

# HEURÍSTICA Y SIMULACIÓN COMPUTACIONAL PARA EL DISEÑO DE UN SISTEMA DE CULTIVO CELULAR

## HEURISTIC AND COMPUTATIONAL SIMULATION FOR THE DESIGN OF A CELL CULTURE SYSTEM

Héctor Eduardo Sánchez Vargas<sup>1</sup>  Rosario Adriana Polo Salazar<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Cuba

<sup>2</sup>Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo, Huaraz, Ancash, Perú

### Correspondencia:

Dr. C. Héctor Eduardo Sánchez Vargas  
[hector.sanchez@reduc.edu.cu](mailto:hector.sanchez@reduc.edu.cu)

### Como citar este artículo:

Sánchez, H., & Polo, R. (2023). Heurística y simulación computacional para el diseño de un sistema de cultivo celular. *Hatun Yachay Wasi*, 2 (2), 20–39. <https://doi.org/10.57107/hyw.v2i2.44>

### RESUMEN

Un sistema fermentativo en etapa de desarrollo tecnológico va dirigido a la producción del ingrediente farmacéuticamente activo (IFA) de una vacuna contra la Peste Porcina Clásica empleando la línea celular HEK293. El objetivo fue proponer una estrategia de optimización aplicada al diseño del sistema de cultivo celular empleando la heurística sobre la base de la analogía entre el sistema experimental real y la simulación computacional. Para realizar las simulaciones del proceso se seleccionó el modelo cinético (Kontoravdi et al., 2007). Se mostró que los sistemas de fermentación reales han sido operados en condiciones muy alejadas de las óptimas y que el comportamiento de estos responde al errado régimen de alimentación al biorreactor que provoca la acumulación de productos tóxicos del metabolismo y el apagado del biorreactor. A partir de estos resultados se propone una estrategia de optimización que tiene en cuenta las características específicas del sistema de cultivo celular, la complejidad del modelo cinético seleccionado y que aprovecha las prestaciones del software MATLAB.

**Palabras clave:** estrategia heurística, analogía, simulación computacional, modelo cinético, cultivo celular

### ABSTRACT

A fermentative system in the technological development stage is aimed at the production of the pharmaceutically active ingredient (API) of a vaccine against Classical Swine Fever using the HEK293 cell line. The objective was to propose an optimization strategy applied to the design of the cell culture system using heuristics based on the analogy between the real experimental system and the computational simulation. To carry out the simulations of the process, the kinetic model was selected (Kontoravdi et al., 2007). It was shown that the real fermentation systems have been operated in far from optimal conditions and that their behavior responds to the wrong feeding regimen to the bioreactor that causes the accumulation of toxic metabolism products and the shutdown of the bioreactor. Based on



these results, an optimization strategy is proposed that considers the specific characteristics of the cell culture system, the complexity of the selected kinetic model and that takes advantage of the MATLAB software features.

**Key words:** heuristic strategy, analogy, computer simulation, kinetic model, cell culture

## INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo es una de las fuentes de proteínas con mayor demanda y crecimiento a nivel mundial, solamente superada por la carne de aves de corral (OECD/FAO, 2021). Esta ha sido durante muchos años la fuente de proteínas fundamental en Cuba, país que ha dedicado enormes esfuerzos para el desarrollo de la ganadería porcina.

La cría del ganado porcino tiene como uno de sus problemas principales la incidencia de la Peste Porcina Clásica (PPC) o Cólera Porcino, que es una de las enfermedades virales que afecta esta especie, tanto en condiciones domésticas como salvajes. Se caracteriza por lesiones de carácter hemorrágico y de curso generalmente fatal en las formas agudas (Dunn & Burghes, 1983).

La PPC es capaz de expresar todo su potencial negativo para la economía de la producción porcina y tener un impacto social y hasta político de gran envergadura (Gómez *et al.*, 2006).

La estrategia para la obtención de nuevas vacunas para combatir el virus de la PPC se basa en la identificación de la proteína o proteínas del agente infeccioso que sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora de forma semejante a la que induciría el agente infeccioso completo (Frías & Percedo, 2003). En este sentido se ha identificado que las glicoproteínas E1 y E2, que forman parte de la envoltura del virus y están relacionadas con la adhesión y penetración de éste en las células del hospedero (Li *et al.*, 2011), tienen esa capacidad de respuesta inmune. Varios autores coinciden en que la glicoproteína E2 es el antígeno de mayor capacidad para inducir la formación de anticuerpos

neutralizantes y conferir protección a los cerdos (Chen & Tong, 2010).

Aunque históricamente se han empleado varios sistemas de expresión para la síntesis de esta proteína, actualmente se prefiere su obtención a partir del cultivo de células de mamíferos (CCM), ampliamente usado en el mundo para la producción de proteínas complejas y anticuerpos monoclonales (García, 2002). El empleo de sistemas de CCM en suspensión en biorreactores de tanque agitado ha permitido la producción de proteínas de alto valor a gran escala, con una disminución significativa de los costos con respecto a otras tecnologías (Scott, 2004).

Aunque existen diversas formas de emplear los biorreactores de tanque agitado, los sistemas más comunes son los de operación semicontinua y los continuos con reciclaje celular (perfusión), siendo esta última con la que se puede alcanzar la mayor densidad celular y productividad (Fenge & Lüllau, 2006; Komolpis, Udomchokmongkol, Phutong, & Palaga, 2010; Sbarciog, Coutinho, & Vande Wouwer, 2014). A pesar de las ventajas del sistema continuo con perfusión, se reconoce que su operación aún no está lo suficientemente estudiada y que resulta ser compleja. Se requiere un control riguroso para evitar la limitación de nutrientes, la acumulación de metabolitos inhibidores, el retraso en el crecimiento celular y el lavado del biorreactor, razones que dificultan la estabilidad del sistema fermentativo (Lohmeier *et al.*, 2013; Sbarciog *et al.*, 2014).

Para sortear las reconocidas complejidades durante el diseño de los sistemas de CCM se utilizan cada

vez más las estrategias de investigación basadas en la modelación matemática y la simulación de procesos (Baughman et al., 2011; Gernaey & Gani, 2010; Weber et al., 2006). Estas estrategias basadas en modelos ofrecen importantes ventajas respecto a las estrategias empíricas y brindan la posibilidad de una mejor comprensión del proceso, complementando el conocimiento ya disponible con nuevos datos y reduciendo el tiempo y el costo del desarrollo tecnológico.

La estrategia de modelación matemática de procesos permite resolver problemas de diseño acudiendo a los métodos de optimización con auxilio de la simulación computacional (Nfor et al., 2009; Zadeh, 2011), pero la naturaleza compleja de este tipo de sistema de cultivo y la carencia de modelos matemáticos robustos y ajustados atentan contra la calidad y efectividad del diseño.

Aunque no es común el empleo de la heurística en el diseño de sistemas de cultivo, esta estrategia suele usarse como herramienta para enfrentar problemas complicados que no cuentan con un procedimiento algorítmico de solución (Cocinero, 2015). La heurística es usada en la ingeniería como un método basado en la experiencia, que puede utilizarse para resolver problemas de diseño, desde calcular los recursos necesarios de un proceso hasta determinar las condiciones de operación de los sistemas.

Esta investigación se ha desarrollado tomando como objeto de estudio el proceso productivo de la glicoproteína E2, fusionada a un determinante antigénico que mejora la respuesta inmunológica celular. Para la obtención del IFA de la vacuna en este proceso se emplea la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano).

El proceso fermentativo bajo estudio se realiza en un biorreactor de tanque agitado en operación continua con perfusión (BCTAP). En el momento

del estudio, este sistema productivo se encontraba en una etapa inicial de desarrollo tecnológico y se alcanzaban bajos rendimientos productivos con alta inestabilidad operacional. Atendiendo a la situación descrita, en este trabajo se persigue el objetivo de proponer una estrategia de optimización aplicada al diseño del sistema de cultivo celular empleando la heurística y la simulación computacional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el desarrollo del proceso fermentativo tienen lugar dos etapas fundamentales. En una primera etapa se desarrollan de manera consecutiva, la descongelación del vial del banco celular, la expansión celular y la preparación del inóculo. En una segunda etapa se desarrolla la fermentación en el biorreactor.

La descongelación del vial se realiza rápidamente a 37 °C, juntamente con la eliminación de los restos de crioprotector (dimetilsulfóxido). Las células se suspenden añadiendo medio fresco y se cultivan consecutivamente en frascos de 25, 50, 75 y 175 mL hasta alcanzar una densidad de  $3 \times 10^5$  células/mL. La incubación en los frascos se realiza también a una temperatura de 37 °C en estado estático.

La expansión celular continúa con el trasvasado de los frascos de 175 mL a frascos de tipo *roller* de 2 L de capacidad con 500 mL de cultivo, a los que se le añade medio fresco y se incrementa el volumen de cultivo hasta lograr seis frascos *rollers* a una concentración de  $1,2 \times 10^6$  células/mL. Cada frasco o *roller* es muestreado para control cada dos días y en el momento de preparar el inóculo. En el control se le realizan conteos de células en una cámara de Neubauer, determinando su concentración y viabilidad. También se verifica la ausencia de contaminantes, y en el momento de preparar el inóculo, se seleccionan los frascos que se emplearán para dicho fin, que deben sumar una cantidad de cuatro frascos.

El contenido de los cuatro frascos *roller* seleccionados, cuyo volumen es de 2 L, se mezcla en un sifón en una cabina de flujo laminar para garantizar la esterilidad del inóculo. El sifón preparado se traslada hacia el local de fermentación para proceder a la inoculación del biorreactor.

Previa a la etapa de fermentación tiene lugar la preparación del medio de cultivo y su esterilización. Esta última se realiza por filtración con una micro membrana cuyo tamaño de poro oscila entre 0,45 y 0,1  $\mu\text{m}$ . El filtrado se almacena en una bolsa estéril hasta su liberación para ser usada en la fermentación.

Para cumplir el objetivo propuesto en esta investigación se aplicó una estrategia heurística. Este tipo de estrategia, aunque es comúnmente usada en los procesos de investigación y desarrollo (Figueiredo & Loiola, 2017; González, 1991), no se cuenta con abundante bibliografía sobre su uso en el diseño de cultivos celulares.

Una de las técnicas empleadas dentro de las estrategias heurísticas incluye el uso de problemas análogos que ya hayan sido resueltos. Para su aplicación se procesaron los datos obtenidos de dos fermentaciones realizadas en la instalación objeto de estudio y se realizó una caracterización de la operación y de los resultados alcanzados en dichas fermentaciones. Posteriormente se estudió un grupo de los modelos más representativos de este tipo de sistemas reportados en la literatura especializada y se seleccionó uno de ellos, para realizar simulaciones exploratorias en condiciones análogas a las del sistema real.

Las analogías identificadas entre el proceso estudiado y los procesos que representan las simulaciones realizadas permitieron establecer criterios de comparación y manejar posibles correcciones de las variables fundamentales del proceso. En este sentido, la simulación computacional y el empleo

de la analogía estuvieron dirigidas a comprobar si las condiciones de velocidad de dilución, así como las concentraciones de glucosa y de glutamina en la corriente de alimentación al biorreactor, que se usan en el proceso estudiado, están alejadas o no de las condiciones de máxima productividad. Este análisis permitió trazar una estrategia para la optimización computacional.

Los modelos no estructurados-no segregados, tales como el de Monod y el de Andrews, entre otros, han tenido gran utilidad práctica y aún se continúan utilizando en CCM; pues la mayoría de los productos de tercera generación y de las tecnologías de fermentación continua han sido desarrollados con este tipo de modelos (Jang & Barford, 2000; Ozturk, 2006; Papathanasiou et al., 2016); sin embargo, presentan serias limitaciones, ya que no son capaces de describir las dinámicas inducidas por cambios metabólicos como consecuencia de las regulaciones intracelulares que tienen lugar en una célula de mamífero (Teixeira et al., 2005), y por lo tanto, no son capaces de explicar la dinámica de este tipo de sistema.

Debido a las referidas limitaciones de los modelos no estructurados, se han tenido que desarrollar modelos estructurados más complejos, que tienen en cuenta la estructura celular y que permiten describir las dinámicas de los CCM. Estos modelos cinéticos son cada vez más empleados para describir el comportamiento del metabolismo celular y pueden ser usados como herramienta para la optimización de bioprocesos (Almquist et al., 2014; Ghorbaniaghdam, 2013; Kiparissides et al., 2011; Robitaille et al., 2015; Wang et al., 2009).

### **Selección del modelo cinético y simulación**

Uno de los modelos más utilizados actualmente, es un modelo híbrido desarrollado por un grupo de especialistas del departamento de ingeniería química del Colegio Imperial de Londres (Kontoravdi, 2006; Kontoravdi et al., 2007), que se nutre de

otros modelos para describir diferentes procesos cinéticos.

Para el crecimiento y la muerte celular; así como, para el metabolismo, se basa en el modelo no estructurado de Jang & Barford, (2000). Para la síntesis y la secreción de la proteína se basa en el modelo estructurado de Bibila & Flickinge, (1992) y para el proceso de glicosilación en el de Umaña & Bailey, (1997). Este modelo ha sido utilizado exitosamente en diferentes sistemas de expresión (Ho et al., 2012; Kiparissides et al., 2011; Kontoravdi et al., 2010).

En la Tabla 1 se muestran las ecuaciones del modelo cinético de Kontoravdi seleccionado para las simulaciones exploratorias. Estas ecuaciones representan las velocidades de cada uno de los procesos celulares relacionados con el crecimiento y el metabolismo celular, así como con la síntesis de la proteína de interés. Las ecuaciones del modelo cinético son empleadas en los balances de masa en el biorreactor que opera en modo perfusión.

En la Tabla 2 se presentan las ecuaciones de los balances de masa por componentes en el BCTAP, que incluyen la cinética en términos de formación y consumo de dichos componentes, constituidos estos por células (viables, muertas y totales), glucosa, glutamina, lactato, amonio y la proteína de interés, mientras que en la Tabla 3 se muestran los balances de masa de los principales componentes intracelulares según el modelo de Kontoravdi.

Estos balances de masa por componentes constituyen el modelo matemático del biorreactor, que será utilizado en las simulaciones exploratorias y en el análisis comparativo por analogía, para el posterior establecimiento de la estrategia de optimización aplicada al diseño del sistema de cultivo. El modelo está constituido por un sistema de 16 ecuaciones diferenciales ordinarias que tienen como variables respuestas los componentes

intracelulares y extracelulares del sistema de cultivo. Este sistema de ecuaciones diferenciales fue resuelto empleando una combinación del método de Runge-Kutta con un método trapezoidal, implícito en la función `ode23tb` del software MATLAB (The MathWorks Inc., 2020). Las simulaciones también fueron realizadas empleando la herramienta SimBiology del propio software MATLAB.

TABLA 1

Modelo cinético de Kontoravdi (2007)

**Ecuaciones asociadas al crecimiento celular**

Velocidad neta de crecimiento de células viables	$r_X = r_{X_v} - r_{X_d}$
Velocidad de crecimiento de células viables	$r_{X_v} = \mu X_v$
Velocidad específica de crecimiento celular	$\mu = \mu_{max} \left( \frac{Glc}{K_{Glc} + Glc} \right) \left( \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \right) \left( \frac{KI_{Amn}}{KI_{Amn} + Amm} \right) \left( \frac{KI_{Lac}}{KI_{Lac} + Lac} \right)$
Velocidad de muerte celular	$r_{X_d} = \mu_d X_v - K_{Lys} X_d$
Velocidad específica de muerte celular	$\mu_d = \frac{\mu_{dmax}}{\left( 1 + \left( \frac{Kd_{Amn}}{Amn} \right)^n \right)}$
Velocidad de crecimiento de células totales	$r_{X_t} = r_{X_v} - K_{Lys} (X_t - X_v)$

**Ecuaciones asociadas al metabolismo celular**

Velocidad total de consumo de glucosa	$r_{Glc} = r_{Glc/X} + r_{Glc/M}$
Velocidad total de consumo de glutamina	$r_{Gln} = r_{Gln/X} + r_{Gln/M} + r_{Gln/D}$
Velocidad de consumo de glucosa para la síntesis de biomasa	$r_{Glc/X} = \frac{1}{Y_{X/Glc}} r_{X_v}$
Velocidad de consumo de glutamina para la síntesis de biomasa	$r_{Gln/X} = \frac{1}{Y_{X/Gln}} r_{X_v}$
Velocidad de consumo de glucosa para el mantenimiento celular	$r_{Glc/M} = m_{Glc} X_v$
Velocidad de consumo de glutamina para el mantenimiento celular	$r_{Gln/M} = m_{Gln} X_v$
Velocidad específica de consumo de glutamina para el mantenimiento celular	$m_{Gln} = \frac{a_1 Gln}{a_2 + Gln}$
Velocidad de producción de amonio	$r_{Amn} = Y_{Amn/Gln} (r_{Gln/X} + r_{Gln/M}) + r_{Gln/D}$
Velocidad de producción de lactato	$r_{Lac} = Y_{Lac/Glc} r_{Glc}$
Velocidad de degradación de la glutamina	$r_{Gln/D} = k_{dGln} Gln$

**Ecuaciones asociadas a la síntesis de proteína**

Velocidad de producción intracelular de ARNm de cadena pesada	$r_{mH} = N_H S_H + K m_H$
Velocidad de producción intracelular de ARNm de cadena ligera	$r_{mL} = N_L S_L + K m_L$
Velocidad de producción de aminoácidos de cadena libre pesada en el retículo endoplasmático	$r_{[H]} = T_H m_H - R_H$
Velocidad de producción de aminoácidos de cadena libre ligera en el retículo endoplasmático	$r_{[L]} = T_L m_L - R_L$

Velocidad de consumo de cadena pesada en el ensamblaje	$R_H = 2K_A[H_2][L] + K_A[H_2L][L]$
Velocidad de consumo de cadena ligera en el ensamblaje	$R_L = \frac{3 R_H}{2 K_A[H]^2}$
Velocidad de ensamble de intermediarios en el retículo endoplasmático	$r[H_2] = \frac{1}{3}K_A[H]^2 - 2K_A[H_2][L]$
Velocidad de ensamble de intermediarios en el retículo endoplasmático	$r[H_2L] = 2K_A[H_2][L] - K_A[H_2L][L]$
Velocidad de producción de proteína en el retículo endoplasmático	$r[H_2L_2]_{ER} = K_A[H_2L][L] - K_{ER}[H_2L_2]_{ER}$
Velocidad de producción de proteína en el aparato de Golgi	$r[H_2L_2]_G = \varepsilon_1 K_{ER}[H_2L_2]_{ER} - K_G[H_2L_2]_G$
Velocidad específica de síntesis de proteína	$Q_{Prot} = \varepsilon_2 \lambda K_G[H_2L_2]_G$
Velocidad de síntesis de proteína	$r_{Prot} = (\gamma_1 - \gamma_2 \mu) Q_{Prot} X_v$

TABLA 2

*Ecuaciones del balance de masa por componentes en el biorreactor*

Componente o especie química	Ecuación del balance de masa
Células viables ( $X_v$ )	$\frac{d(X_v)}{dt} = r_{X_v} - r_{X_d} - D \cdot \varphi \cdot X_v$
Células muertas ( $X_d$ )	$\frac{d(X_d)}{dt} = r_{X_d} - D \cdot \varphi \cdot X_d$
Células totales ( $X_t$ )	$\frac{d(X_t)}{dt} = r_{X_t} - D \cdot \varphi \cdot X_t$
Glucosa (Glc)	$\frac{d(Glc)}{dt} = -r_{Glc} + D(Glc_f - Glc)$
Glutamina (Gln)	$\frac{d(Gln)}{dt} = -r_{Gln} + D(Gln_f - Gln)$
Amonio (Amn)	$\frac{d(Amn)}{dt} = r_{Amn} - D \cdot Amn$
Lactato (Lac)	$\frac{d(Lac)}{dt} = r_{Lac} - D \cdot Lac$
Proteína E2 ( $C_{Prot}$ )	$\frac{d(C_{Prot})}{dt} = r_{Prot} - D \cdot C_{Prot}$

TABLA 3

*Balances intracelulares según el modelo de Kontoravdi*

Componente intracelular	Ecuación
ARNm de cadena pesada	$\frac{d(mH)}{dt} = r_{mH}$
ARNm de cadena ligera	$\frac{d(mL)}{dt} = r_{mL}$
Aminoácidos de cadena libre pesada en el retículo endoplasmático	$\frac{d(H)}{dt} = r_H$
Aminoácidos de cadena libre ligera en el retículo endoplasmático	$\frac{d(L)}{dt} = r_L$
Intermediarios ensamblados en el retículo endoplasmático	$\frac{d(H_2)}{dt} = r_{H_2}$
Intermediarios ensamblados en el retículo endoplasmático	$\frac{d(H_2L)}{dt} = r_{H_2L}$
Proteína en el retículo endoplasmático	$\frac{d([H_2L_2]_{er})}{dt} = r_{[H_2L_2]_{er}}$
Proteína en el aparato de Golgi	$\frac{d([H_2L_2]_g)}{dt} = r_{[H_2L_2]_g}$

Aunque el medio de cultivo empleado en las fermentaciones contiene una gran cantidad de componentes entre aminoácidos, fuentes de carbono, sales minerales y otros, los únicos componentes del medio de cultivo que incluye el modelo cinético de Kontoravdi, (2007) son la glucosa y la glutamina. Estos son consumidos rápidamente por las células, y el metabolismo de ambos genera productos inhibidores del crecimiento y la síntesis de productos como el lactato y el amonio (Jang & Barford, 2000; Kwang & Lee, 2015; Ozturk, 2006).

Por esta razón, ellos determinan la cinética del proceso fermentativo y las concentraciones de ambos sustratos en la corriente de alimentación al biorreactor, por esta razón estas concentraciones de alimentación son comúnmente seleccionadas como variables de diseño (Dewasme et al., 2017; Jang & Barford, 2000; Kiparissides et al., 2011).

Se seleccionaron entonces como variables de diseño del sistema fermentativo la concentración de glucosa y de glutamina en el alimento ( $Glc_f$  y  $Gln_f$ , respectivamente). También se seleccionó como variable de diseño la velocidad de dilución ( $D$ ), que relaciona el volumen del fermentador con el caudal volumétrico. Esta es una variable que debe ser manipulada cuidadosamente y determina el suministro adecuado de los nutrientes al sistema de cultivo. Un bajo valor de esta variable no garantizaría los nutrientes para el desarrollo del cultivo y un valor muy alto trae consigo el llamado *Wash-out* o lavado del biorreactor.

### Fermentaciones experimentales

Las condiciones de operación del biorreactor para las dos fermentaciones experimentales fueron las siguientes: agitación, 150 rpm; temperatura,  $36,5 \pm 1$  °C; pH,  $7,3 \pm 0,5$ ; oxígeno disuelto  $30 \pm 10$  %; aireación, 0,04 – 0,1 vvm. Este equipo es de marca Sartorius Biostat B Plus, con un vaso de vidrio de 10 L de capacidad y un volumen efectivo de 8 L. Se estableció una eficiencia de reciclaje de células de

97 %, lo que equivale a una fracción no reciclada ( $\phi$ ) de 0,03.

En ambas fermentaciones la velocidad de dilución fue incrementada progresivamente partiendo de un valor de  $0,01 \text{ h}^{-1}$  al inicio de la fermentación en modo perfusión y hasta un máximo de  $0,048 \text{ h}^{-1}$ . Este incremento progresivo es realizado de manera manual por el operario del biorreactor y se justifica por la elevación de las demandas nutricionales del cultivo a medida que aumenta la concentración celular. La concentración de glucosa en la corriente de alimentación se fijó en 29, 5 mmol/L y la de glutamina en 4 mmol/L.

Durante en desarrollo de las dos fermentaciones experimentales se midieron a través del tiempo la concentración de células viables en el biorreactor ( $X_v$ ), empleando el método de conteo celular en cámara de Neubauer, y la concentración de la proteína de interés ( $C_{Prot}$ ), empleando la técnica de ELISA tipo *sandwich*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de las mediciones y las determinaciones realizadas durante el desarrollo de las fermentaciones experimentales, se presentan en la tabla 4 los valores de  $X_v$  y  $C_{Prot}$  a través del tiempo.

**TABLA 4***Comportamiento de D, Xv y C<sub>Prot</sub> en las fermentaciones experimentales*

Fermentación 1				Fermentación 2			
Tiempo (h)	D (h <sup>-1</sup> )	Xv (x10 <sup>6</sup> células/mL)	C <sub>Prot</sub> (mg/L)	Tiempo (h)	D (h <sup>-1</sup> )	Xv (x10 <sup>6</sup> células/mL)	C <sub>Prot</sub> (mg/L)
0	0,01	0,65	0	0	0,01	0,51	0
24	0,01	0,955	2,83	19	0,01	0,805	6,75
48	0,01	1,285	3,31	43	0,01	0,975	7,98
60	0,01	1,655	3,80	67	0,01	1,255	11,25
72	0,01	2,06	4,21	91	0,01	1,545	13,62
84	0,0127	2,485	6,21	115	0,01	1,54	17,95
96	0,0127	2,96	8,63	139	0,0165	1,81	17,71
108	0,0127	4,02	9,63	163	0,0165	2,415	19,6
120	0,0127	3,71	10,38	187	0,0165	4,44	25,84
132	0,0123	3,06	11,18	211	0,0247	7,36	29,35
144	0,0173	2,76	11,24	235	0,0247	7,56	26,57
156	0,01	2,39	10,38	259	0,028	7,97	44,99
168	0,01	1,92	8,16	283	0,028	13,0	65,91
180	0,01	1,81	7,35	307	0,028	18,03	87,01
192	0,01	1,03	6,76	331	0,0380	36,28	111,75
				355	0,0429	38,08	136,17
				379	0,0479	46,48	186,34
				403	0,0479	17,44	97,31
				410	0,0479	26,64	105,23
				427	0,0479	29,36	130,20

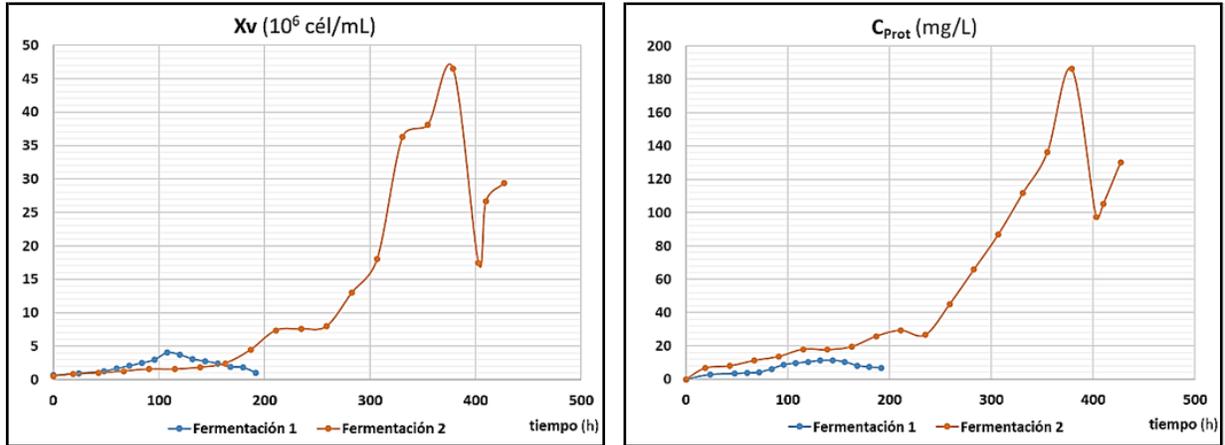
Como se puede observar en la propia Tabla 4, la fermentación 2 ha sido más duradera que la fermentación 1, sobrepasando las 427 h, algo deseable en las fermentaciones continuas cuando se aspiran a altos niveles productivos. También han sido superiores la concentración celular y la concentración de proteínas alcanzadas, sobrepasando los 46 millones de células/mL de cultivo la primera y siendo superiores a 186 mg/L en el caso de la concentración de proteína. Se observa que en la primera fermentación este último valor

no sobrepasa los 12 mg/L.

Ante la diferencia tan marcada entre las fermentaciones 1 y 2, se impone indagar sobre las causas que la provoca y sobre los cambios que pudieran evaluarse para lograr mejoras sustanciales en el proceso. Sobre la búsqueda de las causas de la diferencia de comportamiento, la formulación de hipótesis y la comprobación de dichas causas se sustenta la aplicación de la estrategia heurística de la analogía en este caso de estudio.

**FIGURA 1**

Comportamiento de la concentración de células viables y de proteína E2 para ambas fermentaciones experimentales



En la Figura 2 se puede observar mejor la gran diferencia entre ambas fermentaciones en cuanto al crecimiento celular y concentración de la proteína de interés E2.

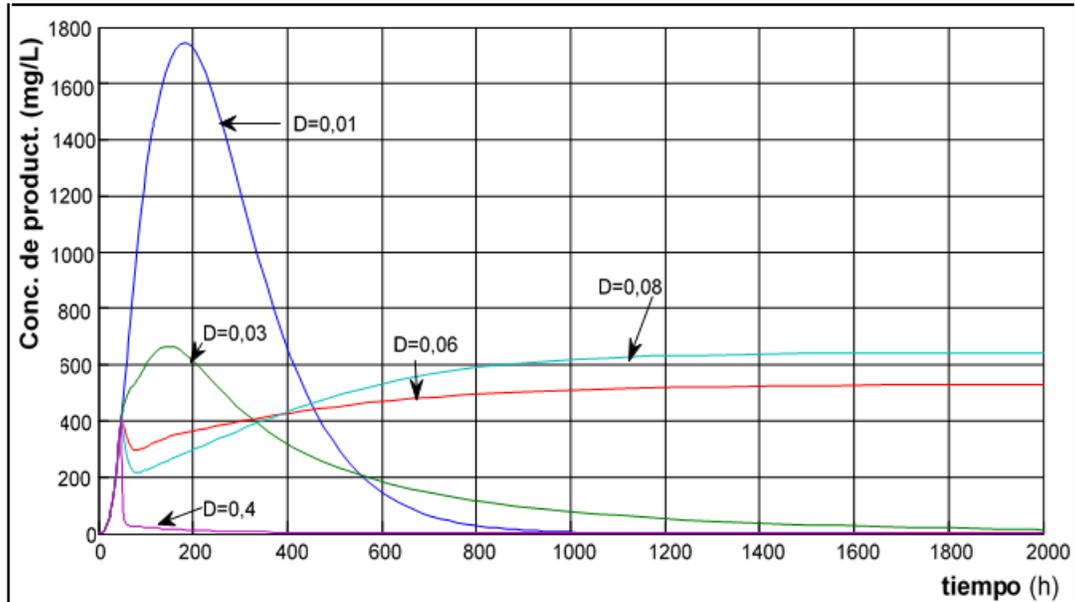
En la búsqueda de las diferencias entre las dos fermentaciones experimentales desde el punto de vista operacional, se observa que en la primera fermentación la velocidad de dilución ( $D$ ) es manipulada desde un valor inicial de  $0,01 \text{ h}^{-1}$  hasta un máximo de solamente de  $0,0173 \text{ h}^{-1}$ , reduciéndose posteriormente hasta el mismo valor inicial. Sin embargo, en la segunda fermentación el valor máximo de  $D$  es 2,76 veces superior que el valor máximo de  $D$  empleado en la primera fermentación. Bajo esta observación se llegó a la hipótesis de que en la primera fermentación los valores de  $D$  estaban muy alejados de los óptimos e incluso alejados también de valores aceptables para fermentaciones de rendimiento promedio. Para probar la referida hipótesis se recurrió a la estrategia heurística de la analogía a partir de simulaciones para un sistema análogo al experimental, en este caso, el empleado por Kontoravdi (2007).

Las simulaciones se realizaron empleando valores de  $D$  en un rango entre  $0,01$  y  $0,4 \text{ h}^{-1}$  para un BCTAP. Además, en esta figura 2 se presenta el resultado de dichas simulaciones. Se puede observar que para valores de  $D$  cercanos a  $0,01 \text{ h}^{-1}$  la concentración del producto sigue una trayectoria acampanada similar al comportamiento de la fermentación 1.

Este comportamiento conlleva a la caída casi total de la concentración en 800 h y se debe a la carencia de suficientes nutrientes por el bajo caudal de alimentación y a la elevación de la concentración de productos tóxicos del metabolismo tales como el lactato y el amonio, algo típico de las operaciones discontinuas a la cual tiene una operación continua a bajos valores de  $D$ .

FIGURA 2

Comportamiento del sistema con las variaciones de la velocidad de dilución



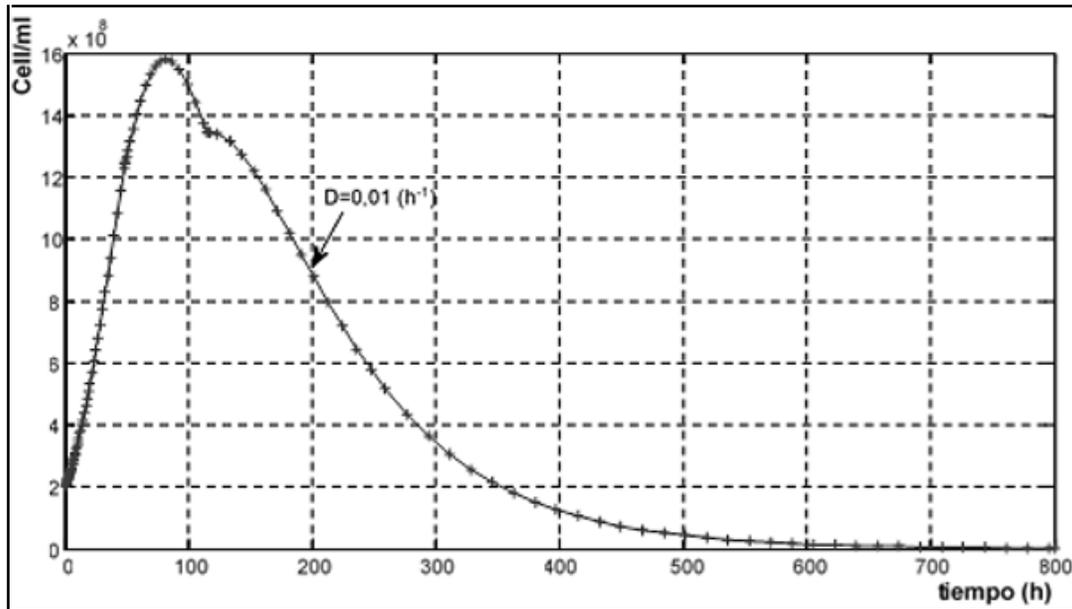
La operación a valores de  $D$  cercanos a  $0,4 \text{ h}^{-1}$  trae consigo el apagado del reactor por lavado, con el arrastre de células y productos fuera de los límites del biorreactor. En este sistema de Kontoravdi, a valores de  $D$  entre  $0,06$  y  $0,08 \text{ h}^{-1}$  se puede alcanzar un estado estacionario, en el que la concentración de productos y la del resto de los componentes del sistema permanecen constantes con el tiempo a la salida del biorreactor.

Al observar la Tabla 4 y la Figura 2, se puede constatar que existe una correspondencia entre el comportamiento de la fermentación 1, que se opera a valores de  $D$  cercanos a  $0,01 \text{ h}^{-1}$  y el comportamiento obtenido por simulación al mismo valor de  $D$ . La analogía entre el sistema experimental real y el simulado permite comprobar la hipótesis planteada y afirmar que los valores de  $D$  empleados en la fermentación 1 están muy alejados de los óptimos y en un intervalo en el que irremediablemente ocurrirá el apagado del biorreactor por la reducción en la concentración celular, (Fig. 3).

Aunque el régimen de alimentación de la fermentación 2 también se considera alejado de las condiciones de  $D$  óptimas, el comportamiento de esta fermentación experimental es más favorable. El empleo de valores de  $D$  cercanos a  $0,048 \text{ h}^{-1}$  indica con evidencias que un incremento del valor de  $D$  en ese intervalo mejora la estabilidad y productividad del sistema de cultivo en el BCTAP.

**FIGURA 3**

*Comportamiento de la concentración de células viables del sistema de Kontoravdi para una velocidad de dilución de 0,01 h<sup>-1</sup>*



La disminución de la concentración celular (Fig. 3) provoca una reducción en la síntesis de proteína y de su concentración en el biorreactor, tal como se muestra en la Figura 2 para un valor de  $D$  de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ . Aunque la baja velocidad de dilución que se emplea no garantiza los requerimientos nutricionales del sistema de cultivo en desarrollo, el comportamiento observado hasta el definitivo apagado del biorreactor es el resultado del incremento de la concentración de lactato y amonio en el biorreactor, reconocidos inhibidores del crecimiento celular que pueden llegar a ser letales a la células (Gagnon et al., 2011; Liu et al., 2008). En el caso del amonio esta letalidad se manifiesta por encima de los  $5 \text{ mmol/L}$  en CCM (Liu et al., 2008).

En la Figura 4 se presenta la dinámica de lactato y amonio para el sistema de Kontoravdi a una  $D$  de  $0,02 \text{ h}^{-1}$ .

A pesar de la gran importancia de la selección correcta de  $D$ , la estabilidad y alta productividad del sistema fermentativo se logra con el efecto combinado de esta variable y otras de alta importancia como las concentraciones de alimentación de glucosa y glutamina, empleadas también como variables de diseño.

En la Figura 5 se muestra el resultado de un análisis de sensibilidad por simulación efectuado sobre la concentración de proteína respecto a la Glcf. Se empleó un intervalo de Glcf desde la usada en el sistema experimental de  $29,5 \text{ mmol/L}$  hasta el valor empleado por Kontoravdi de  $500 \text{ mmol/L}$ .

FIGURA 4

Dinámica de lactato y amonio en el sistema de Kontoravdi para  $D=0,02 \text{ h}^{-1}$

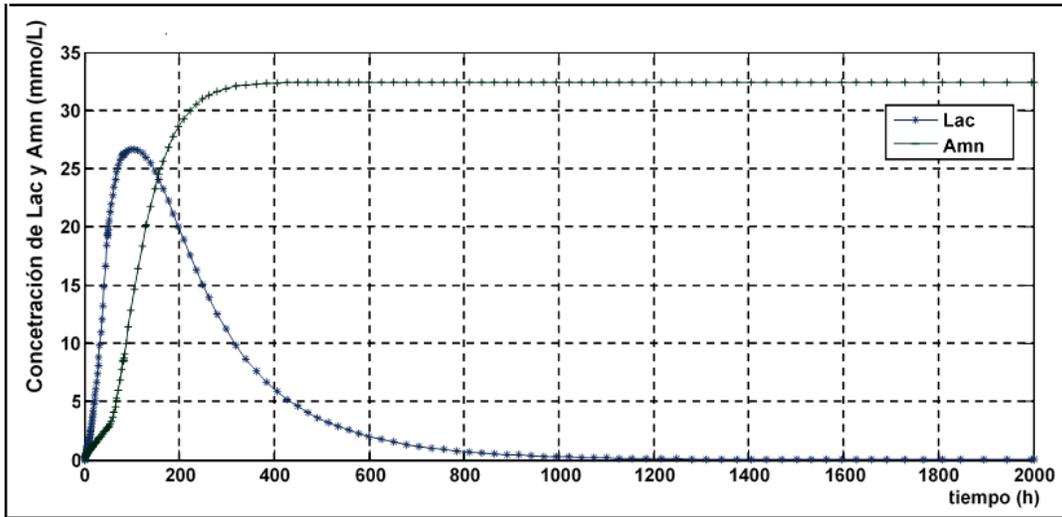
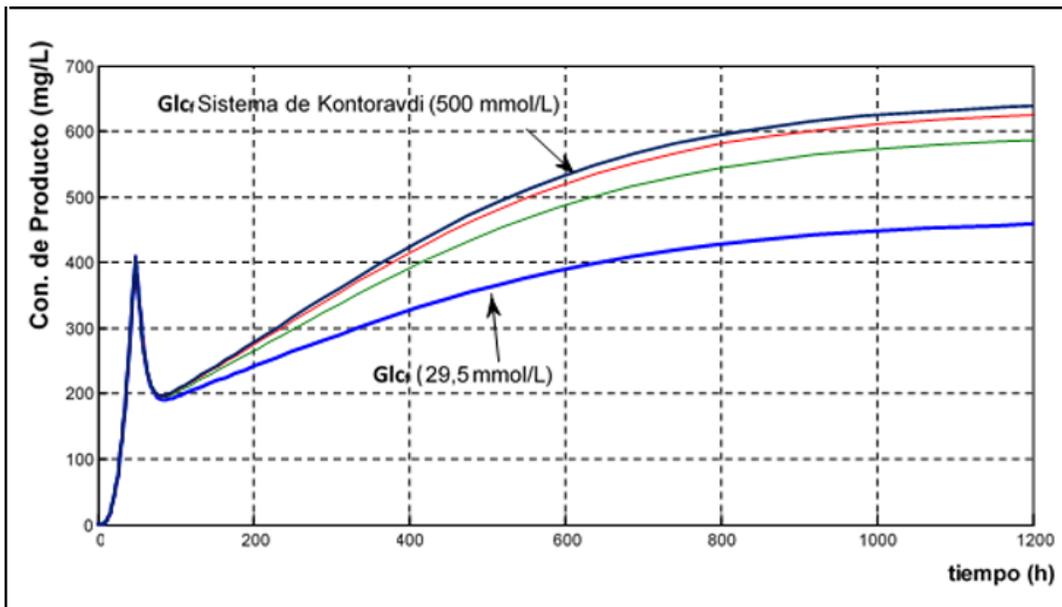


FIGURA 5

Resultados del análisis de sensibilidad respecto a  $Glc_r$



Como se puede observar en la Figura 5, la concentración  $Glc_f$  empleada por Kontoravdi ofrece mejores resultados en cuanto a la concentración de producto que los que se obtendrían para ese mismo sistema si se empleara la  $Glc_f$  que se usó en el sistema experimental. Esto también es un indicio de que esa variable pudiera estar también muy alejada de las condiciones óptimas.

Debido a la interrelación de los factores que determinan la estabilidad y productividad del sistema de cultivo, la optimización de las variables de diseño ( $D$ ,  $Glc_f$ ,  $Gln_f$ ) no se lograría con la formulación de un problema de optimización que no tenga en cuenta estas tres variables. Debe entonces concebirse una estrategia de optimización que se base en los resultados del análisis realizado en este trabajo.

### Estrategia de optimización

Después de las simulaciones realizadas con el modelo cinético seleccionado y bajo las condiciones de operación reales del proceso fermentativo en la producción del IFA de la vacuna contra la PPC, se tienen indicios de que el modelo cinético propuesto por Kontoravdi describe el comportamiento de la línea celular HEK293 bajo las condiciones del proceso actual.

Esta afirmación debe ser confirmada con el ajuste del modelo a datos reales del sistema experimental. Este proceso de ajuste puede formar parte de una estrategia concebida para la optimización del proceso fermentativo, la cual se propone con la siguiente secuencia de pasos:

1. Diseñar un experimento dinámico en tres niveles de los factores  $D$ ,  $Glc_f$  y  $Gln_f$  sobre un biorreactor continuo a pequeña escala. Se proponen como nivel mínimo y máximo los empleados en la fermentación 1 y los empleados por Kontoravdi respectivamente.

2. Ejecutar el experimento diseñado y medir al menos cada dos horas las variables respuestas  $X_v$ ,  $X_v$ ,  $X_v$ ,  $Glc$ ,  $Gln$ ,  $Amn$ ,  $Lac$  y .
3. Realizar un análisis de sensibilidad de los parámetros del modelo de Kontoravdi, empleando la herramienta *SimBiology* del software MATLAB. Con este análisis se podrán seleccionar los parámetros más significativos con el fin de simplificar el ajuste del modelo.
4. Estimar los parámetros significativos del modelo a partir de su ajuste a los datos experimentales.
5. Repetir la ejecución del diseño experimental y obtener nuevos datos a otros niveles de los factores y con estos validar el modelo.
6. Formular el problema de optimización definiendo la función objetivo y las restricciones. La variable respuesta de la función objetivo a optimizar se selecciona según los intereses o política de la empresa y puede ser, entre otras, la productividad, el costo o la ganancia. Las restricciones están definidas por los límites inferior y superior de las variables independientes ( $D$ ,  $Glc_f$  y  $Gln_f$ ).
7. Resolver el problema de optimización y con esto determinar el valor de las variables independientes para la mejor respuesta. Debido a que el modelo a resolver tiene carácter multimodal se debe emplear una estrategia de optimización global. Pudiera emplearse la función *pattern search* de MATLAB o las estrategias de optimización *Global Search* o *MultiStart* del propio software

### CONCLUSIONES

El empleo de la estrategia heurística de la analogía, conjugado con la simulación computacional, ha permitido caracterizar el sistema de cultivo celular y determinar las causas de las manifestaciones

negativas que se presentan en las condiciones de operación, para las dos fermentaciones experimentales.

Las simulaciones realizadas empleando el modelo ajustado al sistema análogo de Kontoravdi han mostrado que las velocidades de dilución empleadas en ambas fermentaciones están significativamente alejadas de las condiciones óptimas y han contribuido a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, como el lactato y el amonio, trayendo consigo el apagado del biorreactor.

El desempeño operacional del biorreactor usado en la síntesis de la proteína E2 puede ser optimizado manipulando las variables  $D$ ,  $Glc_f$  y  $Gln_f$ . La estrategia de optimización propuesta se ha concebido teniendo en cuenta los resultados de esta investigación, las características específicas del sistema de cultivo celular, la complejidad del modelo cinético seleccionado y aprovechando las prestaciones del software MATLAB.

El rediseño del proceso a partir de los resultados de la optimización desarrollada con la estrategia propuesta permitirá mayor duración y estabilidad de los ciclos fermentativos, la elevación de la productividad y el incremento de los niveles productivos de la vacuna contra la PPC.

## Nomenclatura

Glc	Concentración de glucosa	$N_H$	Número de copias de genes por células de cadena pesada
Gln	Concentración de glutamina	$N_L$	Número de copias de genes por células de cadena ligera
Lac	Concentración de lactato	$S_H$	Velocidad específica de transcripción de genes de cadena pesada
Amn	Concentración de amonio	$S_L$	Velocidad específica de transcripción de genes de cadena ligera
$K_{Glc}$	Constante de Monod para la glucosa	$K$	Velocidad de descomposición de ARNm de cadena ligera y pesada
$K_{Gln}$	Constante de Monod para la glutamina	$mH$	Concentración intracelular de ARNm de cadena pesada
$KI_{Amn}$	Constante de inhibición para el amonio	$mL$	Concentración intracelular de ARNm de cadena ligera
$KI_{Lac}$	Constante de inhibición para el lactato	$[H]$	Concentraciones de cadenas libres pesadas en el retículo endoplasmático
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento celular	$[L]$	Concentraciones de cadenas libres ligeras en el retículo endoplasmático
$\mu_{max}$	Velocidad específica máxima de crecimiento celular	$T_H$	Velocidad específica de traducción de aminoácidos de cadena pesada
$\mu_d$	Velocidad específica de muerte celular	$T_L$	Velocidad específica de traducción de aminoácidos de cadena ligera
$\mu_{dmax}$	Velocidad específica máxima de muerte celular	$K_A$	Constante de la velocidad de ensamble
$Kd_{Amn}$	Constante de células muertas para el amonio	$[H_2]$	Concentración de intermediarios ensamblados en el retículo endoplasmático
$n$	Constante de la ecuación de muerte celular	$[H_2L]$	Concentración de intermediarios ensamblados en el retículo endoplasmático
$K_{Lys}$	Velocidad específica de lisis celular	$[H_2L_2]_{ER}$	Concentración de proteína en el retículo endoplasmático
$r_{Lys}$	Velocidad de lisis celular	$[H_2L_2]_G$	Concentración de proteína en el aparato de Golgi
$Y_{X/Glc}$	Rendimiento biomasa -glucosa	$K_{ER}$	Constante de velocidad de transporte de la proteína entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi
$Y_{X/Gln}$	Rendimiento biomasa -glutamina	$K_G$	Constante de velocidad de transporte de proteína entre el aparato de Golgi y el medio extracelular
$Y_{Amn/Gln}$	Rendimiento amonio -glutamina	$\lambda$	Masa molecular de la proteína
$Y_{Lac/Glc}$	Rendimiento lactato-glucosa	$\varepsilon_1$	Factor de eficiencia de la glicosilación en el retículo endoplasmático
$m_{Glc}$	Coefficiente de mantenimiento para la glucosa	$\varepsilon_2$	Factor de eficiencia de la glicosilación en el aparato de Golgi
$k_{dGln}$	Constante de descomposición espontanea de la glutamina	$\gamma_1$	Constante de la ecuación de síntesis de proteína
$a_1$	Constante para el mantenimiento celular por glutamina	$\gamma_2$	Constante de la ecuación de síntesis de proteína
$a_2$	Constante para el mantenimiento celular por glutamina	ARNm	Ácido ribonucleico mensajero

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., & Nielsen, J. (2014). Kinetic models in industrial biotechnology – Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering*, *24*, 38-60. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.007>
- Baughman, A., Sharfstein, S., & Martin, L. (2011). A flexible state-space approach for the modeling of metabolic networks II: Advanced interrogation of hybridoma metabolism. *Metabolic Engineering*, *13*, 138-149. doi: 10.1016/j.ymben.2010.12.003.
- Bibila, T., & Flickinge, M. (1992). Use of a structured kinetic model of antibody synthesis and secretion for optimization of antibody production systems: I. Steadystate analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, *39*, 251-261. doi: 10.1002/bit.260390302
- Chen, N., & Tong, C. (2010). Antigenic analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein using pig antibodies identifies residues contributing to antigenic variation of the vaccine C-strain and group 2 strains circulating in China. *Virology Journal*, *7*, 378. doi: 10.1186/1743-422X-7-378.
- Cocinero, P. (2015). Método heurístico y su incidencia en el aprendizaje del álgebra. (Tesis de Licenciatura, Universidad Rafael Landívar]. <https://xdoc.mx/preview/metodo-heuristico-y-su-incidencia-en-el-aprendizaje-5ee7dd61bc31b>
- Dewasme, L., Côte, F., Filee, P., Hantson, A., & Vande, A. (2017). Macroscopic dynamic modeling of sequential batch cultures of hybridoma cells: An experimental validation. *Bioengineering*, *4*, 1-20. doi: 10.3390/bioengineering4010017.
- Dunn, M., & Burghes, A. (1983). High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *4*, 97-116. doi:10.1002/elps.1150040202
- Fenge, C., & Lüllau, E. (2006). Cell culture bioreactors. In S. S. Ozturk & W.-S. Hu (Eds.), *Cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies* United States of America: Taylor & Francis Group.
- Figueiredo, P., & Loiola, E. (2017). The impact of project introduction heuristics on research and development performance. *Revista de Administración e innovación*, *14*, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.rai.2017.03.004>
- Frías, M., & Percedo, M. (2003). *Reconociendo la Peste Porcina Clásica*. Roma, Italia. <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UNANI.054560/Details>
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y., Kittredge, A., DeFelice, Y., & Drapeau, D. (2011). High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in cho fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(6), 1328-1337. doi:10.1002/bit.23072
- Gernaey, K., & Gani, R. (2010). A model-based systems approach to pharmaceutical product-process design and analysis. *Chemical Engineering Science*, *65*, 5757-5769. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.05.003>
- Ghorbaniaghdam, A. (2013). *Development of a dynamic model to describe cho cells metabolic network and regulation*. [Tesis Doctoral, Universidad de Montreal]. [https://publications.polymtl.ca/1228/1/2013\\_AtefehGhorbaniaghdam.pdf](https://publications.polymtl.ca/1228/1/2013_AtefehGhorbaniaghdam.pdf)
- Gómez, J., García, I., Nuñez, A., Salguero, F., Ruiz, E., & Romero, J. (2006). Neuropathologic study of experimental classical swine fever. *Veterinary*

- Pathology*, 530-540. doi: 10.1354/vp.43-4-530.
- González, E. (1991). Utilización del Análisis de Procesos en la intensificación de la producción de distintas industrias de Cuba., Universidad Central de las Villas Martha Abreu,
- Ho, Y., Kiparissides, A., Pistikopoulos, E. N., & Mantalaris, A. (2012). Computational approach for understanding and improving GS-NS0 antibody production under hyperosmotic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 88 - 98. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.022.
- Jang, J., & Barford, J. (2000). An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed-batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody. *Biochemical Engineering Journal*, 4 (2), 153–168. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00041-8)
- Kiparissides, A., Koutinas, M., Kontoravdi, C., Mantalaris, A., & Pistikopoulos, E. (2011). Closing the loop' in biological systems modeling — From the in silico to the in vitro. *Automatica*, 5, 9. doi:10.1016/j.automatica.2011.01.013
- Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., Phutong, S., & Palaga, T. (2010). Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16 (4), 567-571. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.03.018>
- Kontoravdi, C. (2006). *An integrated modelling/experimental framework for protein-producing cell cultures*. [Tesis Doctoral, Imperial College London]. <https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/11796/2/Kontoravdi-C-2007-PhD-Thesis.pdf>
- Kontoravdi, C., Asprey, S., Pistikopoulos, E., & Mantalaris, A. (2007). Development of a dynamic model of monoclonal antibody production and glycosylation for product quality monitoring. *Computers and Chemical Engineering*, 31, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2006.04.009>
- Kontoravdi, C., Pistikopoulos, E., & Mantalaris, A. (2010). Systematic development of predictive mathematical models for animal cell cultures. *Computers and Chemical Engineering*, 34, 1192-1198. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.03.012>
- Kwang, T., & Lee, G. (2015). Glutamine substitution: the role it can play to enhance therapeutic protein production. *Pharmaceutical Bioprocess*, 3(3), 249–261. <https://www.openaccessjournals.com/articles/glutamine-substitution-the-role-it-can-play-to-enhance-therapeutic-protein-production.pdf>
- Li, X., Wang, L., Zhao, D., Zhang, G., Luo, J., Deng, R., & Yeng, Y. (2011). Identification of host cell binding peptide from an overlapping peptide library for inhibition of classical swine fever virus infection. *Virus Genes*, 43(1), 33-40. doi:10.1007/s11262-011-0595-7
- Liu, Y., Bi, J., Zeng, A., & Yuan, J. (2008). A simple kinetic model for myeloma cell culture with consideration of lysine limitation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31 (6), 569-577. doi: 10.1007/s00449-008-0204-x.
- Lohmeier, A., Thüte, T., Northoff, S., Hou, J., Munro, T., & Noll, T. (2013). *Effects of perfusion processes under limiting conditions on different Chinese Hamster Ovary cells*. Paper presented at the 23rd European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting: Better Cells for Better Health Lille, Francia.

- Nfor, B., Verhaert, P., Wielen, L., Hubbuch, J., & Ottens, M. (2009). Rational and systematic protein purification process development: the next generation. *Trends in Biotechnology*, 27(12), 673-679. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.09.002.
- OECD/FAO. (2021). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2021-2030*. Paris: OECD Publishing.
- Ozturk, S. (2006). Cell Culture Technology—An Overview. In S. S. Ozturk & W.-S. Hu (Eds.). United States of America: Taylor & Francis Group.
- Papathanasiou, M., Quiroga, A., Oberdieck, R., Mantalaris, A., & Pistikopoulos, E. (2016). Development of advanced computational tools for the intensification of monoclonal antibody production. *Computer Aided Process Engineering*, 38, 1659-1664. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63428-3.50281>
- Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A single dynamic metabolic model can describe mab producing cho cell batch and fed-batch cultures on different culture media. *PLOS ONE*, 1-23. doi: 10.1371/journal.pone.0136815.
- Sbarciog, M., Coutinho, D., & Vande, A. (2014). A simple output-feedback strategy for the control of perfused mammalian cell cultures. *Control Engineering Practice*, 32, 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.conengprac.2014.08.002>
- Scott, C. (2004). Animal Cell Culture: High-Maintenance, but Worth the Trouble. *BioProcess International*.
- Teixeira, A., Cunha, A., Clemente, J., Moreira, J., Cruz, H. J., Alves, P., Carrondo, M., & Oliveira, R. (2005). Modelling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems. *Journal of Biotechnology*, 118, 290–303. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.04.024.
- The MathWorks Inc. (2020). Matlab (Version 9.8.0.1323502 (R2020a)) [Programa de computador]. Natick, MA, USA: The MathWorks Inc.
- Umaña, P., & Bailey, J. (1997). A mathematical model of N-linked glycoform biosynthesis. *Biotechnology Bioengineering*, 55(6), 890-908. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970920)55:6<890::AID-BIT7>3.0.CO;2-B
- Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., Wang, Y., Xia, J., & Zhang, S. (2009). Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. *Biotechnology Advances*, 27, 989–995. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.022
- Weber, W., Link, N., & Fussenegger, M. (2006). A genetic redox sensor for mammalian cells. *Metabolic Engineering* 8, 273-280. doi: 10.1016/j.ymben.2005.12.004
- Zadeh, K. (2011). A synergic simulation-optimization approach for analyzing biomolecular dynamics in living organisms. *Computers in Biology and Medicine*, 41, 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2010.11.002>