

Modelo matemático del metabolismo de las células CHO en la síntesis de eritropoyetina humana para aplicar la técnica de análisis de flujos metabólicos

✉ Osmán Fernández^{1,2}, Julio C Dustet², Ernesto Chico¹

¹ Desarrollo de Plataformas Tecnológicas, Centro de Inmunología Molecular, CIM
Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa, CP 16 040, La Habana, Cuba

² Grupo de Biotecnología Aplicada, Facultad de Ingeniería Química
Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría
Calle 114, No. 11901 e/ 119 y 127, Marianao, La Habana, Cuba
E-mail: osman@cim.sld.cu

RESUMEN

La modelación matemática del metabolismo tiene importantes aplicaciones relacionadas con la ingeniería de bioprocesos; entre ellas, la interpretación de estados fisiológicos de la célula. El análisis de flujos metabólicos es una herramienta útil en la modelación matemática del metabolismo. Para aplicar esta técnica a la síntesis de eritropoyetina humana recombinante en células CHO, se construyó la matriz con los números estequiométricos de las reacciones de las principales rutas que generan energía y forman los precursores fundamentales para la síntesis del producto y de la biomasa. Se incluyeron también las ecuaciones que representan las biosíntesis de la eritropoyetina humana recombinante y el crecimiento de las células CHO, lo cual ofrece ventajas al modelo con respecto a otros. La matriz obtenida tiene una dimensión de 47×44 , con un rango igual a 44 y un número de condición de 83, por lo que el modelo tiene solución única y es poco sensible. El mapa de flujos metabólicos a partir de la solución del modelo usando datos experimentales, muestra resultados consistentes desde el punto de vista bioquímico, que coinciden con resultados de otros investigadores, en células CHO y otras de mamíferos. Con la propuesta de este modelo matemático se ofrecen elementos generales de la metodología para su construcción.

Palabras clave: análisis de flujos metabólicos, metabolismo, modelo matemático, CHO, EPO

Biotecnología Aplicada 2012;29:238-245

ABSTRACT

Mathematical model of CHO cells metabolism in the synthesis of human erythropoietin to apply Metabolic Flux Analysis technique. Mathematical modeling of metabolism meets several important applications in the context of bioprocess engineering such as the interpretation of cell physiology. Metabolic flux analysis is a useful tool for mathematical modeling of cell metabolism. To applying this technique to describe the biosynthesis of recombinant human erythropoietin in CHO cells the matrix of stoichiometric numbers is built representing the major metabolic pathways that generates energy and essential precursors for product and biomass synthesis. It also includes the equations representing recombinant human erythropoietin biosynthesis and CHO cells growth, which provides advantages compared to other models reported before. The dimension of the matrix obtained is 47×44 with a rank equal to 44 and a condition number of 83; therefore, the model has a unique solution and it is not sensitive. The metabolic flux map obtained by the solution of the mathematical model using experimental data shows results consistent with the biochemistry of the CHO cells and coincides with other reports for these and other mammalian cells. The work shows the general steps of the methodology to build the proposed mathematical model.

Keywords: metabolic flux analysis, metabolism, mathematical model, CHO, EPO

Introducción

Las células de mamíferos se utilizan para fabricar proteínas terapéuticas complejas y anticuerpos monoclonales, porque producen proteínas con el patrón de glicosilación adecuado. Para mejorar la cantidad y calidad de la proteína de interés, se requiere comprender cómo su producción está relacionada con el crecimiento y mantenimiento celulares, y el metabolismo [1]. La modelación matemática del metabolismo, que es la base de muchos trabajos en ingeniería metabólica, tiene otras aplicaciones como la interpretación de los estados fisiológicos de la célula, la formulación de los medios de cultivo y el diseño de las estrategias de operación.

Los modelos matemáticos más usados para el metabolismo son los estequiométricos, y las técnicas de análisis que predominan son el análisis del balance de flujos (FBA) y el análisis de flujos metabólicos

(MFA). Cuando se aplica la técnica de FBA se usa un criterio de optimización para reducir el espacio solución del modelo hasta encontrar una solución única [2]. El resultado de la técnica de MFA es un mapa de flujos metabólicos que muestra las reacciones bioquímicas y los flujos metabólicos para cada reacción, en forma de diagrama. La ventaja fundamental de esta segunda técnica sobre la primera está en que permite determinar los flujos metabólicos de una ruta *in vivo*, en especial cuando el objetivo es convertir la mayor cantidad de sustratos posibles en productos útiles [3]. La técnica de MFA se aplica cada vez más en la caracterización cuantitativa del metabolismo de las células de mamíferos [4-8]. El mapa de flujos metabólicos de la red se obtiene mediante el método del balance de metabolitos combinado con la información experimental de las velocidades específicas de producción

1. Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DI. Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnol Bioeng.* 1999;62(3):324-35.

2. Kauffman KJ, Prakash P, Edwards JS. Advances in flux balance analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):491-6.

3. Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J. Metabolic Flux Analysis. In: *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. California: Academic Press; 1998:309-51.

4. Altamirano C, Illanes A, Casablanca A, Gamez X, Cairo JJ, Godia C. Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Prog.* 2001; 17(6):1032-41.

o consumo de metabolitos, y el sistema de ecuaciones se resuelve con las técnicas de álgebra lineal o mediante la aplicación de experimentos con marcaje de carbono 13. Este último método presenta desventajas frente al primero, por su elevado costo y porque los resultados son dependientes de la escala de trabajo; mientras que la información experimental del primero es independiente de la escala. De ahí que el método del balance de metabolitos sea reconocido como el más adecuado para el uso rutinario en el desarrollo de procesos y la caracterización del metabolismo [9]. Su precisión y la similitud de sus resultados con los del método del carbono 13 se ha demostrado para varios tipos de células: hibridomas [10], *Aspergillus oryzae* [11] y más recientemente para células de ovario de hámster chino (CHO) cultivadas en modo perfusión [9]. Cada modelo matemático del metabolismo propuesto para un tipo de célula puede ser particular en función de la información que brinda a partir del número de metabolitos balanceados, del número de nodos de la red observados y del objetivo de los investigadores. Existen modelos para la aplicación de la técnica MFA para las células CHO que han sido utilizados con el objetivo de conocer los cambios que se producen en el metabolismo de la célula en respuesta a la variación de la concentración inicial de glucosa en un cultivo continuo [4], para demostrar la validez del método de balance de metabolitos como herramienta útil para estudiar el metabolismo de la célula sin requerir métodos experimentales costosos como el marcaje de carbono (^{13}C) [9] y para comparar las predicciones del modelo con resultados experimentales [12]. Los resultados obtenidos a través de la solución de los modelos son consistentes con los conocimientos sobre la bioquímica de la célula. Sin embargo no ha sido publicado modelo alguno para células CHO produciendo la proteína glicosilada eritropoyetina humana recombinante (EPO-hr).

El objetivo de este trabajo fue construir un modelo matemático para aplicar la técnica de MFA en células CHO que produzcan EPO-hr. En el modelo se incluye una ecuación para la formación del producto de interés, a partir de un análisis de la composición química de la molécula, la cual se puede usar en otros modelos con otras líneas celulares que produzcan la proteína EPO-hr.

Materiales y métodos

Análisis de flujos metabólicos y método de solución del modelo matemático

La ecuación del balance de masa para cada metabolito balanceado en una red para aplicar la técnica de MFA, se obtiene al interpretar los términos de la expresión general de la ley de conservación de la masa. En este trabajo se propone la forma particular desde el punto de vista matemático:

$$\frac{dN_i}{dt} = F_{i0} - F_i + \sum_{j=1}^{i=n} \alpha_{ij} \frac{d\varepsilon_j}{dt} \quad (1)$$

donde:

dN_i/dt es la variación de la cantidad de sustancia de cada metabolito en el tiempo; F_{i0} y F_i son los flujos de cantidad de sustancia del metabolito i de entrada (F_{i0})

y salida (F_i) en el sistema (célula); α_{ij} es el número estequiométrico del metabolito i en la reacción j . Los valores de α_{ij} tienen signo positivo cuando el metabolito i es producto de la reacción; y signo negativo, cuando es reactivo; $d\varepsilon_j/dt$ es la velocidad de la reacción (grado de avance de la reacción j en el tiempo);

La ecuación 1 es un aporte original de este trabajo que une los enfoques termodinámico y cinético, grado de avance de la reacción (ε_j) y velocidad de la reacción ($d\varepsilon_j/dt$). Esta ecuación se puede usar no solo para la modelación matemática de redes metabólicas, sino para cualquier tipo de sistema reaccionante múltiple en los campos de la química básica e ingeniería química.

El modelo matemático que se obtiene en estado estacionario (variación de la cantidad de sustancia de cada metabolito: $dN_i/dt = 0$) a partir del balance de masa para cada metabolito de la red, incluyendo las ecuaciones para la biomasa y el producto de interés, es un sistema de ecuaciones lineales que se representa de forma matricial:

$$Ax = q \quad (2)$$

donde:

A es la matriz de dimensión $m \times n$ que contiene los números estequiométricos (α_{ij}) para cada metabolito en cada reacción de la red; x es el vector que contiene los flujos metabólicos internos (las velocidades de reacción, $d\varepsilon_j/dt$), que son las variables incógnitas del modelo; q es el vector que contiene las salidas netas de los metabolitos que la célula intercambia con el entorno ($q_i = F_i - F_{i0}$).

Para los metabolitos intermediarios y que no se encuentran en el medio de cultivo, el valor de q_i es igual a cero; mientras que para los metabolitos intercambiados con el entorno tendrá valores negativos para los nutrientes y positivos para los que se producen en el metabolismo.

El modelo propuesto tiene más ecuaciones de balance de metabolitos que reacciones, por lo que el sistema es sobredeterminado y su solución matemática está dada por la ecuación 3, según el método de mínimos cuadrados [3]. Se utilizó el programa de cálculo MATLAB 7.11 R2010b.

$$x = (A^T A)^{-1} A^T q \quad (3)$$

donde:

A^T es la matriz transpuesta de A .

Para comprobar el grado de propagación de los errores de la matriz y la confiabilidad de los flujos metabólicos calculados se hizo un análisis de sensibilidad a la matriz a partir de su número de condición, aplicando el criterio de Stephanopoulos y cols. [3].

Matriz de los números estequiométricos para la síntesis de EPO-hr en células CHO

Para la construcción de la matriz de los números estequiométricos se incluyeron las rutas de la glucólisis, de las pentosas fosfatos, del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la reacción catalizada por la enzima mállica, de la fosforilación oxidativa y de la degradación de los aminoácidos. Todas esas reacciones del metabolismo en las células de mamíferos se consideran importantes [1, 3, 4, 9, 10, 12-16]. Además se

5. Forbes NS, Clark DS, Blanch HW. Using isotopomer path tracing to quantify metabolic fluxes in pathway models containing reversible reactions. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74(3):196-211.

6. Gòdia C, Cairó JJ. Metabolic engineering of animal cells. *Bioprocess Eng.* 2002;24(5):289-98.

7. Srivastava S, Chan C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99(2):399-410.

8. Wahl A, Sidorenko Y, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. Metabolic flux model for an anchorage-dependent MDCK cell line: characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution. *Biotechnol Bioeng.* 2008;101(1):135-52.

9. Goudar C, Biener R, Boisart C, Heide-mann R, Piret J, de Graaf A, et al. Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [^{13}C , ^1H] COSY NMR spectroscopy. *Metab Eng.* 2010;12(2):138-49.

10. Zupke C, Stephanopoulos G. Intracellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro (^{13}C nmr. *Biotechnol Bioeng.* 1995;45(4):292-303.

11. Schmidt K, Marx A, de Graaf AA, Wiechert W, Sahm H, Nielsen J, et al. ^{13}C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. *Biotechnol Bioeng.* 1998;58(2-3):254-7.

12. Deshpande RR. Mammalian Cell Culture: High throughput applications of oxygen sensor plates and cellular physiological studies using ^{13}C -labeling [dissertation]. Saarbrücken: Universität des Saarlandes; 2008.

tuvieron en cuenta las reacciones de las síntesis de los precursores para la formación de biomasa y del producto de interés, y se expresaron también ecuaciones estequiométricas para la biomasa y el producto. Estas dos últimas ecuaciones estequiométricas son las que hacen que este modelo sea específico para las células CHO en la síntesis de EPO-hr, ya que las demás reacciones son comunes a todas las células de mamíferos.

Ecuación estequiométrica para la formación de la biomasa

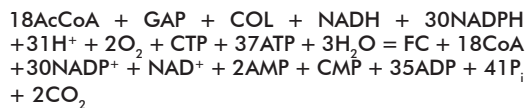
La ecuación estequiométrica para la formación de la biomasa se obtiene a partir de las ecuaciones de biosíntesis de las macromoléculas principales que conforman las células de mamíferos (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos). Esas reacciones se expresaron en función de los precursores que se forman en el metabolismo central del carbono según la metodología propuesta por Zupke y Stephanopoulos [10].

Las reacciones de formación para cada base de las moléculas ARN (ATP, CTP, GTP y UTP) y ADN (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) se tomaron de Nelson y Cox [17]. Las composiciones molares de las bases de las moléculas de ARN y ADN en células de mamíferos se tomaron de Zubay y cols. [18].

Se empleó la composición molar promedio de cada aminoácido de la proteína celular, calculada a partir de los datos informados en la literatura [4, 13, 14, 19] (Tabla 1). Por cada aminoácido incorporado a la proteína celular se requieren 4 moléculas de ATP [10, 13].

Para la composición másica de los lípidos se usó como referencia la membrana del eritrocito [10, 20]. Los valores promedios calculados y utilizados en el modelo fueron 63.0% para fosfolípidos, 13.0% para glucolípidos y 26.5% para colesterol.

De los fosfolípidos, la fosfatidilcolina (FC) es la especie más abundante en las membranas celulares [17, 20-22] y su reacción de formación se presenta a continuación:



donde:

AcCoA: acetil coenzima A; AMP, ADP y ATP: adenosina mono, di y trifosfato, respectivamente; CMP y CTP: citidina mono y trifosfato, respectivamente; CoA: coenzima A; FC: fosfatidilcolina; GAP: gliceraldehído-3-fosfato; COL: colina; NADH y NAD⁺: nicotinamina adenina dinucleótido reducida y oxidada, respectivamente; NADPH y NADP⁺: nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducida y oxidada, respectivamente; P_i: fosfato inorgánico.

Para obtener esta reacción de formación se partió del ácido oleico como ácido graso precursor, por ser el que tiene mayor proporción en las células de mamíferos [14, 17]. También se tuvo en cuenta la reacción de formación del colesterol por ser un constituyente importante en las membranas de células de mamíferos [20, 22].

Para representar la síntesis de carbohidratos (CH), se tomó la ecuación general de Altamirano y cols. [4]:



donde:

G6P: glucosa-6-fosfato.

Para calcular la masa de las cinco macromoléculas presentes en una célula CHO, se calculó el promedio de la composición másica [10, 13, 14, 16, 23] y el peso seco [1, 4, 24]. De modo que el 69.4% de la masa seca total corresponde a la proteína celular; el 5.4%, al ARN, el 3.7% al ADN; el 14.8% a los lípidos y el 6.1% a los carbohidratos. Se obtuvo además un valor de peso seco de 368 pg por célula. Estos valores promedios se multiplicaron y se obtuvo la masa de cada macromolécula en las células CHO.

Con la masa molar de cada macromolécula se obtuvieron sus cantidades de sustancia en la célula. La masa molar de la proteína celular se calculó sumando el producto de la composición molar promedio de cada aminoácido (Tabla 1) por su masa molar correspondiente, y se obtuvo un valor de 129 g/mol. La masa molar de las moléculas de ARN y de ADN se halló sumando el producto de la composición molar de cada base [18] por su masa molar, y se obtuvieron masas molares de 307 y 295 g/mol, respectivamente. Las masas molares de la fosfatidilcolina y el colesterol son 760 y 387 g/mol, respectivamente, mientras que para los carbohidratos se utilizó una masa molar promedio de 215 g/mol.

Con respecto a la proteína celular, se calculó la cantidad de sustancia de cada aminoácido multiplicando la composición de cada uno (Tabla 1) por la cantidad de sustancia de la proteína celular (1.99 pmol).

Por último, a partir de las cantidades de sustancia de las cinco macromoléculas en la célula y las reacciones que las forman, se obtuvo la reacción global de formación para la biomasa como la suma de las cantidades de sustancia de cada macromolécula.

Ecuación estequiométrica para la formación del producto (EPO-hr)

Para obtener la ecuación de formación del producto (EPO-hr), se precisó la composición química de la biomolécula, su composición de aminoácidos y carbohidratos [25, 26].

La reacción de la EPO-hr dependió de las reacciones de formación de los oligosacáridos que se encuentran en los sitios de glicosilación (por su alta proporción en la molécula) en función de los metabolitos del metabolismo central del carbono. Con las cantidades de los aminoácidos y de los precursores

13. Savinell JM, Palsson BO. Optimal selection of metabolic fluxes for in vivo measurement. II. Application to *Escherichia coli* and hybridoma cell metabolism. *J Theor Biol.* 1992;155(2):215-42.

14. Bonarius H, Hatzimanikatis V, Meesters K, Gooijer C, Schmid G, Tramper J. Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balances. *Biotechnology and Bioengineering.* 1996;50:299-318.

15. Gambhir A, Korke R, Lee J, Fu PC, Europa A, Hu WS. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. *J Biosci Bioeng.* 2003; 95(4):317-27.

16. Europa AF, Gambhir A, Fu PC, Hu WS. Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67(1):25-34.

17. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de Bioquímica. 4th ed. Barcelona: Ediciones Omega S.A.; 2005.

18. Zubay GL, Parson WW, Vance DE. Principles of Biochemistry. New York: William C Brown; 1995.

19. Okayasu T, Ikeda M. The amino acids composition of mammalian and bacterial cells. *Amino Acids.* 1997;13:379-91.

20. Voet D, Voet JG. Bioquímica. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.

21. Metzler DE, Metzler CM. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2003.

22. Koolman J, Roehm KH. Color Atlas of Biochemistry. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2005.

23. Xie L, Wang DI. Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnol Bioeng.* 1996;52(5):579-90.

24. Xie L, Nyberg G, Gu X, Li H, Mollborn F, Wang DI. Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1997;56(5):577-82.

25. Lee DE, Ha BJ, Kim SJ, Park JS. Carbohydrate structure of N- and O-linked oligosaccharides of human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biochem Mol Biol.* 1996;29:266-71.

Tabla 1. Composición molar promedio de los aminoácidos (código de tres letras) en células de mamíferos, calculada a partir de datos de la literatura

Aminoácido	Composición (%)	Aminoácido	Composición (%)
ALA	8.8	GLN	4.7
GLY	8.6	ILE	4.7
LEU	8.5	PRO	4.7
LYS	8.1	ASN	4.2
GLU	7.3	PHE	3.3
SER	6.3	TYR	2.6
ASP	6.0	HIS	2.0
VAL	6.0	MET	1.7
ARG	5.6	CYS	1.6
THR	5.6	TRP	0.6

de los oligosacáridos se halló la composición de cada uno dividiendo el número de unidades de cada metabolito entre la suma de todas las unidades. Se tuvo en cuenta además que por cada aminoácido incorporado se requieren 4 ATP [10, 13].

Información experimental analizada con el modelo propuesto

El cultivo de las células se realizó en un biorreactor modelo Minifors (Infors HT, Suiza) con 3.2 litros de volumen efectivo, que operaba en modo continuo y en estado estacionario con una velocidad de dilución de 0.026 h⁻¹, una velocidad de agitación de 130 min⁻¹ y un flujo de aire de 0.02 vvm.

Técnicas analíticas

La determinación de la concentración de los aminoácidos se realizó mediante HPLC (Shimadzu, Japón), para lo cual se empleó una columna de fase reversa C18 (ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 5 µm, Agilent Technologies, EE.UU.) con precolumna (Vydac C-18) después de la derivatización con el agente derivatizante fenilisotiocianato según el protocolo de Elkin y Wasynczuk [27]. La determinación de la concentración de glucosa, lactato y glutamina se realizó en un analizador bioquímico YSI Modelo 2700 SELECT (YSI Life Sciences, EE.UU.).

Para determinar la concentración de EPO en el sobrenadante del cultivo, se utilizó una columna de fase reversa Vydac C8 de 150 × 4.6 mm con una partícula de 5 µm. La separación se logró con un gradiente no lineal de solventes orgánicos (fase móvil A: ácido trifluoroacético en agua 0.1%; fase móvil B: acetonitrilo 90% + ácido trifluoroacético en agua 0.09%).

Cálculo de las velocidades netas de salida de los metabolitos a partir de la información experimental

La información necesaria para formar el vector q del modelo, se calcula a partir de los datos experimentales de las concentraciones de los metabolitos mediante la ecuación de balance de masa en el reactor en estado estacionario [4]:

$$q_i = \frac{D(C_i^s - C_i^e)}{X_v} \quad (4)$$

donde:

D es la velocidad de dilución; C_i^e y C_i^s son la concentración del metabolito a la entrada y la salida del reactor (mg/L), respectivamente; X_v es la concentración de células vivas en el reactor (células/mL).

La velocidad neta de salida para el oxígeno se calculó de manera experimental, según el método dinámico para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [28].

Comprobación de la calidad de la información experimental

El análisis de consistencia se realizó mediante el método propuesto por van der Heijden y cols. [29, 30], que se basa en el balance de materiales por elementos y la redundancia de los datos experimentales.

En este método se calcula una función de prueba o índice de consistencia (h) que sigue una distribución de probabilidades igual a la de χ^2 , donde los grados de

libertad son iguales al rango de la matriz redundancia R [30]. Con los grados de libertad y un nivel de confianza de 95% se obtiene un valor crítico de χ^2 para realizar una prueba de hipótesis que permite corroborar que el error en las mediciones no es significativo.

Resultados y discusión

Ecuación del modelo que simboliza la formación de la biomasa y su fórmula química normalizada

En la tabla 2 se muestran los valores de las masas y cantidades de sustancias de las macromoléculas de una célula CHO, obtenidas por la metodología antes descrita.

La ecuación que simboliza la formación de una célula CHO en el modelo es:

0.067R5P + 11.100ATP + 0.229GLN + 0.203GLY + 0.205ASP + 0.077NAD⁺ + 0.067 N¹⁰-Formil-THF + 0.067HCO⁻ + 0.008N⁵,N¹⁰-Metilén-THF + 0.175ALA + 0.110ARG + 0.083ASN + 0.032CYS + 0.040HIS + 0.093ILE + 0.168LEU + 0.160LYS + 0.033MET + 0.066PHE + 0.093PRO + 0.126SER + 0.112THR + 0.013TRP + 0.051TYR + 0.119VAL + 1.485AcCoA + 1.875H⁺ + 2.451NADPH + 0.501O₂ + 0.105G6P + 0.020GTP + 0.045GAP + 0.045COL + 0.045CTP + 0.031H₂O + 0.008GLU = CHO + 2.918ADP + 3.354P_i + 0.422CO₂ + 0.008DHF + 0.067THF + 0.053FUM + 0.002NADH + 1.485CoA + 1.891NADP⁺ + 0.171AMP + 0.020GDP + 0.045CMP

donde:

DHF: dihidrofolato; FUM: fumarato; GDP y GTP: di y trifosfato de guanosina; GLU: glutamato; R5P: ribosa-5-fosfato; THF: tetrahidrofolato. Se muestra también la nomenclatura estándar de tres letras de los aminoácidos.

Esta ecuación contiene más información que la descrita por Altamirano y cols. [4], quienes representan la formación de la célula dividida en cinco ecuaciones para las macromoléculas principales. Ello dificulta la identificación del aporte de las rutas principales del metabolismo central a la formación de la célula. Para la biosíntesis de los lípidos, en este trabajo se tienen en cuenta publicaciones más recientes que reconocen la membrana de eritrocito en las células de mamíferos, como modelo por su caracterización [10, 20].

A partir de la cantidad de sustancia y la composición elemental de cada macromolécula se obtuvo una composición elemental normalizada a un átomo de carbono de la biomasa de CH_{1.95}N_{0.23}O_{0.50} y de la proteína celular de CH_{2.01}N_{0.29}O_{0.52}. Estas dos formas

Tabla 2. Cantidad de cada macromolécula en una célula CHO

Macromolécula	Masa (pg/célula)	Cantidad de sustancia (pmol/célula)
Colesterol	14.44	0.04
ADN	13.48	0.03
Fosfatidilcolina	34.33	0.05
Carbohidratos	22.64	0.11
ARN	19.79	0.04
Lípidos	54.49	-
Proteína celular	255.55	1.99

26. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem.* 1987;262(25):12059-76.

27. Elkin RG, Wasynczuk AM. Amino acid analysis of feedstuff hydrolysates by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* 1987;64(4):226-9.

28. Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press; 1995.

29. van der Heijden RT, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KC. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43(1):3-10.

30. van der Heijden RT, Romein B, Heijnen JJ, Hellinga C, Luyben KC. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43(1):11-20.

son necesarias para la determinación de la calidad de la información experimental que se usa en la solución del modelo matemático.

Ecuación del modelo que simboliza la formación de la proteína EPO-hr y su fórmula química normalizada

A partir del análisis de la composición de la molécula de EPO y expresando su formación en función de precursores del metabolismo central, se obtiene la ecuación que simboliza la formación de EPO en el modelo:

$$0.045\text{ALA} + 0.029\text{ARG} + 0.014\text{ASN} + 0.014\text{ASP} + 0.010\text{CYS} + 0.088\text{GLN} + 0.021\text{GLY} + 0.005\text{HIS} + 0.012\text{ILE} + 0.055\text{LEU} + 0.019\text{LYS} + 0.002\text{MET} + 0.010\text{PHE} + 0.019\text{PRO} + 0.024\text{SER} + 0.026\text{THR} + 0.007\text{TRP} + 0.010\text{TYR} + 0.026\text{VAL} + 0.143\text{F6P} + 0.052\text{G6P} + 0.071\text{AcCoA} + 0.124\text{UTP} + 0.026\text{CTP} + 0.026\text{H}_2\text{O} + 0.071\text{GTP} + 1.480\text{ATP} + 0.026\text{PEP} = \text{EPO} + 0.030\text{ADP} + 0.452\text{P}_i + 0.043\text{MAN} + 0.021\text{GLC} + 0.116\text{UDP} + 0.071\text{GDP} + 0.026\text{CMP} + 0.007\text{UMP} + 0.071\text{CoA} + 0.043\text{GLU}$$

donde:

F6P: fructosa-6-fosfato; GLC: glucosa; GLU: glutamato.; MAN: manosa; PEP: fosfoenolpiruvato; UMP, UDP y UTP: mono, di y trifosfato de uridina, respectivamente. Se representan los aminoácidos según el código de tres letras.

Pocos autores han propuesto una ecuación para expresar la formación del producto extracelular de interés [3, 31]. Stephanopoulos y cols. [3] proponen una para modelar la producción de una inmunoglobulina G en el hibridoma murino ATCC CRL 1606, y comentan que entre las ventajas de que este modelo posea una ecuación para el producto, está la posibilidad de conocer la relación entre la distribución de flujos metabólicos en la célula y la cantidad de producto formado para tomar decisiones de modificaciones en el metabolismo mediante las técnicas de ingeniería metabólica. Otra de las ventajas es que se puede calcular el flujo metabólico mediante la solución del modelo cuando se dificulta su determinación experimental.

Calik y Ozdamar [31] propusieron por primera vez una ecuación para la EPO-hr producida en células de *Bacillus licheniformis*, y no tuvieron en cuenta la estructura glicosilada de la molécula. Ello limita su uso en modelos metabólicos en células que no expresan glicoproteínas. Otra desventaja del uso de esta ecuación es que introduce un aumento del grado de propagación de los errores en el cálculo de los flujos metabólicos debido a un incremento en el número de condición de la matriz estequiométrica.

La ecuación de nuestro trabajo para la proteína EPO-hr es la primera que tiene en cuenta la estructura glicosilada que la conforma y expresa la estequiometría en función de las composiciones molares, sin que se comprometa la estimación de los flujos metabólicos [10], y además se logra una disminución del número de condición de la matriz de los números estequiométricos.

La composición elemental de la secuencia de aminoácidos en la molécula de EPO es $\text{C}_{809}\text{H}_{1305}\text{N}_{229}\text{O}_{240}\text{S}_5$. La composición elemental en los tres sitios de N-glicosilación es $\text{C}_{387}\text{H}_{627}\text{N}_{27}\text{O}_{279}$, mientras que la del sitio de O-glicosilación es $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{26}$. A partir del análisis

anterior, la molécula de EPO-hr tiene una composición elemental de $\text{C}_{1232}\text{H}_{1989}\text{N}_{259}\text{O}_{545}$, que normalizada a un átomo de carbono queda $\text{CH}_{1.61}\text{N}_{0.21}\text{O}_{0.44}$.

Modelo matemático para describir la formación de EPO-hr en células CHO

En la tabla 3 se muestran todas las reacciones que se incluyeron en la construcción del modelo matemático. Se tuvieron en cuenta nodos importantes del metabolismo central del carbono, en este caso G6P, F6P y piruvato (PYR), y las ecuaciones del crecimiento de las células CHO y de la síntesis de EPO-hr resultantes. Es importante incluir un número mayor de nodos del metabolismo central del carbono que en otros modelos propuestos para CHO [4, 9, 12], para usar el modelo como herramienta de ingeniería metabólica, donde es preciso identificar los nodos principales de la red y su rigidez, para redireccionar los flujos hacia la formación del producto de interés [3].

La matriz de los números estequiométricos obtenida tiene una dimensión de 47×44 con un rango igual a 44; por tanto, cumple la condición matemática para solucionar el modelo y se puede aplicar la técnica de MFA (Figura 1). Tiene además un número de condición de 83, menor que 100, por lo que la matriz es funcional desde el punto de vista matemático, poco sensible, y los resultados de los flujos metabólicos que se calculen son confiables. En la figura, los puntos significan números estequiométricos diferentes de cero.

Comprobación de la calidad de la información experimental

A los flujos metabólicos externos (velocidades netas de salida de la célula) se les realizó el análisis de consistencia (Tabla 4), y se dejaron como velocidades específicas para calcular las de CO_2 y NH_3 . Se obtuvo una función h de prueba igual a 4.718; menor que el valor crítico de χ^2 (5.991) para dos grados de libertad y un nivel de confianza del 95%. Por ello, los datos experimentales son consistentes y se pueden estimar los valores de las velocidades específicas de CO_2 y NH_3 en 0.80 y 0.09 mmol/g de biomasa seca por hora, respectivamente. El conjunto de datos experimentales se puede utilizar para calcular los flujos metabólicos internos mediante la solución del modelo matemático.

Solución del modelo matemático

En el mapa de los flujos metabólicos calculados, solo se representaron los flujos con mayores valores (Figura 2). La glucólisis, la formación de lactato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa, el consumo de glutamina, la lanzadera malato-aspartato y la reacción catalizada por la enzima málica mitocondrial muestran los flujos mayores, también observados por Ahn y cols. [32]. Este comportamiento coincide con el fenotipo metabólico ineficiente, caracterizado por altas velocidades de consumo de glucosa y altas velocidades de formación de lactato aun en presencia de oxígeno (efecto Warburg), referido por Goudar y cols. [9] y por Mulukutla y cols. [33] para células de mamíferos. Esto se debe a que el flujo glucolítico está relacionado con la rapidez con que se regenera el NAD^+ a través de la conversión a piruvato y por las lanzaderas de NADH.

Los resultados mediante el MFA muestran que el alto consumo de glucosa está descoordinado con el

31. Calik P, Ozdamar T. Metabolic flux analysis for human therapeutic protein productions and hypothesis for new therapeutic strategies in medicine. *Biochem Eng J.* 2002;11(1):49-68.

32. Ahn WS, Antoniewicz MR. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng.* 2011;13(5):598-609.

33. Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* 2010;28(9):476-84.

Tabla 3. Reacciones de la red metabólica del modelo matemático para la producción de eritropoyetina humana recombinante en células CHO*

Ruta	No.	Reacción
Glucólisis	1.	GLC + ATP = G6P + ADP
	2.	G6P = F6P
	3.	F6P + ATP = 2GAP + ADP
	4.	GAP + P _i + NAD ⁺ + ADP = G3P + NADH + H ⁺ + ATP
	5.	G3P = PEP + H ₂ O
	6.	PEP + ADP = PYR + ATP
Ruta de las pentosas fosfato	7.	PYR + NADH + H ⁺ = LAC + NAD ⁺
	8.	G6P + 2NADP ⁺ + H ₂ O = R5P + CO ₂ + 2NADPH + H ⁺
	9.	R5P + X5P = S7P + GAP
	10.	E4P + X5P = F6P + GAP
	11.	S7P + GAP = F6P + E4P
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	12.	PYR + CoA + NAD ⁺ = AcCoA + CO ₂ + NADH + H ⁺
	13.	AcCoA + OAA + H ₂ O = CIT + CoA
	14.	CIT + NADP ⁺ = α-KG + CO ₂ + NADPH + H ⁺
	15.	α-KG + CoA + NAD ⁺ = SucCoA + CO ₂ + NADH + H ⁺
	16.	SucCoA + GDP + P _i = SUC + CoA + GTP
	17.	SUC + FAD = FUM + FADH ₂
	18.	FUM + H ₂ O = MAL
	19.	MAL + NAD ⁺ = OAA + NADH + H ⁺
Enzima málica	20.	PYR + H ₂ O + CO ₂ + NADH + H ⁺ = MAL + NAD ⁺ + P _i
Fosforilación oxidativa	21.	NADH + H ⁺ + 3ADP + 3P _i + 0.5O ₂ = 4H ₂ O + 3ATP + NAD ⁺
	22.	FADH ₂ + 2ADP + 2P _i + 0.5O ₂ = 3H ₂ O + 2ATP + FAD
Degradación y síntesis de aminoácidos	23.	ALA + α-KG = PYR + GLU
	24.	GLY + N ⁵ ,N ¹⁰ -Metilén-THF = SER + THF
	25.	SER = PYR + H ₂ O + NH ₃
	26.	THR = GLY + ACE
	27.	CYS + 2O ₂ + 2NADH + 2H ⁺ + α-KG = PYR + 2H ₂ O + 2NAD ⁺ + GLU
	28.	TRP + 3O ₂ + 3H ₂ O + NADPH + H ⁺ + CoA = ALA + 2AcCoA + FOR + NADP ⁺ + 3CO ₂ + NH ₃
	29.	PHE + O ₂ + NADPH + H ⁺ = TYR + NADP ⁺ + H ₂ O
	30.	TYR + 2O ₂ + α-KG + CoA + SucCoA = 2AcCoA + SUC + GLU + CO ₂
	31.	LEU + α-KG + 2H ₂ O + 3CoA + NAD ⁺ + FAD + ATP = 3AcCoA + ADP + P _i + NADH + H ⁺ + GLU + FADH ₂
	32.	LYS + 2α-KG + 3NAD ⁺ + 2CoA + FAD + 2H ₂ O = 2AcCoA + 2GLU + 3NADH + 3H ⁺ + 2CO ₂ + FADH ₂
	33.	ARG + α-KG + 2H ₂ O + NAD ⁺ = 2GLU + NADH + H ⁺ + Urea
	34.	HIS + 2H ₂ O + THF = GLU + NH ₄ + N ⁵ -Formimino-THF
	35.	PRO + H ₂ O + 0.5O ₂ + NAD ⁺ = GLU + NADH + H ⁺
	36.	GLN + H ₂ O = GLU + NH ₄
	37.	GLU + NADP ⁺ = α-KG + NH ₄ + NADPH + H ⁺
	38.	MET + 3H ₂ O + 2ATP + SER + CoA + NAD ⁺ = SucCoA + ADP + 4P _i + CYS + NADH + H ⁺
	39.	VAL + 3H ₂ O + ATP + α-KG + CoA + 3NAD ⁺ + FAD = SucCoA + ADP + P _i + FADH ₂ + 3NADH + 3H ⁺ + GLU + CO ₂
	40.	ILE + 2H ₂ O + ATP + α-KG + 2CoA + 2NAD ⁺ + FAD = SucCoA + ADP + P _i + FADH ₂ + 2NADH + 2H ⁺ + GLU + AcCoA
	41.	ASN + H ₂ O = ASP + NH ₄
	42.	ASP + α-KG = OAA + GLU

* El número de la reacción se corresponde con su posición en la matriz de MatLab. AcCoA: acetil-CoA; ACE: acetaldehído; ADP y ATP: adenosina di y trifosfato; ALA: alanina; ARG: arginina; ASN: asparagina; ASP: aspartato; CIT: citrato; CoA: coenzima A; CYS: cisteína; E4P: eritrosa-4-fosfato; F6P: fructosa-6-fosfato; FAD y FADH₂: flavina adenina dinucleótido oxidada y reducida, respectivamente; FOR: ácido fórmico; FUM: fumarato; G3P: 3-fosfoglicerato; G6P: glucosa-6-fosfato; GAP: gliceraldehído-3-fosfato; GDP y GTP: guanosina di y trifosfato, respectivamente; GLC: glucosa; GLN: glutamina; GLU: glutamato; GLY: glicina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LAC: lactato; LEU: leucina; LYS: lisina; MAL: malato; MET: metionina; NADH y NAD⁺: nicotinamina adenina dinucleótido reducida y oxidada, respectivamente; NADPH y NADP⁺: nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducida y oxidada, respectivamente; OAA: oxalacetato; PEP: fosfoenolpiruvato; PHE: fenilalanina; Pi: fósforo inorgánico; PRO: prolina; PYR: piruvato; PYR: piruvato; R5P: ribosa-5-fosfato S7P: sedoheptulosa-7-fosfato; SER: serina; SUC: succinato; SucCoA: succinil-CoA; THF: tetrahidrofolato; THR: treonina; TRP: triptófano; TYR: tirosina; VAL: valina; X5P: xilulosa-5-fosfato; α-KG: α-cetoglutarato.

ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Si se analiza la distribución de flujos metabólicos alrededor del nodo piruvato que es el metabolito que enlaza la glucólisis con el ciclo, se observa que el 82% del piruvato que se encuentra en el citoplasma se convierte en lactato y solo el 15% se transporta a la mitocondria. Solo el 41% del piruvato que entra a la mitocondria

ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo que representa el 8.8% del piruvato que se encuentra en el citoplasma; mientras que el otro 56% se convierte a alanina por la enzima alanina-aminotransferasa y es expulsado al medio de cultivo. A su vez, casi toda la glutamina consumida se convierte en glutamato por la enzima dependiente de fosfato glutaminasa en la

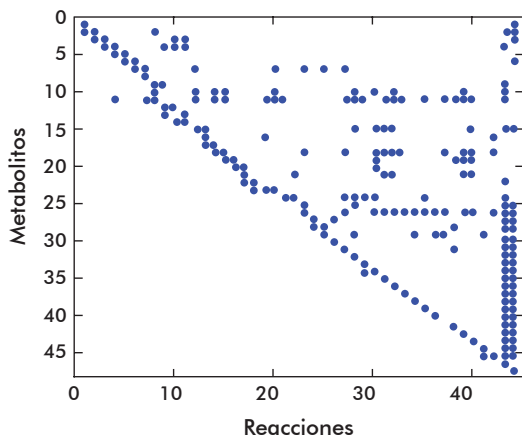


Figura 1. Matriz de los números estequiométricos que forman parte del modelo matemático. Los puntos representan los números estequiométricos diferentes de cero para las reacciones 1 a la 42, descritas en la tabla 3. Los puntos de las reacciones 43 y 44 se corresponden con las ecuaciones obtenidas para la formación de biomasa de células CHO y la producción de eritropoyetina, respectivamente (ver el texto para más detalles sobre las reacciones).

mitocondria. Estos comportamientos de altas velocidades en la glucólisis junto con la oxidación parcial de la glutamina y la formación de alanina para células CHO fueron descritos por Altamirano y cols. [4] y Goudar y cols. [9].

El flujo de piruvato que entra a la mitocondria es similar al flujo de transporte del malato desde el citoplasma. Esto coincide con lo descrito por Mulukutla y cols. [33], quienes plantean que en estado estacionario, la velocidad de piruvato que entra a la mitocondria es aproximadamente igual al flujo de equivalentes reductores transferidos a través de la membrana mitocondrial mediante las lanzaderas de NADH. El aspartato formado en la mitocondria se transporta al citoplasma para contribuir a las reacciones de transferencia de electrones mediante la lanzadera malato-aspartato. En esta lanzadera, el aspartato que deja la mitocondria se convierte a oxalacetato por la aspartato-aminotransferasa citosólica. El oxalacetato entonces se reduce a malato usando electrones donados por el NADH generado en la glucólisis. Este malato entra a la mitocondria y dona electrones al complejo I de la cadena de transporte electrónico. Así, la lanzadera mantiene en curso la producción de ATP en la mitocondria (a través de la fosforilación oxidativa) y el citoplasma (por el reabastecimiento del NAD⁺ necesario para la glucólisis).

Un parámetro metabólico de interés que se calcula es la relación O₂/ATP. Si todo el NADH y el FADH₂ se convierten a ATP por la vía de la fosforilación oxidativa, esta relación debe tener un valor cercano a 0.17 [15]. El NADH y el FADH₂ generados en la mitocondria donan electrones al complejo I y II de la cadena de transporte electrónico, respectivamente. El valor obtenido de la relación O₂/ATP es de 0.20, lo que indica que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no está acoplado en su totalidad a la generación de energía por la vía de la fosforilación oxidativa.

Otro parámetro que refleja el estado metabólico de la célula es la razón de respiración, definida como la relación entre la velocidad específica de formación de CO₂

Tabla 4. Velocidades específicas de producción (valor positivo) o consumo (valor negativo) utilizados en el análisis de la consistencia de los datos experimentales*

Producción		Consumo			
Metabolito	Velocidad específica	Metabolito	Velocidad específica	Metabolito	Velocidad específica
LAC	6.54	CYS	-0.01	PHE	-0.09
Biomasa	1.03	TRP	-0.01	TYR	-0.09
ALA	0.93	HIS	-0.02	LEU	-0.12
GLU	0.40	MET	-0.02	LYS	-0.12
ASP	0.16	THR	-0.04	ASN	-0.32
SER	0.03	PRO	-0.05	O ₂	-0.72
EPO-hr	0.02	VAL	-0.05	GLN	-0.80
GLY	0.02	ARG	-0.06	GLC	-8.28
		ILE	-0.06		

*Velocidad específica expresada en milimoles por gramo de biomasa seca por hora. EPO-hr: eritropoyetina humana recombinante; GLC: glucosa; LAC: lactato. Se representan los aminoácidos según el código de tres letras.

y la velocidad específica de consumo de O₂ (CO₂/O₂). La razón de respiración en el caso estudiado tiene un valor de 1.11, similar al valor de 1.1 para células de mamíferos antes publicado [14].

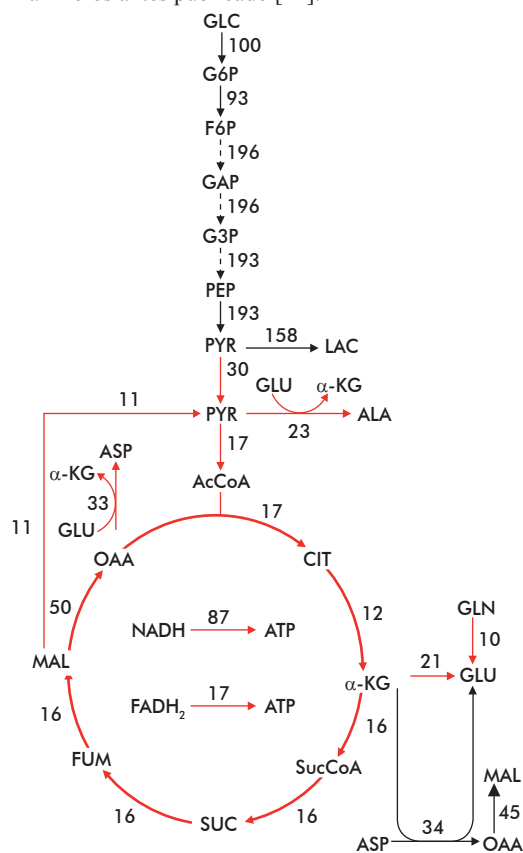


Figura 2. Mapa de flujos metabólicos que representa la solución del modelo matemático. El color negro indica las reacciones que ocurren en el citoplasma, y el rojo las que ocurren en la mitocondria. Los valores numéricos representan los flujos metabólicos normalizados contra el flujo metabólico de la reacción de consumo de glucosa (100). Líneas discontinuas representan más de una reacción. AcCoA: acetil-CoA; ALA: alanina; ASP: aspartato; CIT: citrato; F6P: fructosa-6-fosfato; FUM: fumarato; G3P: 3-fosfoglicerato; G6P: glucosa-6-fosfato; GAP: gliceraldehído-3-fosfato; GLC: glucosa; GLN: glutamina; GLU: glutamato; LAC: lactato; MAL: malato; OAA: oxalacetato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; SUC: succinato; SucCoA: succinil-CoA; α-KG: α-cetoglutarato.

Conclusiones

Los resultados mediante la técnica de MFA son consistentes desde el punto de vista bioquímico y coinciden con los descritos por otros autores para las células CHO; por tanto, el modelo matemático del metabolismo propuesto en este trabajo se puede usar para caracterizar su metabolismo al producir la proteína recombinante EPO-hr. Una ventaja que presenta este modelo matemático con respecto a otros para células CHO es

que en la red metabólica se reflejan muchos nodos del metabolismo central del carbono, lo que proporciona una información más detallada al interpretar la red y puede ser usado en ingeniería metabólica. La ecuación presentada para la formación de la proteína EPO es la primera que se ha descrito en la literatura y se puede usar en otros trabajos, aun cuando la biomolécula se produzca por una línea celular diferente de CHO. La metodología para construir el modelo se puede usar también para obtener otros modelos [34].

34. Fernández-Oliva O, Dustet-Mendoza JC, Chico-Véliz E. Dos aplicaciones de la técnica de análisis de flujos metabólicos. *Rev Cub Quím.* 2012;24(1):70-82.

Recibido en abril de 2010. Aprobado en junio de 2012.