	1,63 x10 ⁻³	-51%
				Ser	-8,77 x10 ⁻³	-5,61 x10 ⁻³	207%
				Tyr	4,43 x10 ⁻³	2,84 x10 ⁻³	-153%

Tabla 49: Caso 2.3. Tasas específicas de intercambio estimadas de metabolitos intracelulares, en [mmol/10⁹ cel/h].

Metabolito	Tasa específica a 58 [h] de cultivo	Tasa específica a 78 [h] de cultivo
Acetil CoA	-1,11 x10 ⁻⁴	-7,10 x10 ⁻⁵
α Cetoglutarato	-2,77 x10 ⁻⁴	-1,77 x10 ⁻⁴
Fumarato	-2,22 x10 ⁻⁴	-1,42 x10 ⁻⁴
Gliceraldehído 3P	-1,66 x10 ⁻⁴	-1,06 x10 ⁻⁴
Glucosa 6P	-3,33 x10 ⁻⁴	-2,13 x10 ⁻⁴
Oxaloacetato	-2,22 x10 ⁻⁴	-1,42 x10 ⁻⁴
Ornitina	3,20 x10⁻³	2,05 x10⁻³
Piruvato	-1,66 x10 ⁻⁴	-1,06 x10 ⁻⁴
Succinil CoA	-2,22 x10 ⁻⁴	-1,42 x10 ⁻⁴

Resumiendo, en este caso de consumo 100% de fructosa, se obtuvo que fue el caso de mayor crecimiento, por lo que el flujo v_{32} de formación de biomasa es el mayor de los 3 casos estudiados. Existe un elevado flujo en el ciclo TCA lo que produce problemas en ciertas vías dentro del metabolismo. Uno de los efectos de esto es que la célula necesita un elevado flujo de carbono proveniente de las reservas de TG intracelular. Además, ambas reacciones de aspartato resultaron ser dirigidas hacia el ciclo TCA, no respetando el equilibrio entre ellas. Este mismo hecho produce que el flujo de nitrógeno se mantenga a nivel de ciclo de úrea, y que el aporte hacia glutamato (v_{16}) sea prácticamente nulo.

3.4.4 Discusiones Generales del Estudio II

El enfoque de estudio era examinar las diferencias en el metabolismo de las células HepG2 que se generan al utilizar diferentes fuentes de carbono. Esto se justifica por la creciente demanda de endulzantes con fructosa como compuesto principal, y que según los reportes publicados, producen desórdenes metabólicos a nivel del hígado, siendo su efecto más directo la sobreproducción de lípidos. Bajo este contexto se evaluaron tres casos de concentración de azúcar suplementada en el medio, a una concentración suficiente que permitiría ver estas diferencias. Las curvas de crecimiento señalan que para los tres casos los parámetros de crecimiento son bastantes similares, donde las velocidades máximas de crecimiento no se diferencian en más de un 10% entre sí. En cuanto a densidad celular máxima alcanzada, la suplementación con sólo fructosa (F10) se aleja de los otros dos casos, siendo $0,2 \times 10^6$ [cel/ml]

por debajo de los otros dos casos. Las células HepG2 están acostumbradas a un crecimiento a base de glucosa, por lo que las células no están capacitadas para un cambio drástico de la fuente de carbono, a pesar que se mantuvieron las células durante un pasaje previo en un medio con fructosa. La diferencia entre la suplementación mixta (G5F5) y la exclusiva de fructosa (F10) es que en la primera se presenta el fenómeno conocido como crecimiento diauxico, en donde las células HepG2 utilizando primero la glucosa disponible para crecer, y solamente cuando los niveles de ésta en el medio son nulos utilizarán la fructosa disponible.

El análisis metabólico hecho sostiene la teoría expresada en el párrafo anterior. En un ensayo diferente, se obtuvo que la entrada de glucosa en el caso 2.1 es mucho mayor que en las que se utiliza fructosa, y por consiguiente hubo una mayor producción de TG. Este hecho constituye una piedra de tope en la hipótesis de este estudio. Por mucho que las células posean un mecanismo de asimilación de fructosa mucho más rápido que el de glucosa, si la entrada de fructosa a través de las proteínas transportadoras es menor no habrá un aumento de la formación de TG, ya que existe un menor flujo disponible de átomos de carbono. De la distribución de flujos internos obtenida, la principal conclusión que se desprende es que el único efecto directo del uso de fructosa es un aumento de las tasas internas del ciclo TCA, mientras que la vía de síntesis de TG es casi despreciable al lado de éstas. Incluso, se obtuvo que para el caso 2.3, para un correcto balance, la tasa de intercambio de TG debiese ser de consumo, debido a la necesidad de flujos de carbonos requerida para alimentar el ciclo TCA. Una segunda sugerencia para este estudio sería aumentar el número de evaluaciones por curva de crecimiento, ya que este ensayo solo permitió el análisis al inicio de la fase exponencial, por lo que esta modificación permitiría ver si los efectos se mantienen durante el tiempo de cultivo o existen cambios posteriores.

Con respecto a la aplicación del modelo planteado, es necesario indicar ciertos hechos en base al cálculo de las tasas específicas de producción de CO₂, GSH y úrea. Como se ve en la Tabla 50, fue posible balancear las tasas específicas de intercambio extracelular a través de las mismas ponderaciones de las tasas de producción en los tres casos, lo que permitió obtener un balance bastante cerrado de carbono y nitrógeno. Sin embargo, las tasas específicas estimadas por el modelo al resolver el sistema (Ec. 18) indican en todos los casos que la tasa de producción de úrea está subestimada. Además, para el cálculo de esta tasa el supuesto usado era que el 97% del flujo que pasa de arginina a ornitina era destinado a glutamato, pero en todos los casos este flujo es bastante bajo comparado con lo que se mantiene en el ciclo. Aún más, para mantener el equilibrio en el ciclo de la úrea, no solo se elimina el exceso de flujo como úrea, sino que también debe existir un flujo de salida de ornitina. Realizando una medición real de la tasa de producción de úrea será posible indicar si este valor fue subestimado, y como consecuencia, es necesario que exista esta tasa de ornitina mencionada.

Tabla 50: Resumen de balances de carbono y nitrógeno en Estudio II.

Caso	Balance de Carbono	Balance de Nitrógeno
2.1: Glucosa 10	101%	97%
2.2: Glucosa 5 / Fructosa 5	99%	102%
2.3: Fructosa 10	102%	101%

De la tasa de producción de GSH, en todos los casos se ponderó esta tasa por 10 para poder cerrar el balance. Esta acción genera una tasa muy alta de producción comparada con la entrada de cisteína. En los tres casos analizados, el modelo indica que las tasas de producción de GSH debe ser la mitad de la considerada para mantener un equilibrio en el sistema, junto con un aumento sustancial de la tasa de consumo de cisteína de por lo menos 6 veces a la obtenida

experimentalmente. Finalmente, la tasa de producción de CO_2 es determinante para definir el flujo que tendrá el ciclo de TCA y el sentido de ciertas vías aledañas a ésta. La tasa usada es la misma para todos los casos estudiados, sólo que se encuentran en proporción con la concentración de células obtenidas en cada uno de los tiempos de cultivo. Dado que la suplementación con fructosa exclusiva fue el caso en donde se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento, esto produjo que la tasa de CO_2 sea también alta, por lo que arrastraría el error asociado a la densidad celular en este caso. Para una correcta representación de metabolismo interno de la célula es necesario que existan mediciones precisas de las tasas específicas de intercambio, idealmente todas obtenidas de forma experimental. En los 3 casos estudiados, si bien se logró cerrar el balance, la estimación de las tasas de intercambio hecha por el modelo refleja que muchas de éstas deben modificarse para una distribución de flujos internos balanceada, es decir, no sólo es necesario cerrar el balance, sino que debe existir una consistencia entre las tasas calculadas. El cálculo de estas 3 tasas de producción de forma experimental, permitiría identificar falencia que posea el modelo planteado. Si estas tasas fueron sobreestimadas, habría que agregar al modelo una tasa específica de producción de carbono X_c y una de nitrógeno X_n , o en su defecto, una tasa específica de producción de un metabolito que contenga ambos elementos en su estructura X_{cn} , lo que permitiría el cierre de los balances de ambos elementos. Luego, es necesario revisar en la literatura si existe algún subproducto de las células hepáticas que no se esté considerando en el modelo planteado en este trabajo.

Sin dejar de considerar lo expuesto en los párrafos anteriores, es posible señalar que el modelo hepático si es capaz de entregar una representación del metabolismo interno, siendo coherentes con los reportes de la literatura: el principal flujo de carbono corresponde a las vías de glicólisis y ciclo TCA, mientras que la principal salida de carbono de la célula sería en forma de lactato; en todos los casos se obtuvo que es necesaria la síntesis de alanina y de serina a partir de piruvato; existe un equilibrio en las reacciones del metabolismo de aspartato, a excepción del caso F10, donde ambos flujos son utilizados para mantener los elevados flujos en el ciclo TCA; dentro de los aminoácidos que poseen un metabolismo pequeño, pero que son necesarios para mantener el equilibrio dentro de la células, están metionina, asparagina, tirosina, fenilalanina, valina, isoleucina, prolina, histidina, leucina y lisina; el principal ingreso de nitrógeno es a través de la reacción de glutaminólisis, encargada de aumentar los niveles de amonio intracelular y de glutamato para realizar las reacciones de transaminación en los procesos de síntesis de aminoácidos.

4 CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo de tesis es establecer una metodología que permita realizar estudios metabólicos en células de origen hepático, con herramientas *in silico* que complemente el entendimiento en investigaciones *in vitro*. Se diseñó un modelo hepático para realizar los análisis del metabolismo de las células HepG2, a partir de modelos reportados en la literatura, el cuál comprende 37 metabolitos intracelulares y 32 reacciones que abarcan las principales vías metabólicas. Del análisis de sensibilidad de la matriz pseudoestequiométrica se desprende que las reacciones de mayor sensibilidad son las referentes al metabolismo de piruvato y acetil CoA, las que incluyen reacción anaplerótica, ciclo TCA y síntesis de triglicéridos.

En un primer enfoque, se estudió el efecto de la aplicación de acetaminofén (APAP) sobre el crecimiento de las células. Comparando las curvas de crecimiento obtenidas en un primer ensayo, se corroboró el efecto tóxico que posee el APAP, debido a que luego de su aplicación (a las 40 [h] de cultivo), las células inmediatamente detienen su crecimiento y comienza una fase de muerte celular. Sin embargo, la concentración utilizada (1 [mM]) es menor a la registrada como dosis dañina, indicando que las células utilizadas en este estudio son más sensible a los efectos nocivos directos e indirectos que provoca la presencia de APAP en el medio. En un segundo ensayo se realizó el análisis del metabolismo de las células en ausencia y presencia del APAP. Los resultados para el control 0A/0N no estuvieron exentos a errores de medición ya que la fue velocidad de crecimiento observada 30% menor al obtenido para la curva de crecimiento y un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 3,3, valor por sobre el esperado teórico. Además, luego de calcular las tasas específicas de consumo/producción, se alcanzó un desbalance por sobre 400%, es decir, los flujos de salida son 4 veces los flujos de entrada. Para el caso de presencia de APAP en el medio (1A/0N), a diferencia del control, si se logró cerrar los balances de masas por especie a través de la ponderación de las tasas específicas de producción. En este caso se obtuvo una alta producción de lactato, con un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ de 7,1, lo que se tradujo en que los flujos interno se redireccionen hacia piruvato y satisfacer esta demanda de carbono, utilizando como fuente de carbono triglicéridos y triptófano, además de la glucosa. Como se mencionó en la respectiva sección, esta alta tasa de lactato, junto con el cambio de sentido de ciertos flujos pueden ser indicadores del estado de muerte celular, pero dado que el ensayo del caso control no fue exitoso, no es posible comparar estos resultados.

Por otra parte, se estudió el efecto protector del N-acetilcisteína (NAC), ya que frente a la acción de APAP las células disminuyen los niveles de glutatión intracelular. El NAC aporta con los residuos de cisteína para reestablecer los niveles de glutatión, y disminuir el estrés oxidativo que se genera dentro de las células. Se evaluaron dos casos de protección, en donde se aplicó 3 horas antes y 3 horas después de suministrar el APAP al medio. El efecto preventivo no fue efectivo, ya que luego de agregar APAP la densidad comenzó a bajar, al igual que el caso 1A/0N. Se deduce que dado a que antes del APAP las células se encuentran en un crecimiento con condiciones estándar, el NAC suministrado fue utilizado para otros propósitos dentro de la célula. El efecto protector al aplicarlo después el APAP resultó ser efectivo, en donde se obtuvo un crecimiento con un 50% y 58% menor en la velocidad y concentración máxima que el caso control 0A/0N, respectivamente. En el segundo ensayo sólo se realizó el análisis de flujo metabólico para el caso con protección posterior a la aplicación de APAP. Si bien, éste fue el único caso en que el $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ se encuentra dentro del rango esperado, la concentración celular se mantuvo prácticamente constante durante el tiempo de cultivo, y no fue posible reproducir los resultados de la curva de crecimiento. Además, del cálculo de las tasas específicas se obtuvo un desbalance por sobre el 300%, y una distribución de flujos internos con casos inconsistentes con

lo esperado, como flujos excesivos en ciertas vías sentidos de flujos opuestos. En síntesis, de este primer estudio, los resultados obtenidos no pueden ser concluyentes sin realizar antes una repetición de los ensayos, con el fin de dilucidar si existe un problema con el modelo planteado y no se están considerando todas las tasas específicas de consumo, o simplemente hubo un problema en el procedimiento experimental, y por consiguiente, las mediciones y el cálculo de tasas específicas tiene un error experimental asociado.

En el segundo estudio, se analizaron los cambios metabólicos que se generan al utilizar diferentes fuentes de carbono, ya que se ha reportado que una dieta a base de fructosa produce desórdenes en el metabolismo de células hepáticas, siendo una excesiva síntesis de lípidos el efecto más directo. Se estudió tres casos de suplementación: 10 [mM] de glucosa (G10), 5 [mM] de glucosa y de fructosa (G5F5) y 10 [mM] de fructosa (F10). Comparando los tres casos de estudio, se obtuvieron curvas de crecimiento similares, siendo el caso de suplementación mixta el que presentó una mayor velocidad de crecimiento. Sin embargo, las demás no se diferencian más allá de un 10% en cuanto a la velocidad de crecimiento. En un comienzo del crecimiento, las densidades celulares del caso G5F5 son prácticamente iguales al caso G10, debido que en este período la fuente de carbono es glucosa (comportamiento diauxico), por lo que el cambio de azúcar no retardó el crecimiento de las células. En cambio, para el caso de 100% fructosa, se obtuvo que las concentraciones celulares siempre fueron menores que los otros casos, debido a que las células deben pasar un proceso de adaptación que les permitan crecer en un medio con fructosa.

Se realizó un segundo ensayo con el que se obtuvieron las tasas específicas de consumo/producción para generar los diagramas de flujos internos y analizar los cambios que ocurren en el metabolismo al interior de las células. De estos resultados se obtuvo que en todos los casos las densidades celulares se encuentran por sobre los valores de las curvas de crecimiento en los mismos tiempos de evaluación. Este error se atribuye a que las placas pueden haber sido inoculadas a una concentración mayor. Sin embargo, solamente para el caso G10 se logró reproducir la velocidad de crecimiento, mientras que la de G5F5 fue un 36% menor y F10 un 52% mayor que en el ensayo de las curvas de crecimiento. Además, en los tres casos hubo un $\Delta\text{Lac}/\Delta\text{Glc}$ menor a 1,5. La diferencia entre los tres casos se refleja en la concentración relativa de triglicéridos (con respecto a la concentración total de proteína). Se obtuvo que para el único caso en que hubo un aumento de esta concentración fue para el caso G10, que coincidentemente fue el caso con mayor consumo de azúcar y mayor producción de lactato. Además, la distribución de flujos internos indica que en términos generales son bastante similares los casos estudiados, y que el gran flujo que entra por concepto de consumo de hexosa es distribuido principalmente entre la producción de lactato y lo destinado al ciclo TCA. En resumen, en la hipótesis de este estudio se planteó que altos niveles de fructosa en el medio producen un incremento de la síntesis de triglicéridos. Esta hipótesis se rechaza, debido a que el aumento de triglicéridos se correlaciona con el aumento de fuente de carbono que entran al sistema, y que la entrada de fructosa es una etapa limitante, a pesar de que dentro de las células es metabolizada más rápido que glucosa.

La línea celular HepG2 ha sido ampliamente utilizada por la comunidad científica, y posee un potencial uso como modelo *in vitro* para estudios metabólicos debido a que mantiene varias funciones propias de las células hepáticas. No obstante, para estudios de carácter toxicológicos, las células presentan un bajo nivel de expresión de enzimas involucradas en procesos de eliminación de drogas, hecho que se refleja en la alta sensibilidad a los efectos nocivos del APAP en el primer estudio. Existen alternativas de sublíneas, como HepG2 E47 y HepG2 Mvh22E1, que sobreexpresan enzimas involucradas en procesos de eliminación de fármacos. Sería

interesante desarrollar un estudio en que se realice el mismo diseño experimental, y en base a los resultados definir si estas sublíneas son una mejor representación *in vitro* que las utilizadas en este trabajo. Por otro lado, ya que en el segundo estudio se obtuvieron bajas tasas de consumo de fructosa y concentraciones relativas de triglicéridos menores en por lo menos un orden de magnitud a lo reportado, sería de gran utilidad evaluar el nivel de expresión de las proteínas de membrana GLUT2 y GLUT5 de las células HepG2 utilizadas en este trabajo y compararlo con los de un hepatocito, con el objetivo de complementar la caracterización de esta línea celular.

El modelo hepático planteado fue capaz de presentar una distribución de flujos internos del metabolismo de las células en cada uno de los casos estudiados, presentando problemas en ciertas vías metabólicas (sobre todo en el primer estudio), pero que podrían ser por errores de cálculo de las tasas específicas. Es necesario realizar más ensayos de carácter toxicológicos para validar el modelo como herramienta computacional para la caracterización de los efectos que podrían tener nuevas drogas, e incluso, ser utilizado para proponer nuevas técnica de tratamientos para contrarrestar el daño causado por drogas o alguna enfermedad que produzca cambios en el metabolismo interno de las células hepáticas. Más aún, el modelo podría utilizarse no sólo con células HepG2, sino que también con otros sistemas de cultivo *in vitro*, con la finalidad de caracterizar y mejorar funciones hepáticas en el desarrollo de nuevos dispositivos de carácter medicinal, como hígados artificiales.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Arai, K., Lee, K., et al. (2001). "Intrahepatic amino acid and glucose metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model." Hepatology **34**(2): 360-71.
- ATCC Catalog Search. HepG2 HB-8065. <<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology>> [consulta: 01 mayo 2011].
- Atienzar, F., Gerets, H., et al. (2007). "Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells." Toxicol Sci **96**(1): 101-14.
- Bajt, M. L., Knight, T. R., et al. (2004). "Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine." Toxicol Sci **80**(2): 343-9.
- Banta, S., Vemula, M., et al. (2007). "Contribution of gene expression to metabolic fluxes in hypermetabolic livers induced through burn injury and cecal ligation and puncture in rats." Biotechnol Bioeng **97**(1): 118-37.
- Basciano, H., Federico, L., et al. (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia." Nutr Metab (Lond) **2**(1): 5.
- Bell, G. I., Kayano, T., et al. (1990). "Molecular biology of mammalian glucose transporters." Diabetes Care **13**(3): 198-208.
- Bessems, J. G. and Vermeulen, N. P. (2001). "Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches." Crit Rev Toxicol **31**(1): 55-138.
- Bin Nor Aripin, K. N. and Choonara, I. (2009). "The management of paracetamol poisoning." Paediatrics and Child Health **19**(11): 492-497.
- Boghigian, B. A., Seth, G., et al. (2010). "Metabolic flux analysis and pharmaceutical production." Metab Eng **12**(2): 81-95.
- Brandon, E. F., Raap, C. D., et al. (2003). "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons." Toxicol Appl Pharmacol **189**(3): 233-46.
- Burley, M. R. and Roth, C. M. (2007). "Effects of Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of HepG2 Cells." The Open Biotechnology Journal **1**: 47-51.
- Calik, P. and Akbay, A. (2000). "Mass flux balance-based model and metabolic flux analysis for collagen synthesis in the fibrogenesis process of human liver." Med Hypotheses **55**(1): 5-14.
- Cederbaum, A. I. (2006). "Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells." J Gastroenterol Hepatol **21 Suppl 3**: S22-5.
- Ceriello, A. and Colagiuri, S. (2008). "International Diabetes Federation guideline for management of postmeal glucose: a review of recommendations." Diabet Med **25**(10): 1151-6.
- Collison, K. S., Saleh, S. M., et al. (2009). "Diabetes of the liver: the link between nonalcoholic fatty liver disease and HFCS-55." Obesity (Silver Spring) **17**(11): 2003-13.
- Corcoran, G. B. and Wong, B. K. (1986). "Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vivo: studies with N-acetyl-D-cysteine in mice." J Pharmacol Exp Ther **238**(1): 54-61.
- Corstorphine, L. and Sefton, M. V. (2011). "Effectiveness factor and diffusion limitations in collagen gel modules containing HepG2 cells." J Tissue Eng Regen Med **5**(2): 119-29.

- Chang, T. T. and Hughes-Fulford, M. (2009). "Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes." Tissue Eng Part A **15**(3): 559-67.
- Dai, Y. and Cederbaum, A. I. (1995). "Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450E1-transfected HepG2 cells." J Pharmacol Exp Ther **273**(3): 1497-505.
- Doran, P. M. (1995). "Bioprocess Engineering Principles." from <http://myaccess.library.utoronto.ca/login?url=http://books.scholarsportal.info/viewdoc.html?id=/ebooks/ebooks0/elsevier/2009-12-02/1/9780122208553>
- Elliott, S. S., Keim, N. L., et al. (2002). "Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome." Am J Clin Nutr **76**(5): 911-22.
- Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells : a manual of basic technique. Hoboken, N.J., Wiley-Liss.
- Gaby, A. R. (2005). "Adverse effects of dietary fructose." Altern Med Rev **10**(4): 294-306.
- Gibbons, G. F., Khurana, R., et al. (1994). "Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization." J Lipid Res **35**(10): 1801-8.
- Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., et al. (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**(9): 1376-89.
- Gomez-Lechon, M. J., Donato, M. T., et al. (2007). "A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis." Chem Biol Interact **165**(2): 106-16.
- Guillouzo, A. (1998). "Liver cell models in in vitro toxicology." Environ Health Perspect **106 Suppl 2**: 511-32.
- Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C. (2008). "Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology." Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(10): 1279-94.
- Guzzardi, M. A., Vozzi, F., et al. (2009). "Study of the crosstalk between hepatocytes and endothelial cells using a novel multicompartamental bioreactor: a comparison between connected cultures and cocultures." Tissue Eng Part A **15**(11): 3635-44.
- Hallfrisch, J. (1990). "Metabolic effects of dietary fructose." Faseb J **4**(9): 2652-60.
- Harris, A. J., Dial, S. L., et al. (2004). "Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells." Mutat Res **549**(1-2): 79-99.
- Heard, K. J. (2008). "Acetylcysteine for acetaminophen poisoning." N Engl J Med **359**(3): 285-92.
- Hirahatake, K. M., Meissen, J. K., et al. (2011). "Comparative effects of fructose and glucose on lipogenic gene expression and intermediary metabolism in HepG2 liver cells." PLoS One **6**(11): e26583.
- Hoess, A., Teuscher, N., et al. (2007). "Cultivation of hepatoma cell line HepG2 on nanoporous aluminum oxide membranes." Acta Biomater **3**(1): 43-50.
- Hu, W. (2011). Cellular Bioprocess Technology.
- Huang, D., Dhawan, T., et al. (2011). "Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride synthesis." Lipids Health Dis **10**: 20.
- Iguchi, K., Takahashi, Y., et al. (2005). "Identification of differentially expressed genes in hepatic HepG2 cells treated with acetaminophen using suppression subtractive hybridization." Biol Pharm Bull **28**(7): 1148-53.
- Invitrogen Technical Resources - Media Formulation. DMEM/F12, powder, HEPES. <http://es-cl.invitrogen.com/site/mx/es/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.59.html> [consulta: 01 mayo 2011].
- Iyer, V. V., Yang, H., et al. (2010). "Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism." Biotechnol Bioeng **107**(2): 347-56.

- James, L. P., Mayeux, P. R., et al. (2003). "Acetaminophen-induced hepatotoxicity." Drug Metab Dispos **31**(12): 1499-506.
- Johnsen, U., Selig, M., et al. (2001). "Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*." Arch Microbiol **175**(1): 52-61.
- Knasmuller, S., Mersch-Sundermann, V., et al. (2004). "Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge." Toxicology **198**(1-3): 315-28.
- Liu, Y., Wang, D., et al. (2011). "Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro." J Agric Food Chem **59**(22): 12254-63.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." Faseb J **13**(10): 1169-83.
- Maier, K., Hofmann, U., et al. (2007). "Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient ¹³C-labeling experiments: Part II. Flux estimation." Biotechnol Bioeng **100**(2): 355-70.
- Manov, I., Hirsh, M., et al. (2004). "N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis." Basic Clin Pharmacol Toxicol **94**(5): 213-25.
- Mari, M. and Cederbaum, A. I. (2000). "CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase." J Biol Chem **275**(20): 15563-71.
- Martinovich, G. G., Cherenkevich, S. N., et al. (2005). "Intracellular redox state: towards quantitative description." Eur Biophys J **34**(7): 937-42.
- Mather, J. P. and Roberts, P. E. (1998). Introduction to cell and tissue culture : theory and technique. New York, Plenum Press.
- Mavri-Damelin, D., Damelin, L. H., et al. (2008). "Cells for bioartificial liver devices: the human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia." Biotechnol Bioeng **99**(3): 644-51.
- Mayes, P. A. (1993). "Intermediary metabolism of fructose." Am J Clin Nutr **58**(5 Suppl): 754S-765S.
- McClain, C. J., Price, S., et al. (1999). "Acetaminophen hepatotoxicity: An update." Curr Gastroenterol Rep **1**(1): 42-9.
- Monga, S. P. S. (2011). Molecular Pathology of Liver Diseases.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., et al. (2005). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- Nibourg, G. A., Huisman, M. T., et al. (2010). "Stable overexpression of pregnane X receptor in HepG2 cells increases its potential for bioartificial liver application." Liver Transpl **16**(9): 1075-85.
- Niklas, J., Noor, F., et al. (2009). "Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2." Toxicol Appl Pharmacol **240**(3): 327-36.
- Omasa, T., Kim, K., et al. (2005). "Construction and evaluation of drug-metabolizing cell line for bioartificial liver support system." Biotechnol Prog **21**(1): 161-7.
- Plant, N. (2004). "Strategies for using in vitro screens in drug metabolism." Drug Discov Today **9**(7): 328-36.
- Provost, A. and Bastin, G. (2006). Metabolic Flux Analysis: An approach for solving non-stationary underdetermined systems Mathematical Modelling and Control of Chemical and Bio-chemical Processes, Vienna.
- Quek, L. E., Dietmair, S., et al. (2010). "Metabolic flux analysis in mammalian cell culture." Metab Eng **12**(2): 161-71.
- Rago, A. P., Chai, P. R., et al. (2009). "Encapsulated arrays of self-assembled microtissues: an alternative to spherical microcapsules." Tissue Eng Part A **15**(2): 387-95.

- Rahman, T. M., Selden, C., et al. (2004). "Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model." Artif Organs **28**(5): 476-82.
- Roelofsen, H., Vos, T. A., et al. (1997). "Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells." Gastroenterology **112**(2): 511-21.
- Sahu, S. C. (2007). Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo Models. England.
- Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-212.
- Schilling, A., Corey, R., et al. (2010). "Acetaminophen: old drug, new warnings." Cleve Clin J Med **77**(1): 19-27.
- Srivastava, S. and Chan, C. (2007). "Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line." Biotechnol Bioeng **99**(2): 399-410.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., et al. (2009). "Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans." J Clin Invest **119**(5): 1322-34.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., et al. (1998). Metabolic engineering : principles and methodologies. London, Academic.
- Thome-Kromer, B., Bonk, I., et al. (2003). "Toward the identification of liver toxicity markers: a proteome study in human cell culture and rats." Proteomics **3**(10): 1835-62.
- U.S. Department of Agriculture, E. R. S. (2011). Sugar and Sweeteners Yearbook Tables. Table 52—High fructose corn syrup: estimated number of per capita calories consumed daily, by calendar year. <<http://www.ers.usda.gov/Briefing/Sugar/Data.htm>>.
- Wang, X., Nath, A., et al. (2011). "Synergy Analysis Reveals Association between Insulin Signaling and Desmoplakin Expression in Palmitate Treated HepG2 Cells." PLoS One **6**(11): e28138.
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G. (2007). "Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells." Toxicol In Vitro **21**(8): 1581-91.
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G. (2007). "Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells." Toxicol In Vitro **21**(8): 1592-602.
- White, J. S. (2008). "Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't." Am J Clin Nutr **88**(6): 1716S-1721S.
- Wilkens, C. A. and Gerdtzen, Z. P. (2011). "Engineering CHO cells for improved central carbon and energy metabolism." BMC Proc **5 Suppl 8**: P120.
- Wu, G., Fang, Y. Z., et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-92.
- Wu, M., Yang, Z., et al. (2010). "The 3-D Culture and In Vivo Growth of the Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 in a Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffold." Nanomaterials **2010**: 1-7.
- Yedjou, C. G. and Tchounwou, P. B. (2007). "N-acetyl-l-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells." Int J Environ Res Public Health **4**(2): 132-7.
- Yokoyama, T., Banta, S., et al. (2005). "Evolution of intrahepatic carbon, nitrogen, and energy metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model." Metab Eng **7**(2): 88-103.

- Yuan, J., Gao, H., et al. (2011). "Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on human hepatoma HepG2 cells: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis." Toxicol In Vitro **25**(8): 1820-7.
- Yuan, J., Gao, H., et al. (2011). "Cytotoxicity evaluation of oxidized single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on human hepatoma HepG2 cells: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis." Toxicol Sci.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., et al. (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.
- Zamorano, F. (2012). Metabolic Flux Analysis of CHO cell cultures, UNIVERSITY OF MONS. **Ph.D.**
- Zamorano, F., Wouwer, A. V., et al. (2010). "A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells." J Biotechnol **150**(4): 497-508.
- Zang, M., Xu, S., et al. (2006). "Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice." Diabetes **55**(8): 2180-91.
- Zhang, M. Y., Lee, P. J., et al. (2008). "Microfluidic environment for high density hepatocyte culture." Biomed Microdevices **10**(1): 117-121.

ANEXOS

Anexo A: Cultivo de Células Animales

El cultivo de células animales nace con el objetivo de estudiar conceptos básicos a nivel celular como parte del desarrollo de la biología. En el año 1907, siendo el primer científico en incursionar en esta área, Ross Harrison estudió el desarrollo de fibras nerviosas en coágulos de plasmas, utilizando tejido de un embrión de rana. Este acontecimiento abrió las puertas al estudio de sistemas celulares alejados de los mismos organismos a lo largo del siglo 20, cuyo interés se desarrolla en base a la comparación entre cultivos de animales bajo condiciones normales y patológicas, para obtener aproximaciones de sistemas humanos. (Mather et al., 1998; Freshney, 2005)

En los años próximos a 1950, comenzó el desarrollo de células con una vida útil mayor a los cultivos normalmente usados. Bajo el nombre de líneas celulares, se logró enfocar los estudios no solo en el crecimiento celular, sino que también en la respuestas de éstas frente factores externos y en la producción y secreción de hormonas y otras funciones *in vitro*. (Freshney, 2005)

No solo se ha logrado un avance en los sistemas celulares, sino que también el ambiente en que crecen estos sistemas ha evolucionado a lo largo de los años. Algunos científicos, como Harry Eagle (1955), demostraron que los extractos celulares pueden crecer en determinados medios compuestos por una mezcla de aminoácidos, vitaminas, co-factores, carbohidratos, sales y suero. Estudios posteriores determinaron que cada tipo de células posee un medio óptimo de nutrientes para su crecimiento. Por último, el remplazo del suero por ciertos compuestos (proteína de anclaje, proteínas de transporte, hormonas y factores de crecimiento) permitió el desarrollo de nuevos medios que permitieron un mejor crecimiento. (Mather et al., 1998)

Tipos de Investigación

Los diferentes estudios que pueden ser llevados a cabo utilizando cultivo *in vitro* se clasifican en 9 líneas de investigación, señaladas en la Tabla 51 (Freshney, 2005).

Tabla 51: Áreas de aplicación de cultivos celulares.

Línea de Investigación	Aplicación
Actividad Intracelular	Transcripción y replicación de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, apoptosis
Flujos Intracelular	Formación y utilización de RNA, receptores hormonales, flujo de metabolitos, señalización traduccional, tráfico a nivel de membrana
Farmacología	Metabolismo de drogas, interacción ligando-receptor, resistencia a drogas
Toxicología	Infección, citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis, irritación, inflamación
Inmunología	Epítomos de superficie celular, hibridomas, citosinas y señalización, inflamación
Interacción célula-célula	Morfogénesis, control paracrino, cinéticas de proliferación celular, cooperación metabólica, motilidad y adhesión celular, interacción matricial
Genómica	Análisis genético, transfección, infección, transformación, inmortalización
Productos Celulares	Proteómica, secreción, biotecnología, diseño de bioreactores, procesamiento down-stream
Ingeniería de Tejidos	Construcción de tejidos, matrices y soportes, fuente de células madre, propagación, diferenciación

Ventajas y Desventajas

Dentro de las ventajas que se pueden mencionar en cuanto al trabajo de laboratorio es que es posible mantener un control del ambiente en que crecen las células, es decir, un control en las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo (pH, temperatura, tensión de O₂ y CO₂). Además, las condiciones fisiológicas (concentración hormonal y de nutrientes) permanecen relativamente constantes. Es posible suplementar los medios de forma de mantener células con un fenotipo lo más próximos a la situación in vivo. Por otra parte, el hecho de que las células se encuentren expuestas permite utilizar concentraciones bajas de agentes externos (nutrientes, drogas, etc.) a la hora de realizar experimentos, evitando pérdidas debido a excreción y distribución en los tejidos aledaños, dentro del mismo organismo. (Freshney, 2005)

Sin embargo, existen también desventajas que se deben considerar a la hora de trabajar con cualquier sistema celular in vitro, partiendo por las estrictas condiciones asépticas que procuran evitar cualquier tipo de contaminación (química, microbiana o cruzada). Conjuntamente, las células en cultivo están propensas a sufrir variaciones a nivel de genotipo (heterogeneidad, variabilidad), como también de fenotipo (desdiferenciación, adaptación). Por último, se debe tener en consideración la baja cantidad de células con que se trabaja y los altos costos de las mismas células, medios, material de trabajo y equipos. (Freshney, 2005)

Tipos de Cultivo

Los cultivos celulares se clasifican bajo el criterio de la cantidad de células y del tamaño con que se trabaja. Es así como existen 3 grandes grupos, cada uno con sus pros y contras. (Mather et al., 1998; Freshney, 2005)

Cultivo de Órganos

Corresponde órganos embrionarios o fragmentos de tejido adulto, que como principal característica es la retención de la estructura tridimensional del órgano en estudio. En necesario mantener durante su cultivo una interface líquido-gas que favorezca la retención de su forma esférica. Dado a que es un extracto directo, las células mantienen las propiedades de diferenciación del órgano, convirtiéndolo en uno de los mejores modelos a nivel funcional. No obstante, una de las desventajas es el requerimiento de fragmentos frescos para cada experiencia debido a su baja capacidad de propagación, impidiendo la reproducibilidad en cada trabajo.

Cultivos de Explantes Primarios

En este caso se habla de pequeños fragmentos de tejido que se colocan en placas para su anclaje y posterior propagación. Sin bien, no poseen la estructura tridimensional completa, las células mantienen las propiedades citológicas iniciales in vivo. Al igual que el caso anterior, el origen de los fragmentos produce una alta variabilidad entre cada experiencia, por lo que disminuye la reproducibilidad, y su cuantificación celular también es compleja.

Cultivos de Células

A este tipo de cultivo pertenecen los cultivos primarios y líneas celulares. La diferencia entre ellos, es que los cultivos primarios son disgregaciones de órganos, por lo que son una representación más próxima que las líneas celulares, o células que han sufrido de modificación

genética. La ventaja de estas últimas, es que poseen una capacidad de proliferación y de subcultivo mayor que los cultivos primarios.

A pesar de sus diferencias, ambos tipos de cultivos corresponden a células que crecen mayoritariamente en forma de monocapas. No obstante, es posible que ciertas células puedan crecer en suspensión, produciendo un modelo más próximo a la situación in vivo. Además, permiten análisis bioquímicos, moleculares, inmunológicos y citológicos, con una alta reproducibilidad. Finalmente, debido a la pérdida de las interacciones célula-célula en este tipo de cultivo, investigadores han profundizado en la búsqueda de la construcción de tejidos de alta densidad celular. Es así como se diferencian entre dos estructuras tridimensionales: Cultivo histotípicos, formados por el mismo tipo de célula; y cultivo organotípicos, formados por diferentes células, simulando la diversidad que presentan los tejidos in vivo. (Freshney, 2005)

Anexo B: Modelos Hepáticos

Para el estudio del hígado a nivel de laboratorio se han utilizado diferentes modelos hepáticos, clasificados según su mecanismo de extracción, su tamaño y su perdurabilidad *ex vivo*.

Microsomas y Supersomas

Los microsomas son vesículas del retículo endoplasmático de hepatocitos que contienen enzimas del citocromo P450 (CYP), flavin monooxigenasas (FMO) y glucuronosil transferasas (UGT). Los supersomas, por otra parte, corresponde al mismo tipo de vesícula, pero proveniente de células de insecto transfectadas con CYP y UGT. (Brandon et al., 2003; Plant, 2004)

Con este mecanismo es posible el estudio (sólo de forma cuantitativa) de la actividad específica de cada enzima en el metabolismo de ciertos compuestos, su comportamiento frente a la presencia de inhibidores específicos, y también interacciones droga-droga.

A pesar de ser de bajo costo y de fácil manejo, la actividad enzimática dependerá de la procedencia de estas vesículas. Para esto, aplicaciones han optado por la formación de *pool* de microsomas, con la intención de obtener una actividad representativa. Dentro de las desventajas se encuentra la ausencia de otras enzimas de la fase II y de cofactores, lo que aumenta la cantidad de intermediarios nocivos.

Fracciones Subcelulares

Como resultado de sucesivas centrifugaciones de muestras celulares hepáticas, se obtiene un pellet y un sobrenadante, denominados fracción mitocondrial y fracción citosólica, respectivamente. Cada fracción se encuentra enriquecida con diferentes enzimas. Mientras que la fracción mitocondrial posee principalmente enzimas de fase I, la fracción citosólica contiene enzimas de fase II. La unión de ambas fases también constituye un modelo para estudios, y recibe el nombre de fracción S9. (Brandon et al., 2003; Plant, 2004)

Ambas fracciones han sido utilizadas para estudiar la actividad enzimática de sus respectivas proteínas, pero al igual que los microsomas, estos estudios son solamente cuantitativos. La fracción S9 además, es utilizada para la detección de mutagénesis provocada por químicos. Es requerido agregar a los medios cofactores exógenos y sistemas de regeneración de NADPH. Como principal desventaja es la baja actividad enzimática que presentan.

Líneas Celulares

Como fue mencionado previamente, las líneas corresponden a células que han sufrido alteraciones a nivel de su genotipo. Líneas celulares de hepatocito son obtenidos de inmortalizaciones oncogénicas y de tumores hepáticos. Por definición, estas células son transformaciones estables funcionalmente hablando, presentan el espectro casi completo de enzimas de fase I y II, y poseen una alta reproducibilidad y consistencia en los experimentos. Además, su manipulación es sencilla y poseen una capacidad de proliferación y de subcultivo mayor a los cultivos primarios. Dentro de las líneas hepáticas utilizadas se encuentran BC2, HepG2, NKNT-3, HepaRG, entre otras. (Guillouzo, 1998; Brandon et al., 2003; Plant, 2004; Guillouzo et al., 2008)

Sin embargo, la modificación a nivel de código genético produce alteraciones fenotípicas que derivan a diferencias funcionales, por lo que no son un completo reflejo del metabolismo de un hepatocito in vivo, presentando en la mayoría de los casos una baja expresión de actividad enzimática. Con el objetivo de incrementar la actividad, se ha aplicado las técnicas de recombinación de genes individuales de enzimas CYP o algún cofactor para un mejor comportamiento. Como alternativa, se ha utilizado ingeniería genética para modificar líneas celulares no hepáticas, introduciéndoles genes de CYP. Un ejemplo de esto último es la línea celular de hámster chino V79.

Cultivo Primario de Hepatocitos

Los cultivos primarios hepáticos son obtenidos a través del método de perfusión con colagenasa modificado, a partir de extractos de hígado humano. Tanto su cultivo en suspensión como en superficie, constituyen un excelente herramienta como modelo in vitro, debido al gran parecido que poseen con hepatocitos in vivo. Su viabilidad se ha estimado en 4 semanas para el caso de crecimiento en placas, y de solamente 3 o 4 horas para crecimiento en suspensión. Sin embargo, se realizan estudios que permitan generar soportes para el aumento de la viabilidad. Además, es posible la criopreservación, y el co-cultivo con células no parenquimales han incrementado su viabilidad y funcionalidad. (Guillouzo, 1998; Brandon et al., 2003; Plant, 2004; Guillouzo et al., 2008)

Están sujetos a variaciones fenotípicas dependientes de las condiciones de cultivo (como la solubilidad, factores de matriz e interacción célula-células). Sufren de pérdidas graduales a lo largo de su corta vida útil, sobretodo en la expresión de enzimas CYP. Por otra parte, la poca disponibilidad de tejidos y la variabilidad entre individuos donadores, afectan de gran manera a la reproducibilidad de los estudios.

Cortes de Hígado y Aislación Completa

Corresponde a los mejores modelos in vitro, debido a que además de representar la real actividad enzimáticas, estas estructuras mantienen la organización tisular tridimensional, las interacciones célula-célula y las interacciones célula-matriz. Sin embargo, ambos poseen una baja viabilidad y reproducibilidad. (Guillouzo, 1998; Brandon et al., 2003; Guillouzo et al., 2008)

Con respecto a los cortes de tejido, son capaces de mantenerse metabólicamente activo durante 2 y 3 días, y su cultivo en medio enriquecido con nutrientes los convierten en una herramienta efectiva para el estudio de biotransformación de drogas. El principal problema que genera su corta vida útil yace en los problemas de difusión de nutrientes y oxígeno dentro del tejido.

Por otro lado, aislar el órgano completo tiene como beneficio representación completa del sistema, ya que se tiene la estructura tridimensional exacta, y la totalidad de los tipos de células hepáticas. Sin embargo, no existe disponibilidad de hígado humano y solo se trabaja con hígados animales a una menor escala. Asimismo, son modelos muy delicados y de difícil manejo, lo que conlleva a su pobre reproducibilidad.

Anexo C: Medios de Cultivo

En sus inicios, el cultivo de células in vitro se realizaban en medios naturales basados en extractos de tejidos y fluidos corporales. Sin embargo, dada la necesidad de grandes cantidades de medio de mayor calidad por el aumento de estudios in vitro, han surgido medios comerciales basados en bioquímica nutricional (Freshney, 2005).

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

Este medio formado por Eagle (1959) es uno de los más usados, debido a que es perfectamente adecuada a la mayoría de las líneas celulares, obteniéndose ciertas ventajas en cuanto a crecimiento celular, como lo es el remplazo del uso del suero, entre otras. Consiste en una solución modificada a partir de un medio previo (Eagle's Basal Medium) (Freshney, 2005).

Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)

Como el nombre lo indica, Dulbecco & Freeman (1959) diseñaron un nuevo medio en base a la modificación de EMEM. Siendo también uno de los más usados, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) posee una concentración mayor de aminoácidos y vitaminas, junto con otros suplementos adicionales.

Las mezclas de nutrientes Ham (1965) fueron desarrollado con el objetivo de brindar un soporte al crecimiento celular, para ser usado con o sin suero, dependiendo del tipo de células. Ham's F12 ha sido utilizado en cultivos primarios de hepatocitos y células epiteliales de rata. Además, también se han realizado estudios en células de ovario de hámster chino (CHO). Esta mezcla está suplementada además con 25 [mM] de HEPES, buffer que mantiene el pH óptimo (entre 7.2 y 7.4) (Freshney, 2005).

Algunos laboratorios han determinado que la unión de Ham's F12 junto con DMEM, en determinadas proporciones, generan un ambiente adecuado para el crecimiento y propagación de células de cultivo primaria o líneas celulares (Freshney, 2005).

A modo de comparación, se encuentra en la Tabla 52 las concentraciones de sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros compuestos de ambos medios (información obtenida de los catálogos de (Invitrogen)):

Tabla 52: Comparación de medios de cultivo.

Componentes	MW	DMEM/F12 12400024		MEM 11095072	
		mg/L	mM	mg/L	mM
Amino Ácidos					
Glycine	75	18,75	0,25		
L-Alanine	89	4,45	0,05		
L-Arginine hydrochloride	211	147,5	0,699	126	0,597
L-Asparagine-H2O	150	7,5	0,05		
L-Aspartic acid	133	6,65	0,05		
L-Cysteine hydrochloride-H2O	176	17,56	0,0998		
L-Cystine 2HCl	313	31,29	0,1	31	0,099
L-Glutamic Acid	147	7,35	0,05		
L-Glutamine	146	365	2,5	292	2
L-Histidine hydrochloride-H2O	210	31,48	0,15	42	0,2
L-Isoleucine	131	54,47	0,416	52	0,397
L-Leucine	131	59,05	0,451	52	0,397
L-Lysine hydrochloride	183	91,25	0,499	73	0,399
L-Methionine	149	17,24	0,116	15	0,101
L-Phenylalanine	165	35,48	0,215	32	0,194
L-Proline	115	17,25	0,15		
L-Serine	105	26,25	0,25		
L-Threonine	119	53,45	0,449	48	0,403
L-Tryptophan	204	9,02	0,0442	10	0,049
L-Tyrosine disodium salt dehydrate	261	55,79	0,214	52	0,199
L-Valine	117	52,85	0,452	46	0,393
Vitaminas					
Biotin	244	0,0035	0,0000143		
Choline chloride	140	8,98	0,0641	1	0,00714
D-Calcium pantothenate	477	2,24	0,0047	1	0,0021
Folic Acid	441	2,65	0,00601	1	0,00227
Niacinamide	122	2,02	0,0166	1	0,0082
Pyridoxine hydrochloride	206	2	0,00971	1	0,0049
Riboflavin	376	0,219	0,000582	0,1	0,000266
Thiamine hydrochloride	337	2,17	0,00644	1	0,00297
Vitamin B12	1355	0,68	0,000502		
i-Inositol	180	12,6	0,07	2	0,0111
Sales Inorgánicas					
Calcium Chloride (CaCl2) (anhyd.)	111	116,6	1,05	200	1,8
Cupric sulfate (CuSO4-5H2O)	250	0,0013	0,0000052		
Ferric Nitrate (Fe(NO3)3·9H2O)	404	0,05	0,000124		
Ferric sulfate (FeSO4-7H2O)	278	0,417	0,0015		
Magnesium Chloride (anhydrous)	95	28,64	0,301		
Magnesium Sulfate (MgSO4) (anhyd.)	120	48,84	0,407	97,67	0,814
Potassium Chloride (KCl)	75	311,8	4,16	400	5,33
Sodium Bicarbonate (NaHCO3)	84	2438	29,02	2200	26,19
Sodium Chloride (NaCl)	58	6995,5	120,61	6800	117,24
Sodium Phosphate dibasic (Na2HPO4) anhydrous	142	71,02	0,5		
Sodium Phosphate monobasic (NaH2PO4-H2O)	138	62,5	0,453	140	1,01
Zinc sulfate (ZnSO4-7H2O)	288	0,432	0,0015		
Otros Componentes					
D-Glucose (Dextrose)	180	3151	17,51	1000	5,56
Hypoxanthine Na	159	2,39	0,015		
Linoleic Acid	280	0,042	0,00015		
Lipoic Acid	206	0,105	0,00051		
Phenol Red	376,4	8,1	0,0215	10	0,0266
Putrescine 2HCl	161	0,081	0,000503		
Sodium Pyruvate	110	55	0,5		
Thymidine	242	0,365	0,00151		

Anexo D: Protocolos

Protocolo de Cultivo en Adherencia

La propagación se lleva a cabo en placas *T-flask*, de superficie 25 [cm²] (T-25) o 75 [cm²] (T-75). El volumen de medio de cultivo es de 8 [ml] para T-25 y 24 [ml] para T-75, suplementado de acuerdo al estudio a realizar. Las condiciones de incubación son a 37 [°C], con aire a un 5% de CO₂.

Se realiza un pasaje 1:3 cada 4 días aproximadamente, cuando la confluencia en la placa haya alcanzado entre 70% u 80%. Durante ese período, se cambia el medio 1 vez entre cada pasaje, sustituyendo 2 tercios del volumen de la placa con medio fresco.

La inoculación de las placas, como también el subcultivo, debe ser llevada bajo campana, en la Cámara de Flujo Laminar, la cual debe estar encendida 20 minutos antes de trabajar en ella, y limpiada con etanol al 70%. Por otra parte, el medio de cultivo debe ser calentado 15 minutos antes de ser utilizado en el baño termorregulado.

Protocolo de Descongelamiento

- Se toma un vial de los tanques de nitrógeno y se coloca en el baño termoregulado a 40°C por unos 5 minutos.
- Al ser descongelado, se toma el contenido del vial (1 [ml] aproximadamente) y se coloca en un tubo de centrifugación con 1 [ml] de medio fresco, homogenizando cuidadosamente.
- Se deja a 40 °C en el baño termorregulado por 5 min.
- Luego, se dobla el volumen, es decir, se mezcla con 2 [ml] de medio fresco, homogenizando la mezcla y nuevamente se deja en el baño termorregulado por 5 min.
- Se repite el paso anterior hasta que el volumen final sea de 16 [ml] aproximadamente.
- Se centrifuga a 700 [rpm] por 5 [min].
- Se elimina el sobrenadante, y se resuspenden las células en 12 [ml] de medio fresco, transfiriendo este volumen en una placa T-75.
- Pasadas las 6 horas, se elimina el medio de la placa, con las células que no se pegaron, y se repone con 24 [ml] de medio fresco.

Protocolo de Congelamiento

- Se prepara el medio para congelar, el cuál contiene medio fresco más un 10% de FBS, 20% de medio usado y un 10% de DMSO.
- Se resuspenden las células en 1 [ml] este medio, a una concentración de 10⁷ [cell/ml].
- Se lleva al *frezzer* que está a una temperatura de -80°C para su congelamiento, rápidamente para evitar intoxicación de las células por DMSO.

Protocolo de Pasaje

- Se saca todo el medio de la placa.
- Se lavan las células con 3 [ml] PBS (para un T-75), para extraer los restos de FBS que puedan quedar.

- Se utiliza tripsina EDTA para despegar las células (1,5 [ml] para una T-75), dejando la placa a 37 °C en la incubadora durante unos 15 a 20 minutos.
- Se toma el volumen (células más tripsina), y se obtiene la concentración de células utilizando la técnica de *Trypan Blue*.
- Se reparten las células en placas, tal que cada una quede a una concentración de 0,3 o 0,4 x 10⁶ [cell/ml].
- Finalmente, se reponen los medios de cada placa y se dejan en la incubadora para su propagación. Se recomienda utilizar un tercio de medio usado y dos tercios de medio fresco.

Protocolo de Medición de Concentración Celular

Para la cuantificación de la concentración, se utiliza la tinción con *Trypan Blue*, la cual permite diferenciar las células vivas de las muertas, debido a que este químico es capaz de entrar a las células muertas, entregándoles un color azul.

- Luego de la tripsinación, se resuspenden la células en un volumen de medio adecuado.
- Se toman 50 [μl] de muestra, y se mezcla con 50 [μl] de *Trypan Blue*.
- Se mezclan con agua destilada para obtener un grado de dilución adecuado para contar.
- En una cámara de Neubauer se colocan 20 [μl] de muestra y se cuentan las células en los 8 cuadrantes de la cámara, con ayuda de un contador de células.
- La concentración de células vivas se calcula con la siguiente ecuación:

$$[\text{Células Vivas}] = \frac{\#células\ vivas\ contadas \cdot factor_dilución \cdot 10.000}{8} \quad \text{Ec. 19}$$

- La concentración de células muertas se obtiene de las mismas formas, pero esta vez, contando muertas. La viabilidad será obtenida de acuerdo la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad = \frac{[\text{Células Vivas}] \cdot 100}{[\text{Células Vivas}] + [\text{Células Muertas}]} \quad \text{Ec. 20}$$

Protocolo de Medición de Concentración de Glucosa

La medición de Glucosa será por medio de *Glucose Gluc-PAP Kit* (Randox), el cual posee las enzimas que catalizan primero la oxidación de la glucosa, y posteriormente la formación de quinonaimina por acción de la peroxidasa. Este producto final de color rojo-violeta es usado como indicador de la cantidad de glucosa. Se ha modificado el protocolo, con el fin de ser ocupado en placas de 96 pocillos.

- En cada uno de los pocillos se colocan 2 [μl] de muestra, obtenidos de los sobrenadantes guardado a -20 [°C].
- En un pocillo aparte de coloca 1 [μl] del estándar que viene en el kit.
- Se colocan 150 [μl] del reactivo 1 en cada pocillo (muestras y estándar), preparado previamente como indica el manual del kit.
- Se deja reaccionar a 37 [°C] por 10 minutos.

- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 500 [nm], utilizando el Lector de Placas.
- La concentración de glucosa se calcula con la siguiente fórmula (la concentración del estándar viene especificada en cada kit):

$$[Glc] = \frac{Abs_{muestra} \cdot Conc_{standard}}{Abs_{standard}} \quad \text{Ec. 21}$$

Protocolo de Medición de Concentración de Lactato

La tasa de producción de Lactato será a través de *L-Lactate LAC Kit* (Randox). Al igual que el caso anterior, este kit posee las enzimas que catalizan dos reacciones. Primero se oxida el lactato, y luego, con ayuda de una peroxidasa se forma un compuesto morado, medible a través del espectrofotómetro. Este protocolo también fue modificado para una placa de 96 pocillos.

- En cada uno de los pocillos se colocan 3 [μl] de muestra, obtenidos de los sobrenadantes guardado a -20 °C.
- En un pocillo aparte de coloca 3 [μl] del estándar que viene en el kit.
- Se colocan 150 [μl] del reactivo 1 en cada pocillo (muestras y estándar), preparado previamente como indica el manual del kit.
- Se deja reaccionar a 37 °C por 5 min.
- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 550 [nm], utilizando el Lector de Placas.
- La concentración de lactato se calcula con la siguiente fórmula (la concentración del estándar viene especificada en cada kit):

$$[Lact] = \frac{Abs_{muestra} \cdot Conc_{standard}}{Abs_{standard}} \quad \text{Ec. 22}$$

Protocolo de Medición de Concentración de Fructosa

La medición de fructosa es a través del uso de *Fructose Assay Kit* (BioVision), el cual consiste en la transformación enzimática de este azúcar en β-glucosa, la cual reacciona con *OxiRed Probe*, entregando un producto coloreado.

- Primero, se prepara la curva de calibración: Diluir la muestra estándar 100 veces, y luego colocar en una placa de 96 pocillos 0, 2, 4, 6, 8 y 10 [μl], y luego ajustar el volumen de cada uno de los pocillos a 50 [μl].
- Se colocan 50 [μl] de muestra, diluida previamente en un factor de 18.
- Se prepara la mezcla de reacción como indica el manual del kit, y se añaden 50 [μl] de esta solución en cada uno de los pocillos (muestras y estándares).
- Se incuba por 1 hora a 37 °C, protegiendo la placa de la luz.
- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 570 [nm], en el Lector de Placas.
- La concentración de fructosa se obtiene interpolando la absorbancia en la curva de calibración obtenida.

Protocolo de Extracción de Triglicéridos

Se utilizará el protocolo basado en el método de Folch para extraer los triglicéridos acumulados dentro de las células. Cabe destacar que para obtener una cantidad suficiente de triglicéridos, es necesario inocular placas de 100 [mm] al momento de realizar las curvas. Utilizando la cuarta parte del total de las células de una placa, es posible obtener una acumulación suficiente para su posterior cuantificación.

- Luego de tripsinar las células, se resuspenden las células en 3 [ml] de PBS. Se separan 1 [ml] y se guarda a -20 °C.
- Tomar 1 [ml] de células almacenadas y mezclar con 4 [ml] de mezcla cloroformo:metanol 2:1, dejando la muestra en hielo.
- Agregar 1 [ml] de NaCl al 0,9%.
- Agregar 100 [μl] de ácido acético 100%.
- Agitar vigorosamente y centrifugar a 2000-3000 [RPM] por 5-10 minutos.
- Colectar con pipeta Pasteur la fase inferior, transfiriéndola a un tubo de vidrio.
- Agregar 2 [ml] de cloroformo 100% a la fase superior remanente, agitar vigorosamente y centrifugar a 2000-3000 [RPM] por 5-10 minutos.
- Nuevamente, colectar la fase inferior, juntar con la previamente colectada y secar bajo nitrógeno.
- Agregar 250 [μl] de mezcla cloroformo:metanol 2:1 al tubo de vidrio y sonicar para resuspender los lípidos totales.
- Tomar 100 [μl] del resuspendido, y trasladar a un tubo eppendorf.
- Secar el contenido con nitrógeno.
- Añadir 100 [μl] de Tritón x100 0,05% y sonicar utilizando un sonicador de vástago.
- Extraer el volumen suficiente para su cuantificación.

Protocolo de Medición de Concentración de Triglicéridos

Se utilizará *EnzyChrom Triglyceride Assay Kit* (BioAssay Systems) para la cuantificación de triglicéridos. El kit consiste en catalizar la hidrólisis de triglicéridos y la determinación de la cantidad de glicerol, a través de la oxidación de un compuesto que genera coloración.

- Primero, se prepara las soluciones de la curva de calibración, diluyendo el estándar como indica el manual.
- En una placa de 96 pocillos colocar 10 [μl] de los estándares de la curva de calibración (0, 3, 6 y 10 [mM])
- Se coloca en cada pocillos 10 [μl] de cada extracto de triglicéridos.
- Se prepara la mezcla de reacción como indica el manual del kit, y se añaden 100 [μl] de esta solución en cada uno de los pocillos (muestras y estándares).
- Se incuba por 30 min. a temperatura ambiente.
- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 570 [nm], en el Lector de Placas.
- La concentración de triglicéridos se obtiene interpolando la absorbancia en la curva de calibración obtenida.

Protocolo de Medición de Concentración de Aminoácidos

La medición de la concentración de los 20 aminoácidos en el medio será a través de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Durante la medición, se hace pasar el flujo primero por una trampa de amonio, eliminando este compuesto de la muestra, y posteriormente por la columna de litio Shim-pack Amino-Li (Shimadzu), la que permitirá el análisis de los aminoácidos libres presentes en la muestra. Cabe destacar que el método contempla la derivatización de los aminoácidos que no poseen anillos aromáticos en sus estructura (y por lo tanto, su lectura es limitada), a través de la reacción de éstos con o-Phtalaldehyde (OPA).

Antes de utilizar el equipo, es necesario preparar las soluciones de reacción, junto con la fase móvil.

Soluciones de Reacción

1. Preparación de *Buffer* de Ácido Carbónico.

Composición química para 2 [L]:

- Na_2CO_3 : 81,4 [gr] (0,384 [M])
- H_3BO_3 : 27,1 [gr] (0,216 [M])
- K_2SO_4 : 37,6 [gr] (0,108 [M])

Procedimiento:

- a. En una botella de aforo de 2 [L] agregar 1,5 [L] de agua desionizada.
- b. Pesar Na_2CO_3 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 desionizada hasta completar los 2 [L] de solución.
- f. Filtrar con 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.

Procedimiento:

- a. Pesar 10 [gr] de Brij-35.
- b. Agregar 50 [ml] de agua desionizada 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 Solución de Reacción A (**AA-RA**)

Procedimiento:

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

No agregar Brij-35 a la solución

4. Preparación Solución de Reacción 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.

Procedimiento:

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

La vida útil de la solución es de **5 días**. Debido a esto, se recomienda preparar esta solución después de chequear la línea base.

Preparación de Fase Móvil

Para esta fase es necesario preparar 3 soluciones, cuya composición se detalla en la Tabla 53.

Tabla 53: Composición de buffers de la fase móvil para HPLC.

		Fase Móvil Inicial (A) AA-MA	Eluent (B) AA-MB	Regenerador Líquido (C) AA-MC
Normalidad ion Litio	[N]	0,15	0,3	0,2
pH		2,6	10	Sin ajuste de pH
Citrato de Litio	[gr]	28,2	28,2	-
Hidróxido de Litio	[gr]	-	5,04	4,2
Ácido Bórico	[gr]	-	12,4	-
Éter Monometílico de Etilenglicol	[ml]	140	-	-
Ácido Perclórico	[ml]	26,7	-	-
Volumen Final	[L]	2	1	0,5

Luego de realizar las mezclas éstas deben ser filtradas a través de una membrana 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 4 [N].

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-MC
- B: AA-MB
- 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 0,1 [μmol/ml] en AA-MA. De esta manera al tomar una muestra de 10 [μl] se tiene 1 [nmol] de aminoácidos.

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.

1. 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.

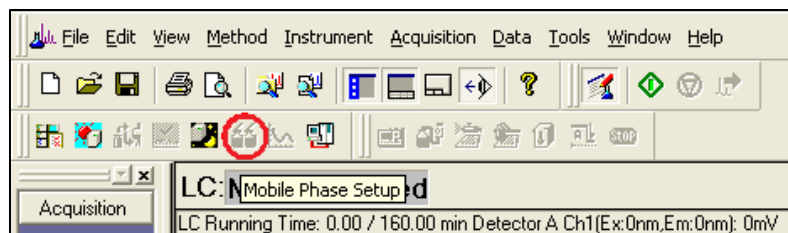


Figura 38: Botón *Mobile Phase Setup*.

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:

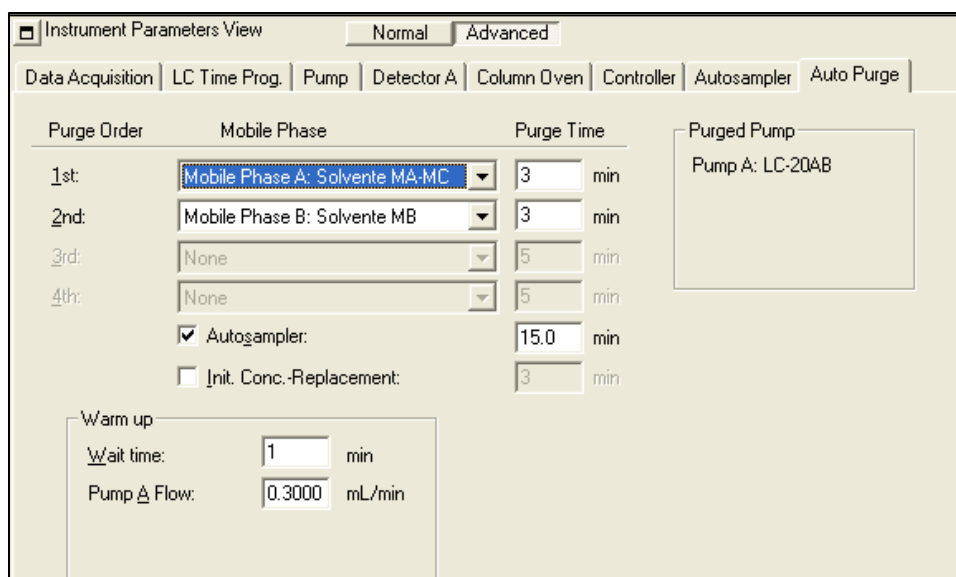


Figura 39: Ventana Autopurge.

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*.

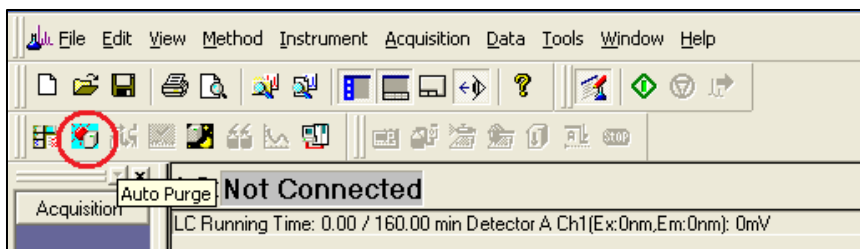


Figura 40: Botón Autopurge.

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 41. 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 42.
- 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 para restaurar la configuración inicial.
- Apretar *DOWNLOAD* para guardar los cambios.
- Cerrar la llave del equipo LC20AB.

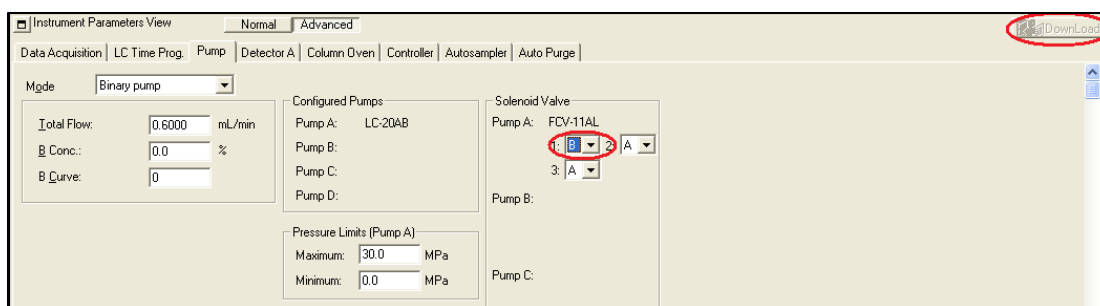


Figura 41: Cambio de bomba A a bomba B.



Figura 42: 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.

2. Procedimiento

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 43. Debido a que la bomba peristáltica funciona independientemente se debe cuidar de conectar ésta a un *timer* para asegurar que se apague y no quede prendido por un tiempo indefinido de tiempo.

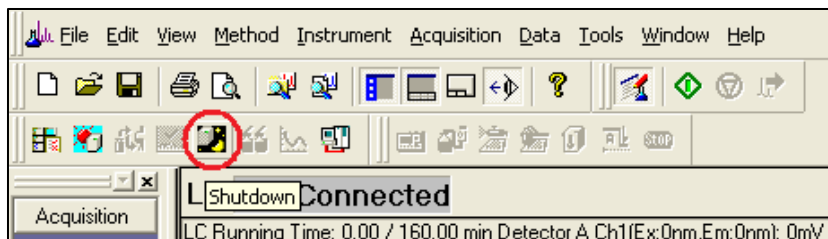


Figura 43: Botón *Shutdown*.

3. Lavado del equipo

Cuando no se ocupará el equipo por más de dos días se debe dejar todos los canales en algún solvente orgánico al 100% como metanol o alcohol isopropílico de grado para cromatografía. Para hacer esto se sabe 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 cómo 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.

Protocolo de Medición de Concentración de Amonio

El amonio será determinado a través de la reacción de Berthelot, la cual consiste en la reacción entre amonio, hipoclorito de sodio y fenol, para formar indofenol en presencia de NaOH y del catalizador nitroprusiato de sodio. El indofenol es un compuesto de color azul, y cuya concentración luego de la reacción es proporcional a la concentración de amonio inicial en el medio.

Antes que todo, es necesario preparar las siguientes soluciones:

- Solución 1: Hipoclorito de sodio 33,3 [mM] y NaOH 562,5 [mM].
- Solución 2: Fenol 487,6 [mM] y nitroprusiato de sodio 1 [mM] (extraer el fenol bajo campana).
- Solución 3: 10 [mM] de NH_4Cl .

Se recomienda preparar las soluciones de forma concentrada y almacenar en el refrigerado para su posterior uso. El protocolo de medición será:

- Se prepara la curva estándar, diluyendo la solución 3 en medio de cultivo a concentraciones de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 y 6 [mM].

- Se coloca 6 [μl] de cada uno de los estándares y de las muestras a medir, en una placa de 96 pocillos, ubicada en un lugar frío (utilizar *friopacks*).
- Se añade a cada pocillo (muestras y estándares) 120 [μl] de la solución 1 y 120 [μl] de la solución 2.
- Se incuba a 37 °C por 10 min.
- Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 630 [nm], en el Lector de Placas.
- La concentración de triglicéridos se obtiene interpolando la absorbancia en la curva de calibración obtenida.

Anexo E: Resultados Preliminares

Se realizaron ensayos previos en donde se utilizó diferentes concentraciones de Acetaminofén (APAP) y N-acetilcisteína (NAC), con el fin de seleccionar las concentraciones a utilizar en los ensayos oficiales. Primero, se utilizó una concentración de 1 y 5 [mM], y se evaluó el efecto por separado y mixto a la vez, en un ensayo que contempla 15 combinaciones: Por un lado, se utilizó 0, 1 y 5 [mM] de APAP, mientras que para el NAC, además de utilizar las concentración indicadas, se aplicó el compuesto antes y después de la intoxicación con APAP (ver el esquema en la Figura 44 A).

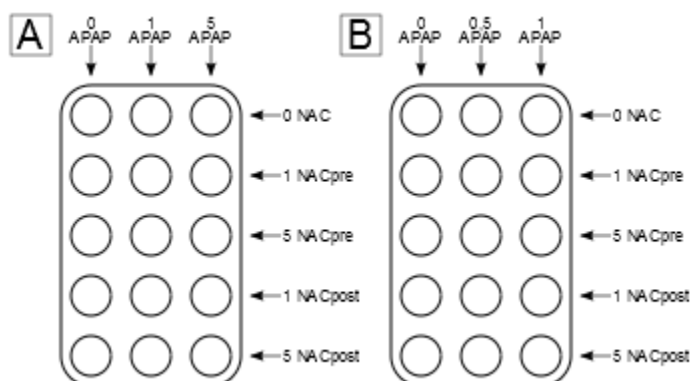


Figura 44: Diseño Experimental de ensayos de efectos de APAP y NAC. (A) 1^{er} ensayo con 0, 1 y 5 [mM] de APAP. (B) 2^{do} ensayo con 0, 0,5 y 1 [mM] de APAP.

Para estas curvas se inoculó a $0,3 \times 10^6$ [cell/ml]. En el tiempo 0 y en el 6 se aplicó el protector, NAC pre y NAC post, respectivamente. A las 3 horas del inóculo, se aplicó el APAP (ver planificación del ensayo en Figura 45 A). Utilizando la cuantificación con *Trypan Blue*, se obtuvieron las curvas de crecimiento a lo largo de 3 días de cultivo, con muestreo cada 24 horas, en uniplicado. Éstas se encuentran ilustradas en la Figura 46.

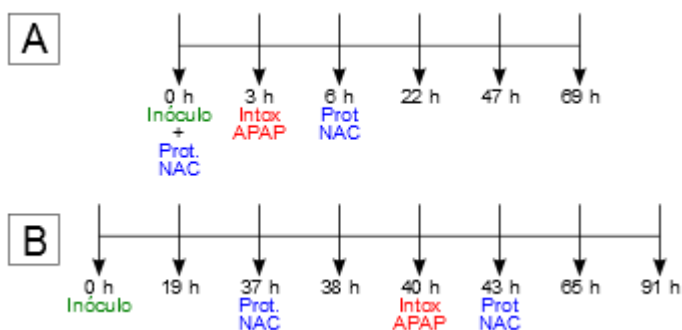


Figura 45: Planificación de ensayos de efectos de APAP y NAC. (A) 1^{er} ensayo con 0, 1 y 5 [mM] de APAP. (B) 2^{do} ensayo con 0, 0,5 y 1 [mM] de APAP (las fechas indican los muestreos).

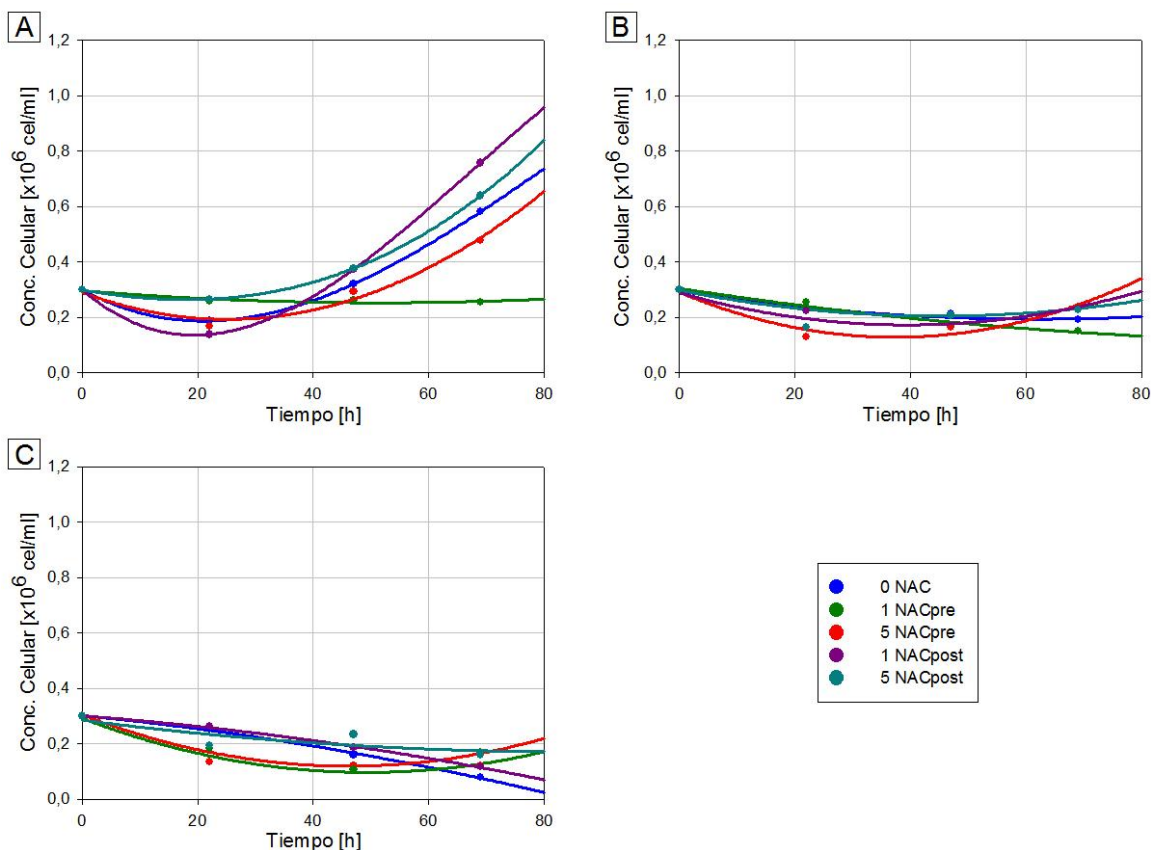


Figura 46: 1^{er} ensayo de efecto mixto. Crecimiento celular con diferentes concentraciones de NAC (0, 1 y 5 [mM], pre y post APAP) en diferentes concentraciones de APAP: (A) 0 [mM], (B) 1 [mM] y (C) 5 [mM].

Es posible indicar de la Figura 46 que: El gráfico A represente el crecimiento sin la presencia de APAP en el medio, por lo que refleja sólo el efecto del NAC sobre las células. Se observa que las concentraciones 1 NAC post y 5 NAC pre y post tienen un comportamiento similar al control (curva azul), con las misma tendencia de crecimiento después de las 40 horas, con la diferencia de que alcanzan niveles de concentración celular diferentes. Mientras tanto, el caso 1 NAC pre fue el único que mostró un nivel bajo de crecimiento, cercano al inóculo. En los gráficos B y C, donde existe APAP en el medio a una concentración de 1 y 5 respectivamente, es posible apreciar el gran efecto tóxico de este compuesto sobre las células hepáticas. El hecho de que los valores de concentración celular sean cercanos a los casos bases respectivos (datos de color azul), y que se encuentren por debajo del inóculo inicial al final de las 70 horas de cultivos, es evidencia suficiente para indicar que el APAP impidió el crecimiento celular.

Para obtener un mejor resultados, se realizaron los siguientes cambios: i) Quedó en manifiesto el alto poder nocivo del APAP, impidiendo la protección con NAC, por lo que se utilizará una concentración menor de 0,5 [mM], y evaluar de nuevo con 1 [mM]; ii) Una característica del cultivo en placas de este tipo de células, es que poseen una gran fase de retardo (*lag phase*). El ataque tóxico con APAP a las 3 horas del inóculo, produjo un estado de mayor estrés celular, impidiendo una correcta adherencia de ellas en la placa. Se decidió esperar a que las células llegasen a la fase exponencial, es decir, para agregar el APAP y el NAC después de las 32 horas; iii) Finalmente, se realizó el muestreo en duplicado, con el fin de tener una mejor reproducibilidad de los datos. El diseño experimental y la planificación de este nuevo ensayo se

encuentran ilustrados en la Figura 44 B y Figura 45 B, respectivamente. Se obtuvo una muestra por día, por 4 días de cultivo, iniciando con un inóculo de $0,25 \times 10^6$ [cell/ml]. Los resultados de este ensayo se encuentran en la Figura 47.

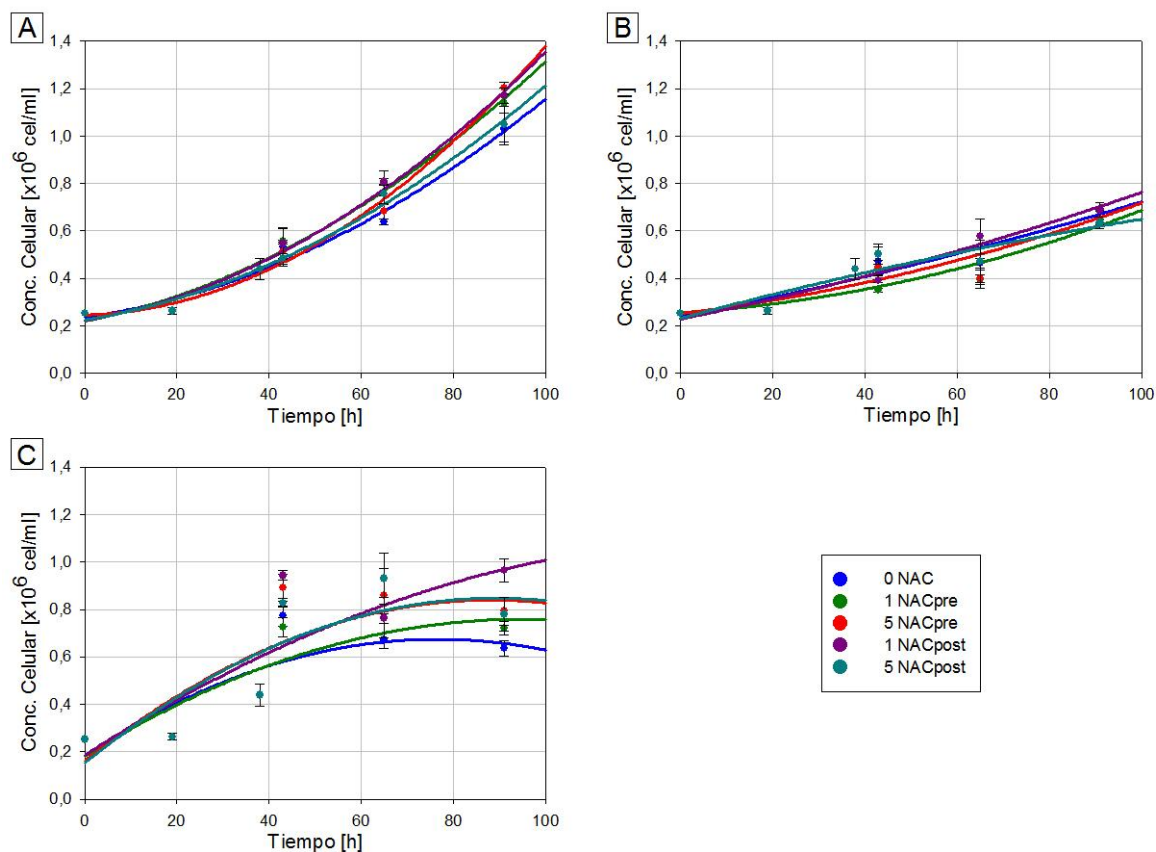


Figura 47: 2^{do} ensayo de efecto mixto. Crecimiento celular con diferentes concentraciones de NAC (0, 1 y 5 [mM], pre y post APAP) en diferentes concentraciones de APAP: (A) 0 [mM], (B) 0,5 [mM] y (C) 1 [mM].

En los gráficos de la Figura 47, los 3 primeros puntos de cada uno, correspondientes a los tiempos 0, 19 y 38 horas, son iguales para todas las curvas, dado a que fueron tomados antes del tratamiento con APAP y/o NAC. El gráfico A, de cultivo sin APAP en el medio, es posible ver que las 5 curvas mostradas siguen una misma tendencia, indicando que el protector aplicado durante la fase exponencial no interfiere en el crecimiento celular. Por otro lado, en el gráfico B es posible observar que nuevamente las 5 curvas siguen una tendencia ascendente de crecimiento, llegando eso si a una concentración celular menor que en el gráfico A. Esto indica que por un lado que existe un ataque a esa concentración de APAP (0,5 [mM]) provocando un retraso, pero que fue contrarrestado por el uso de NAC debido a que las células alcanzaron un mismo nivel de crecimiento que el caso control (curva de color azul). El gráfico C, corresponde al crecimiento con 1 [mM] de APAP en el medio. En el ensayo anterior a la misma concentración (Figura 46B) no hubo crecimiento en ningún caso. En este ensayo, si bien a las 43 horas hubo un crecimiento cercano al doble con respecto al punto anterior, los datos siguientes indican que las células llegan a un estado estacionario, con valores mayores al caso control (datos de color azul), por lo que es un indicio de que hubo protección con NAC. Sin embargo, estos datos están sujetos a un error experimental, indicado por las barras de error, y que en este caso señalan una cercanía entre los valores bastante próximos entre sí.

La complejidad de éste último ensayo radica en la gran cantidad de muestras a cuantificar (15 curvas diferentes, en duplicado, corresponden a 30 muestras). Hasta el momento, se ha corroborado por un lado que el APAP es altamente tóxico, mientras que el NAC, sin la presencia de APAP en el medio, no es nocivo para las células. Para verificar el efecto protector del NAC, se decidió trabajar en el siguiente ensayo solo con las concentraciones mayores de ambos compuestos, de modo de trabajar con una menor cantidad de muestras por punto. Los resultados de este tercer ensayo se encuentran en la sección de Resultados y Discusiones de este trabajo de tesis, ya que constituyen los resultados oficiales de este estudio.

Anexo F: Nomenclatura

- AcCoA: Acetil CoA
- α KG: α -ceto glutarato
- Ala: Alanina
- APAP: Acetaminofén
- Arg: Arginina
- Asn: Asparragina
- Asp: Aspartato
- CYP: Citocromo P450
- DAP: Dihidroxiacetona fosfato
- F1,6BP: Fructosa 1,6 bifosfato
- F1P: Fructosa 1 fosfato
- F2,6BP: Fructosa 2,6 bifosfato
- F6P: Fructosa 6 fosfato
- Frc: Fructosa
- Fum: Fumarato
- G3P: Gliceraldehído 3 fosfato
- GCS: Glutamil cisteína sintetasa
- Glc: Glucosa
- Gln: Glutamina
- Glu: Glutamato
- Gly: Glicina
- GSH: Glutati3n (reducido)
- GSSG: Glutati3n oxidado
- GST: Glutati3n S-trasferasa
- Hex: Hexosa
- HFCS: Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa
- His: Histidina
- Ile: Isoleucina
- Lac: Lactato
- Leu: Leucina
- Lys: Lisina
- Met: Metionina
- NAC: N-acetilcisteína
- NAPQI: N-acetil-p-benzoquinona imina
- OAA: Oxaloacetato
- Orn: Ornitina
- Phe: Fenilalanina
- Pro: Prolina
- Pyr: Piruvato
- ROS: Reactivos de oxígenos
- Ser: Serina
- SucCoA: Succinil CoA
- SULT: Sulfo transferasa
- TG: Triglicéridos
- The: Treonina
- Trp: Triptófano
- Tyr: Tirosina
- UGT: Glucuronosil transferasa
- Val: Valina