



MODELO MATEMATICO DEL METABOLISMO DE CELULAS CHO PARA DESCRIBIR LA SINTESIS DE ERITROPOYETINA HUMANA.

Osmán Fernández¹, Ernesto Chico, José L. Martínez², Julio Dustel³ 1. Centro de Inmunología Molecular, 2. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Coahuila, 3. Facultad de Ingeniería Química, Cujae. Calle 114 # 11901 e/ 119 y 127. Ciudad de La Habana, Cuba. icdm@quimica.cujae.edu.cu, osman@cim.sld.cu.

Palabras clave: *Eritropoyetina humana recombinante, Células CHO, Flujos Metabólicos.*

Introducción. La modelación matemática del metabolismo y en particular el uso del Análisis de Flujos Metabólicos (MFA) constituye una herramienta poderosa para entender la relación entre la formación del producto y el funcionamiento de la red metabólica. La técnica de análisis MFA se basa en la interpretación de la solución de una matriz estequiométrica que representa el conjunto de reacciones de la red en estado estacionario.

El objetivo del trabajo fue obtener un modelo matemático para describir la síntesis de la molécula Eritropoyetina humana producida en células CHO y aplicar la técnica de análisis MFA con datos experimentales.

Metodología. Cuando se realiza un MFA la matriz está compuesta por más balances de metabolitos que reacciones de la red metabólica, por lo que se dice que el sistema está sobredeterminado y no existe una solución única (1). No obstante, es posible encontrar una solución a partir del Método de los Mínimos Cuadrados: $x = (A^T A)^{-1} A^T q$, donde A y A^T representan la matriz y matriz transpuesta de los números estequiométricos y q el vector de las velocidades netas de salida (2). Otro aspecto necesario para la solución de la matriz es la medida de la sensibilidad o grado de propagación de errores de la misma, que se obtiene a partir del Número de Condición (CN): $CN = \|A\| \| (A^T A)^{-1} A^T \|$. Si CN se encuentra entre 0 y 100 la matriz está bien-condicionada, o sea es poco sensible.

Resultados y discusión. En la construcción de la red para CHO solo se incluyeron las reacciones del metabolismo central del carbono identificadas como importantes para la producción de biomasa y energía (Glucólisis, Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos y sus Rutas Anapleróticas, Fosforilación Oxidativa, Ruta de los Fosfatos de Pentosa) y las ecuaciones estequiométricas para la biomasa y el producto. Los metabolitos intermediarios que aparecen en una ruta lineal se agruparon reduciéndose significativamente la dimensión de la red sin comprometer el procedimiento de la estimación de los flujos metabólicos (3). La matriz obtenida tiene una dimensión de 50 x 46 con rango igual a 46 y un CN = 94. Para describir la síntesis de biomasa (células CHO) y del producto (EPO-hr) se consideró el consumo de los metabolitos del metabolismo central del carbono, así como las composiciones específicas de aminoácidos y de las macromoléculas principales de una célula (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos

nucleicos). Las ecuaciones que describen las síntesis de biomasa y el producto obtenidas en este trabajo son:

$0,067 R5P + 11,080 ATP + 0,229 GLN + 0,203 GLY + 0,205 ASP + 0,077 NAD^+ + 0,067 N^{10-} \text{ Formil- THF} + 0,067 HCO_3^- + 0,008 N^5, N^{10-} \text{ Metilén- THF} + 0,175 ALA + 0,110 ARG + 0,083 ASN + 0,032 CYS + 0,040 HIS + 0,093 ILE + 0,168 LEU + 0,160 LYS + 0,033 MET + 0,066 PHE + 0,093 PRO + 0,126 SER + 0,112 THR + 0,013 TRP + 0,051 TYR + 0,119 VAL + 1,485 AcCoA + 1,875 H^+ + 2,451 NADPH + 0,501 O_2 + 0,105 G6P + 0,006 GTP + 0,045 GAP + 0,045 COL + 0,030 CTP + 0,031 H_2O + 0,008 GLU = \text{BIOMASA} + 2,654 ADP + 3,196 P_i + 0,422 CO_2 + 0,008 DHF + 0,067 THF + 0,053 FUM + 0,002 NADH + 1,485 CoA + 1,891 NADP^+ + 0,171 AMP + 0,020 GDP + 0,045 CMP$

$0,045 ALA + 0,029 ARG + 0,014 ASN + 0,014 ASP + 0,010 CYS + 0,088 GLN + 0,021 GLY + 0,005 HIS + 0,012 ILE + 0,055 LEU + 0,019 LYS + 0,002 MET + 0,010 PHE + 0,019 PRO + 0,024 SER + 0,026 THR + 0,007 TRP + 0,010 TYR + 0,026 VAL + 0,143 F6P + 0,052 G6P + 0,071 AcCoA + 0,124 UTP + 0,026 H_2O + 0,071 GTP + 1,480 ATP + 0,026 PEP + 0,026 CTP = \text{EPO} + 0,030 ADP + 0,452 P_i + 0,043 MAN + 0,021 GLC + 0,116 UDP + 0,071 GDP + 0,026 CMP + 0,007 UMP + 0,071 CoA + 0,043 GLU$

Los resultados obtenidos con el modelo haciendo uso de los datos experimentales reportados por (4) fueron valores de coeficientes de respiración (RQ) cercanos a 1.1 (1) y razones de O₂/ATP muy cercanas a 0.17 en todos los casos estudiados. Estos resultados apoyan la fiabilidad de la red bioquímica propuesta.

Conclusiones. El modelo matemático obtenido es una matriz bien condicionada y tiene solución mediante el Método de los Mínimos Cuadrados, contiene además las ecuaciones específicas para describir la síntesis de biomasa y de la molécula de Eritropoyetina humana. Mediante la aplicación de la técnica MFA se obtuvieron valores de parámetros que caracterizan el metabolismo celular.

Agradecimiento. Agradecemos la colaboración de la Dirección Técnica del Centro de Inmunología Molecular.

Bibliografía.

1. Bonarius, H, Hatzimanikatis, V. (1996). Metabolic Flux Analysis of Hybridoma Cells in Different Culture Media Using Mass Balances. *Biotechnol and Bioeng.* vol (50):299-318.
2. Shimizu, H. (2002). Metabolic engineering - Integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J. Biosc Bioeng.* vol (94):563-573.
3. Stephanopoulos, G, Aristidou, A. (1998). Metabolic Flux analysis. En: *Metabolic engineering: Principles and Methodologies.* Academic Press, USA. 313-341.
4. Altamirano, C, Illanes, A. (2001). Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnol Prog.* vol (17):1032-1041.