

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y
Ciencias Biológicas



Laboratorio de Virología

Estudio del comportamiento de cultivos de la línea celular UFL-AG-286: requerimientos nutricionales, proliferación en medios libres de suero y replicación del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*

Tesista: Bioq. Verónica Gioria

Co-Director: Dr. Alejandro Beccaria

Director: Dr. Juan Daniel Claus

- 2008 -

A mi mamá.

*A la memoria de mi papá
y de mi hermano.*

“En La Verdad, La Paz”.

Joseph Ratzinger.

Agradecimientos.

Al Dr. Juan Daniel Claus, por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en el Laboratorio de Virología. Por su ejemplo de honestidad, constancia y dedicación al trabajo.

Al Dr. Marcos Oggero, por su amistad y por haberme brindado, en varias oportunidades, su experiencia y conocimientos en el tema de cultivos celulares.

A la Ing. Alicia Sciocco y al Lic. Ricardo Salvador, por su colaboración en la realización de las pruebas biológicas.

A María Eugenia De Zan y Claudia Piccirilli, mis profesoras de lengua castellana e inglés respectivamente, sin sus consejos y experiencia la escritura de esta tesis hubiese sido mucho más difícil.

A Adriana, *Gachi*, Marta y Ana, por su paciencia ante mis innumerables interrupciones en sus tareas laborales.

Al Pbro. Olidio Panigo, quien me enseñó a proponerme objetivos concretos y perseverar en el camino de su realización afrontando y asumiendo los obstáculos que se presentan.

A mis amigas Cintia Berdard, Marianela Masin y Gabriela Rivas con quienes compartí muy lindos momentos. Por hacerme sentir que puedo contar con ellas a pesar de la distancia.

A Mabel Aleanzi, Ana Demonte, Cecilia Esper y Virginia Piaggio, mis compañeras de tareas en Físico-Química Biológica, por brindarme su amistad.

A mis amigas María Elena Colandré y Mariana Cabagna, por su amistad y por haberme acompañado en momentos difíciles.

A Gabriela Micheloud, mi compañera de laboratorio, con quien intercambiamos ideas, charlas y experiencias profesionales.

A los chicos de los Laboratorios de Bioquímica Microbiana y de Enzimología Molecular: Diego Arias, Matías Ascensión, Belén Bosco, Carolina Buffarini, Carlos Figueroa, Lucila Martínez, Vanina Marquez y Vanesa Piattoni, por los buenos momentos compartidos; por hacerme sentir parte de su grupo aunque pertenezcamos a distintos equipos de trabajo.

A mis compañeros y amigos del Consejo Arquidiocesano de Acción Católica trienio 1999-2002, especialmente a Estela Fornes, Santiago Petrone, Roberto Rodríguez y Juan Carlos Toibero. Juntos aprendimos que la paciencia y la tolerancia son virtudes que nos hacen crecer en nuestra vida personal y laboral.

A Marcelo, de quien aprendí a mirar los acontecimientos de la vida desde distintos puntos de vista y a no encerrarme en una única postura.

A Dios, por las gracias recibidas durante estos años de trabajo y por haberme dado la fuerza para afrontar y superar las dificultades.

Abreviaturas y Símbolos	i
I. Introducción	1
I. 1. <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	1
I.1.1. Características del insecto	1
I.1.2. Su importancia como plaga	2
I.1.3. Control de la isoca de las leguminosas	2
I.1.3.1. Control químico	2
I.1.3.2. Agentes de control biológico.....	3
I. 2. Los baculovirus.....	5
I.2.1. Estructura y morfología	5
I.2.2. Taxonomía.....	9
I.2.3. Ciclo de infección en la naturaleza y patogénesis de las infecciones por baculovirus	10
I.2.4. Ciclo de replicación y regulación de la expresión génica.....	13
I.2.5. Aplicaciones tecnológicas de los baculovirus	15
I.2.5.1. Expresión de proteínas recombinantes	15
I.2.5.2. Vehículos de transferencia génica.....	16
I.2.5.3. Bioinsecticidas	17
I.3. Los cultivos de células de insectos aplicados a la producción de baculovirus insecticidas.....	22
I.3.1. Líneas celulares establecidas	22
I.3.1.1. La línea celular UFL-AG-286	23
I.3.2. Medios de cultivo para líneas de células de insecto	24
I.3.2.1. Una breve reseña histórica	24
I.3.2.2. Medios de cultivo básicos para células de insectos.....	26
I.3.2.3. El suero fetal bovino como suplemento en medios de cultivo para células de insecto.....	28
I.3.2.4. Medios de cultivo libres de suero fetal bovino.....	29
I.3.3. Factores que condicionan la producción de baculovirus en cultivos de células de insectos.....	33
I.3.3.1. Procesos “batch”	33
I.3.3.2. Metodologías alternativas: <i>fed-batch</i> y perfusión	39
I. 4. El virus de la poliedrosis nuclear múltiple de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	40
I.4.1. Breve reseña histórica e importancia del virus como bioinsecticida	40
I.4.2. Características del virus.....	40
I.4.3. Utilización como agente de control de la isoca de las leguminosas	42

I.4.4. Procesos de producción de AgMNPV	43
I.4.4.1. Producción <i>in vivo</i>	43
I.4.4.2. Producción <i>in vitro</i>	44
I. 5. Justificación del tema de tesis	45
II. Objetivos.....	47
II.1. Objetivo general	47
II.2. Objetivos específicos	47
III. Materiales y Métodos	48
III.1. Línea celular	48
III.1.1. Medios de cultivo.....	48
III.1.1.1. Agua	48
III.1.1.2. Tipos de medios de cultivo	48
III.1.1.3. Hidrolizados proteicos y extractos naturales	49
III.1.1.4. Suplementos	49
III.1.1.5. Preparación de soluciones	49
III.1.1.6. Preparación de medios de cultivo.....	51
III.1.2. Material para cultivos celulares	53
III.1.2.1. Material de plástico	53
III.1.2.2. Material de vidrio	54
III.1.3. Acondicionamiento del material	54
III.1.3.1. Lavado	54
III.1.3.2. Preparación y esterilización.....	54
III.1.4. Cultivos celulares tipo <i>batch</i>	55
III.1.4.1. Cultivos con células adheridas	55
III.1.4.2. Cultivos en suspensión	55
III.1.5. Recuentos celulares.....	56
III.1.5.1. Recuento de células totales, no viables y viables	56
III.1.5.2. Cuantificación colorimétrica de células viables	56
III.1.6. Cuantificación de nutrientes y metabolitos	58
III.1.6.1. Dosaje de la concentración de glucosa	58
III.1.6.2. Dosaje de la concentración de glucosa y de lactato mediante el empleo de autoanalizador.....	59
III.1.6.3. Dosaje de la concentración de aminoácidos	60
III.1.6.4. Dosaje de la concentración de amonio	60

III.2. Virus.....	61
III.2.1. Preparación de <i>stock</i> de AgMNPV	61
III.2.2. Cuantificación viral.....	61
III.2.2.1. Titulación de virus brotado de AgMNPV.....	61
III.2.2.2. Cuantificación de poliedros de AgMNPV.....	62
III.3. Determinación de los parámetros cinéticos de multiplicación celular	64
III.4. Determinación de los coeficientes de rendimiento y de las velocidades específicas de consumo y producción de nutrientes y productos	65
III.4.1. Coeficientes de rendimiento	65
III.4.2. Velocidad específica de consumo (producción de nutrientes y metabolitos)	66
III.5. Diseños experimentales.....	66
III.5.1. Ensayos factoriales completos	66
III.5.1. Diseño de Plackett-Burman	68
III.5.3. Método de superficie de respuesta (RSM):.....	69
IV. Resultados	71
IV.1. Crecimiento, metabolismo y producción de AgMNPV en cultivos de la línea celular UFL-AG-286 en suspensión	71
IV.1.1. Adaptación de la línea celular al cultivo en suspensión	71
IV.1.2. Determinación de los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión	72
IV.1.3. Consumo de nutrientes y producción de metabolitos	73
IV.1.4. Infección de células saUFL-AG-286 con AgMNPV	75
IV.1.5. Consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos infectados	77
IV.2. Diseño de un nuevo medio de cultivo para la línea celular saUFL-AG-286	80
IV.2.1. Evaluación de IPL-41 como medio básico para el cultivo de la línea celular saUFL-AG-286	80
IV.2.2. Estrategia de diseño de un nuevo medio de cultivo básico para la línea celular saUFL-AG-286	82
IV.2.3. Evaluación de la capacidad de los medios UNL y UNL-5 para sostener la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286	85
IV.2.4. Evaluación de la capacidad de los medios UNL y UNL-5 para sostener la replicación viral	86

IV.2.5. Evaluación rápida de los efectos de la suplementación individual con hidrolizados proteicos y extractos naturales sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286	88
IV.2.6. Evaluación de los efectos de la suplementación combinada con distintos hidrolizados y extractos naturales sobre los niveles de proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y sobre la replicación del virus de poliedrosis nuclear múltiple de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	90
IV.2.7. Efectos de la suplementación con hidrolizados proteicos y ultrafiltrado de extracto de levaduras en un medio de cultivo con baja concentración de aminoácidos y libre de suero	99
IV.2.8. Evaluación de la producción viral en cultivos libres de suero y de suplementación lipídica	103
IV.3. Estudio del metabolismo de la línea celular saUFL-AG-286: respuesta a los cambios en las concentraciones de los nutrientes principales	106
IV.3.1. Respuesta a los cambios en la concentración de glutamina	106
IV.3.1.1. Influencia de la concentración de glutamina sobre la proliferación celular	106
IV.3.1.2. Influencia de la concentración de glutamina sobre la replicación viral	114
IV.3.2. Respuesta a los cambios en la concentración de glucosa	115
Densidad celular máxima (células viables. ml ⁻¹).....	117
IV.3.3. Influencia de la concentración de amonio sobre la producción de poliedros	123
IV.4. Cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en medios libres de suero y optimización de la composición de un nuevo medio de cultivo completo	126
IV.4.1. Estudio de la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y la producción de AgMNPV en el medio de cultivo Sf-900II	126
IV.4.2. Adaptación de la línea celular saUFL-AG-286 al crecimiento en el medio de cultivo UNL-5 libre de suero	128
IV.4.3. Adaptación de la línea celular saUFL-AG-286 a concentraciones elevadas de ultrafiltrado de extracto de levaduras.....	131
IV.4.4. Efecto de la adición de cloruro de colina sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286	133
IV.4.5. Sustitución del ultrafiltrado de extracto de levadura por el extracto de levadura.....	135
IV.4.6. Influencia de la concentración de extracto de levadura sobre la producción viral	138
IV.4.7. Evaluación de la actividad de los componentes del medio libre de suero sobre la producción de poliedros de AgMNPV	139
IV.5. Crecimiento, metabolismo y producción de AgMNPV en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en un medio libre de suero	142
IV.5.1. Crecimiento y metabolismo de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión en el medio UNL-8 libre de suero	142

IV.5.2. Cultivo en suspensión en “spinner flasks”	146
IV.5.3. Estudio de la influencia de los parámetros de infección sobre la replicación de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8	151
IV.5.4. Determinación de los componentes en defecto en un medio de cultivo libre de suero y su relación con la producción de virus no ocluido	156
V. Discusión.....	163
VI. Conclusiones	211
VII. Bibliografía.....	215

Abreviaturas y Símbolos

AcNPV: virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*.

AcMNPV: virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*.

AfMNPV: virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anagrapha falcifera*.

AgMNPV: virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*.

Bt: *Bacillus thuringiensis*.

BV: viriones brotados.

cél. v.: células viables.

cél. t.: células totales.

DICC: dosis infectiva para cultivo celular.

FP: fenotipos productores de pocos poliedros.

GV: virus de granulosis.

HA: Hidrolizado de caseína N-Z Case Plus

HaNPV: virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera*.

HB: Caldo triptosa fosfato.

HPV: virus del papiloma humano.

IC-BEVS: sistema de expresión célula de insecto-baculovirus

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

MOI: multiplicidad de infección.

NeleNPV: virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion lecontei*.

NeseNPV: virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion sertifer*.

NPV: virus de poliedrosis nuclear.

OB: cuerpos de oclusión.

ODV: viriones derivados de los cuerpos de oclusión.

PDI: partículas defectivas interferentes.

pol.: poliedros.

RSM: método de superficie de respuesta.

SFB: suero fetal bovino.

SfMNPV: virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Spodoptera frugiperda*.

SfNPV: virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera frugiperda*.

TOI: tiempo de infección.

UFEL: Ultrafiltrado de extracto de levadura.

ufp: unidad formadora de placa.

VLPs: partículas virales similares al virus.

I. Introducción

I. 1. *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

I.1.1. Características del insecto

La isoca de las leguminosas, *Anticarsia gemmatalis*, es un insecto nativo de las zonas tropicales y subtropicales del hemisferio occidental. Fue hallada por primera vez en Florida, Estados Unidos, en el año 1903 (Hinds y Osterberger, 1931). A causa de los daños que este insecto ocasiona en los cultivos de soja, provoca grandes pérdidas económicas en el sur de los Estados Unidos y Sudamérica (Moscardi, 1989). En la Argentina, los mayores brotes se registran en los cultivos de soja de las zonas noroeste y noreste. Las orugas, que llegan a medir entre 35 y 40 mm de longitud, se presentan en dos formas: una de color verde intenso y la otra de color oscuro a negro con una serie de líneas blancas longitudinales (figura I.1.).



Figura I.1.: Isoca de las leguminosas, *Anticarsia gemmatalis* (Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series)

Los adultos son mariposas de hábitos nocturnos de color marrón a azulado oscuro. Al poseer gran capacidad de vuelo migran desde las áreas tropicales y subtropicales a las templadas durante el verano. Las larvas y pupas invernantes, provenientes de las infestaciones producidas en los meses de marzo y abril, mueren durante el invierno como consecuencia de la baja tolerancia al frío.

I.1.2. Su importancia como plaga

La isoca de las leguminosas es el insecto plaga con actividad defoliante que ataca con más frecuencia los cultivos de soja. El daño ocasionado se relaciona en forma directa con los hábitos alimentarios de este insecto. En general, las orugas, durante sus primeros estadios, solamente raspan las hojas. Pero a medida que crecen se vuelven más voraces. La alimentación de las orugas comienza con las hojas de la parte superior de la planta, para luego pasar a las hojas maduras de la parte inferior. Por último, una vez eliminado el follaje, se alimentan de la parte más suculenta del tallo e inclusive pueden llegar a deteriorar las vainas.

Para que los daños provocados por la isoca no sean devastadores es importante la vigilancia del agricultor, ya que la rapidez de un control oportuno impedirá pérdidas económicas importantes. Para ello, el agricultor debe implementar la revisión frecuente de los lotes con presencia de larvas pequeñas.

I.1.3. Control de la isoca de las leguminosas

Si bien el uso de plaguicidas químico está muy difundido en la Argentina, para el control sustentable de las principales plagas de la soja, entre ellas la isoca de las leguminosas, se recomienda la aplicación de un sistema de manejo integrado de plagas. Esta metodología de trabajo comienza, básicamente, con inspecciones regulares del cultivo para evaluar el nivel de ataque (grado de defoliación), el número y el tamaño de las orugas. De acuerdo al grado de ataque, se debe pasar a la etapa de implementación de medidas de control.

I.1.3.1. Control químico

Cuando se debe limitar rápidamente el avance de un insecto plaga, el control químico constituye una de las herramientas básicas en un programa de manejo integrado de plagas. No obstante, cuando es necesario recurrir a la utilización de un producto químico se debe conocer perfectamente su modo de empleo de manera de obtener mayores beneficios de control y, a su vez, minimizar los efectos negativos ejercidos

sobre el ambiente. En el siguiente cuadro se detallan algunos de los insecticidas químicos más empleados en el control de la isoca de las leguminosas.

Cuadro I.1.: Productos químicos empleados para el control de la isoca de las leguminosas, *Anticarsia gemmatilis*.

Producto químico	Dosis
Diflubenzurom	80 g . ha ⁻¹
Lufenuron	100 cc . ha ⁻¹
Cipermetrina	100 cc . ha ⁻¹

A pesar de que los daños causados por la isoca de las leguminosas en los cultivos de soja son, en algunos casos, alarmantes, no se recomienda la aplicación preventiva de productos químicos. Esto se debe a los problemas de polución ambiental que ocasiona el empleo de los insecticidas químicos, al incremento significativo del costo del cultivo debido a la aplicación innecesaria de estos productos, y a la aceleración de la selección de individuos resistentes.

I.1.3.2. Agentes de control biológico

El control biológico se define como un proceso a través del cual se disminuye la densidad de un insecto plaga mediante el empleo de otros organismos (insectos predadores, parasitoides, bacterias, hongos, nematodos y virus). La regulación biológica puede implementarse siguiendo tres mecanismos de acción diferentes:

- 1- La importación y establecimiento de un agente natural exótico.
- 2- La conservación y / o el aumento de los enemigos naturales del insecto plaga: para ello, se deben preservar los agentes nativos favoreciendo las condiciones ambientales y nutricionales que incrementan su densidad.
- 3- La aplicación de bioinsecticidas, en forma inoculativa o inundativa: este mecanismo de control biológico es el más utilizado en los últimos años debido a sus buenos resultados, practicidad de implementación, menor impacto ambiental y bajo costo, respecto a las metodologías citadas previamente (Lacey y col. 2001; Szewczyk y col. 2006). Entre éstos, el análisis se focalizará en los bioinsecticidas de origen

microbiano, o agentes entomopatógenos capaces de producir enfermedades infecciosas en los insectos blanco.

Los bioinsecticidas microbianos utilizan como principios activos:

a- Bacterias: dentro de las bacterias entomopatógenas se encuentra un elevado número de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), empleadas desde 1958 para el control de plagas agrícolas y forestales. A principios de este siglo, solamente en los Estados Unidos, se habían registrados más de 200 bioinsecticidas a base de Bt. El Bt es una bacteria esporígena, Gram positiva, cuyo hábitat es el suelo, la superficie de las plantas, los insectos y los granos almacenados (Maadg y col. 2001). Esta bacteria es portadora de una variedad de proteínas cristalinas de características insecticidas que se encuentran codificadas en plásmidos. Cuando los cristales son ingeridos por las larvas, se disuelven en el medio fuertemente alcalino del tracto digestivo. Posteriormente, la pro-toxina es parcialmente hidrolizada por proteasas específicas del tracto digestivo dando como producto un fragmento activo que resulta tóxico para el insecto. La interacción de esta proteína con receptores específicos, presentes en las células del huésped, conduce a la formación de canales iónicos de transmembrana. Como consecuencia, se genera un desequilibrio del balance iónico con posterior necrosis celular. Esto último favorece la germinación de los esporos del bacilo, proceso que sinergiza la acción tóxica del insecticida (Schnepf, 1995; Aromson, 2002).

b- Hongos: se han identificado aproximadamente 750 especies de hongos con características entomopatógenas. Sin embargo, solamente diez de ellos han sido utilizados para el control de insectos plagas (Szewczyk y col. 2006). El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* es un agente natural que tiene la capacidad de infectar, enfermar y producir la muerte de las larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Moscardi, 1981). Las orugas afectadas por este patógeno adquieren un color blanco y quedan adheridas a los tallos y a las hojas de las plantas de soja. Sin embargo, un bioinsecticida producido a base de *Nomuraea rileyi* produce buenos resultados solamente cuando en la zona de aplicación se registran altos niveles de humedad.

c- Nematodos: algunos nematodos, especialmente los pertenecientes a las familias *Steinerrematidae* y *Heterorhabditidae*, han sido utilizados para el control de insectos plagas. Sin embargo, su empleo ha sido muy limitado a causa de ser muy sensibles a la desecación (Szewczyk y col., 2006).

d- Virus: quince familias de virus han sido identificadas como capaces de infectar insectos. Sin embargo, solo los miembros de la familia *Baculoviridae* son considerados potenciales bioinsecticidas. A esta propiedad se le debe agregar la característica de ser inocuos para el hombre y para el ambiente. A pesar de estas importantes ventajas, muchas veces su empleo no resulta atractivo debido, principalmente, a dos causas. La primera de ellas se relaciona con el largo período de tiempo que transcurre desde la infección del insecto hasta su muerte. La segunda razón se basa en la inexistencia de un sistema de producción *in vitro* que sea sustentable desde el punto de vista técnico y económico (Szewczyk y col. 2006). Hasta la fecha, el programa más exitoso de empleo de un baculovirus para el control de un insecto plaga es el desarrollado en Brasil, donde anualmente se tratan con AgMNPV cuatro millones de hectáreas de cultivos de soja con el fin de controlar la isoca de las leguminosas (Moscardi y Santos, 2005). Esta cuestión será tratado en forma más extensa en apartados posteriores.

I. 2. Los baculovirus

I.2.1. Estructura y morfología

La familia *Baculoviridae* comprende un gran número de virus con genoma de DNA doble cadena, envueltos, que presentan la propiedad de generar cuerpos de inclusión que incluyen uno o más viriones en su interior y son específicos de artrópodos. Los más de 600 virus que integran esta familia han sido aislados, en su mayoría, de insectos que pertenecen al orden Lepidóptera; sin embargo, algunos de ellos han sido aislados de los ordenes Diptera, Hymenoptera y de crustáceos del orden Decapoda (Herniou y col., 2004). El nombre de esta familia se atribuye a la forma de bastón o báculo que presentan los virus clasificados en ella.

La estructura de la nucleocápside viral está constituida, por un lado, por una cápside cilíndrica tapada en ambos extremos, cuyo diámetro se encuentra comprendido entre 30 y 60 nm, y su longitud entre 250 y 300 nm, siendo ésta proporcional al tamaño del genoma. Su modelo estructural consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que configuran la forma cilíndrica. Todos los anillos están formados por un número constante de sub-unidades proteicas y, entre un anillo y el

siguiente, existe una separación de aproximadamente 4,5 nm (Federici, 1986; Fraser, 1986). La proteína principal de la cápside es la proteína VP39 (Blissard y col., 1989). Otros componentes de la cápside son la proteína básica P6,9 (Funk y col., 1997), la proteína P24 (Gombart y col., 1989), la proteína P80 (Müller y col., 1990) y la fosfoproteína PP78/83 (Ayres y col., 1994), además de otros componentes minoritarios, pero funcionalmente relevantes.

En el interior de la cápside viral, asociado estrechamente a la proteína P6,9, se encuentra el DNA genómico super enrollado y condensado. El tamaño del mismo puede oscilar entre 90 y 230 Kpb, y está organizado en una única molécula circular de DNA de doble cadena (Caballero y col., 2001; Federici, 1986; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dB, 2006). En relación a la organización y contenido génico de los genomas de baculovirus, los que han sido secuenciados hasta el presente contienen entre 140 y 180 marcos abiertos de lectura. Estos marcos de lectura se pueden encontrar en cualquiera de las dos orientaciones posibles, separados por secuencias intergénicas cortas, solapándose con frecuencia la señal de finalización de la traducción con la señal de poliadenilación del transcripto (Ayres y col., 1994), mientras que, por otro lado, también los elementos promotores pueden solaparse sobre la secuencia codificante de otro marco abierto de lectura (Passarelli y Miller, 1993). Los marcos abiertos de lectura no parecen estar agrupados en el genoma por función o patrón temporal de expresión. Si bien la mayoría de los genes se encuentran en copia única, existen dos tipos de secuencia multicopia: los genes *bro* (Kuzio y col., 1999), y las regiones homólogas *hrs*, que podrían estar implicados como orígenes de replicación (Pearson y col., 1992) y como activadores transcripcionales (Leisy y col., 1995; Pearson y Rhormann, 1997).

La morfogénesis de los viriones es un rasgo particular de la familia *Baculoviridae*. Por tratarse de virus envueltos, los viriones maduros se forman cuando las nucleocápsides adquieren una envoltura que, de acuerdo a su origen, pueden originar dos tipos de viriones:

a) Algunas nucleocápsides permanecen en la célula infectada y adquieren una envoltura a partir de su síntesis *de novo*, dando lugar a la formación de viriones que posteriormente quedan ocluidos en los denominados cuerpos de oclusión. Estos viriones reciben el nombre de viriones ocluidos (OV).

b) Otras nucleocápsides, en cambio, brotan a través de la membrana citoplasmática de la célula huésped. A estos viriones se los conoce con el nombre de viriones brotados (BV).

La particularidad de los viriones de ser morfológicamente distintos, pero genótipicamente idénticos, refleja sus respectivos roles en el ciclo de infección viral. Mientras los viriones brotados son los encargados de diseminar la infección de célula a célula, los viriones ocluidos cumplen la misión de transmitir la infección de insecto a insecto. Treinta años atrás Summers y sus colaboradores determinaron, a través del empleo de la microscopía electrónica, centrifugación en gradiente de densidad y ensayos de infección que, si bien los viriones brotados obtenidos en cultivos celulares y en hemolinfa de larvas eran similares entre sí, diferían de los viriones obtenidos por tratamiento alcalino de los cuerpos de oclusión. En estos últimos, no se observó la presencia de peplómeros, estructura esencial para comenzar el ciclo de infección en cultivos celulares. Estas observaciones se correspondieron con estudios previos que hacían referencia a la imposibilidad de infectar cultivos de líneas celulares derivadas de insectos con viriones obtenidos a partir de poliedros (Summers y col., 1976).

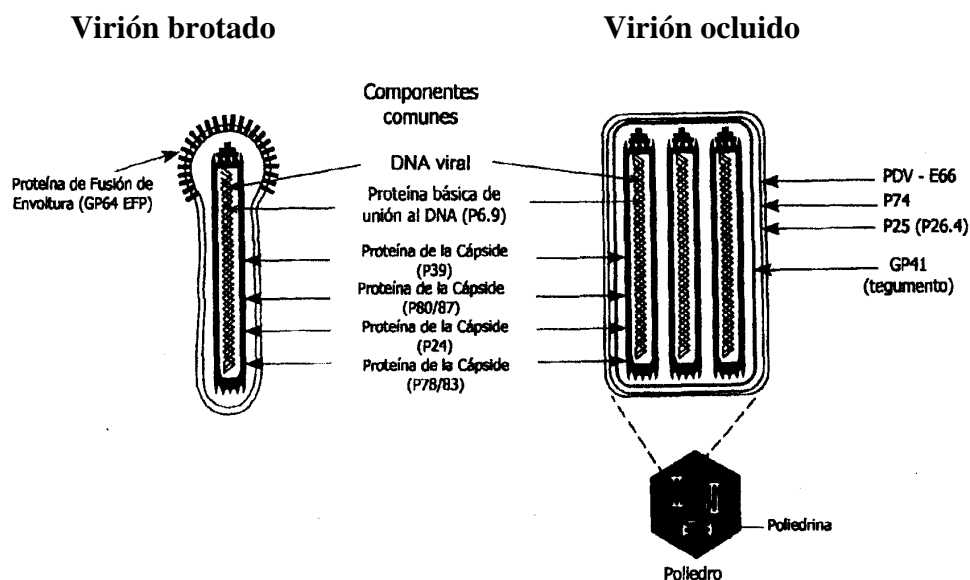


Figura I.3.: Estructura de los fenotipos virales del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) (VII report ICTV, 2000).

Los viriones ocluidos pueden contener una sola nucleocápside por virión (viriones simples) o bien contener un número variable de nucleocápsides (viriones múltiples). Los viriones derivados de los cuerpos de oclusión (ODV) son los elementos infecciosos responsables de la transmisión horizontal del virus, como así también de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón del insecto huésped. La proteína P74, presente en la membrana de los ODVs, es la responsable de la unión y la fusión de las membranas del virión a la célula huésped (Faulkner y col., 1997). Entre la nucleocápside y la membrana de estos viriones existe una zona, a la que se denomina tegumento, donde se ubica la glicoproteína GP41 cuya función aún es desconocida (Whitford y Faulkner, 1992).

Los viriones brotados (BV) contienen una sola nucleocápside por virión. Ellos son los agentes infecciosos responsables de diseminar la infección entre los órganos y tejidos de la cavidad hemocélica del huésped, como así también de iniciar el ciclo de infección en los cultivos celulares. La forma de penetración de los BV en la célula huésped está relacionada con el origen y la composición proteica de su envoltura. La glicoproteína GP64, presente en la envoltura de AcMNPV, aparece concentrada en uno de los extremos del virión dando lugar a una estructura en forma de espiga, a la cual se denomina “peplómero”. Esta estructura le confiere especificidad tisular al virión y es la que está involucrada en su entrada a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptores. En conclusión, la glicoproteína GP64 es esencial para la propagación de AcMNPV de célula a célula (Caballero y col., 2001; Jarvis y García, 1994; Pearson y col, 2001).

Hacia el final de su ciclo de replicación, las células infectadas por baculovirus sintetizan grandes cantidades de poliedrina o granulina. Estas proteínas, codificadas en el genoma viral, cristalizan formando los cuerpos de oclusión (OB), con forma de gránulo o de poliedro irregular, que encierran uno o más viriones ocluidos, respectivamente. El tamaño de los cuerpos de oclusión varía entre 0,13 – 15 μm , son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos, y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o la liofilización. Todas estas características le confieren capacidad de persistencia en el medio ambiente. Por otra parte, los OBs son solubles en condiciones alcalinas como las que se encuentran en los intestinos de algunos insectos (pH 9-11). Esta propiedad facilita la

liberación de los viriones de los OBs, los cuales comienzan la infección en el insecto huésped (Federici, 1986).

I.2.2. Taxonomía

Sobre la base de criterios morfológicos, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), en su sexto reporte, distinguió dos géneros dentro de la familia *Baculoviridae*, los *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (VIth ICTV report). Los baculovirus clasificados entre los NPVs se caracterizan por ensamblar, en el núcleo celular, cuerpos de oclusión con forma de poliedros, los cuales contienen en su interior varios viriones ocluidos. Dentro del género se reconocen dos grupos, I y II, en el primero de los cuales ha sido clasificado el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Por otro lado, los virus clasificados entre los GVs se distinguen por producir cuerpos de oclusión ovoides, que contienen en su interior un solo virión. En este caso, los gránulos son de localización citoplasmática.

En cuanto al tipo de huésped de los cuales han sido aislados los virus que integran estos dos géneros, se ha observado que los GVs provienen solamente de insectos del orden Lepidóptera, en cambio los NPVs han sido aislados de un grupo más diverso de artrópodos. La clasificación de la familia *Baculoviridae* en dos géneros fue posteriormente modificada por el ICTV al incorporar un nuevo género que se denominó “*Baculovirus* sin clasificación”. Este género incluye los siguientes grupos de virus: *Baculoviridae penaei*; Gonad-specific virus; *Monodon baculovirus* y *Baculovirus* no identificados.

En marzo de 2006, Jehle y col. (2006) presentaron una revisión de la taxonomía y la clasificación de la familia *Baculoviridae* en base al estudio filogenético de 29 genomas de baculovirus. Estos investigadores propusieron que la familia *Baculoviridae* debería ser dividida en cuatro géneros:

a) Alphabaculovirus: Este género debería incluir todos los virus de poliedrosis nuclear específicos de Lepidópteros. Producen viriones ocluidos y viriones brotados, y su genoma varía en un rango de 100 a 180 kpb. Para este género se propone como especie tipo al virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV).

b) Betabaculovirus: Aquí se posicionarían los virus del género *Granulovirus*. Al igual que los alphabaculovirus, estos virus durante su ciclo de replicación producen viriones brotados y viriones ocluidos, y su genoma también varía en un rango de 100 a 180 kpb. Para este género se propone como especie tipo al virus de la granulosis de *Cydia pomonella* (CpGV).

c) Gammabaculovirus: Los virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion lecontei* (NeleNPV) y de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion sertifer* (NeseNPV) constituirían este género, con la posibilidad de incorporar un virus de poliedrosis nuclear específico de Hymenoptera aislado de *Gilpinia hercyniae*. Los poliedros de un tamaño comprendido entre 0,4 – 1,1 µm contienen una única nucleocápside. El tamaño de los genomas de NeleNPV y NeseNPV oscila entre los 82 – 86 kpb. Entre los virus de este grupo no se han identificado viriones brotados ni tampoco genes que codifiquen para la proteína de fusión GP64. Para este género se propone como especie viral tipo al virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion lecontei*.

d) Deltabaculovirus: En este género se propone incluir al virus de la poliedrosis nuclear de *Culex nigripalpus* (CuniNPV) y posiblemente otros baculovirus específicos del orden Diptera. En estos virus se han hallado viriones brotados y viriones ocluidos. Los cuerpos de oclusión de CuniNPV tienen forma esférica y su diámetro es de aproximadamente 400 nm. Se ha determinado que los genes que codifican la proteína que forma los cuerpos de oclusión no son homólogos a los que codifican la poliedrina o la granulina.

I.2.3. Ciclo de infección en la naturaleza y patogénesis de las infecciones por baculovirus

En general, el ciclo de infección de los baculovirus en la naturaleza comienza cuando los cuerpos de oclusión son ingeridos por las larvas al alimentarse, continúa con la diseminación de la enfermedad dentro del insecto y finaliza con la muerte del huésped que libera nuevos cuerpos de oclusión al medio ambiente. Si bien en el apartado anterior fue presentada una nueva clasificación taxonómica de la familia *Baculoviridae*, propuesta por Jehle y col. (2006), la descripción del ciclo de infección de los baculovirus será realizada siguiendo la clasificación taxonómica propuesta por el sexto reporte del ICTV.

a) Género *Granulovirus*: El ciclo de infección de los virus clasificados en este género comienza cuando los cuerpos de oclusión son ingeridos por las larvas y disueltos a nivel del intestino medio debido a la alcalinidad de los fluidos intestinales. Posteriormente, los viriones ocluidos atraviesan la membrana peritrófica; este proceso es facilitado por la acción de proteínas virales que producen la ruptura de esta membrana (Deksen y Granados, 1988). Continuando el ciclo de infección, los viriones se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de las células del intestino medio del insecto. Una vez producida la fusión, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo inyectando el DNA viral a través de los poros nucleares (Summers, 1971). Si bien la replicación comienza en el núcleo, inmediatamente se rompe la membrana nuclear produciéndose una mezcla del material nuclear y citoplasmático. En ese momento, las células de la membrana peritrófica comienzan a disociarse desapareciendo las uniones (desmosomas y hemidesmosomas) que las mantenían unidas. Finalmente, las nuevas nucleocápsides brotan a través de la membrana plasmática.

Dependiendo del lugar al que se circunscribe la infección, Federici (1993) clasificó los *Granulovirus* (GV) en tres tipos. En los de tipo I (*Trichoplusia ni* GV), el virus invade el intestino medio en forma transitoria limitándose la infección al cuerpo graso. A pesar de la infección, las larvas no cesan de ingerir alimento y, la muerte de las mismas se produce recién entre los 8 y los 12 días post-infección. Los insectos se tornan de color blanquecino debido a la acumulación de los cuerpos de oclusión en el tejido infectado, sin que se produzca la ruptura del tegumento por no encontrarse afectada la epidermis. Una vez muertas, las larvas adquieren una coloración oscura debido a la invasión de los cadáveres por microorganismos saprófitos. Finalmente, los cadáveres presentan un aspecto seco que culmina con la desintegración de las larvas. En los granulovirus de tipo II (*Cydia pomonella* GV, *Epinotia aporema* GV), la infección es poliorganotrópica. Los tejidos más afectados por la infección incluyen el cuerpo graso, la matriz traqueal y la epidermis. La velocidad de acción de estos virus es más rápida que la advertida en los GVs de tipo I, ya que las larvas mueren entre los días 5 y 6 posteriores a la infección. En estas larvas se observa la licuefacción de los tejidos y, finalmente, la ruptura de la cutícula con posterior liberación de los cuerpos de oclusión. Por último, en los granulovirus de tipo III (*Harrisinia brillians* GV), la infección es

monoorganotrópica, afectando solamente el intestino medio del insecto. La misma produce diarrea en los insectos afectados y es transmisible a través de las heces. La muerte de las larvas se produce, en promedio, a los 7 días post-infección (Sciocco, 2001).

b) Género *Nucleopolyhedrovirus*: Las larvas son infectadas, principalmente, cuando ingieren los cuerpos de oclusión presentes como contaminantes en el alimento. A causa de la alta alcalinidad presente en el intestino del insecto, y con la participación de proteasas alcalinas, se produce la hidrólisis de la poliedrina, principal proteína constituyente de los cuerpos de oclusión (Adams y McClintock, 1991). Una vez liberados, los viriones ocluidos deben atravesar la membrana peritrófica del intestino. Superada esta primera barrera, los viriones ocluidos se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de las células del intestino medio (Horton y Burand, 1993). Luego de la fusión, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo (Chalton y Volkman, 1993), inyectando el DNA a través de los poros nucleares (Granados y Williams, 1986). El núcleo se hipertrofia, observándose la formación de un estroma virogénico en la región central del núcleo (Granados y Williams, 1986), y comienza la transcripción de los primeros genes virales, activándose las cascadas responsables, finalmente, de la replicación del genoma viral y su posterior encapsidación. Las nuevas nucleocápsides pasan a través de la membrana nuclear adquiriendo una envoltura de dicha membrana; se alinean con la membrana plasmática en la base de la célula para finalmente emerger traspasando esta membrana como viriones brotados. De ahí que, éstos últimos, presenten una envoltura de composición similar a la membrana plasmática de la célula huésped, pero modificada por la presencia de proteínas virales (GP64 en AcMNPV y el resto de los virus de poliedrosis nuclear del grupo I). Concluida la etapa de la infección primaria, comienza la diseminación de los viriones brotados hacia las células de otros tejidos, para comenzar la etapa correspondiente a la infección secundaria (hemocitos, matriz traqueal, epidermis, cuerpo graso, tejidos muscular, nervioso, reproductivo, glandular y células pericardiales). Si bien no está del todo esclarecido cuál es la principal vía de diseminación de la infección, está comprobado que los hemocitos y las células traqueales cumplen un rol muy importante en este proceso (Engelhard y col., 1994). A diferencia de la vía de penetración de los viriones ocluidos en las células del epitelio intestinal, que se produce por fusión de membranas, los viriones brotados, producto de

la infección primaria, penetran a las células mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptores, el mismo mecanismo por el que penetran los viriones brotados cuando infectan células en cultivo. Durante el proceso de infección secundaria se produce una abundante progenie de viriones ocluidos. Los mismos quedan confinados en el núcleo celular, atrapados en una matriz de la proteína poliedrina, formando así los cuerpos de oclusión. Avanzada la infección, el insecto muere, en promedio a los 7 días post-infección, produciéndose finalmente la lisis del tegumento y la liberación de los cuerpos de oclusión, que dan origen a un nuevo ciclo de infección (Sciocco, 2001).

I.2.4. Ciclo de replicación y regulación de la expresión génica

La mayor parte del conocimiento existente acerca del ciclo de replicación de los baculovirus y la regulación de la expresión génica ha sido obtenida por infección de cultivos de células de insectos lepidópteros. El estudio de las infecciones por baculovirus en cultivos de células de insectos comenzó a cobrar interés a partir de que Trager lograra, en el año 1935, la replicación de *Bombyx mori* NPV en explantes de tejidos de insectos (Trager, 1935). Sin embargo, no fue hasta 1970 que se hizo posible la replicación de un virus de poliedrosis nuclear múltiple en cultivos de una línea celular establecida, cuando Goodwin y col. (1970) lograron replicar el virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) en una línea celular de la misma especie.

A diferencia de lo que ocurre en la infección natural, las células en cultivo deben ser inoculadas con viriones brotados para comenzar el ciclo de replicación. Su ingreso se lleva a cabo por endocitosis mediada por receptores (Charlton y Volkman, 1993; Volkman y Goldsmith, 1985). Esta vía de ingreso depende de la GP64 viral, que actúa como anti-receptor y responsable de la fusión mediada por pH (Blissard y Wens, 1992). No se han identificado aún los receptores celulares para GP64 o sus análogos. Una vez liberadas las nucleocápsides desde las vesículas endocíticas al citoplasma, son transportadas hacia el núcleo en asociación con filamentos de actina cuya polimerización es inducida por la infección (Charlton y Volkman, 1993). Las nucleocápsides interaccionan con los poros nucleares, ingresan al núcleo y se desnudan (Granados y Williams, 1986), quedando el genoma viral en condiciones de expresarse y replicarse.

La expresión del genoma de los baculovirus está regulada en forma de cascada, pudiéndose distinguir tres fases sucesivas: temprana, tardía y muy tardía.

I - La expresión de los genes tempranos (*ie-0*, *ie-1*, *ie2*, *iap1*, *iap2*, *dnapol*, *p43*, *p47*, *lef1*, *lef3*, *gp64*, etc.) comienza después de la desagregación de la nucleocápside y del desnudamiento del genoma, cuando algunos genes del DNA viral son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula huésped, dando origen a una serie de productos entre los que se cuentan las enzimas responsables de la replicación del genoma viral (DNA polimerasa, DNA helicasa), proteínas regulatorias de la transcripción de genes tempranos y tardíos, y polipéptidos estructurales, como la GP64. Esta fase se extiende, para el virus prototipo AcMNPV, desde el momento de la infección hasta las 6 a 8 horas post-infección (Romanowski y Ghiringhelli, 2001).

II- La replicación del DNA parece ser una condición para el comienzo de la expresión de los genes tardíos de los baculovirus. Prueba de ello es que la inhibición de la replicación del DNA por afidicolina (inhibidor de la enzima DNA polimerasa) también bloquea la transcripción de este grupo de genes. A diferencia de los genes de expresión temprana, los genes de expresión tardía y muy tardía son transcritos por una RNA polimerasa codificada por el virus (Grula y col., 1981; Beniya y col., 1996). Muchos de los genes transcritos durante la etapa temprana continúan haciéndolo durante la fase tardía, y además se activa la transcripción de nuevos genes, cuyos productos son de naturaleza estructural (*vp39*), enzimática (*chiA*, *ubi*) o regulatoria (*lef2*, *lef10*, *vlf-1*) Con la expresión de los genes tardíos comienza la etapa de ensamblaje de las nucleocápsides en el núcleo de las células infectadas, y posteriormente la liberación de viriones brotados. Esta etapa se extiende aproximadamente hasta las 18 horas post-infección (Romanowski y Ghiringhelli, 2001), y durante la misma se produce una acumulación exponencial de virus brotado en el medio de cultivo sobrenadante.

III- La fase muy tardía de la infección se caracteriza por la interrupción de la transcripción de muchos de los genes tardíos, y por la expresión de los genes muy tardíos, tales como *polh*, *p10* y *gp41*, cuyos productos van a formar parte de la estructura de los viriones ocluidos, que es la progenie viral producida mayoritariamente durante esta etapa, y los cuerpos de oclusión. Para ello, la proteína poliedrina forma una matriz cristalina alrededor de los viriones ocluidos que se encuentran a nivel nuclear. Este proceso se completa con la envoltura de los cuerpos de oclusión compuesta por, al

menos, una glicoproteína (PEP o PP34). La proteína P10 interviene en el proceso de maduración y liberación de los cuerpos de oclusión. La delección del gen p10 conduce al agregado defectuoso de la envoltura de los cuerpos de oclusión, producción de poliedros frágiles, bloqueo de la desintegración del núcleo y lisis celular deficiente (Rohrmann, 1992; Romanowski y Ghiringhelli, 2001).

Finalmente, a partir de las 72 horas post-infección, se inicia el proceso de lisis celular y, en consecuencia, el vertido de los cuerpos de oclusión al medio de cultivo (Granados, 1980; Jarvis y García, 1994; Palomares y Ramirez, 1998).

I.2.5. Aplicaciones tecnológicas de los baculovirus

I.2.5.1. Expresión de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, diagnósticos o para su utilización en investigación y desarrollo ha cobrado en las últimas décadas un gran interés. Tradicionalmente, estas proteínas eran obtenidas en sistemas de expresión procariotas. Sin embargo, estos organismos no son capaces de efectuar modificaciones post-traduccionales tales como la glicosilación, la fosforilación, la carboximetilación, etc. Estas modificaciones son esenciales, por ejemplo, cuando las proteínas son empleadas con fines terapéuticos, ya que determinan las propiedades del producto (inmunogenicidad, solubilidad, tiempo de vida media, actividad específica, resistencia a las proteasas). Distintos sistemas de expresión de proteínas han sido desarrollados en los últimos 20 años en células eucariotas, de los cuales el sistema de expresión célula de insecto-baculovirus (IC-BEVS) es uno de los más empleados. Básicamente, en este sistema las proteínas son producidas luego de que un cultivo de células de insectos es infectado con un baculovirus recombinante en cuyo genoma se ha incorporado el gen de la proteína a expresar. Entre las ventajas que presenta el sistema IC-BEVS se destacan: la capacidad de las células de insectos de efectuar modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales propias de las células eucariotas, la facilidad de la construcción de los virus recombinantes, su inocuidad para mamíferos y la posibilidad de expresar simultáneamente dos o más proteínas. Las proteínas recombinantes producidas en el sistema IC-BEVS pueden ser utilizadas para la manufactura de productos

farmacéuticos, en ensayos diagnósticos, en la producción de vacunas y en el estudio de las interacciones entre proteínas (Palomares y Ramírez, 1998). Un ejemplo importante de la aplicación del sistema de expresión célula-baculovirus es la producción de las “partículas virales similares a virus” (VLPs) empleadas para la producción de vacunas contra el virus del papiloma humano (HPV). Estas VLPs están compuestas por las proteínas estructurales L1 del HPV-16 y del HPV-18. Sus beneficios clínicos han sido demostrados en la prevención de las infecciones de estos dos tipos de papilomas relacionados con las lesiones y anomalías citológicas del cuello uterino (Kost y col., 2005). Por último, la principal desventaja que presenta el sistema IC-BEVS es la calidad del proceso de modificación post-traducciona l de las proteínas expresadas, principalmente debido a las diferencias en los patrones de glicosilación entre las células de insectos y las de mamíferos. Estas diferencias han limitado la producción industrial de proteínas terapéuticas en este sistema de expresión (Palomares y col., 2005).

I.2.5.2. Vehículos de transferencia génica

Una de las aplicaciones más novedosas de los baculovirus es su utilización como vehículos de transferencia génica (Kost y col., 2005). Hofmann y col. (1995) demostraron por primera vez que un baculovirus recombinante, obtenido a partir la modificación del genoma de AcMNPV silvestre, era capaz de infectar eficientemente hepatocitos humanos y de transportar los genes funcionales hasta los núcleos celulares. Utilizando un promotor que es activo en células de mamíferos, estos investigadores observaron además que los hepatocitos infectados con el baculovirus recombinante expresaban altos niveles de los genes insertados en su genoma.

Los baculovirus tienen ciertas características que propician su utilización como vectores en terapia génica. Entre ellas se destacan la facilidad de su construcción y propagación, la capacidad de introducir genes en células de mamíferos que no se hallan en división y su estrecho rango de huésped. Sin embargo, los baculovirus presentan el inconveniente de ser inactivados por el sistema complemento de la sangre. Para superar este problema, los baculovirus recombinantes deberían ser inyectados directamente en tejidos tales como el músculo esquelético y el cerebro.

Entre las aplicaciones más importantes de los baculovirus en terapia génica se pueden destacar la producción de VLPs transportadoras de DNA para inmunización, y la construcción de vectores híbridos. Cheshenko y col. (2001) diseñaron un sistema de producción de un vector amplicón sin necesidad de recurrir al empleo de un virus *helper*. En su reemplazo, utilizaron un híbrido baculovirus / adenovirus que les permitió obtener altos títulos del vector amplicón, libre de la contaminación acompañante ocasionada por el virus *helper*.

I.2.5.3. Bioinsecticidas

Existen antecedentes acerca de la utilización de los baculovirus como bioinsecticidas que se remontan al año 1892 (Benz, 1986); sin embargo, no fue hasta mediados del siglo pasado que se demostró formalmente su utilidad en el control de plagas. En los treinta años siguientes se llevaron a cabo diversos estudios a campo, culminando en 1975 con el registro del primer baculovirus insecticida. Así, el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa zea* fue registrado en la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos bajo el nombre de Elcar[®] (Benz, 1986). Más de 40 baculovirus, entre los que se incluyen nucleopoliedrovirus y granulovirus, han sido utilizados como bioinsecticidas en distintos países del mundo sin producir efectos adversos sobre organismos distintos a los de su blanco de acción. Como ejemplos se pueden citar el uso de AgMNPV en Brasil para el control de la isoca de las leguminosas, donde anualmente son tratadas cuatro millones de hectáreas de cultivos de soja; el CpGV empleado en varios países para combatir los gusanos que atacan los cultivos de manzana, peras y nueces; y el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera*, empleado anualmente en China sobre más de cien mil hectáreas para proteger los cultivos de algodón, tabaco y plantas de tomate (Palomares y col. 2005).

Los baculovirus presentan características propicias para que sean considerados buenos bioinsecticidas. En primer lugar, actúan exclusivamente sobre insectos. Los miembros de la familia *Baculoviridae* sólo infectan organismos del phylum Arthropoda, mayoritariamente a los de clase Insecta. En segundo lugar, tienen un reducido espectro de huésped, y no afectan a los insectos que son parasitoides y depredadores de las plagas, o a otros insectos benéficos como las abejas. En tercer lugar, persisten en el

medio ambiente. Esta propiedad permite prolongar el efecto de una aplicación o bien posibilita el establecimiento del baculovirus como un factor regulador de las poblaciones del insecto huésped. Sin embargo, el uso de baculovirus como agentes de control biológico de plagas presenta también algunas limitaciones y desventajas, a saber:

a) Desde el punto de vista comercial, la elevada especificidad podría constituir una desventaja, ya que el nicho de utilización para cada virus es muy estrecho y, por lo tanto, el desarrollo de procesos de producción a nivel industrial se reduce a baculovirus utilizados para controlar especies de plagas de gran importancia económica.

b) La persistencia de los baculovirus en el medio ambiente es afectada por la acción de la radiación solar ultravioleta. Por esta causa, es fundamental una apropiada formulación cuando son utilizados como bioinsecticidas.

c) Todos los baculovirus destinados al control de plagas son producidos, hasta el presente, mediante procesos de multiplicación *in vivo*, en insectos susceptibles. Esto determina que los costos aumenten significativamente con la escala de producción a causa de la mano de obra intensiva que se requiere. Una manera de resolver éste problema es a través de la producción de los baculovirus en cultivos celulares. Sin embargo, no se cuenta aún con procesos desarrollados que permitan obtener un producto competitivo desde el punto de vista económico.

d) La limitación que más influyó en el empleo de los baculovirus como bioinsecticidas es su lento modo de acción. Un insecto infectado puede tardar entre 5 y 15 días en morir. Durante el proceso de infección, el insecto continúa su alimentación y, en consecuencia, dañando el cultivo. Sin embargo, los avances en el conocimiento de la biología molecular de los baculovirus posibilitó la obtención de virus recombinantes que expresan entomotoxinas que le otorgan una mayor virulencia, comparados con los virus silvestres (Ibarra y Del Rincón Castro, 2001). Entre los genes que, expresados en baculovirus bajo el control de promotores apropiados, les confieren un incremento de su virulencia se incluyen toxinas bacterianas y de otros artrópodos, como avispas, escorpiones y garrapatas. Dependiendo del gen empleado, se han observado distintos efectos sobre las larvas, incluyendo reducción del volumen de la hemolinfa, pérdida del apetito y parálisis. En los casos más efectivos se observó una caída de la supervivencia de la larva del orden del 40%, respecto a los insectos infectados con un baculovirus silvestre (Palomares y col., 2005).

e) Por último, en los últimos años, el desarrollo de plantas transgénicas que expresan resistencia o tolerancia a insectos ha significado un fuerte freno al interés, por parte de las grandes compañías vinculadas a la producción de agroquímicos y agrobiológicos, por los bioinsecticidas en general, y por los baculovirus en particular. Sin embargo, en forma paulatina, sobre todo en los países con mayores niveles de desarrollo socioeconómico, se verifica un incremento en el número de personas interesadas en producir y consumir alimentos producidos mediante agricultura orgánica. Estas nuevas expresiones sociales pueden significar una revitalización del interés por el desarrollo de nuevos bioinsecticidas formulados sobre la base de baculovirus.

I.2.5.3.1. Producción de baculovirus insecticidas *in vivo*

En la actualidad, todos los baculovirus empleados para el control de plagas son producidos en larvas de insectos susceptibles (Palomares y col., 2005). La producción de baculovirus *in vivo* es factible, desde el punto de vista técnico y económico, si se alcanzan altos rendimientos de cuerpos de oclusión a bajo costo. La cantidad y calidad de los cuerpos de oclusión producidos en insectos infectados con baculovirus están sujetas a la influencia de una serie de factores, entre los que se incluyen el insecto huésped, el inóculo viral, las condiciones ambientales y el tipo de dieta.

1- El insecto huésped: en general, las colonias de insectos de los laboratorios se generan a partir de individuos colectados en el campo, aunque hoy es posible mantener colonias de lepidópteros en condiciones de cautividad. La producción de cuerpos de oclusión por mg de larva está comprendida entre $9,2 \times 10^6$ y $4,3 \times 10^7$ en las infecciones con virus de la poliedrosis nuclear de insectos lepidópteros. La máxima producción de poliedros ocurre en los tejidos más ricos en nutrientes y metabólicamente activos (cuerpo graso, epidermis, matriz traqueal) entre los 5 y 10 días post-infección. Sin embargo, es aconsejable coleccionar las larvas cuando presentan estado de flacidez (5-6 días post-inoculación), antes de que se produzca la licuefacción de los tejidos. El almacenamiento del material coleccionado se realiza a -20°C .

2- El inóculo viral: cuando se trata de un nuevo aislamiento viral, lo más frecuente es que sea obtenido a partir de larvas muertas o enfermas recolectadas en el campo. Luego de la purificación de los cuerpos de oclusión, se debe proceder a su caracterización morfológica, biológica, bioquímica y molecular. Entre los baculovirus de una misma especie existen aislamientos que presentan diferente actividad biológica

y, en consecuencia, distinta virulencia y rendimiento. A causa de ello, se debe seleccionar aquel aislamiento que presenta una mayor actividad. Para obtener el máximo rendimiento de poliedros por gramo o por larva, se emplea la dosis más baja de inóculo viral que produce el 100% de mortalidad de las larvas. El inóculo puede ser utilizado por incorporación en la dieta artificial, por contaminación artificial o por aplicación a trocitos de la dieta. En general, las dosis varían entre 1×10^5 y 5×10^7 poliedros. ml^{-1} de dieta.

3- Las condiciones ambientales y el tipo de dieta: las larvas en los laboratorios son mantenidas a temperaturas comprendidas entre los 20° C y los 26° C, y una humedad relativa del 60% promedio. La composición de la dieta para la alimentación de los insectos repercute en forma directa sobre el costo de producción. Desde el punto de vista de su composición, las dietas pueden ser naturales o semi-sintéticas. Estas últimas contienen fuentes de proteínas (germen de trigo, caseína, hidrolizados de distintas proteínas), de lípidos y esteroides (aceite de germen de trigo, colesterol), de hidratos de carbono (azúcar, harinas) y de vitaminas (extractos de levaduras, complementos vitamínicos). Además, las dietas semi-sintéticas deben incluir un agente gelificante para darle al alimento la consistencia adecuada.

I.2.5.3.2. Producción de baculovirus insecticidas *in vitro*

Es posible también producir baculovirus insecticidas mediante propagación en cultivos celulares. La producción a gran escala de baculovirus en cultivos de células de insectos presenta una serie de ventajas potenciales respecto a los métodos de producción *in vivo*, como el mejoramiento de la relación beneficio-costo a medida que se incrementa la escala de producción, el desarrollo de procesos mejor controlados que la propagación en larvas, y la posibilidad de obtener virus libre de contaminación con otros microorganismos o con productos alergénicos tales como proteínas de insecto o cutículas (Weiss y Vaughn, 1986). Sin embargo, a pesar de estas ventajas potenciales, no se ha podido establecer aún ningún proceso que reúna, al mismo tiempo, factibilidad técnica y económica. A este respecto se debe considerar que un insecticida formulado sobre la base de baculovirus debe ser necesariamente un producto de bajo costo, ya que su ámbito de competencia económica es el del conjunto de los insecticidas, incluidos los de síntesis química de muy bajo costo. Este marco impone fuertes condicionamientos sobre las características de los procesos a desarrollar, que deben ser altamente

productivos y de muy bajo costo (Murhammer, 1996; Rhodes, 1996) Las principales condiciones que deben satisfacerse para establecer un proceso factible, técnica y económicamente, de producción de baculovirus insecticidas *in vitro* son:

- a) Línea celular bien caracterizada, adaptable a condiciones de producción industrial.
- b) Medio de cultivo de composición simple y bajo costo, apto para sostener la proliferación celular y la producción viral.
- c) Cepa viral de elevada patogenicidad para el insecto blanco, y genéticamente estable.
- d) Conocimiento de las condiciones óptimas de cultivo e infección para alcanzar elevados rendimientos del fenotipo viral insecticida.
- e) Estrategia de producción apta para su escalamiento a nivel industrial.

Quizás porque el mayor interés por el desarrollo de procesos de producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares ha estado radicado en la industria (Gong y col., 1997), más que en los ambientes académicos, existe muy poca información publicada acerca de estos procesos (Murhammer, 1996), aunque por otro lado se ha generado gran cantidad de información acerca de los procesos de producción de proteínas recombinantes en el sistema baculovirus – células de insecto (Palomares y col., 2005). Luego de los trabajos iniciales de Vaughn (1976) y Weiss y col. (1981a; 1981b; 1982), quienes produjeron poliedros de baculovirus en cultivos celulares en botellas “roller”, y de Hink y Strauss (1980) y Hink y col. (1977), que lo hicieron en cultivos en suspensión agitada, la mayor parte de las publicaciones han quedado limitadas a la producción de unos pocos grupos trabajando en Australia (Chakraborty y col., 1995; 1999; Chakraborty y Reid, 1999; Lua y col., 2002; Lua y Reid, 2000; 2003; Pedrini y col., 2005; 2006), Europa (Fertig y col., 1993; Kloppinger y col., 1990; Kool y col., 1991; 1993a; 1993b; van Lier y col., 1990; 1992; 1994; Marteiijn y col., 2000; Miltenburger, 1985; Miltenburger y col., 1984).y Sudamérica (Batista y col., 2005; Claus y col., 1993; Claus y col., 1997; Rodas y col., 2005; Visnovsky y Claus, 1994; Visnovsky y col., 2003). Del análisis de esta información se desprende que los principales problemas a resolver para alcanzar la factibilidad técnica y económica son la baja productividad celular, o la falta de conocimiento de las condiciones que permitan optimizar esa productividad, la carencia de medios de cultivo de bajo costo y capaces de sostener altos rendimientos virales, la falta de experiencia en el escalamiento de

procesos en reactores robustos, y la falta de estabilidad de los genomas virales cuando los baculovirus son sometidos a repetidos pasajes en cultivos celulares.

I.3. Los cultivos de células de insectos aplicados a la producción de baculovirus insecticidas

I.3.1. Líneas celulares establecidas

Los primeros cultivos *in vitro* de células de vertebrados fueron establecidos por Harrison en el año 1902. Su metodología de trabajo impulsó las investigaciones de Goldschmidt y de Glaser, pioneros en el cultivo de tejidos y de células de insectos (Benz, 1986). Estos investigadores empleaban en sus trabajos un medio de cultivo constituido íntegramente por fluidos corporales de insectos, o por sus diluciones en soluciones salinas suplementadas con glucosa y peptona. En 1956, Wyatt y col. publicaron la composición de los compuestos orgánicos de la hemolinfa de *Bombyx mori*. A partir de estos datos, y los correspondientes a la composición iónica de la hemolinfa, Wyatt desarrolló un medio de cultivo sintético suplementado con 5% de hemolinfa. En 1962, Grace estableció las primeras cuatro líneas celulares derivadas de insectos lepidópteros, a partir de *Antheraea eucalypti*, utilizando un medio de cultivo similar al empleado por Wyatt. Posteriormente, se observó que estas células podían ser mantenidas en un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino en reemplazo de la tradicional hemolinfa (Wilkie y col., 1980). Actualmente, existen cientos de líneas celulares establecidas, la mayoría de ellas pertenecientes a los órdenes Díptera y Lepidóptera. En el cuadro I.2. se presentan algunas de las principales líneas celulares establecidas derivadas de tejidos insectos lepidópteros. El significativo incremento en el número de las líneas celulares de insectos durante las últimas décadas está directamente relacionado con el diseño de nuevos medios de cultivos (Caballero y col., 2001; Lynn, 1996; Lynn y Ferkovich, 2004).

Cuadro I.2.: Principales líneas celulares establecidas derivadas de insectos lepidópteros.

Insecto de procedencia	Líneas celulares
<i>Adoxophes arana</i>	FTRS-AoL1
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	UFL-AG-286
<i>Bombyx mori</i>	Bm-21E-HNUS
<i>Heliothis zea</i>	BCIRL-Hz-AM1; -AM2
<i>Heliothis virescens</i>	IPLB-HVT1
<i>Manduca sexta</i>	MRL-CH1; -CH2
<i>Spodoptera exigua</i>	UCR-SE-1
<i>Spodoptera frugiperda</i>	IPLB-Sf21AE; Sf-9
<i>Trichoplusia ni</i>	TN-368; BTI-TN5B1-4

I.3.1.1. La línea celular UFL-AG-286

La línea celular UFL-AG-286 fue establecida en la Universidad de Florida en febrero de 1986, por Sieburth y Maruniak, a partir de huevos embrionados de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Sieburth y Maruniak, 1988a). El cultivo primario se estableció utilizando TC-100, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 50 mg.l⁻¹ de gentamicina, como medio de cultivo. Además, se incorporó una solución 0,1M de cisteína para prevenir la melanización de las células. La suspensión celular fue colocada en una botella de cultivo de 25 cm². Al cabo de siete días, cuando el cultivo alcanzó la confluencia, se realizó el primer subcultivo. Luego, en el término de un año se llevaron a cabo un total de treinta pasajes celulares.

Luego del establecimiento de la línea celular UFL-AG-286, Sieburth y Maruniak procedieron a la caracterización de la misma. Así se determinó que un cultivo estático tenía que tener un inóculo celular inicial mínimo de 2×10^5 células viables.ml⁻¹, que la temperatura óptima de proliferación celular era 27° C y que el tiempo de duplicación estaba comprendido entre 142 horas y 161 horas, dependiendo del inóculo celular inicial

(3×10^5 células viables.ml⁻¹ y 2×10^5 células viables.ml⁻¹, respectivamente). Si se comparan estos resultados con los informados para otras líneas celulares de insectos caracterizadas hasta ese momento, se puede observar que son similares a los hallados para una línea celular de *Blattella germanica* (120 horas), pero mayores a los reportados para la línea celular IPLB-Sf-21 (26 y 30 horas) (Sieburth y Maruniak, 1988a).

Los primeros estudios de susceptibilidad y permisividad a la infección viral pusieron en evidencia que la línea celular UFL-AG-286 producía altos títulos de virus brotado cuando era infectada con AgMNPV o con AcMNPV (Sieburth y Maruniak., 1988b); sin embargo, por otro lado, era semipermissiva a la infección con SfMNPV (Hink y Hall, 1989). Posteriormente, en el año 2003, Lynn realizó un nuevo estudio comparativo sobre la susceptibilidad y la permisividad de la línea celular UFL-AG-286 a la infección con distintos baculovirus. Los títulos más elevados de viriones brotados se obtuvieron en los cultivos infectados con AgMNPV, aunque se obtuvo también replicación de AcMNPV y del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) (Lynn, 2003).

I.3.2. Medios de cultivo para líneas de células de insecto

I.3.2.1. Una breve reseña histórica

Como se mencionó en párrafos anteriores, Goldschmidt en 1915 y Glaser en 1917 fueron quienes por primera vez demostraron que era posible el cultivo *in vitro* de células de insectos. El medio de cultivo que utilizaban estos investigadores estaba constituido íntegramente por fluidos corporales de insectos, o por sus diluciones en soluciones salinas suplementadas con glucosa y con peptona. En 1928, Frew declaró que el mayor obstáculo en el desarrollo de cultivos de tejidos de invertebrados residía principalmente en el desconocimiento de la composición de la hemolinfa. Hasta ese momento, el mantenimiento de los cultivos de células dependía exclusivamente de los fluidos corporales de insectos (Benz, 1986).

El primer diseño de un medio de cultivo sintético para células de insectos se remonta al año 1956, cuando Wyatt y col. formularon un medio de cultivo sintético a partir del conocimiento de la composición de la hemolinfa de *Bombyx mori*. Este medio de cultivo contenía altas concentraciones de aminoácidos, ácidos orgánicos, sales inorgánicas y azúcares, y era suplementado con hemolinfa sometida a calentamiento para inactivar la enzima polifenol oxidasa. (Wyatt, 1961).

Al medio de cultivo formulado por Wyatt, Grace le adicionó vitaminas del complejo B. Este nuevo medio de cultivo, suplementado también con hemolinfa calentada, le permitió a Grace establecer la primera línea celular de invertebrados derivada de tejidos de ovarios de *Antheraea eucalypti* (Grace, 1962). La principal modificación del medio de cultivo original formulado por Grace fue realizada por Hink en 1970. Este investigador reemplazó la hemolinfa por una combinación de lactoalbúmina, extracto de levadura y suero fetal bovino como suplementos del medio, denominado TNM-FH. No obstante, se debe destacar que ya en años anteriores Mitsuhashi y Maramorosch habían observado que la suplementación de los medios de cultivos basales con hidrolizados proteicos ejercían efectos positivos sobre el mantenimiento y la proliferación de las líneas celulares de insectos (Mitsuhashi y Maramorosch, 1964). Una nueva modificación del medio de cultivo Grace dio origen al medio de cultivo TC-100, denominado en sus comienzos como BML-TC/10 (Gardiner y Stockdale, 1975). El mismo fue diseñado y optimizado para la producción de AcMNPV en cultivos celulares derivados de *Spodoptera frugiperda*. Respecto al medio de cultivo Grace, en el medio de cultivo TC-100 se eliminaron los ácidos orgánicos y la glucosa fue utilizada como única fuente de carbono. Como suplemento se adicionó, además del suero, una solución de caldo triptosa. Posteriormente, en 1981, Weiss diseñó un medio de cultivo para células de insectos más complejo que el medio de cultivo TC-100, denominado IPL-41 (Weiss y col., 1981). Básicamente, este medio de cultivo difiere del medio Grace original en cuanto a su mayor concentración de aminoácidos y vitaminas (Schlaeger, 1996a).

La suplementación de los medios de cultivo básicos con hemolinfa, y luego en forma generalizada con suero fetal bovino, es una importante limitación para el aumento de escala de los procesos de producción que hacen uso de los cultivos de células de insectos. Para superar los inconvenientes que acarrea el empleo de suero, que serán

explicados en detalle en el apartado **I.3.2.3.**, Röder (1982) utilizó como suplemento una emulsión de yema de huevo. Posteriormente, en 1989, Inlow y col. (1989) diseñaron, a partir del medio de cultivo IPL-41 un nuevo medio de cultivo libre de suero, denominado ISFM, suplementado con ultrafiltrado de extracto de levadura y una compleja mezcla lipídica. Ésta última estaba compuesta principalmente por aceite de hígado de bacalao y por Tween 80 como fuentes de ácidos grasos, colesterol como fuente de esteroides, y acetato de α -tocoferol como antioxidante. El uso de ésta formulación libre de suero se generalizó durante los últimos veinte años, y en la actualidad se dispone de varios medios de origen comercial, como el ExCell-401 y el Sf-900II, cuya composición deriva de esa formulación, pero el precio de estos medios es aún tan elevado que su uso es incompatible con la producción de baculovirus con fines insecticidas.

I.3.2.2. Medios de cultivo básicos para células de insectos

Para que sean posibles el mantenimiento y la proliferación celular, y la replicación viral, los medios de cultivo para células de insectos deben contener una mezcla balanceada de distintos componentes que se adecuen a los requerimientos nutricionales de la línea celular, antes y después de su infección. Se resumen a continuación los compuestos que generalmente están presentes en un medio de cultivo básico para células de insectos, así como también la información disponible sobre sus consumos, funciones y vías de aprovechamiento y metabolización.

a) Hidratos de carbono: Estos nutrientes constituyen la principal fuente de energía para las células animales en cultivo. En general, los medios para células de insectos contienen mezclas de hidratos de carbono. Así, por ejemplo, mientras el medio de cultivo TNM-FH contiene glucosa, fructosa y sacarosa, el medio IPL-41 contiene maltosa en lugar de fructosa. La esencialidad de un determinado hidrato de carbono depende de los requerimientos nutricionales de cada línea celular. En el año 1993, Ferrance y col. (1993) observaron que la línea celular Sf-9 era capaz de proliferar en un medio de cultivo similar al medio de cultivo IPL-41, pero conteniendo solamente glucosa, fructosa o maltosa; en cambio, no se observó proliferación celular cuando el medio de cultivo contenía solamente sacarosa. Sin embargo, este disacárido continúa incluyéndose en la formulación del IPL-41 con el fin de regular la osmolaridad del

medio de cultivo. Con respecto a la velocidad de consumo, Bédard y Kamen (1993) determinaron que la glucosa era el hidrato de carbono más rápidamente consumido por los cultivos de la línea celular Sf-9 en los medios TNM-FH, suplementado con suero, y Sf-900II, libre de suero. Similares observaciones se registraron para los cultivos de las líneas celulares BmN4 y M-BmN derivadas de *Bombyx mori*. Ambas líneas celulares metabolizan, en primer lugar, la glucosa registrándose en forma paralela la acumulación del lactato. Finalmente, cuando los niveles de glucosa son bajos las células comienzan, por un lado, a consumir lactato, y por otro, a metabolizar distintos aminoácidos, principalmente glutamina. Esto último trae como consecuencia un aumento en el pH del cultivo celular debido a la acumulación de amonio en el medio de cultivo (Wang y col., 1999). En referencia a los cambios que la infección por baculovirus produce sobre la demanda de glucosa, la información disponible es contradictoria. Mientras algunos investigadores encontraron que la demanda de glucosa no se modifica o inclusive disminuye, otros observaron un incremento en su consumo específico respecto a los cultivos sin infectar (Wong y col., 1994; Kamen y col. 1996; Radford y col., 1997; Rodas y col., 2005).

b) Aminoácidos: por supuesto, todos ellos forman parte de la estructura primaria de las proteínas celulares. En segundo lugar, algunos aminoácidos, como la glutamina, son utilizados como fuentes de energía. Por último, existen antecedentes que relacionan la prolongación de la viabilidad celular, durante la fase estacionaria de un cultivo, con la presencia de tirosina y metionina en el medio de cultivo (Mendonça y col. 1999; Claus y Sciocco, 2001). Según estudios llevados a cabo por Mitsuhashi, 15 aminoácidos son esenciales para el cultivo de células de insectos: arginina, cistina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina y valina (Mitsuhashi, 1989). Sin embargo, en trabajos posteriores se ha demostrado que la glutamina no es esencial para el cultivo de las líneas celulares Sf-9 y Sf-21, siempre y cuando se suplemente el medio de cultivo con glutamato y amonio (Öhman y col., 1996). Respecto a las velocidades de consumo, en la mayoría de los cultivos de células de insectos los aminoácidos más rápidamente consumidos son glutamina, serina, glutamato, aspartato y asparagina (Bédard y Kamen, 1993; Palomares y Ramírez, 1998). En relación a este último aminoácido, Donaldson y Shuler (1998) demostraron que el comienzo de la fase de crecimiento estacionaria de los cultivos de la línea celular Tn-5 en el medio Ex – Cell 405 coincidía con la depleción en la concentración de asparagina. Por último, es escasa y contradictoria la información con

la que se cuenta acerca de cómo modifica la infección con baculovirus el consumo de los aminoácidos presentes en un medio de cultivo (Claus y Sciocco, 2001).

c) Vitaminas: Estos compuestos son esenciales para la proliferación celular y el mantenimiento de la viabilidad celular. Si bien se cuenta con escasa información acerca de cómo ejercen las vitaminas su efecto sobre las células en cultivo, se ha descrito que algunas de ellos, entre las que se incluyen la colina, la biotina y el inositol, actúan como factores promotores del crecimiento de distintas líneas celulares de insectos (Mitsuhashi, 1989). Otras vitaminas que se han utilizado para suplementar medios de cultivo son ácido fólico, biotina, ácido pantoteico, piridoxina, riboflavina y tiamina (Liss, 1983).

d) Ácidos orgánicos: Algunos medios de cultivo, como Grace e IPL-41, contienen ácidos orgánicos en su formulación, tales como el ácido succínico, el ácido málico, el ácido fumárico y el ácido α -cetoglutárico. Estos ácidos orgánicos, a excepción del ácido succínico, son rápidamente consumidos en los cultivos de la línea celular Sf-9 en el medio TNM-FH (Bédard y Kamen, 1993). La esencialidad de los ácidos orgánicos depende fundamentalmente de la línea celular, ya que se ha observado proliferación celular en cultivos carentes de estos compuestos. (Claus y Sciocco, 2001).

e) Sales inorgánicas: Entre las funciones que cumplen estos compuestos se destacan la regulación de la presión osmótica y del pH, el mantenimiento de los potenciales de membrana y la acción positiva sobre la adhesión de las células al soporte cuando se cultivan en monocapa. Así, el potasio y el sodio regulan la presión osmótica, el calcio y el magnesio intervienen como co-factores en las reacciones enzimáticas y en la adhesión de las células al soporte, y el bicarbonato actúa como *buffer*. Existen, además, medios de cultivo suplementados con trazas de iones metálicos (hierro, cobre, manganeso, cobalto, zinc y molibdeno). Si bien se tiene conocimiento que estos iones actúan como co-factores enzimáticos en distintas reacciones bioquímicas, sus funciones específicas no están dilucidadas (Liss, 1983; Mitsuhashi, 1989).

I.3.2.3. El suero fetal bovino como suplemento en medios de cultivo para células de insecto

El suero fetal bovino (SFB) es una mezcla extremadamente compleja formada por componentes de alto y bajo peso molecular. Este suplemento le aporta al medio de cultivo hormonas, factores de adhesión, proteínas transportadoras, lípidos y minerales,

que por lo general no se encuentran en la formulación de un medio de cultivo básico (Barnes y Sato, 1980; Claus y Sciocco, 2001; Van der Valk y col., 2003). Su composición le confiere al suero la posibilidad de actuar como un suplemento que ejerce un efecto positivo sobre la proliferación celular, la replicación viral y la producción de proteínas recombinantes. Otras propiedades que se le han atribuido al suero son las de aportar al cultivo celular componentes *buffers* y detoxificantes, necesarios para mantener el pH e inhibir la acción de proteasas, respectivamente (Van der Valk y col., 2003). Hild y col. (1992) demostraron, a través de sus trabajos con la línea celular Sf-9, que el SFB se comporta como un limitante estequiométrico y cinético del crecimiento de los cultivos, resultados que ponen en evidencia que el suero posee propiedades nutricionales y promotoras de la proliferación celular, respectivamente. Se ha ensayado también la capacidad de otros sueros (humano, de caballo, de conejo y de pollo) como suplementos de los medios de cultivo para células de insectos, pero ninguno de ellos presentó ventajas frente al uso del suero de origen bovino (Mitsubishi, 1989).

Por último, si bien la suplementación con suero presenta innegables ventajas, su utilización trae aparejada una serie de inconvenientes, entre los que se destacan: el riesgo de contaminación con hongos, bacterias, virus y priones, el elevado costo, la variabilidad de lote a lote, la composición indefinida y la complejidad de los procesos de purificación de los productos de síntesis debida a la elevada concentración de proteínas que contiene el suero (Wu y col., 1988; Cruz y col., 1997).

I.3.2.4. Medios de cultivo libres de suero fetal bovino

A causa de los inconvenientes que ocasiona el empleo del SFB como suplemento de un medio de cultivo, desde hace varios años se ha comenzado a trabajar en el diseño de medios de cultivo libres de este suplemento.

En general, un medio de cultivo libre de suero está constituido por un medio básico, enriquecido con una mezcla de hidrolizados proteicos, extractos naturales, y una emulsión de lípidos y esteroides.

I) Hidrolizados proteicos y extractos naturales: Estos compuestos son obtenidos a partir de la digestión ácida o enzimática de distintos sustratos. En el primero de los

casos se obtienen aminoácidos libres, mientras que en la digestión enzimática el producto resultante es una mezcla de di-péptidos, tri-péptidos y péptidos de mayor tamaño. Los sustratos más utilizados para la generación de hidrolizados incluyen proteínas de la leche, proteínas de soja y proteínas de carne (Donaldson y Shuler, 1998; Franek y col., 2000). A continuación se detallan los hidrolizados proteicos y los extractos naturales más empleados como suplementos de medios de cultivos para células de insectos:

a) Hidrolizado de lactoalbúmina: se describió que este hidrolizado ejerce un efecto positivo sobre la proliferación de algunas líneas celulares (Mitsubishi, 1989). Su acción no se debería únicamente al aporte de aminoácidos ya que, cuando el hidrolizado de lactoalbúmina fue reemplazado por una mezcla de aminoácidos de composición química similar, el efecto desapareció. Este fenómeno estaría indicando que el hidrolizado de lactoalbúmina aporta, además de los aminoácidos, factores de crecimiento aún no identificados.

b) Ultrafiltrado de suero de leche: utilizado como suplemento del medio de cultivo Grace, no solo posibilitó la disminución de la concentración de suero, sino que también ejerció un efecto positivo sobre la proliferación de la línea celular Sf-9 y la replicación de AgMNPV (Batista y col., 2005).

c) Primatone RL: es un producto de la digestión enzimática de carne, empleado desde hace años para reducir o reemplazar al suero (Mizrahi, 1977; Zoom y col., 1979; Velez y col., 1986). Mediante su utilización se logró alcanzar altas densidades celulares y prolongar la viabilidad celular en cultivos en suspensión de distintas líneas celulares de mamíferos (Schumpp y Schlaeger, 1990; Schlaeger y Schumpp, 1992). Considerando estos antecedentes, Schlaeger desarrolló un medio de cultivo libre de suero enriquecido con una mezcla de Primatone RL, hidrolizado de lactoalbúmina y extracto de levadura que permitió la proliferación de la línea celular Sf-9 (Schlaeger, 1996b). Posteriormente, Ikonomou y col. (2001) desarrollaron un medio de cultivo libre de suero, al que denominaron YPR, que entre los suplementos contiene Primatone RL. Este medio de cultivo soportó la proliferación y la prolongación de la fase estacionaria de cultivos de las líneas celulares Sf-9 y BTI-Tn5B1-4. Ahora bien, el Primatone RL, como el hidrolizado de lactoalbúmina y el suero lácteo, tiene la desventaja de ser de origen animal; ello puede traer aparejado una serie de inconvenientes, entre los que se destacan la potencial contaminación con micoplasmas y priones.

d) Hidrolizado de soja: Donaldson y Shuler utilizaron este hidrolizado, junto con ultrafiltrado de extracto de levadura y una emulsión lipídica, para suplementar el medio de cultivo IPL-41. El medio de cultivo completo, denominado ISYL, permitió la proliferación de la línea celular BTI-Tn5B1-4 y la producción de la proteína fosfatasa alcalina humana recombinante (Donaldson y Shuler, 1998).

II) Extracto de levadura (“yeastolate”): es uno de los suplementos más utilizados como integrante de mezclas sustitutas del suero. El extracto es el producto de una digestión autolítica de levaduras, que provee aminoácidos, vitaminas, nucleótidos y otros nutrientes esenciales. Lee y Park (1994) informaron que la adición de extracto de levadura al medio de cultivo Grace, suplementado con 5% de SFB, incrementaba cuatro veces la densidad celular máxima de cultivos estáticos de la línea celular Sf-9. Posteriormente, Wu y Lee (1998) observaron que la densidad celular máxima alcanzada por cultivos de la línea celular Sf-9 en el medio IPL-41 suplementado con 4 g.l⁻¹ de yeastolate, fue similar a la alcanzada en el mismo medio suplementado con 2% de SFB. Si bien se sabe que los principales constituyentes del extracto de levadura son las vitaminas del complejo B y las bases púricas y pirimidínicas, no serían estos componentes los que ejercen, exclusivamente, el efecto positivo sobre la proliferación celular. Recientemente, Shen y col. (2007) atribuyeron el efecto positivo del extracto de levadura a oligopéptidos de alto peso molecular. Estos investigadores observaron un efecto positivo sobre la proliferación de la línea celular Sf-9 en el medio IPL-41 suplementado con una fracción de extracto de levadura de alto contenido de oligopéptidos.

El ultrafiltrado de extracto de levadura es un producto derivado del extracto de levadura, obtenido a partir de su filtración a través de una membrana con un corte nominal de 10000 dalton. Como consecuencia de este proceso, los componentes de mayor peso molecular (proteínas y factores de crecimiento) son excluidos; sin embargo, pequeños péptidos podrían actuar como factores de crecimiento. Ikononou y col. demostraron el efecto positivo de la adición de ultrafiltrado de extracto de levadura sobre cultivos de las líneas celulares BTI-Tn5B1-4 y Sf-9 en el medio YPR (Ikononou y col., 2001).

III) Lípidos: El suministro de lípidos y esteroides, de naturaleza hidrofóbica, en medios de cultivo de base acuosa, ha sido un problema de importancia para el desarrollo de tecnología en cultivos de células animales. En medios suplementados con suero, éste actúa como fuente natural de estos compuestos a través de la actividad de sus proteínas transportadoras de lípidos y esteroides. Sin embargo, cuando se utilizan medios libres de suero se debe recurrir a la preparación de microemulsiones conteniendo ácidos grasos, esteroides, vitaminas liposolubles y fosfolípidos, en condiciones tales que aseguren su disponibilidad para las células en cultivo.

En el año 1982, Röder empleó como fuente de lípidos una emulsión de yema de huevo. Este suplemento, adicionado al medio de cultivo TC-100, permitió la proliferación de la línea celular Sf-21 y la replicación de AcMNPV (Röder, 1982). Posteriormente, Maiorella y col. (1988) diseñaron una microemulsión constituida por ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao, Tween-80, colesterol y acetato de tocoferol; todos estos componentes fueron disueltos en etanol y, posteriormente, emulsionados en Pluronic F-68. La suplementación del medio de cultivo IPL-41 con esta microemulsión lipídica permitió obtener elevados niveles de producción del factor estimulante de macrófagos (MCS-F) expresado en cultivos de la línea celular Sf-9. Claus y col. lograron reducir la concentración de SFB de un 10% a un 1%, empleando como suplemento del medio de cultivo TC-100, una emulsión de lípidos extraídos de yema de huevo al 2%. En estos cultivos celulares también fue posible la replicación de AgMNPV. La producción de viriones no ocluidos fue similar a la hallada en cultivos suplementados con suero. Sin embargo, en el cultivo reducido en suero, la cantidad de poliedros producidos fue significativamente menor respecto a la hallada en el cultivo suplementado con 10% de SFB (Claus y col., 1993). Vaughn y Fan. (1997) determinaron que cultivos de la línea celular Sf-21, suplementados con una microemulsión lipídica de origen comercial, producían cantidades similares de ambas progenies de AcMNPV, respecto a las halladas cuando el medio de cultivo IPL-41 estaba suplementado con suero. Estos investigadores observaron además, que la actividad biológica de los poliedros que se obtuvieron en los cultivos libres de suero fue tres veces menor a la determinada para poliedros producidos en larvas de *Trichoplusia ni*.

Los inconvenientes más importantes que se han observado como consecuencia de la eliminación del suero como suplemento son:

a) El incremento de la fragilidad celular. Este fenómeno podría atribuirse al descenso en la densidad del medio de cultivo y, en consecuencia, al aumento del estrés mecánico sufrido por las células en cultivos en suspensión. Para superar este problema, a los medios de cultivo se les adiciona agentes tensioactivos como el polialcohol Pluronic F-68.

b) El aumento de la sensibilidad celular a las bajas temperaturas.

c) La disminución de la proliferación celular, la replicación viral y la producción de proteínas recombinantes. Estos fenómenos se relacionan directamente con la reducción de los factores que ejercen un efecto positivo sobre los procesos antes mencionados, y con la eliminación o falta de disponibilidad de componentes esenciales para el mantenimiento y la proliferación celulares.

I.3.3. Factores que condicionan la producción de baculovirus en cultivos de células de insectos

I.3.3.1. Procesos “batch”

La proliferación celular, la producción viral y la síntesis de proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos son condicionadas por un conjunto de variables. Entre ellas se destacan la composición del medio de cultivo, la edad y la condición metabólica de la población celular al momento de su infección, la multiplicidad de infección y la calidad del inóculo viral. A continuación se resumen las influencias de estas variables sobre la evolución de cultivos de células de insectos no infectados e infectados con baculovirus.

I.3.3.1.1. Concentración de nutrientes (glucosa, glutamina, otros aminoácidos)

a) Concentración de glucosa: el agotamiento de este nutriente en cultivos de células de insectos ha sido relacionado, por un lado, con la finalización de la fase de

crecimiento exponencial en cultivos “batch”; por otro lado, con la caída de la viabilidad celular. Estas observaciones hicieron suponer que la glucosa en un medio de cultivo actúa como un nutriente limitante de la proliferación celular (Kamen y col., 1991; Hild y col. 1992; Bédard y Kamen, 1993; Drews y col., 1995). Al parecer, este hidrato de carbono también actuaría como un limitante de la producción de proteínas recombinantes (Yamaji y col. 1999). Posiblemente este hecho se deba a la caída de la viabilidad celular observada en los cultivos luego del agotamiento de glucosa.

b) Concentración de glutamina: Öhman y col. (1996) investigaron la esencialidad de la glutamina para distintas líneas celulares. Así, observaron que la línea celular Sf-9 era capaz de proliferar y de producir la proteína recombinante β -galactosidasa en ausencia de glutamina, siempre y cuando al medio de cultivo se le agregara amonio bajo la forma, por ejemplo, de cloruro de amonio. También fue posible la proliferación celular de las líneas Sf-21 y MB 503 (*Mamestra brassicae*), bajo las condiciones antes descriptas. En contrapartida, la línea celular BTI-Tn5B1-4 no fue capaz de proliferar en un medio de cultivo libre de glutamina.

c) Concentración de otros aminoácidos: además de la glutamina, otros aminoácidos son utilizados como fuente de energía y empleados para la síntesis de proteínas. Ferrance y col. observaron que cultivos de la línea celular Sf-9 en el medio IPL-41 libre de suero entraban en fase de crecimiento estacionaria cuando la concentración de aminoácidos era muy baja (Ferrance y col., 1993). El mismo fenómeno fue reportado por Rhiel y col. cuando la asparagina se agotó en cultivos de la línea celular Tn-5 en el medio Sf-900II (Rhiel y col. 1997). Por último, Mendonça y col. advirtieron que la presencia de tirosina y metionina contribuían eran determinantes del mantenimiento de la viabilidad en cultivos de la línea celular Sf-9 (Mendonça y col., 1999). Respecto a la producción de proteínas recombinantes, Radford y col. observaron que la caída en la producción de β -galactosidasa coincidía con el agotamiento de la cisteína en el medio de cultivo. Estos resultados se obtuvieron al infectar cultivos de la línea celular Sf-9 con un AcMNPV recombinante, tanto en el medio IPL-41 suplementado con suero como en Sf-900 II (Radford y col., 1997).

I.3.3.1.2. Concentración de catabolitos (amonio, lactato)

a) Concentración de amonio: La acumulación de amonio en un cultivo de células animales es una de las principales causas de inhibición de la proliferación celular. El elevado nivel de amonio produce cambios de pH a nivel intracelular, afectando la actividad de numerosas enzimas y provocando, finalmente, la caída de la viabilidad celular (Ozturk y col., 1992; Ryll y col., 1994). También se ha observado que niveles de amonio superiores a 40 mM afectan la producción de proteínas recombinantes debido a problemas que, al parecer, se generan a nivel de la glicosilación. Estas observaciones fueron registradas por Donaldson y col. (1999) cuando trabajaron en la producción de fosfatasa alcalina humana recombinante a través de la infección de la línea celular Tn5B1-4 con un baculovirus modificado genéticamente.

b) Concentración de lactato: El lactato es un metabolito tóxico capaz de inhibir la proliferación de las células en cultivo y disminuir la viabilidad celular (Stavroulakis y col., 1991; Rhiel y col., 1997). Sus efectos negativos se basan en la acidificación del medio de cultivo y en el aumento de la osmolaridad (Ozturk y col., 1992). La acumulación o la ausencia del lactato en un cultivo parecen depender del metabolismo de la línea celular. Por ejemplo, algunos investigadores observaron que el lactato se acumuló en cultivos de la línea celular Tn-5, en tanto que no se registró acumulación de este metabolito en los cultivos de la línea celular Sf-9 (Rhiel y col., 1997; Benslimane y col., 2005). También se le ha atribuido al lactato la propiedad de ejercer un efecto negativo sobre la producción viral cuando se encuentra en elevadas concentraciones. Wu y col. (1993) observaron una importante caída en la producción de AcMNPV, en cultivos de la línea celular Sf-9 en el medio TNM-FH suplementado con suero, cuando la concentración acumulada de lactato en el cultivo alcanzó valores superiores a 40 mM.

I.3.3.1.3. Densidad celular al momento de la infección

La capacidad de obtener cultivos de elevadas densidades celulares ha sido considerada, con frecuencia, un requisito para el desarrollo de procesos económicamente factibles para la producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares. Sin embargo, existen distintos antecedentes que refieren acerca de que las productividades descendientes en los cultivos son infectados a alta densidad celular,

cuando alcanzaron las fases de crecimiento exponencial tardía o estacionaria. Este fenómeno fue observado, entre otros, por Stockdale y Gardiner al infectar con AcMNPV cultivos de la línea celular IPLB-Sf-21 (Stockdale y Gardiner, 1977); por Reuveny y col. (1993), y también por Lee y Park (1995), al emplear la línea celular Sf-9 para la producción de la enzima β -galactosidasa a través de la infección con un AcMNPV recombinante; por Visnovsky y Claus (1994) al trabajar con la línea celular IPLB-Sf-21 infectada con AgMNPV; y por Taticek y col. (2001) al infectar las líneas celulares IPLB-Sf-21 y Tn 5B-1-4 con un virus recombinante de AcMNPV. El descenso de la producción de virus o proteínas recombinantes en cultivos celulares “batch” de alta densidad podría deberse a distintas causas, entre ellas la disminución de la concentración de los nutrientes esenciales, la acumulación de metabolitos tóxicos o el aporte insuficiente de oxígeno (Lee y Park, 1995; Yamaji y col. 1999). Con el objeto de superar estos inconvenientes, distintos grupos de investigación plantearon diversas estrategias de trabajo. Por ejemplo, Lee y Park observaron que la producción de la enzima β -galactosidasa aumentaba cuando se adicionaba glutamina al medio de cultivo. Este resultado fue obtenido al trabajar con la línea celular Sf-9 en el medio de cultivo Grace suplementado con suero e infectado en la fase tardía de crecimiento (Lee y Park, 1995). Otros investigadores informaron que el descenso en la producción de proteínas recombinantes en cultivos infectados de células Sf-9 fue revertido al reemplazar parte del medio de cultivo envejecido por medio de cultivo fresco al tiempo de infección (Bédard y col., 1994; Radford y col. 1997). Estos ejemplos ilustran acerca de la importancia de la calidad del medio en el cual se encuentran en cultivo las células, en el momento en que son infectadas, y multiplican un baculovirus o producen una proteína recombinante.

I.3.3.1.4. Multiplicidad de infección

La multiplicidad de infección (MOI) y el tiempo de infección son factores que afectan en forma directa la producción de virus y de proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos. Por lo general, se han utilizado bajas MOI ($0,0001-1$ ufp.célula⁻¹) para infectar cultivos en la fase temprana del ciclo de proliferación celular. Luego de la infección viral, se pueden distinguir dos poblaciones celulares en estos cultivos: las células no infectadas y las células infectadas. En tanto estas últimas dejarían de proliferar, las células no infectadas continúan multiplicándose, si existe disponibilidad

de nutrientes y de oxígeno, por lo menos hasta que resulten infectadas por los viriones brotados generados en la población de células infectadas originalmente. Ahora, esta segunda generación de células resulta infectada en condiciones diferentes a la primera, diferencias que pueden condicionar la capacidad de producción de virus o proteína recombinante. El empleo de bajas multiplicidades de infección presenta la ventaja, por un lado, de disminuir el requerimiento de inóculo viral, una de las materias primas de mayor costo en los procesos de producción de virus; por otro lado, reduce la probabilidad de generar partículas defectivas interferentes (PDIs). Sin embargo, también presenta una serie de desventajas, particularmente importantes en los procesos de producción de proteínas recombinantes, como la exposición prolongada a la acción de las proteasas celulares (Palomares y Ramírez, 1998), y la necesidad de alimentar el cultivo con nutrientes agotados, si la proliferación de las células no infectadas originalmente produce un incremento significativo de la densidad celular.

Por otro lado, las MOI más altas (5-500 ufp.célula⁻¹) se utilizaron para infectar cultivos celulares en la fase de crecimiento exponencial tardía o estacionaria. La combinación de emplear alta MOI y tiempo de infección tardío acarrea como desventajas el aumento de la cantidad de inóculo viral requerido para la infección, y por otro lado favorecer la producción de PDIs. Además, se debe tener en cuenta que, como se describió previamente, la producción específica de virus y proteínas recombinantes desciende cuando los cultivos celulares son infectados a alta densidad celular. Para superar esta última limitación, puede ser necesario recurrir a estrategias de cultivo alternativas, como el “batch alimentado” o la perfusión, cuando no directamente al recambio de medio (Bédard y col., 1994; Palomares y Ramírez, 1998; Radford y col. 1997; Tsao y col., 1996).

I.3.3.1.5. Calidad del inóculo viral

La calidad del inóculo viral se relaciona en forma directa con la capacidad de replicación de los baculovirus en cultivos celulares, y por lo tanto con los rendimientos obtenidos y con la calidad del virus. Por ello, se debe prestar especial atención a la generación y propagación de variantes genómicas que originan bajos rendimientos virales o poliedros con virulencia reducida. Entre las variantes de virulencia reducida

generadas por pasajes repetidos en cultivos celulares se encuentran los fenotipos productores de pocos poliedros y las partículas defectivas interferentes (PDIs). Éstas últimas son mutantes virales de delección, capaces de infectar células pero incapaces de completar su ciclo de replicación, a menos que la célula sea co-infectada con el virus parental (De Gooijer y col., 1992; Kirkwood y Bangham, 1994). El pasaje repetido de baculovirus en cultivos celulares tiene como consecuencia un aumento de las PDIs y una rápida caída de los rendimientos virales. Este comportamiento, que recibe el nombre de efecto pasaje, es acelerado cuando los cultivos celulares se infectan a altas multiplicidades de infección. Por esta causa, está recomendado que los *stocks* virales sean producidos en cultivos celulares infectados a multiplicidades de infección comprendidas entre 0,01 y 0,1 UFP.ml⁻¹ (Claus y Sciocco, 2001). Así, al utilizar bajas multiplicidades de infección existe una alta probabilidad de que las células se infecten solo con una partícula viral (infecciosa o PDI), inhibiendo de esta manera la propagación de las PDIs.

Los fenotipos productores de pocos poliedros (FP) se han relacionado con mutaciones que ocurren a nivel de la región 25K (nt 48513 – 49155) del genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV). Katsuma y col. (1999) determinaron que mutaciones en esta región de BmNPV trajeron como consecuencia un descenso en la producción de poliedros. Estos investigadores observaron, además, que cuando infectaban larvas de *Bombyx mori* con poliedros mutantes, la licuefacción de los tejidos también era afectada. Otro grupo de investigadores refirió que en cultivos de la línea celular Sf-21 infectados con FP de AcMNPV se observa incremento en la producción de viriones brotados, caída en la cantidad de poliedros, descenso en la producción de viriones derivados de los cuerpos de oclusión, alteración en las membranas intranucleares, declive en la producción de transcritos de *polh* y una modificación en el transporte de la poliedrina en el núcleo (Braunagel y col. 1999). Por último, Lua y col. observaron que al cabo de seis pasajes sucesivos en cultivos celulares del virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), se obtenía un 100% de FP. El análisis del genoma de las FP evidenció mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o delecciones en la región 25K (Lua y col. 2002).

I.3.3.2. Metodologías alternativas: *fed-batch* y perfusión

Los cultivos en perfusión permiten prolongar la viabilidad del cultivo y alcanzar altas densidades celulares debido al continuo aporte de nutrientes y eliminación de metabolitos tóxicos. Otra ventaja que presenta esta metodología, específicamente cuando el proceso está destinado a la producción de una proteína recombinantes, es la de reducir el tiempo de permanencia de la proteína en el reactor, y por lo tanto su exposición a la degradación por acción de proteasas. Sin embargo, como contrapartida, los cultivos en perfusión presentan también una serie de desventajas. Wood y col. (1982) observaron que la productividad específica de AcMNPV en la línea celular Tn 368 cae abruptamente cuando se trabaja a altas densidades celulares. Similares resultados fueron observados por Chung y Shuler al producir fosfatasa alcalina humana en cultivos de la línea celular BTI-Tn 5B1-4 (Chung y Shuler, 1993). Por otra parte, la producción de partículas virales infecciosas en un cultivo perfundido decae con el tiempo, como así también la producción de proteínas recombinantes (Jäger, 1996).

Los cultivos en lote alimentado, o “fed batch”, constituyen otra opción que permite alcanzar elevadas densidades celulares en cultivos de algunas líneas de células de insectos. Esto se debe principalmente a que, a diferencia de los cultivos de células de mamíferos, estas células no son productoras de los metabolitos que son habitualmente tóxicos. Por ejemplo, Bédard y Kamen (1997) lograron alcanzar densidades celulares del orden de 3×10^7 células.ml⁻¹ en cultivos de la línea celular Sf-9. Por otra parte, se han reconocido una serie de ventajas que presenta el sistema de cultivo del tipo *fed-batch* respecto al de perfusión. Entre ellas se destacan el menor costo de producción, la simplicidad de la metodología de trabajo y la no necesidad de contar con un dispositivo que retenga las células (Elias y col. 2000). Sin embargo, esta metodología no resultaría apta para la intensificación de procesos que hagan uso de líneas de células de insectos que excretan metabolitos tóxicos.

I. 4. El virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*

I.4.1. Breve reseña histórica e importancia del virus como bioinsecticida

El primer aislamiento identificado de AgMNPV data del año 1977, cuando Carner y Turnipseed observaron la presencia de cuerpos de oclusión compatibles con virus de poliedrosis nuclear en los cuerpos grasos de larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Las mismas habían sido infectadas con poliedros extraídos de larvas de ese insecto que presentaban signos de infección viral, recolectadas en campos de soja del sur de Brasil. Las pruebas biológicas dieron como resultado una mortalidad del 96% de las larvas con una dosis de 174 poliedros por larva y un tiempo letal $_{50\%}$ de 9,2 días (Carner y Turnipseed, 1977). A partir de esta experiencia se planteó la posibilidad de utilizar AgMNPV como un virus insecticida para el control específico de la isoca de las leguminosas en los cultivos de soja en Brasil, a través de un proyecto implementado, a partir de 1980, por el *Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO-EMBRAPA)*, dirigido por Flavio Moscardi. En su fase piloto inicial, desarrollada sobre veintinueve campos de soja de los estados brasileños de Parana y Rio Grande Do Sul, se observó que la población de *Anticarsia gemmatalis* disminuía en un 80 % bajo tratamiento con AgMNPV, un porcentaje de control similar al hallado cuando los campos fueron tratados con insecticidas químicos (Moscardi, 1999). En forma paralela se desarrolló un proceso de producción del virus en larvas infectadas de *Anticarsia gemmatalis*, primero en parcelas de cultivos de soja y luego en bio-fábricas. Actualmente, este bioinsecticida es aplicado sobre más de cuatro millones de hectáreas anuales de cultivo de soja, transformándose en el ejemplo más exitoso de utilización de un agente entomopatógeno para el control de una plaga de un cultivo extensivo.

I.4.2. Características del virus

El virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* ha sido incluido dentro del grupo I dentro del género *Nucleopolyhedrovirus* (Zanotto y col., 1993). El prototipo de la especie es AgMNPV-2D (Maruniak y col., 1989), un aislamiento clonal obtenido a partir de un plaqueo de la población viral originalmente aislada en Brasil (Carner y Turnipseed, 1977). Si bien el genoma completo de

AgMNPV-2D fue secuenciado por de Castro Oliveira en el año 2006 (de Castro Oliveira y col., 2006), algunos de los genes individuales de este virus habían sido secuenciados y analizados con anterioridad: *polh* (poliedrina) (Zanotto, y col. 1992), *gp41* (Liu y Maruniak, 1999), *egt* (Rodrigues y col. 2001), *p10* (Razuck y col., 2002), *gp64* (Piloff y col. 2003; Slack y col. 2004); *v-trex* (Slack y Shapiro, 2004), *p143* (helicasa) (Lima y col. 2004).; *dnapol* (DNA polimerasa) (Dalmolin y col. 2005), *iap-3* (Carpes y col., 2005) y *p74* (Belaich y col. 2006). Por otra parte, la región homóloga *hr4* también había sido caracterizada por Garcia-Maruniak y col. (1996).

El genoma completo de AgMNPV-2D comprende 132.239 pb, con un contenido de C+G de 44,5 mol % (de Castro Oliveira y col., 2006). En el genoma viral se han identificado 152 marcos abiertos de lectura, de los cuales 24 codifican para proteínas estructurales conocidas. De la totalidad de estos genes estructurales, nueve de ellos son hallados en todos los baculovirus y seis en los baculovirus específicos de lepidópteros (Herniou y col. 2003). Por otro lado, se han identificado tres genes que codifican para proteínas anti-apoptóticas en el genoma de AgMNPV-2D: *iap-1* (ag-40), *iap-2* (ag-70), e *iap-3* (ag34) (de Castro Oliveira y col., 2006). Anteriormente, Carpes y sus colaboradores habían determinado que el gen *iap-3* codifica una proteína funcional anti-apoptótica (IAP) (Carpes y col., 2005). Las IAPs fueron halladas por primeras vez en los baculovirus (Crook y col. 1993). Sin embargo, luego fueron identificadas en varias especies de animales, incluyendo algunos insectos y el hombre (Clem, 1997; Uren y col., 1998). A diferencia de AcMNPV, el gen anti-apoptótico p35, que inhibe la actividad caspasa, no fue hallado en AgMNPV-2D.

A pesar de que los genes auxiliares no son esenciales para la replicación viral, le confieren al virus ciertas particularidades. Por ejemplo, los genes auxiliares *cathepsin* (Hill y col., 1995) y *chitinase* (Hawtin y col. 1995), hallados en la mayoría de los nucleopoliedrovirus de lepidópteros, no se encontraron en el genoma de AgMNPV-2D. La ausencia de estos genes podría ser la causa de la deficiente licuefacción de las larvas de *Anticarsia gemmatilis*, muertas por acción de AgMNPV. Cuando este virus es usado como bioinsecticida, las larvas tardan en morir entre 7 y 10 días. Posteriormente, sus cuerpos permanecen intactos aproximadamente otros dos días. Luego de este período, y bajo condiciones de humedad, los cadáveres se oscurecen y se destruyen como producto de la putrefacción. Sin embargo cuando el clima se presenta seco, los cuerpos de las

larvas permanecen intactos por más tiempo. Por otro lado, se ha identificado el gen *ag32*, que codifica para una superóxido dismutasa. Si bien su función no se conoce exactamente, podría proteger a los poliedros presentes en el medio ambiente de los radicales superóxidos generados por la exposición a la radiación ultravioleta (Ignoffo y Garcia, 1994).

I.4.3. Utilización como agente de control de la isoca de las leguminosas

La isoca de las leguminosas es la especie más importante del complejo de defoliadores que ataca los cultivos de soja. El daño provocado por esta plaga puede ser muy alto, llegando a reducir hasta un 40% el rendimiento del cultivo si no se aplica un control eficiente. Como se mencionó en apartados anteriores, AgMNPV es un patógeno que presenta elevada virulencia hacia las larvas de *Anticarsia gemmatalis*, insecto que por sus hábitos defoliadores presenta una alta exposición al virus. Sin embargo, está comprobado que estos insectos en la edad adulta, en general, no son infectados por AgMNPV. Los virus actúan en los primeros estadios de la fase larval, que son los más susceptibles a la infección. *Anticarsia gemmatalis* disminuye la susceptibilidad hacia el virus hasta en un 50% a partir del cuarto estadio. Por lo tanto, la mejor fase para la aplicación de AgMNPV es en larvas de los primeros tres estadios, es decir, cuando éstas son menores a 1.5 cm.

El control de la isoca de las leguminosas con AgMNPV favorece el establecimiento y el incremento de la entomofauna benéfica asociada al cultivo de soja. Esta población comprende alrededor de veinte organismos, entre depredadores, parasitoides y entomopatógenos. Este fenómeno se debe fundamentalmente a que AgMNPV no tiene ningún efecto negativo sobre estas especies benéficas. Otra ventaja que presenta AgMNPV es que no necesita de un equipo especial de aplicación, ya que se puede utilizar el mismo con el que se aplican los insecticidas convencionales. Sin embargo, se debe tener especial cuidado con el agua que se utiliza como vehículo. La misma no debe contener cloro debido a que esta sustancia inactiva el virus. Una de las principales desventajas que presenta el uso de AgMNPV, y que ha condicionado su empleo como bioinsecticida, es el largo período de tiempo entre la infección y la muerte

de la larva (7 – 10 días). Durante ese período la plaga continúa alimentándose y, en consecuencia, desfoliando el cultivo.

Desde la temporada 1989 / 1990, más de un millón de hectáreas de cultivos de soja fueron tratadas anualmente con AgMNPV. Actualmente, esta cifra asciende a cuatro millones de hectáreas (Moscardi y Santos, 2005). El éxito del programa brasileño se debe a una combinación de factores entre los que se destacan que la isoca de las leguminosas es normalmente la única especie plaga de importancia económica presente en el cultivo de soja; la existencia previa de un exitoso programa de manejo integrado de plagas, el cual facilitó la aceptación del virus por parte de los productores; disponer de un virus altamente virulento que posibilita emplear baja dosis de bioinsecticida (Cherry y Williams, 2001); un costo del bioinsecticida entre un 20% y un 30% menor a los insecticidas químicos; y la posibilidad de controlar la isoca de las leguminosa mediante una única aplicación anual, contra al menos dos aplicaciones cuando se emplean insecticidas químicos (Szewczyk y col. 2006). Finalmente se debe destacar que, desde el comienzo del programa brasileño, más de 17 millones de litros de insecticidas químicos no han sido volcados al ambiente (Moscardi y col. 2002).

I.4.4. Procesos de producción de AgMNPV

I.4.4.1. Producción *in vivo*

Inicialmente, el único método de producción *in vivo* de AgMNPV en Brasil, era en parcelas de cultivos de soja, a través de la aplicación del virus en una zona con elevada infestación de isocas. Hacia fines de los años noventa se destinaban aproximadamente 30.000 hectáreas de cultivos a la producción de AgMNPV. Las larvas de *Anticarsia gemmatalis*, muertas por acción de este virus, eran colectadas y conservadas en cámaras de frío hasta el momento de su procesamiento y formulación (Cherry y Williams, 2001). Sin embargo, en el año 1999 la producción de AgMNPV no fue suficiente para tratar los cultivos de soja debido a la creciente demanda de este bioinsecticida. A fin de superar este inconveniente, en noviembre de 2004, la Estación Experimental Agropecuaria del estado de Parana (Brasil) inauguró una “bio-fábrica” de

gran escala. La misma tiene una capacidad de producción de AgMNPV suficiente para el tratamiento de 1,3 a 1,5 millones de hectáreas de cultivos de soja. Actualmente, EMBRAPA Soja, Londrina, construyó una planta piloto con la finalidad, por una parte, de mejorar los procesos de producción de AgMNPV en los laboratorios; y por otra parte, para entrenar mano de obra especializada en la producción del virus (Szewczyk y col. 2006).

I.4.4.2. Producción *in vitro*

Si bien el programa de utilización de AgMNPV como bioinsecticida en el control de la isoca de las leguminosas es muy exitoso en Brasil, su empleo se encuentra muy condicionado por la capacidad de producción del virus. Actualmente, más de veinte millones de hectáreas se encuentran sembradas con soja en Brasil. Sin embargo, solamente cuatro millones de hectáreas son tratadas anualmente con AgMNPV. La producción *in vivo* de este virus está condicionada por factores bióticos y abióticos que inciden sobre la abundancia de *Anticarsia gemmatalis*. El desarrollo de bio-fábricas cada vez más eficientes puede permitir el incremento de la escala de producción del virus *in vivo*, pero difícilmente se pueda producir en la cantidad suficiente para cubrir totalmente el área sembrada. Alternativamente, el desarrollo de un proceso de producción *in vitro* podría permitir contar con una alternativa tecnológica cuya factibilidad técnica y económica crece con la escala de producción.

Existen algunos antecedentes acerca de la replicación de AgMNPV en distintas líneas de células de insectos heterólogas (Batista y col., 2005; Claus y col., 1993; Lynn y Oberlander, 1983; Rodas y col., 2005; Sieburth y Maruniak, 1988b; Visnovsky y Claus, 1994), pero los rendimientos virales alcanzados, principalmente de poliedros, no resultaron compatibles con el establecimiento de un proceso de producción factible. Por otro lado, también se ha ensayado la multiplicación del mismo en algunas líneas homólogas (Sieburth y Maruniak, 1988a; Grasela y McIntosh, 1998). Entre éstas, la línea celular UFL-AG-286, establecida por Sieburth y Maruniak en 1986, es la que presenta niveles de sensibilidad y permisividad a la replicación de AgMNPV que la tornan en candidata para desarrollar un proceso de producción *in vitro* de AgMNPV (Castro y col., 1997; Pombo y col., 1998; Sieburth y Maruniak, 1988b). Sin embargo,

esta línea celular sólo había sido cultivada en forma estacionaria, y no se conocía su potencial para el establecimiento de cultivos en suspensión, una condición necesaria para el desarrollo de un proceso de producción escalable para un baculovirus insecticida de bajo costo. Además, había sido cultivada sólo en medios de cultivo convencionales, suplementados con suero, y tampoco se conocía su aptitud para adaptarse a un medio libre de suero de bajo costo. Por último, tampoco se conocían sus características metabólicas particulares, cuyo conocimiento es una herramienta valiosa en el diseño de un proceso de producción viral en cultivos celulares.

I. 5. Justificación del tema de tesis

Poco conocida a principio de los 70, la soja es hoy la oleaginosa más difundida del país y, con sus derivados, el principal producto de exportación argentino. Nuestro país figura como el principal exportador de aceite de soja, y como segundo proveedor mundial de los subproductos proteicos de este cultivo. El importante aumento de la producción se ha logrado no solo con los incrementos de la superficie sembrada, sino también con rendimientos unitarios que se ubican entre los más altos del mundo. Esa producción agrícola ha impulsado el desarrollo de una estructura industrial para la elaboración de aceites y harina que ha ganado rápidamente participación en el mercado internacional de estos productos, localizada en las áreas de producción y equipada con las más modernas tecnologías a nivel mundial.

Después del algodón, la soja es el cultivo que sufre los mayores ataques de plagas, principalmente de insectos. Por esta razón, es el cultivo que requiere más insecticidas para su protección, respecto a otros cereales y oleaginosas. Bien conocidas son las consecuencias negativas, sobre el ambiente y el hombre, que trae aparejada la utilización de insecticidas químicos.

En la actualidad, la producción de AgMNPV con fines bioinsecticidas es llevada a cabo *in vivo*. Este proceso puede desarrollarse a través de dos métodos. Uno de ellos consiste en la infección de las larvas de *Anticarsia gemmatalis* que se encuentran en parcelas de cultivos de soja destinadas para este fin. La otra posibilidad permite la producción de AgMNPV en insectarios instalados como pequeñas bio-fábricas virales. Si bien la producción *in vivo* constituye la única posibilidad actual de obtener

AgMNPV, el proceso presenta una serie de desventajas entre las que se destacan el alto requerimiento de mano de obra, la dependencia de la abundancia del insecto huésped, el control de calidad del producto y las dificultades para escalar los procesos a los niveles requeridos por el aumento de la demanda.

Una alternativa a la producción *in vivo* la constituye la producción del virus en cultivos celulares. Se ha informado que la línea celular UFL-AG-286 presenta una elevada susceptibilidad a la infección y permisividad a la replicación de AgMNPV. La disposición de una tecnología factible para la producción *in vitro* de AgMNPV abriría una opción para promover el control biológico o integrado en la protección de los cultivos de soja y, por lo tanto, el cuidado ambiental. Sin embargo, un sistema de producción *in vitro* será competitivo desde el punto de vista técnico y económico, siempre y cuando reúna una serie de requisitos. Entre ellos se destacan el conocimiento del comportamiento cinético y metabólico de la línea celular utilizada en el proceso de producción, el empleo de medios de cultivo de bajo costo, la determinación de la influencia de las condiciones de infección de un cultivo celular sobre la producción viral y la capacidad de generar productos virales biológicamente activos.

II. Objetivos

II.1. Objetivo general

Caracterizar la línea celular UFL-AG-286 y desarrollar un proceso de producción del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* en cultivos de esa línea celular.

II.2. Objetivos específicos

a) Identificar y cuantificar los principales nutrientes utilizados en cultivos de la línea celular UFL-AG-286.

b) Caracterizar el comportamiento metabólico de las células UFL-AG-286.

c) Diseñar un medio de cultivo básico que se ajuste a los requerimientos nutricionales de la línea celular UFL-AG-286.

d) Estudiar los efectos ejercidos por hidrolizados y extractos de bajo costo sobre la proliferación de células UFL-AG-286 y la aptitud para replicar el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*.

e) Diseñar un medio de cultivo completo, libre de suero fetal bovino, para la línea celular UFL-AG-286.

f) Estudiar la influencia de las condiciones de infección sobre la producción de ambas progenies virales del AgMNPV.

g) Evaluar la actividad biológica de los poliedros de AgMNPV obtenidos a partir de la infección de cultivos de la línea celular UFL-AG-286 en un medio de cultivo completo libre de suero.

III. Material es y Métodos

III.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular UFL-AG-286 que fuera establecida por Sieburt y Maruniak en el año 1986 (Sieburt y Maruniak, 1988). Las células empleadas fueron cedidas por el Dr. Victor Romanowski del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La línea celular fue enviada y mantenida en monocapa en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie en el medio de cultivo TC-100 (Gardiner y Stockdale, 1975) suplementado con 10% de suero fetal bovino.

III.1.1. Medios de cultivo

III.1.1.1. Agua

Todas las soluciones y los medios de cultivo se prepararon con agua bidestilada, previa desionización.

III.1.1.2. Tipos de medios de cultivo

- TC-100 (Gardiner y Stockdale, 1975) para preparar 900 ml de medio de cultivo provisto como droga en polvo por GIBCO[®] (Cat. 11600-053).

- IPL-41 (Weis y col., 1981) para preparar 900 ml de medio de cultivo provisto como droga en polvo por Sigma[®] (Cat. 440-1400EB).

- Sf-900II, provisto por Invitrogen-GIBCO[®] (Cat. 10902-088) como medio de cultivo comercial libre de suero apto para el cultivo de células de insectos.

- UNL: serie de medios de cultivo básicos diseñados en el laboratorio de Virología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, de acuerdo con los requerimientos nutricionales de la línea celular saUFL-AG-286.

III.1.1.3. Hidrolizados proteicos y extractos naturales

- Hidrolizado enzimático de lactoalbúmina (Sigma[®], Cat. L-4896).
- Peptona de soja tipo III (Sigma[®], Cat. P-1265).
- Digesto papaínico de soja (DMV[®], Cat. B913 990855-1).
- Extracto de levadura (Difco[®], Cat. 5577-15-5).
- Ultrafiltrado de extracto de levadura (Sigma[®], Cat. Y-4375).
- Infusión cerebro-corazón (Difco[®], Cat. 0037-01-6).
- Extracto de hígado (Difco[®], Cat. 0133-01-9).
- Primatone (Quest[®]).
- Peptona de carne (Fluka[®], Cat. 70175).
- Hidrolizado enzimático de caseína N-Z-Case Plus (Sigma[®], Cat. N-4642).
- Caldo triptosa fosfato (Sigma[®], Cat. T-9157).

III.1.1.4. Suplementos

- Suero fetal bovino provisto por Bioser[®] (Cat. A 15-042).
- Concentrado lipídico químicamente definido de origen comercial provisto por Invitrogen-GIBCO[®] (Cat. 11905-031). El medio de cultivo se suplementa a razón de 1 ml de concentrado lipídico por cada 100 ml de medio.

III.1.1.5. Preparación de soluciones

III.1.1.5.1. Solución concentrada de aminoácidos solubles

L-alanina	2,25 g
L-arginina	5,5 g
Acido L-aspártico	3,5 g
L-asparagina	3,5 g
Acido L-glutámico	6,0 g
L-glutamina	6,0 g
L-glicina	6,5 g
Clorhidrato de L-histidina	33,8 g

L-isoleucina	0,5 g
L-leucina	0,75 g
Clorhidrato de L-lisina	6,25 g
L-metionina	0,5 g
L-prolina	3,5 g
L-fenilalanina	1,5 g
L-serina	5,5 g
L-treonina	1,75 g
L-valina	1,0 g
H ₂ O _{dd} csp	1000 ml

III.1.1.5.2. Solución concentrada de aminoácidos insolubles

L-cisteína	0,22 g
L-tirosina	0,5 g
L-triptofano	1,0 g
Acido Clorhídrico 2 N	50 ml
H ₂ O _{dd} csp	1000 ml

III.1.1.5.3. Solución de vitaminas IPL-160

Clorhidrato de tiamina	0,02 g
Pantotenato de calcio	0,11 g
Clorhidrato de piridoxina	0,02 g
Acido p-aminobenzoico	0,02 g
Acido fólico	0,02 g
Acido nicotínico	0,02 g
i-inositol	0,02 g
Cianocobalamina	0,02 g
Riboflavina	0,02 g
Biotina	0,01 g
H ₂ O _{dd} csp	1000 ml

III.1.1.5.4. Solución concentrada de ácidos orgánicos

Acido fumárico	0,220 g
Acido α ceto-glutárico	1,500 g
Acido L (-) málico	2,700 g
H ₂ O _{dd} csp	1000 ml

III.1.1.6. Preparación de medios de cultivo

III.1.1.6.1. TC-100

El polvo para preparar el medio de cultivo se coloca en un vaso de precipitado de 2 litros conteniendo 850 ml de agua bidestilada.

Se añade 0,35 g de bicarbonato de sodio.

Se ajusta el pH a 6,23 con una solución de hidróxido de potasio 10 N.

Se lleva la solución a 900 ml con agua bidestilada.

Se esteriliza el medio de cultivo con un equipo de vacío, utilizando como filtro una membrana de acetato de celulosa de 0,2 micras de tamaño de poro. El medio de cultivo estéril se recoge en un kitasato de 2 litros de capacidad.

Posteriormente, se trasvasa a botellas estériles de 500 ml, y se conserva a 4° C hasta el momento de su utilización.

III.1.1.6.2. IPL-41

El polvo para preparar el medio de cultivo se coloca en un vaso de precipitado de 2 litros conteniendo 800 ml de agua bidestilada.

Se añade 0,35 g de bicarbonato de sodio.

Se ajusta el pH a 6,23 con una solución de hidróxido de potasio 10 N.

Se lleva a un volumen de 900 ml con agua bidestilada.

Se esteriliza el medio de cultivo con un equipo de vacío, utilizando como filtro una membrana de acetato de celulosa de 0,2 micras de tamaño de poro. El medio de cultivo estéril se recoge en un kitasato de 2 litros de capacidad.

Posteriormente, se trasvasa a botellas estériles de 500 ml, y se conserva a 4° C hasta el momento de su utilización.

III.1.1.6.3. UNL

En un vaso de precipitado de 1 litro conteniendo 290 ml de agua bidestilada se disuelven los siguientes aminoácidos: glutamina (2,4g); asparagina (0,21g); serina (0,125g); alanina (0,08g); metionina (0,145g); leucina (0,01g).

Posteriormente, se agregan las siguientes soluciones:

- 10 ml de la solución de aminoácidos solubles.
- 19 ml de la solución de vitaminas IPL-160.
- 100 ml de una solución conteniendo: cloruro de potasio (2,9g); cloruro de calcio di-hidratado (1,3g); glucosa (7,0g).
- 50 ml de una solución de cloruro de magnesio hexa-hidratado (2,3g).
- 50 ml de una solución de sulfato de magnesio (1,37g).

Se ajusta el pH a 6,29 con una solución de ácido clorhídrico 1 N ó de hidróxido de potasio 10 N.

Inmediatamente, se incorporan los siguientes componentes:

- 50 ml de una solución salina conteniendo fosfato di-ácido de sodio (0,88g); carbonato ácido de sodio (0,35g).
- 90 ml de una solución de L-tirosina (0,011g).
- 10 ml de la solución de aminoácidos insolubles.
- 10 ml de solución de ácidos orgánicos.
- 100 µl de solución de cloruro de colina (200 g/l).
- 100 µl de sulfato ferroso.7 H₂O (27,5 mg/l).
- 100 µl de ácido molíbdico amoniacal.4H₂O (2 mg/l).
- 200 µl de cloruro de cobalto.6H₂O (2,5 mg/l).
- 60 µl de cloruro cúprico (anhidro) (7,9 mg/l).
- 50 µl de cloruro de manganeso.4H₂O (1 mg/l).
- 150 µl de cloruro de zinc (2 mg/l).

Se lleva a un volumen de 800 ml con agua bidestilada.

Se ajusta el pH a 6,23 con una solución de ácido clorhídrico 1 N ó de hidróxido de potasio 10 N.

Se completa el volumen a 900 ml con agua bidestilada.

El medio se esteriliza con un equipo de vacío, utilizando como filtro una membrana de acetato de celulosa de 0,2 micras de tamaño de poro.

Posteriormente, se trasvasa a botellas estériles de 500 ml, y se conserva a 4° C hasta el momento de su utilización.

III.1.1.6.5. UNL-5

Medio de cultivo UNL suplementado con 3 mg.ml⁻¹ de hidrolizado de caseína N-Z Case Plus, 1 mg.ml⁻¹ de caldo triptosa fosfato y 1 mg.ml⁻¹ de ultrafiltrado de extracto de levaduras.

III.1.1.6.4. UNL-8

Medio de cultivo UNL-5 (libre de UFEL) suplementado con 3 mg.ml⁻¹ de extracto de levaduras y 1% de concentrado lipídico químicamente definido de origen comercial provisto por Invitrogen-GIBCO® (Cat. 11905-031)

III.1.2. Material para cultivos celulares

III.1.2.1. Material de plástico

- Frascos de 25 cm² (Greiner Bio-one®, Cat. 690160).
- Placas de 24 pozos (Greiner Bio-one®, Cat. 662160).
- Placas de 96 pozos (Greiner Bio-one®, Cat. 655180).

III.1.2.2. Material de vidrio

- Botellas de vidrio con tapa a rosca de bakelita (forma: cilíndrica; capacidad: 100 ml; volumen de trabajo: 10 ml).
- Frascos de vidrio borosilicato con agitador magnético pendular marca Techne[®], modelo F7609 (capacidad nominal: 500 ml).

III.1.3. Acondicionamiento del material

III.1.3.1. Lavado

Para el lavado del material de vidrio se empleó una solución al 1% de detergente no iónico (DB-79[®], Laboratorio Rivero).

Las botellas de vidrio se dejaron en remojo durante 24 horas. Posteriormente, se cepillaron y enjuagaron, primero con agua de red y luego con agua desionizada.

Luego de su tratamiento con una solución de detergente, las pipetas se traspasaron a un lavador de pipetas a sifón conectado al sistema de agua de red, donde permanecieron en enjuague durante 24 horas; posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua desionizada (tiempo de cada enjuague: 24 horas), y se secó en estufa a 40°C.

III.1.3.2. Preparación y esterilización

A cada pipeta se le incorporó un tapón de algodón en su boquilla; luego, se distribuyeron en cilindros de aluminio de acuerdo a su volumen. La esterilización se realizó en estufa a 200° C durante 3 horas.

Las botellas de vidrio, las probetas, los tubos plásticos y las puntas de las micropipetas se esterilizaron por calor húmedo, autoclavando el material durante 30 minutos a 1 atmósfera de presión.

III.1.4. Cultivos celulares tipo batch

III.1.4.1. Cultivos con células adheridas

La línea celular saUFL-AG-286 fue mantenida en cultivos en monocapa en frascos de 25 cm² de superficie, utilizando distintos medios de cultivo. Cada botella, con 5 ml de cultivo, se incubó a 28° C en una estufa de cultivo marca Dalvo[®]. Los pasajes celulares se realizaron cuando se alcanzó un 80-90% de confluencia celular. Para ello, se despegaron las células adheridas a la superficie por acción mecánica, se homogeneizó la suspensión celular por pipeteos sucesivos y se tomó una alícuota de 0,5 ml. La misma se transfirió a otra botella que contenía 4,5 ml de medio de cultivo fresco.

III.1.4.2. Cultivos en suspensión

Los cultivos celulares se mantuvieron en suspensión utilizando dos tipos de agitación. Por un lado, se usaron frascos de vidrio con agitador magnético pendular de 500 ml de capacidad, los que se colocaron sobre una plataforma de agitación marca Techne[®]. La misma se reguló a una velocidad de agitación de 80 revoluciones por minuto y se colocó en una estufa de incubación a 28° C. El volumen de trabajo fue de 30 ml y el inóculo celular de 3×10^5 células viables.ml⁻¹, a menos que se especificara otra densidad celular inicial. Los pasajes se realizaron cuando el cultivo celular alcanzó una densidad comprendida entre $1,5 \times 10^6$ y $2,0 \times 10^6$ células viables.ml⁻¹. Por otro lado, los cultivos se mantuvieron en suspensión en botellas de vidrio cilíndricas, de 100 ml de volumen nominal, bajo agitación orbital en un agitador marca Thermo Forma[®] modelo 4520. Este equipo permite la regulación de la temperatura (28° C) y de la velocidad de agitación (100 revoluciones por minuto). Estos cultivos fueron iniciados a una densidad celular de 3×10^5 células viables.ml⁻¹, empleando como volumen final de trabajo 10 ml. Los pasajes se realizaron cuando el cultivo alcanzó una densidad comprendida entre $1,0 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^6$ células viables.ml⁻¹.

III.1.5. Recuentos celulares

III.1.5.1. Recuento de células totales, no viables y viables

En un tubo de plástico de 1,5 ml de volumen se colocó 10 μ l de una solución de Azul de Trypan 0,4 %. Posteriormente, se agregó 45 μ l de una solución de PBS 1% y 45 μ l de la suspensión celular a cuantificar. Se homogeneizó suavemente y se cargaron ambas hemicámaras de una cámara de recuento globular de Neubauer. El recuento celular se realizó por observación en un microscopio Olympus® modelo CK2 con un aumento 10X de objetivo y 10X de ocular. Se cuantificó el número de células totales y no viables (células teñidas de azul) en los cuatro cuadrados de los extremos del retículo de ambas hemicámaras. Las densidades celulares se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

- Densidad de células totales (células totales. ml^{-1}) = recuento promedio \times $\text{dil}^{-1} \times 1 \times 10^4$.
- Densidad de células no viables (células muertas. ml^{-1}) = recuento promedio \times $\text{dil}^{-1} \times 1 \times 10^4$.
- Densidad de células viables (células viables. ml^{-1}) = células totales. ml^{-1} – células no viables. ml^{-1} .

III.1.5.2. Cuantificación colorimétrica de células viables

El equipo comercial provisto por Promega®, denominado Cell Titer 96® (Cat. G-5421), permite determinar el número de células viables a través de un método colorimétrico. Este equipo provee un compuesto salino tetrazólico (MTS) y un reactivo dador de electrones (PMS). La reacción está basada en la reducción del MTS por parte de las enzimas deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas, en un producto soluble coloreado denominado formazán. La cantidad de formazán producido es cuantificado espectrofotométricamente a 490 nm de absorbancia, siendo este valor directamente proporcional al número de células viables presentes en un cultivo celular.

Para cuantificar las células viables mediante esta técnica, en primer lugar se debió realizar una curva de calibrado. Con este fin se partió de un cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-1 suplementado con 10% de SFB. Luego de la cuantificación celular, se realizaron diluciones seriadas al medio de la suspensión celular. En todos los casos, la densidad de células viables se determinó mediante el uso del colorante de exclusión azul de trypan. Posteriormente, se dispensaron 100 μ l de cada muestra, por quintuplicado, en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Seguidamente, se colocaron, en cada pocillo, 20 μ l de la mezcla MTS-PMS. Los cultivos en la placa se incubaron durante 3 horas a 28° C. Finalmente, la cantidad de formazán se cuantificó a 490 nm en un espectrofotómetro marca Molecular Devices® modelo Emax.

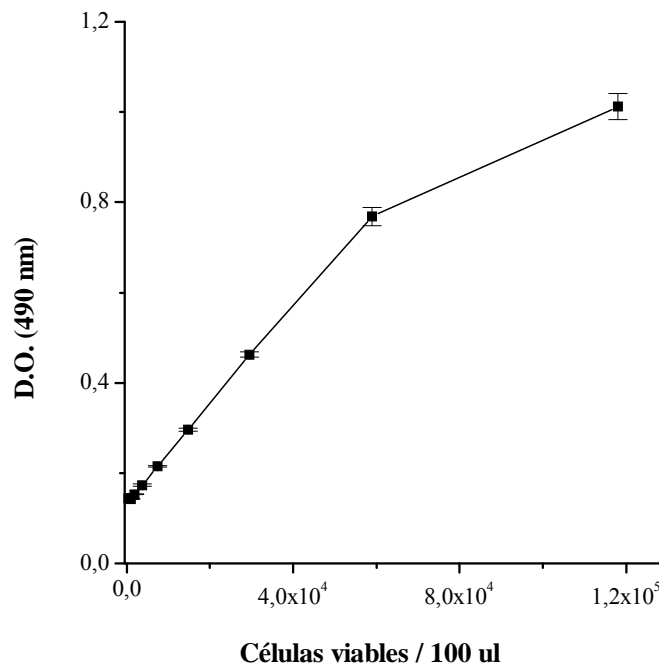


Figura III.1.: Curva de calibrado para la determinación de células viables empleando la técnica de reducción de MTS.

Para evaluar la proliferación celular, se sembraron alícuotas de 100 μ l de cultivos con una densidad celular inicial de 2×10^5 células viables. ml^{-1} en pocillos de placas de cultivos de 96 orificios. Éstas se incubaron a 28° C durante 120 horas, y al cabo de este tiempo, se colocó en cada pocillo 20 μ l de la mezcla reactiva MTS-PMS. El tiempo de incubación (cultivo celular – mezcla MTS + PMS) y la lectura

espectrofotométrica se llevó a cabo de forma similar a la descrita en el párrafo anterior. La densidad de células viables se determinó mediante el empleo de la curva de calibrado (figura II.1.).

III.1.6. Cuantificación de nutrientes y metabolitos

Las concentraciones de los nutrientes y de los metabolitos se determinaron en los sobrenadantes de cultivo. Para ello, una alícuota de cultivo se centrifugó en una microcentrífuga marca Biofuge *pico*[®] a 13000 rpm durante 1 minuto. Los sobrenadantes se conservaron a -20° C hasta el momento de realizar las respectivas determinaciones.

III.1.6.1. Dosaje de la concentración de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó empleando un equipo enzimático provisto por Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). Este método se basa en la oxidación enzimática de la glucosa, por parte de la glucosa oxidasa, a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último, en presencia de peroxidasa, produce la copulación oxidativa del fenol con el reactivo 4-amino fenazona, formando un compuesto coloreado proporcional a la concentración de glucosa, que se cuantificó espectrofotométricamente a 505 nm en un espectrofotómetro marca Beckman[®] modelo DU 530. Previo a la cuantificación de la glucosa presente en las muestras, se construyó una curva de calibrado que resultó lineal hasta una concentración de 23 mM de glucosa (figura 2.). Si la concentración de la glucosa superaba este valor, la muestra se diluía al medio con agua bidestilada.

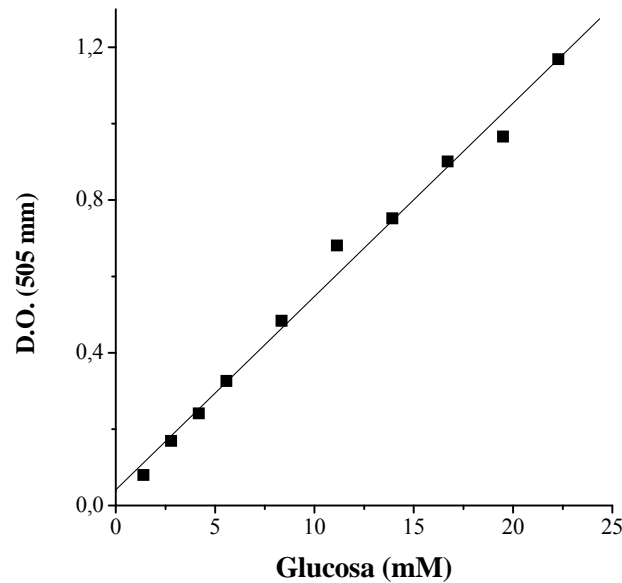


Figura III.2.: Curva de calibrado para la determinación de la concentración de glucosa.

III.1.6.2. Dosaje de la concentración de glucosa y de lactato mediante el empleo de autoanalizador

Alternativamente, las concentraciones de glucosa y lactato, se determinaron con un analizador automático de glucosa y lactato, modelo YSI 2700[®] (Yellow Spring Instruments, EEUU de Norteamérica), basado en métodos enzimáticos. Las enzimas (glucosa oxidasa y lactato oxidasa) están inmovilizadas, cada una por separado, en una membrana que se coloca sobre un electrodo. La glucosa y / o el lactato de la muestra fluyen a través de la membrana y reaccionan con la enzima respectiva produciendo peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es oxidado electroquímicamente en el ánodo de plata del electrodo, originando una señal eléctrica cuya intensidad es proporcional a la concentración de cada sustrato. En el *display* del equipo se indica la concentración del analito en las unidades previamente seleccionadas, pudiéndose analizar muestras entre 0.05 y 20 g.l⁻¹ de glucosa y 0.05 y 2g.l⁻¹ de lactato.

III.1.6.3. Dosaje de la concentración de aminoácidos

La cuantificación de los aminoácidos presentes en un cultivo celular se llevó a cabo en *Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung GMBH, Inhoffenstr*, Braunschweig, Alemania, por gentileza del Dr. Voller Jäger y el Sr. J. Hammer. La determinación se realizó por un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia en una columna de fase reversa, con derivatización previa con o-ftaldialdehído. A través de este ensayo, se cuantificaron los siguientes aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, serina, histidina, glutamina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, triptofano, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

III.1.6.4. Dosaje de la concentración de amonio

Para la cuantificación del amonio se utilizó un equipo comercial provisto por Laboratorio Wiener (Rosario, Argentina), basado en la reacción de Berthelot, donde el amonio, en presencia de fenol e hipoclorito de sodio, produce un compuesto coloreado (azul de indofenol) que es cuantificado espectrofotométricamente a 540 nm.

Previo a la cuantificación del amonio presente en las muestras, se construyó una curva de calibrado, empleando una solución de sulfato de amonio. La curva resultó lineal hasta la máxima concentración de amonio ensayada (60 mM).

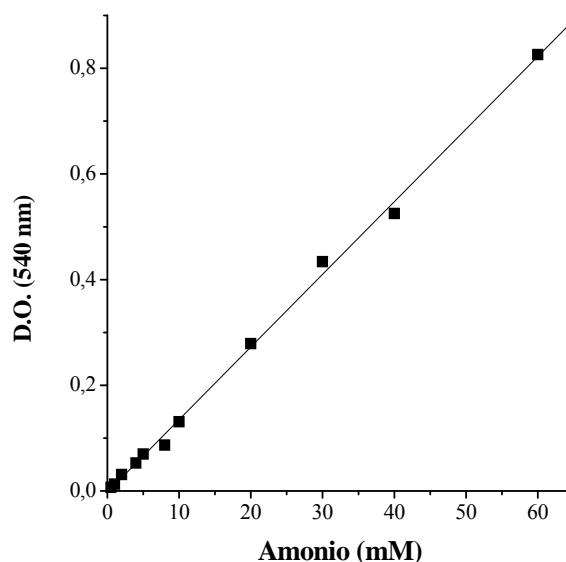


Figura III.3.: Curva de calibrado para la determinación de la concentración de amonio.

III.2. Virus

Se empleó una cepa del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, aislada en la Estación Experimental Oliveros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, gentilmente cedido por la Prof. Sara Lorenzatti (Claus y col., 1993).

III.2.1. Preparación de stock de AgMNPV

Los *stocks* virales se obtuvieron a partir de la infección con AgMNPV de cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB. Los cultivos, de densidad 2×10^5 células viables. ml^{-1} , se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,05 $\text{DICC}_{50\%}$.célula $^{-1}$. Durante la primera hora de incubación a 28° C, los cultivos se agitaron suavemente cada 15 minutos para lograr una adecuada homogenización del inóculo viral. Los cultivos infectados se observaron diariamente y se cosecharon cuando el efecto citopático alcanzó aproximadamente al 90% de las células. Cada cultivo se trasvasó a un tubo cónico de plástico de 15 ml de capacidad y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente, se colocó el sobrenadante en otro tubo cónico de plástico y se centrifugó a 5.000 rpm durante otros 5 minutos. Ambas centrifugaciones se realizaron a 4° C en una centrífuga marca Beckman Coulter® modelo Allegra 2IR. Finalmente, alícuotas de 100 μl de los sobrenadantes se fraccionaron en tubos cónicos de plástico y se conservaron a -80° C.

III.2.2. Cuantificación viral

III.2.2.1. Titulación de virus brotado de AgMNPV

El título de virus brotado se determinó a través de una técnica de dilución límite y punto final. En primer lugar, a una alícuota del sobrenadante de un cultivo infectado, previamente centrifugado, se le realizaron una serie de diluciones decimales (10^0 - 10^{-9}). Como solución diluyente, se empleó el medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB. Posteriormente, se sembraron 50 μl de una suspensión celular (4×10^5 células

viables.ml⁻¹) en cada pocillo de una placa de cultivos celulares de 96 orificios. A continuación, se dispensaron, por quintuplicado, 50 µl por pocillo de cada dilución de la muestra a titular. El control se realizó sembrando por quintuplicado 50 µl de la suspensión celular y 50 µl del medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB. Las placas se incubaron a 28° C durante 7 días. Un pocillo fue considerado positivo cuando se observaba en el microscopio óptico al menos una célula con presencia de poliedros. Al cabo de los 7 días de incubación, los pocillos negativos y dudosos se replicaron. Así, en una placa de cultivo nueva se sembraron tantos pocillos con 50 µl de suspensión celular como pocillos a replicar. Inmediatamente, se les adicionó 50 µl del sobrenadante proveniente del pocillo negativo o dudoso. Este nuevo cultivo en placa se incubó durante 7 días adicionales a 28°C.

Para calcular el título viral por el método desarrollado por Reed y Muench (Reed y Muench, 1938) se confeccionó una tabla de respuestas (+) y (-) para cada una de las diluciones. Posteriormente, se calculó para cada dilución la frecuencia acumulada para las respuestas positivas y negativas. Por último, se determinaron los porcentajes de respuestas positivas que surgieron del cociente entre la frecuencia acumulada positiva y las frecuencias acumuladas totales. Como punto final, se consideró la dilución que produce un 50% de respuestas positivas que, para el caso de cultivos celulares, se denomina dosis infectiva para cultivo celular 50% (DICC_{50%}). Los títulos virales se expresaron en DICC_{50%} . ml⁻¹.

III.2.2.2. Cuantificación de poliedros de AgMNPV

Para cuantificar la cantidad de poliedros producidos en un cultivo celular, se separó una alícuota de la suspensión celular y se centrifugó en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de SDS 1%. Las muestras se conservaron a 4° C hasta el momento de su procesamiento. Los recuentos de poliedros se realizaron en el cuadrado central de una cámara de Neubauer que tiene una superficie de 1 mm² y se encuentra dividido en 25 cuadrados medianos, cada uno de los cuales se encuentra sub-dividido en 16 cuadrados pequeños. Se cuantificaron los poliedros presentes en 5 de los cuadrados

medianos (Σ) (los 4 de los extremos y el central). Las producciones volumétrica y específica de poliedros se determinaron aplicando las siguientes fórmulas:

- Producción volumétrica de poliedros (poliedros.ml^{-1}) = $\Sigma \times 5 \times 10.000$

- Producción específica de poliedros ($\text{poliedros.célula}^{-1}$) = $\Sigma \times 5 \times 10.000 \times (\text{células viables.ml}^{-1})^{-1}$.

III.2.2.3. Cuantificación de la actividad biológica de los poliedros de AgMNPV

Para la preparación de los poliedros virales, la suspensión celular infectada se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga. Posteriormente, el *pellet* celular se resuspendió en medio de cultivo fresco. A continuación, se llevó a cabo la lisis celular a través del empleo de un equipo de sonicación marca Vibra-Cell® modelo VC 600 (1 pulso de potencia 4 durante 60", con 50% de silencio). Inmediatamente, se centrifugó la muestra en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto, se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo fresco, se cuantificaron los poliedros y la muestra se conservó a 4°C hasta el momento de la determinación de la actividad.

La evaluación de la actividad biológica de los poliedros se llevó a cabo en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola con sede en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la localidad de Castelar, Buenos Aires, Argentina, por gentileza de la Ing. Alicia Sciocco de Cap y el Licenciado Ricardo Salvador. Para esta evaluación se utilizaron larvas de *Anticarsia gemmatalis* de 3° estadio. La infección se llevó a cabo siguiendo el método de inoculación empleado por Hughes y Word, que se basa en la infección *per os* de larvas que se han mantenido en ayunas durante un breve período de tiempo (Hughes y cl., 1981). Luego de 12 horas de ayuno, se administró a cada insecto una gota de la suspensión viral dispuesta sobre papel *film*, utilizándose sacarosa al 1% como fagoestimulante y *Coomasie Brilliant Blue* al 0.1%, como colorante para la verificación final de la ingesta. Se ensayaron tres dosis (100, 200 y 300 $\text{poliedros.larva}^{-1}$) más un control en el que se utilizó agua en lugar de inóculo viral. Cada dosis se ensayó sobre un mínimo de 20 insectos. Una vez ingerida la dosis, las

larvas se transfirieron a recipientes individuales que contenían la dieta artificial. La mortalidad se registró a intervalos de 12 horas y los resultados de mortalidad final se analizaron por Probits (Finney, 1971). Mediante este análisis, se obtiene una recta de regresión entre dosis transformadas a logaritmos y los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit ($DL_{50} \cdot \text{larva}^{-1}$).

III.3. Determinación de los parámetros cinéticos de multiplicación celular

Cuando un inóculo de células viables de concentración C_i es colocado en un medio de cultivo que aporta los nutrientes necesarios para su mantenimiento y proliferación celular, en un intervalo de tiempo dt , el inóculo celular se incrementará en una cantidad dC_i , proporcional a C_i y al intervalo de tiempo dt . Por lo tanto:

$$dC_i = \mu \cdot C_i \cdot dt \quad (1)$$

$$dC_i / dt = \mu \cdot C_i \quad (2)$$

El cociente dC_i / dt es una expresión de la velocidad de multiplicación de la población celular. El parámetro μ , llamado velocidad de multiplicación específica, representa la velocidad de multiplicación por unidad de masa y tiene dimensiones de tiempo⁻¹.

Si μ es una constante y se integra la expresión (2), resulta:

$$\ln C_i = \ln C_{i_0} + \mu \cdot t \quad (3)$$

donde C_{i_0} es el inóculo celular inicial a tiempo cero.

Relacionada con la velocidad específica de multiplicación surge la definición de tiempo de duplicación. Este parámetro mide el tiempo necesario para que la masa celular se duplique cuando la velocidad específica de crecimiento es μ . Por lo tanto, haciendo $C_i = 2 \times C_{i_0}$ y reemplazando en (3)

$$t_{1/2} = \ln 2 / \mu$$

Para un cultivo del tipo *batch* las fórmulas antes deducidas son solo válidas en la etapa de crecimiento exponencial, fase en la cual se consideran constantes las condiciones de la biomasa y del medio extracelular.

III.4. Determinación de los coeficientes de rendimiento y de las velocidades específicas de consumo y producción de nutrientes y productos

III.4.1. Coeficientes de rendimiento

Se define el coeficiente de rendimiento $Y_{Ci/s}$ para un nutriente consumido, s , al cociente entre la cantidad de células producidas y la cantidad de sustrato empleada en esa producción:

$$Y_{Ci/s} = dCi / ds \quad (4)$$

Para un cultivo del tipo *batch*, en la zona de crecimiento celular exponencial, el coeficiente de rendimiento (4) puede calcularse utilizando la siguiente expresión:

$$Y_{Ci/s} = (Ci - Ci_0) / (s_0 - s)$$

donde Ci y Ci_0 representan la variación de la densidad celular y, s y s_0 , la variación de la concentración del nutriente.

De la misma manera, se definen los coeficientes de rendimiento para los productos del metabolismo celular y para las progenies virales (viriones no ocluidos y poliedros).

III.4.2. Velocidad específica de consumo (producción de nutrientes y metabolitos)

La velocidad de consumo de un sustrato, s , en un determinado momento está dada por:

$$ds / dt = q_s \cdot C_i$$

donde q_s es un coeficiente conocido con el nombre de velocidad específica de consumo. Si las condiciones ambientales y la constitución de la biomasa son constantes, entonces q_s es una constante. De las expresiones (1) y (4) surge la siguiente expresión:

$$Y_{C_i/s} \cdot ds = \mu \cdot C_i \cdot dt$$

Reordenando:

$$ds / dt = \mu \cdot C_i / Y_{C_i/s} \quad (5)$$

Considerando que $ds / (dt \cdot C_i) = q_s$ y reemplazando en la expresión (5)

$$q_s = \mu / Y_{x/s} \quad (6)$$

La expresión (6) es generalmente utilizada para estimar las demandas de sustrato a diferentes velocidades de crecimiento (Pirt, 1975).

III.5. Diseños experimentales

Se utilizaron tres tipos diseños experimentales diferentes: factorial completo, factorial fraccionado saturado (diseño de Plackett-Burman) y superficie de respuesta (diseño central compuesto). Los dos primeros se utilizaron para identificar factores activos, mientras que el último fue utilizado para optimizar el valor de los factores activos.

III.5.1. Ensayos factoriales completos

Los ensayos factoriales completos permiten estudiar simultáneamente el efecto de un número limitado de factores sobre una respuesta, y los efectos que las

interacciones entre esos factores ejercen sobre la respuesta. Se denomina factor a las condiciones de un proceso que influyen la variable de respuesta, mientras que ésta se define como una cantidad medible cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores. Por otro lado, se dice que hay interacción entre dos factores cuando las diferencias de nivel de uno de ellos afectan la respuesta del otro. Una condición necesaria para detectar estas interacciones es la utilización de más de un nivel para cada factor.

En un diseño factorial completo, el número de experimentos a llevar a cabo es igual a:

$$N = n^k$$

donde N es el número de experimentos, k el número de factores a estudiar y n el número de niveles para cada factor.

En un experimento en el cual se estudia una determinada respuesta frente a dos factores (x_1 y x_2), cada uno de ellos a dos niveles, el número de experimentos asciende a cuatro, y el diseño puede ser representado de la siguiente manera:

Número de experimento	Factor	Nivel
1	x_1 / x_2	+ / +
2	x_1 / x_2	+ / -
3	x_1 / x_2	- / -
4	x_1 / x_2	- / +

Si se diseña un experimento en el cual cada factor es analizado en más de dos niveles, se debe tomar el valor medio como valor de referencia del factor y elegir los otros niveles de los experimentos en forma equidistante, siendo una determinada proporción del valor medio. Así, por ejemplo, si se analizan 3 niveles, el valor de referencia del factor será 0, el superior (+1) y el inferior (-1). La significación estadística de la magnitud del efecto ejercido por cada factor, y de las interacciones entre ellos, se determina mediante el análisis de la varianza. Tanto el diseño como el posterior análisis de las respuestas fueron asistidos, en esta tesis, con el paquete estadístico JMP 4®.

III.5.1. Diseño de Plackett-Burman

Generalmente, en las primeras etapas del proceso de diseño de un medio de cultivo se realizan ensayos de *screening* para evaluar, entre las decenas de componentes (**factores**) del mismo, aquellos que, producida una modificación en su concentración, ejercen un efecto mensurable significativo sobre alguna variable del cultivo (**respuesta**), como la velocidad de proliferación, la densidad celular o la capacidad de generar un determinado producto, como en este caso un virus. Habitualmente, este tipo de estudios implica la evaluación de un elevado número de factores: si, por ejemplo, se quisiera determinar, mediante un ensayo factorial completo, la magnitud de los efectos principales producidos por 10 componentes de un medio de cultivo, y los efectos surgidos de las interacciones entre los mismos, se deberían llevar a cabo 1024 experimentos, con un costo experimental injustificable. En estas situaciones, y con el objetivo de reducir el número de experimentos, se utilizan diseños de tipo factorial fraccionado. Este tipo de diseño experimental simplificado está basado en la suposición que los efectos principales son provocados por unos pocos factores aislados, y que, por lo tanto, las interacciones entre distintos factores son despreciables. Si las interacciones se pueden considerar despreciables, una fracción adecuada de todas las posibles combinaciones de los niveles del factor es suficiente para proporcionar una estimación de los efectos principales. En un diseño factorial fraccionado, el número de experimentos se reducirá de acuerdo al valor dado a p , de tal manera que:

$$N = 2^{k-p}$$

El diseño experimental de Plackett-Burman, presentado por R. Plackett y J. Burman en 1946, es un tipo particular de modelo factorial fraccionado de dos niveles, muy empleado en el desarrollo de experimentos de *screening*. La particularidad de este diseño es que el número de experimentos es un múltiplo de 4, y que la cantidad de factores a analizar es igual:

$$k = E - 1$$

donde E es un múltiplo de 4.

Mediante el empleo de un diseño de tipo Plackett-Burman se pueden identificar aquellos factores que ejercen los efectos más importantes sobre una determinada respuesta, no analizándose las interacciones entre ellos. Los diseños de tipo Plackett-Burman, como así también el estudio estadístico de los resultados a través del análisis de la varianza, fueron realizados con la asistencia del paquete estadístico JMP 4[®].

III.5.3. Método de superficie de respuesta (RSM):

El método de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas muy utilizado para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables.

Para el caso de los factores x_1 e x_2 , la respuesta y se relaciona con los factores x_1 y x_2 de la siguiente manera:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad \text{donde } \varepsilon \text{ representa el error observado en la respuesta } y.$$

Si la respuesta esperada se denota por $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$, entonces la superficie de respuesta queda representada por la ecuación $\eta = f(x_1, x_2)$ y se denomina superficie de respuesta. La superficie de respuesta se representa como una superficie sólida en un espacio tridimensional. El RSM tiene como objetivo determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación.

Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe presentar por lo menos tres niveles para cada factor. Dado que la finalidad del RSM es la optimización, y se desconoce la localización del óptimo antes de comenzar el experimento, es recomendable usar un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones. El diseño central compuesto es, probablemente, el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. Incluido en este diseño, se encuentra el diseño estrella que permite agregar más

niveles y describir una curvatura en la cual se agregan más puntos α . Los mismos se sitúan a una determinada distancia del centro, describiendo una estrella. El número de puntos responde a los puntos axiales n_s ; el valor que toma $\alpha = (n_s)^{1/4}$ y un punto central n_0 con todos los niveles iguales a cero, generalmente es el replicado (Montgomery, 1991).

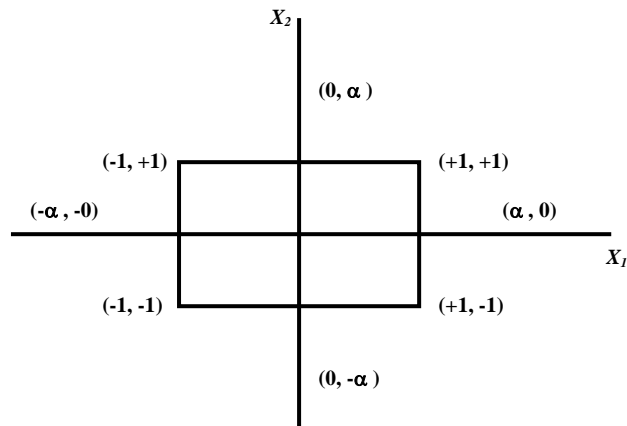


Figura III.4.: Diseño central compuesto para dos factores

El análisis de la varianza para el modelo de segundo orden fue realizado con la asistencia del paquete estadístico JMP 4[®].

IV. Resultados

IV.1. Crecimiento, metabolismo y producción de AgMNPV en cultivos de la línea celular UFL-AG-286 en suspensión

IV.1.1. Adaptación de la línea celular al cultivo en suspensión

Cultivos de la línea celular UFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10 % SFB fueron adaptados al crecimiento en suspensión. Para ello, cultivos estáticos se desprendieron de la superficie de la botella plástica mecánicamente. La suspensión celular resultante se centrifugó, se resuspendió en medio de cultivo fresco a una densidad celular de $3,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹, se colocó en un frasco de cultivo tipo “spinner”, con agitador pendular, y se comenzó a agitar sobre una plancha magnética hasta que el cultivo alcanzó una densidad de $1,5 \times 10^6$ células viables.ml⁻¹, momento en el cual se realizó el primer sub-cultivo. Los primeros pasajes en suspensión se caracterizaron por una elevada proporción de células agrupadas en agregados de diversos tamaños.

Con el objetivo de seleccionar una población de células capaces de proliferar en forma aislada en cultivos en suspensión, antes de cada repique el cultivo se trasvasó a un tubo plástico cónico de 50 ml y se dejó sedimentar durante 1 minuto. Al cabo de ese tiempo se cosechó la parte superior del cultivo, enriquecida en células aisladas, y se resuspendió en medio de cultivo fresco para obtener una densidad de $3,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹. La proporción de células aisladas se incrementó progresivamente con los sub-cultivos sucesivos, hasta que luego de 30 pasajes el 80% de las células no formaba agregados. En cultivos en suspensión mantenidos sin sedimentación previa a cada pasaje, el porcentaje de células aisladas no varió significativamente a lo largo de los sucesivos sub-cultivos. La línea celular resultante del proceso de adaptación al cultivo en suspensión se denominó saUFL-AG-286.

IV.1.2. Determinación de los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión

Para caracterizar los parámetros cinéticos de los cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en suspensión (saUFL-AG-286), un cultivo en el pasaje trigésimo en suspensión se diluyó en medio de cultivo fresco a una densidad de $3,7 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} . El cultivo fue incubado en estufa a 28°C , y cada 24 horas se tomó una alícuota de la suspensión celular para cuantificación de células totales y viables.

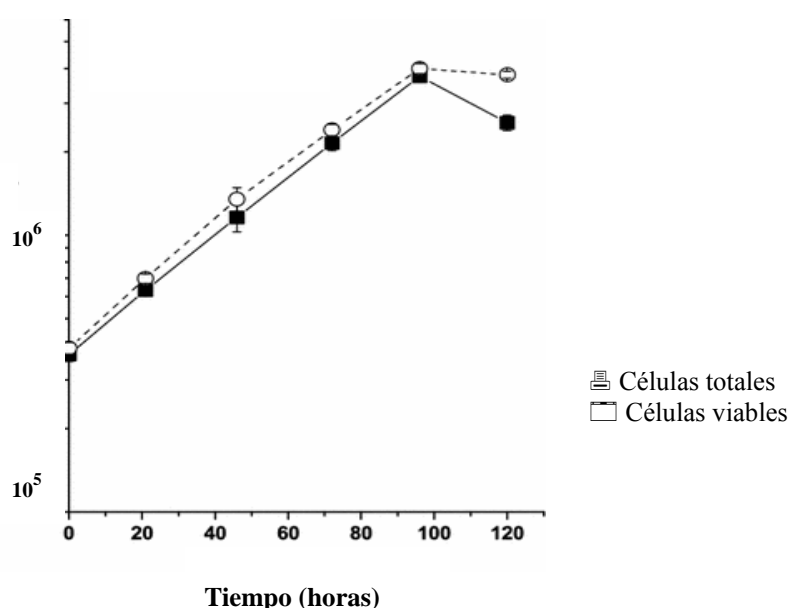


Figura IV.1.1.: Curva de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión agitada en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Cada punto representa el promedio de los recuentos efectuados en tres cultivos independientes.

No se observó fase “lag” al comienzo del cultivo, cuyo crecimiento se extendió hasta las 96 horas (figura IV.1.1.). La velocidad específica de multiplicación celular mantuvo un valor constante de $0,024 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de duplicación: 28,9 h). La densidad celular máxima, alcanzada a las 96 horas de cultivo, fue de $3,7 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . La viabilidad del cultivo se mantuvo en porcentajes superiores al 98% hasta las 96 horas, y luego decayó abruptamente sin mediar fase estacionaria.

IV.1.3. Consumo de nutrientes y producción de metabolitos

Para caracterizar el perfil nutricional y metabólico de los cultivos de células saUFL-AG-286, se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato, amonio y dieciocho aminoácidos en los sobrenadantes de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de cultivo.

Como se puede observar en la figura IV.1.2., la concentración de glucosa decayó constantemente desde el comienzo, hasta agotarse entre las 96 y 120 horas de cultivo. La velocidad específica de consumo celular de glucosa se mantuvo constante hasta las 96 horas, en un valor de $3,20 \times 10^{-11}$ mmol.cel⁻¹.h⁻¹.

La glutamina, luego de un incremento inicial de su concentración durante las primeras 24 horas de cultivo, que se verificó también para el resto de los aminoácidos (no se muestra), fue consumida rápidamente hasta agotarse a las 120 horas. La velocidad específica de consumo celular de glutamina alcanzó un valor máximo de $5,87 \times 10^{-11}$ mmol.cel⁻¹.h⁻¹ a las 48 horas y luego decayó exponencialmente.

La concentración de lactato, un producto del metabolismo de la glucosa y la glutamina en muchas líneas de células animales, se mantuvo constante durante toda la evolución del cultivo.

Por otro lado, la concentración de amonio, un producto del metabolismo de los aminoácidos, se mantuvo casi constante hasta las 72 horas de cultivo, para luego crecer abruptamente y alcanzar un valor máximo cercano a 20 mM a las 96 horas.

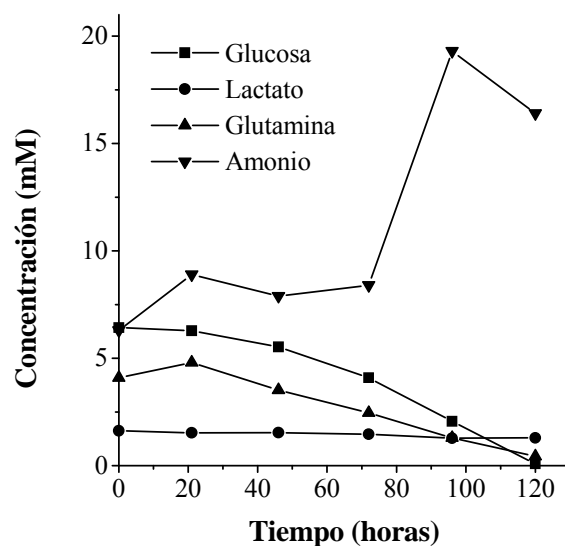


Figura IV.1.2.: Evolución en el tiempo de la concentración de glucosa, lactato, glutamina y amonio en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en medio TC-100 suplementado con 10% de SFB. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Cada punto representa el promedio de las concentraciones determinadas en tres cultivos independientes.

La mayoría de los aminoácidos no fueron significativamente consumidos en los cultivos de células saUFL-AG-286 (cuadro IV.1.1.). Sólo glutamina (89%), asparagina (31%), metionina (29%) y leucina (20%) fueron consumidos en porcentajes superiores al 20% de su concentración inicial. Serina y tirosina fueron consumidos en porcentajes cercanos al 15%, mientras que alanina, arginina, glicina, lisina, fenilalanina, treonina y triptofano lo fueron sólo en mínimas proporciones, respecto a sus concentraciones iniciales. Por otro lado, glutamato, aspartato, valina, isoleucina e histidina incrementaron su concentración en el transcurso del cultivo. Cabe destacar que el consumo de glutamina representó el 50% del total del consumo de aminoácidos en los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286.

Cuadro IV.1.1. Concentraciones iniciales y finales de aminoácidos (mM) en los sobrenadantes de cultivo de células saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB.

Compuesto	0 hora (mM)	120 horas (mM)	Consumo Porcentual (%)
Alanina	2,78	2,44	12
Arginina	3,52	3,32	6
Asparagina	3,47	2,38	31
Aspartato	3,25	3,51	-
Fenilalanina	1,34	1,29	4
Glicina	8,81	8,71	1
Glutamina	4,11	0,44	89
Glutamato	5,24	5,29	-
Histidina	16,56	17,59	-
Isoleucina	0,90	0,95	-
Leucina	1,27	1,02	20
Lisina	4,12	3,58	13
Metionina	0,76	0,55	28
Serina	5,22	4,40	16
Tirosina	0,49	0,42	14
Treonina	1,64	1,63	1
Triptofano	0,61	0,60	2
Valina	1,38	1,45	-

IV.1.4. Infección de células saUFL-AG-286 con AgMNPV

Cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en medio TC-100 suplementado con 10% SFB, sembrados inicialmente a una densidad de $3,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹, fueron infectados 36 horas después con AgMNPV (multiplicidad de infección: 3 DICC_{50%} .célula⁻¹) cuando habían alcanzado una densidad de $8,4 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹. Se tomaron muestras de los cultivos infectados cada 24 horas para

realizar recuento de células totales, viables y con presencia de poliedros, y se separaron muestras para realizar titulación de virus brotados y recuento de poliedros.

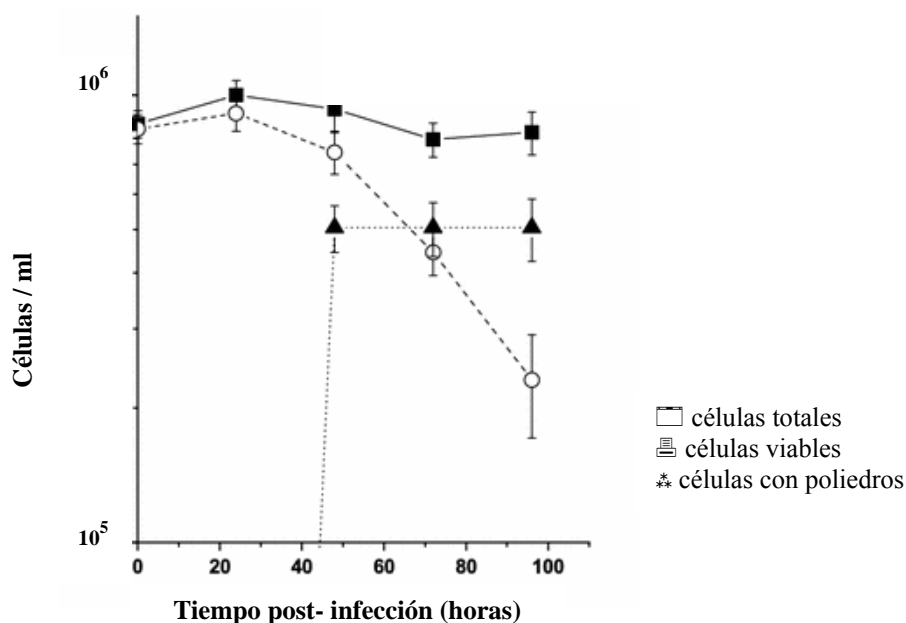


Figura IV.1.3.: Infección de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 3 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$, a una densidad celular de $8,4 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} . Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Cada punto representa el promedio de los recuentos efectuados en tres cultivos independientes.

Las primeras 24 horas post-infección se caracterizaron por un ligero incremento de la densidad de células totales, mientras la viabilidad se mantuvo por arriba del 90%. Posteriormente, el número de células viables comenzó a disminuir, lentamente hasta las 48 horas, y continuó en forma exponencial hasta alcanzar un valor de viabilidad inferior al 30 % a las 96 horas post-infección. La lisis celular no fue importante, de acuerdo a la evolución de los recuentos de células totales, que no decrecieron significativamente hasta las 96 horas post-infección.

Las primeras células con poliedros virales visibles en su interior se observaron a las 48 horas post-infección (50% del total de las células), si bien desde las 24 horas se observaron claros signos de efecto citopático temprano típico de la infección por baculovirus, caracterizado por el aumento de tamaño y el redondeamiento celular. El número de células conteniendo cúmulos de poliedros no se incrementó luego de las 48 horas post-infección.

En la figura IV.1.4. se puede observar la evolución en el tiempo de los títulos de virus brotados y de poliedros. La producción de virus brotados aumentó rápidamente durante las primeras 24 horas post-infección, y luego mucho más lentamente, hasta alcanzar un título máximo de 6.3×10^8 DICCC_{50%}.ml⁻¹ a las 96 hpi (rendimiento celular específico: 692 DICCC_{50%}.cel⁻¹). Los primeros poliedros virales se detectaron a las 48 hpi, en forma coincidente con la observación de las primeras células conteniendo cuerpos de inclusión y con la reducción inicial de la viabilidad celular. La concentración de poliedros se incrementó hasta alcanzar un título máximo de 5.8×10^7 poliedros.ml⁻¹ a las 72 hpi (rendimiento celular específico: 64 poliedros.cel⁻¹).

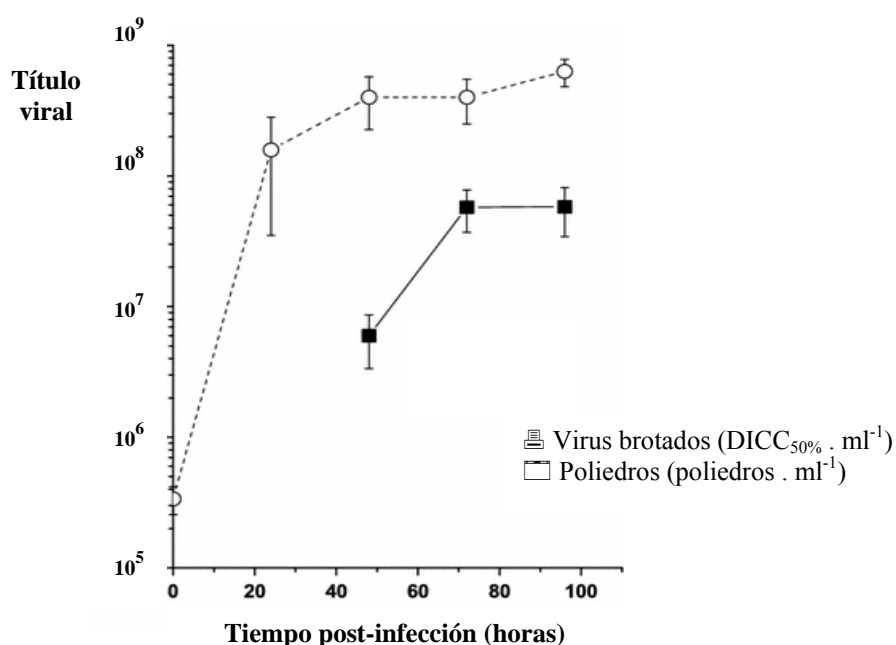


Figura IV.1.4.: Evolución del título de virus brotados y de poliedros a partir de un cultivo en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB e infectado con AgMNPV a una MOI de 3 DICCC_{50%} . célula⁻¹. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo.

IV.1.5. Consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos infectados

Glucosa y glutamina, al igual que en los cultivos no infectados de saUFL-AG-286, fueron los nutrientes consumidos a mayor velocidad en los cultivos infectados con

AgMNPV (figura IV.1.5.). La velocidad específica de consumo celular de glucosa se redujo con respecto a los cultivos no infectados durante las primeras 24 hpi, período durante el cual alcanzó un valor de $1,24 \times 10^{-11}$ mmol.cel.⁻¹.h⁻¹, aproximadamente un tercio de la velocidad correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de un cultivo no infectado. Sin embargo, en el período comprendido entre las 24 y 72 hpi la velocidad de consumo de glucosa retomó el valor previo a la infección.

La concentración de lactato no se modificó significativamente a lo largo del período de infección observándose durante las primeras 24 horas post-infección un leve aumento en su concentración, parte del cual fue consumido en las 24 horas posteriores para luego permanecer prácticamente constante hasta el momento de la cosecha del cultivo.

El consumo de glutamina también se redujo inmediatamente luego de la infección a un valor de $1,42 \times 10^{-11}$ mmol.cel.⁻¹.h⁻¹; esta velocidad se mantuvo constante durante todo el período post-infección.

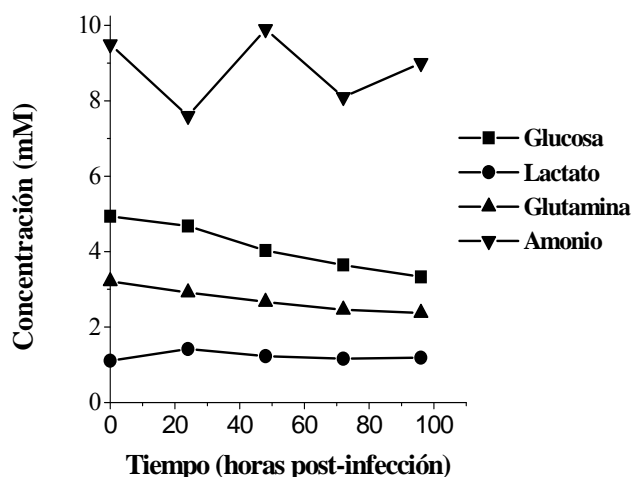


Figura IV.1.5.: Evolución de la concentración de glucosa, lactato, glutamina y amonio en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en medio TC-100 suplementado con 10% de SFB e infectado con AgMNPV a una MOI de 3 DICCC_{50%} . célula⁻¹. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Cada punto representa el promedio de las concentraciones determinadas en tres cultivos independientes.

Además de la glutamina, sólo cinco aminoácidos más se consumieron en los cultivos infectados: alanina, asparagina, lisina, metionina y triptofano (cuadro IV.1.2.).

Los otros aminoácidos incrementaron su concentración en los sobrenadantes de los cultivos, mientras que la concentración de amonio osciló sin cambios significativos (figura IV.1.5.).

Cuadro IV.1.2. Concentraciones iniciales y finales de aminoácidos (mM) en los sobrenadantes de cultivo de células saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB e infectado con AgMNPV a una MOI de 3 $DICC_{50\%}$. célula⁻¹.

Compuesto	0 hpi (mM)	96 hpi (mM)	Consumo Porcentual (%)
Alanina	2,75	2,40	13
Arginina	3,24	3,38	-
Asparagina	3,26	3,04	7
Aspartato	3,23	3,54	-
Fenilalanina	1,28	1,31	-
Glicina	8,40	8,97	-
Glutamina	3,22	2,38	26
Glutamato	4,87	5,61	-
Histidina	15,92	17,64	-
Isoleucina	0,96	1,03	-
Leucina	1,19	1,19	0
Lisina	3,84	3,72	3
Metionina	0,76	0,63	17
Serina	4,88	4,91	-
Tirosina	0,47	0,49	-
Treonina	1,62	1,75	-
Triptofano	0,67	0,57	14
Valina	1,48	1,53	-

IV.2. Diseño de un nuevo medio de cultivo para la línea celular saUFL-AG-286

IV.2.1. Evaluación de IPL-41 como medio básico para el cultivo de la línea celular saUFL-AG-286

Hasta el momento de comenzar los experimentos de esta tesis, la línea celular UFL-AG-286 había sido cultivada sólo en el medio TC-100 suplementado con 10% de suero. Existen muy pocos antecedentes en la bibliografía acerca del uso de este medio básico como soporte para el desarrollo de medios de cultivo libres de suero (Röder, 1982; Claus y col., 1993). En cambio, el medio IPL-41 (Weiss y col., 1981) ha sido extensamente utilizado como base para la preparación de medios de cultivo libres de suero para distintas líneas celulares (Maiorella y col., 1988; Inlow y col., 1989). Por lo tanto, se decidió evaluar la aptitud de este medio para sostener la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, inicialmente en condiciones de suplementación sérica.

El intento de adaptación de las células saUFL-AG-286 al medio IPL-41 se inició a partir de cultivos estáticos, en frascos de 25 cm², adaptados al crecimiento en el medio TC-100 suplementado con 10% de SFB, mediante reducción paulatina del porcentaje de este medio a lo largo de sucesivos subcultivos, y agregado de proporciones crecientes del medio IPL-41 suplementado con 10% de suero fetal bovino. El porcentaje de reducción de TC-100 en cada subcultivo fue del 25%, siempre y cuando las células hubieran alcanzado confluencia a los cinco días de cultivo en el repique precedente. El proceso de adaptación transcurrió favorablemente en los dos primeros subcultivos, hasta que el porcentaje de TC-100 se redujo al 50%. La subsiguiente reducción al 25% ocasionó una disminución en la velocidad de proliferación celular, y la imposibilidad de obtener cultivos confluentes a los cinco días de cultivo. Mediante cambios de medio se pudo alcanzar la confluencia, pero los repiques posteriores en la misma mezcla de medios no mejoraron el comportamiento celular. Por lo tanto, se decidió mantener un cultivo de saUFL-AG-286 en una mezcla 1:1 de IPL-41 y TC-100, y determinar la capacidad de proliferación celular en este medio básico suplementado con 10% de suero fetal bovino. Para ello, cultivos adaptados al crecimiento en cultivos estáticos en TC-100 + 10% SFB y en TC-100/IPL-41 (1:1) + 10% SFB, respectivamente, fueron

cosechados cuando alcanzaron confluencia. Luego se diluyeron en los respectivos medios de cultivo frescos para alcanzar una densidad celular de $3,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} , y se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm^2 (5 ml por botella), por duplicado. Además, a partir del cultivo en TC-100/IPL-41, se sembró una alícuota en el medio IPL-41 + 10% SFB, a la misma densidad celular inicial y con el mismo volumen de cultivo. Las botellas se incubaron en forma estática durante seis días a 28° C , y al cabo de ese tiempo las células se despegaron mecánicamente de la superficie de cada botella, se homogeneizaron las suspensiones celulares y se tomaron alícuotas para realizar el recuento de células viables.

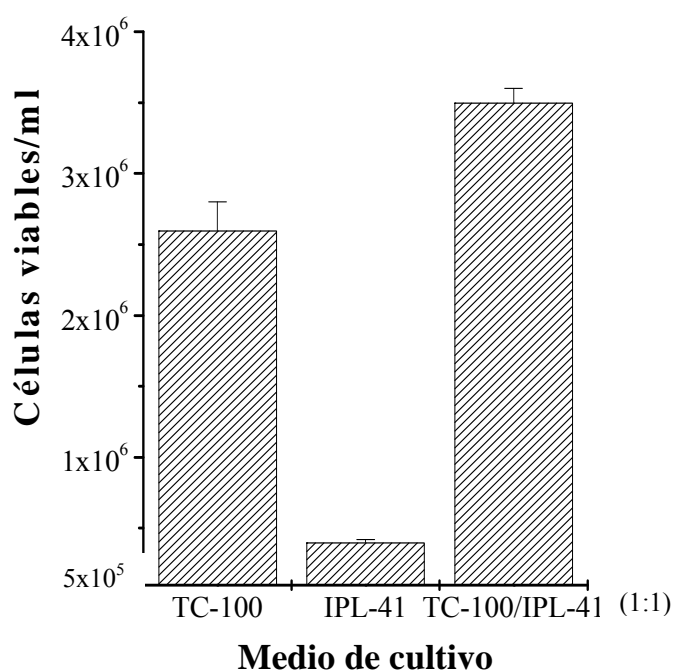


Figura IV.2.1.: Densidad celular alcanzada al tiempo de cosecha, en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en distintos medios suplementados con 10% de SFB. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm^2 con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 6 días a 28° C .

Como se puede observar en la figura IV.2.1., casi no se verificó proliferación celular en el medio IPL-41, mientras que la densidad celular máxima alcanzada en la mezcla TC-100/IPL-41 resultó significativamente más elevada que en el medio TC-100. Por lo tanto, esta mezcla de medios parece constituir un soporte básico más apto para sostener la proliferación de las células saUFL-AG-286 que el medio TC-100. En función de estos resultados se decidió utilizar la mezcla TC-100/IPL-41 (1:1) como

plataforma para la realización de experimentos tendientes a diseñar medios de cultivo libres de suero para esta línea celular (ver sección IV.2.5.).

IV.2.2. Estrategia de diseño de un nuevo medio de cultivo básico para la línea celular saUFL-AG-286

Del análisis del consumo de aminoácidos y glucosa en los cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio de cultivo TC-100 suplementado con suero que se llevó a cabo en la sección IV.1. de esta tesis, se pudo concluir que la composición de este medio no se ajusta a los requerimientos nutricionales de la línea celular. Por una parte, la concentración de la mayoría de los aminoácidos se encuentra en exceso, mientras que la glucosa y la glutamina se hallan en concentraciones limitantes. En la figura IV.2.2. se representa el porcentaje de consumo de los aminoácidos y de la glucosa, respecto a sus concentraciones en el medio TC-100.

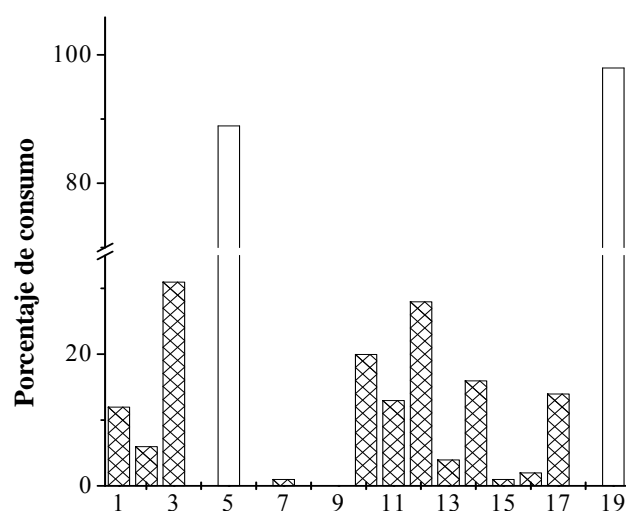


Figura IV.2.2.: Porcentaje de consumo de nutrientes (aminoácidos e hidrato de carbono) en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 + 10% SFB. 1- Alanina; 2- Arginina; 3- Asparagina; 4- Ácido aspártico; 5- Glutamina; 6- Ácido Glutámico; 7- Glicina; 8- Histidina; 9- Isoleucina; 10- Leucina; 11- Lisina; 12- Metionina; 13- Fenilalanina; 14- Serina; 15- Treonina; 16- Triptofano; 17- Tirosina; 18- Valina; 19- Glucosa. Los cultivos, por triplicado, se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados a 28° C durante 5 días. El porcentaje de consumo de los nutrientes fue calculado al tiempo de cosecha de los cultivos celulares.

Como se puede observar, diez de los dieciocho aminoácidos cuantificados en aquellos experimentos se consumieron en porcentajes inferiores a 10%, y solo cuatro de ellos (asparagina, glutamina, leucina y metionina) en porcentajes superiores al 20% de sus respectivas concentraciones iniciales. A partir de estos datos se calcularon los rendimientos celulares asociados al consumo de cada aminoácido en el medio TC-100

(cuadro IV.2.1.). Estos datos se utilizaron para diseñar la composición de la mezcla de aminoácidos de un nuevo medio de cultivo, partiendo de las siguientes premisas:

- a) la concentración de cada aminoácido debería ser suficiente para sostener la proliferación de un cultivo “batch” hasta una densidad celular de 10^7 células. ml^{-1} ;
- b) a los efectos de preservar la contribución de la mezcla de aminoácidos a la regulación del pH del medio de cultivo, la concentración de cada aminoácido no debería ser inferior al 10% de su concentración en el medio TC-100.

Cuadro IV.2.1.: Rendimientos celulares asociados al consumo de aminoácidos en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10% SFB. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “spinner”, de 500 ml de volumen, con 50 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados a 28° C durante 5 días.

Aminoácidos	10^6 células producidas / μmol de aminoácido consumido.
Alanina	9,8
Arginina	16,6
Asparagina	3,0
Fenilalanina	66,6
Glicina	33,3
Glutamina	0,9
Leucina	13,3
Lisina	6,1
Metionina	15,8
Serina	4,1
Tirosina	47,6
Treonina	333,0
Triptofano	333,0

Sobre la base de estas premisas se preparó una nueva solución de aminoácidos, cuya composición relativa respecto a la del medio TC-100 se presenta en la figura IV.2.3. Esta solución se utilizó como base para formular un nuevo medio de cultivo, al cual se denominó UNL, cuya concentración de glucosa, teniendo en cuenta el rendimiento celular en este hidrato de carbono, es más elevada que en el medio TC-100 (figura IV.2.3.). En definitiva, el medio UNL difiere del medio TC-100 en la menor

concentración de la mayoría de los aminoácidos, y en su concentración más elevada de glutamina y glucosa, los nutrientes más consumidos por las células saUFL-AG-286.

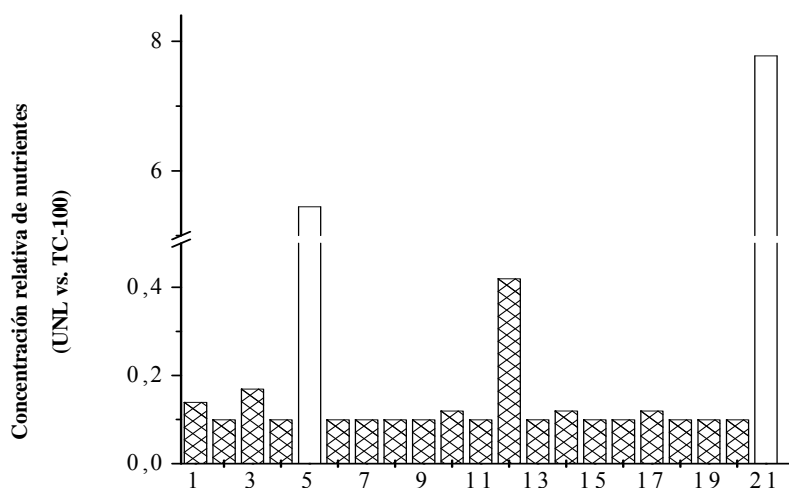


Figura IV.2.3.: Concentraciones relativas de aminoácidos y glucosa presentes en el medio UNL respecto al medio TC-100. 1- Alanina; 2- Arginina; 3- Asparagina; 4- Ácido aspártico; 5- Glutamina; 6- Ácido Glutámico; 7- Glicina; 8- Histidina; 9- Isoleucina; 10-Leucina; 11- Lisina; 12-Metionina; 13- Fenilalanina; 14- Serina; 15- Treonina; 16- Triptofano; 17- Tirosina; 18- Valina; 19- Cisteína; 20- Prolina; 21- Glucosa.

Por otro lado, si se compara la composición de los medios TC-100 e IPL-41 (ver sección Materiales y Métodos) con el objeto de explicar los beneficios de la adición de una proporción del segundo al primero, se puede verificar que las principales diferencias entre ambos radican en la presencia de ácidos orgánicos y micronutrientes minerales en la composición del medio IPL-41, de los que carece el medio TC-100, y una concentración más elevada de vitaminas. Para investigar si estas diferencias pueden explicar aquellos beneficios, se preparó un suplemento conteniendo estos compuestos. Al medio de cultivo UNL suplementado con esta solución de ácidos orgánicos, micronutrientes minerales y vitaminas se lo denominó UNL-5.

IV.2.3. Evaluación de la capacidad de los medios UNL y UNL-5 para sostener la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286

Previamente a evaluar la capacidad de los nuevos medios UNL y UNL-5 para sostener el cultivo de la línea saUFL-AG-286, se llevó a cabo la adaptación de las células a los nuevos medios de cultivo. Este proceso se llevó a cabo mediante la reducción paulatina del porcentaje del medio TC-100 en una mezcla de los medios TC-100 y UNL (25% en cada sub-cultivo, siempre que se hubiera alcanzado el estado de confluencia en el pasaje previo), en cultivos estáticos suplementados con 10 % de suero fetal. Luego de 20 pasajes celulares fue posible eliminar totalmente el medio TC-100 y cultivar las células en el nuevo medio de cultivo UNL suplementado con suero. A partir de este medio, las células se adaptaron rápidamente al cultivo en el medio UNL-5 + 10% SFB.

Para realizar una evaluación preliminar del rendimiento de los medios de cultivo UNL y UNL-5 en relación al original (TC-100), células adaptadas al crecimiento en cultivos estáticos en cada uno de los medios, suplementados con 10% de SFB, fueron cosechadas, centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo fresco. En placas de 96 pocillos (100 μ l de suspensión celular por orificio), por sextuplicado para cada medio, se dispensaron 2×10^4 células viables por pocillo. Las placas fueron incubadas a 28° C y la proliferación celular fue evaluada a las 48 y 96 horas de cultivo. En la figura IV.2.4. se puede observar que los cultivos proliferaron más rápidamente en los medios UNL y UNL-5, durante las primeras 48 horas, que en el medio TC-100. Luego la proliferación cesó en el medio UNL, pero continuó en los otros dos. La mayor densidad celular a las 96 hs. se alcanzó en el medio UNL-5. Este resultado es coherente con la observación visual de la evolución de los cultivos, donde se pudo apreciar que al momento de la cosecha en el medio UNL-5 + 10 % SFB, además de una monocapa confluyente, sobrenadaban abundante cantidad de células en el medio de cultivo. Además, la evolución de la proliferación celular en este medio mostró un perfil similar al obtenido en la mezcla TC-100/IPL-41 (1:1) suplementada con 10% de suero (no se muestra).

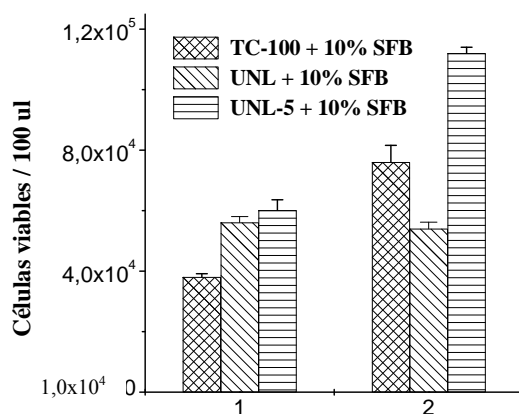


Figura IV.2.4.: Densidad celular en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en distintos medios de cultivo suplementados con 10% de SFB. Los cultivos celulares fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos partiendo de una densidad celular inicial de 2×10^4 células. $100 \mu\text{l}^{-1}$. Las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm, a las 48 horas (1) y 96 horas (2) de incubación a 28° C.

IV.2.4. Evaluación de la capacidad de los medios UNL y UNL-5 para sostener la replicación viral

La capacidad de los medios de cultivo UNL y UNL-5, suplementados con suero, para sostener la replicación del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* fue evaluada a través de la infección de cultivos estáticos de células saUFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en cada uno de los medios de cultivo a ensayar (TC-100, UNL y UNL-5, suplementados con 10 % SFB). Para llevar adelante esta evaluación, los cultivos confluentes fueron cosechados y las células cuantificadas, centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo fresco, a fin de alcanzar una densidad celular de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Las células fueron infectadas inmediatamente a una multiplicidad de infección de $2 \text{ DIC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Los cultivos fueron mantenidos en agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, fueron sembrados por triplicado en pocillos de una placa para cultivos celulares de 96 orificios (100 μl por pocillo). Las placas fueron incubadas en estufa a 28° C durante 6 días, al término de los cuales los sobrenadantes fueron removidos de los pocillos y reemplazados por 100 μl de una solución de SDS 1%.

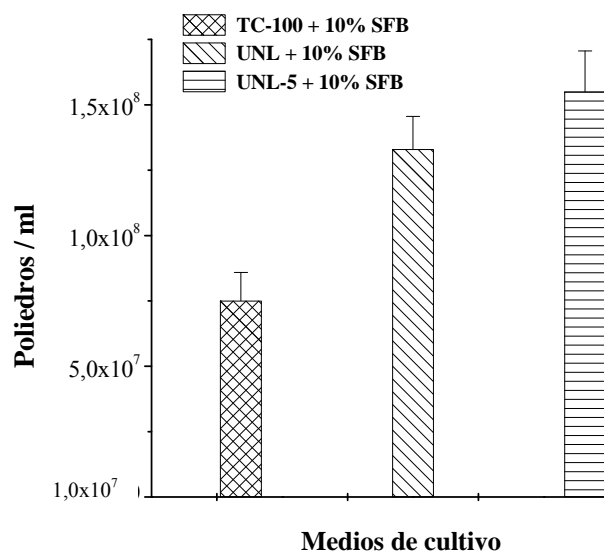


Figura IV.2.5.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en distintos medios de cultivo suplementados con 10% de SFB. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 2 $DICC_{50\%}$. célula⁻¹, en cultivos con una densidad celular de 4×10^5 células viables.ml⁻¹. Los mismos, que se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, fueron incubados a 28° C durante 6 días.

En la figura IV.2.5. se puede observar que los rendimientos volumétricos de poliedros de AgMNPV fueron significativamente más elevados en ambos medios UNL que en el medio TC-100. A su vez, la infección de las células saUFL-AG-286 en el medio enriquecido UNL-5 produjo un número significativamente mayor de poliedros, casi seis veces mayor que el rendimiento obtenido en el medio TC-100.

IV.2.5. Evaluación rápida de los efectos de la suplementación individual con hidrolizados proteicos y extractos naturales sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286

Si bien se ha documentado que algunos hidrolizados proteicos y extractos naturales ejercen un efecto positivo sobre la capacidad de proliferación de algunas líneas de células de insectos, y que pueden ser utilizados como componentes en mezclas complejas destinadas a reemplazar al suero fetal bovino (Schlaeger, 1996; Vaughn y Fan, 1997; Donaldson y Schuler, 1998; Wu y Lee, 1998; Ikononou y col., 2001; Batista y col., 2005), no existen estudios publicados sobre los efectos que estos compuestos ejercen, específicamente, sobre la línea celular UFL-AG-286 o su derivada saUFL-AG-286. Por lo tanto, tampoco se sabe cuál es su potencial para la preparación de un suplemento libre de suero para estas células. En razón de ello, se llevó a cabo un ensayo rápido para identificar, entre un conjunto de hidrolizados proteicos y extractos microbianos conocidos por su habilidad para promover el crecimiento de cultivos de distintos tipos de células, aquellos capaces de ejercer un efecto positivo sobre los niveles de proliferación de la línea celular saUFL-AG-286. Estos compuestos podrían resultar candidatos a integrar un suplemento destinado a reemplazar al suero fetal bovino en un medio completo específicamente desarrollado para esta línea. Células previamente adaptadas al medio TC-100/IPL-41 (1:1) suplementado con 10% de SFB, provenientes de un cultivo estático, fueron cosechadas y cuantificadas. Luego del recuento celular, la suspensión se fraccionó en doce alícuotas, que fueron centrifugadas y resuspendidas, a una densidad celular de 2×10^5 células viables. ml^{-1} , en el mismo medio de cultivo fresco suplementado con 1% de SFB y $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de hidrolizado proteico o extracto natural a ensayar. Como control se utilizó un cultivo en medio TC-100/IPL-41 (1:1) suplementado con 2,5% de SFB. Las distintas suspensiones celulares se dispensaron en pocillos de placas de cultivo de 96 orificios ($100 \mu\text{l}$ por pocillo), las cuales fueron incubadas a 28°C , en cámara húmeda, durante 120 horas. Al cabo de ese tiempo se procedió a la cuantificación del nivel de proliferación celular mediante la técnica de reducción del colorante MTS.

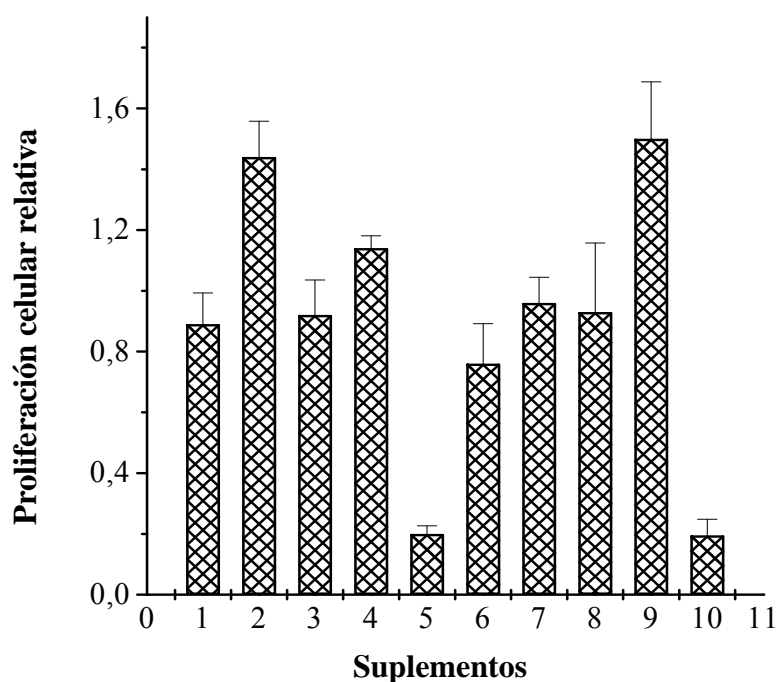


Figura IV.2.6.: Proliferación celular relativa de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB, suplementados con $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de distintos hidrolizados proteicos o extractos naturales (1: Lactoalbúmina; 2: Hidrolizado de caseína N-Z Case Plus; 3: Primatone; 4: Caldo triptosa fosfato; 5: Extracto de levadura; 6: Digesto papaínico de soja; 7: Peptona de carne; 8: Infusión cerebro-corazón; 9: Ultrafiltrado de extracto de levadura; 10: Extracto de hígado). Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28°C , las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. La proliferación celular relativa de cada cultivo fue calculada con respecto a la proliferación celular del cultivo control.

Tomando como criterio de positividad la superación del nivel de proliferación del control suplementado con 2,5% de suero fetal, se puede observar en la figura IV.2.6. que sólo dos de los hidrolizados ensayados, hidrolizado de caseína N-Z Case Plus (HA) y caldo triptosa fosfato (HB), y el ultrafiltrado de extracto de levaduras (UFEL) resultaron activos promotores de la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 cuando fueron adicionados en forma individual a una concentración de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se debe notar, además, el fuerte efecto negativo sobre el nivel de proliferación celular que ejercieron el extracto de hígado y el extracto de levaduras, éste último utilizado con frecuencia como componente de mezclas destinadas al reemplazo del suero fetal bovino en cultivos de células de insectos.

IV.2.6. Evaluación de los efectos de la suplementación combinada con distintos hidrolizados y extractos naturales sobre los niveles de proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y sobre la replicación del virus de poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*

Luego de haber identificado tres aditivos que ejercen un efecto positivo sobre la proliferación de la línea saUFL-AG-286, se procedió a estudiar el efecto de la suplementación cuando los mismos son incorporados al medio de cultivo en una mezcla. Para ello se realizó un ensayo de proliferación celular, en las condiciones experimentales descritas en el ensayo precedente, de acuerdo a un diseño factorial completo de tipo 2x2x2 (tres factores a dos niveles cada uno), de tal manera de poder verificar el efecto de cada aditivo en forma individual, y también la existencia de interacciones entre los mismos, ya sean sinérgicas o antagónicas.

El diseño empleado incluyó un total de 8 experimentos, y cada uno de ellos fue replicado seis veces. Los tres factores cuyo efecto se estudió fueron la suplementación con HA, HB o UFEL, respectivamente, y los dos niveles correspondieron a la ausencia de suplementación (-1) o la suplementación a una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹ (+1). La concentración máxima de células viables a las 120 horas de cultivo en cada experimento, determinada por la técnica de reducción de MTS, fue utilizada como respuesta del sistema.

En el cuadro IV.2.2. se presenta el diseño experimental, y la respuesta asociada a cada una de las combinaciones de factores ensayadas.

Cuadro IV.2.2.: Diseño de tipo factorial completo utilizado para evaluar la acción combinada de tres suplementos (HA, HB y UFEL) en dos niveles de concentración ((-1): 0 mg.ml⁻¹; (+1): 0,5 mg.ml⁻¹), sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB. Los cultivos celulares, de densidad inicial 2x10⁵ células viables.ml⁻¹, fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28° C, las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. La proliferación celular relativa de cada cultivo fue calculada con respecto a la proliferación celular del cultivo control. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

HA	HB	UFEL	Concentración total de suplemento (mg.ml ⁻¹)	Absorbancia (540 nm)	Proliferación celular relativa
+1	+1	+1	1,5	0,460	1,76
-1	+1	+1	1	0,410	1,58
+1	-1	+1	1	0,367	1,42
+1	+1	-1	1	0,357	1,38
-1	-1	+1	0,5	0,333	1,29
+1	-1	-1	0,5	0,320	1,23
-1	+1	-1	0,5	0,317	1,22
-1	-1	-1	0	0,259	1,00

Como se puede observar, el nivel de proliferación más bajo se obtuvo en los cultivos que no fueron suplementados con ningún aditivo, mientras que el mayor nivel de proliferación se alcanzó en los cultivos que fueron suplementados con los tres aditivos en forma conjunta. Estos resultados ratifican las conclusiones del experimento anterior, es decir el efecto positivo del agregado de estos aditivos, aún a una concentración cinco veces más baja que la utilizada en aquel ensayo.

En la figura IV.2.7. se representa el efecto calculado para cada uno de los factores ensayados. Como se puede apreciar, el efecto positivo más importante fue ejercido por el ultrafiltrado de extracto de levaduras, seguido por el caldo triptosa fosfato, ambos estadísticamente significativos ($p < 0,05$), y el hidrolizado de caseína. Por otro lado, se puede apreciar que las interacciones entre los pares de factores, o entre todos ellos, resultaron menos importantes que el efecto de cada suplementación por separado.

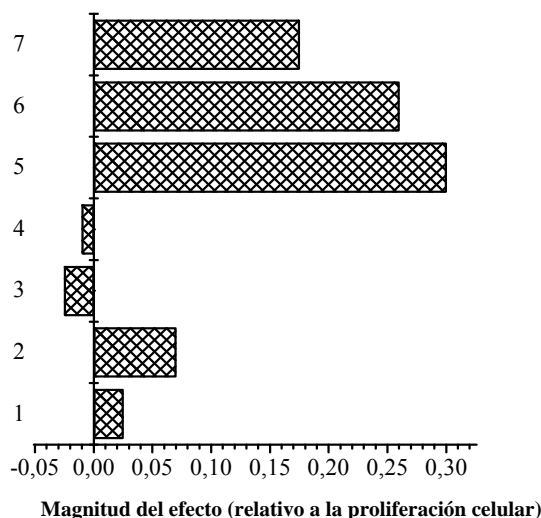


Figura IV.2.7.: Magnitud del efecto originado por la incorporación de distintos suplementos sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, en cultivos estáticos en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB. 1-HA x HB x UFEL. 2- HB x UFEL. 3-HA x UFEL. 4-HA x HB. 5-UFEL. 6- HB. 7- HA. Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28°C , las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

Es interesante resaltar, como se puede apreciar en la figura IV.2.8. que representa la variación de la densidad celular máxima alcanzada con la concentración total de hidrolizado, que el nivel de proliferación se incrementó linealmente con la concentración total de aditivos agregados al medio de cultivo, por lo menos hasta la concentración máxima, de $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, evaluada en este ensayo.

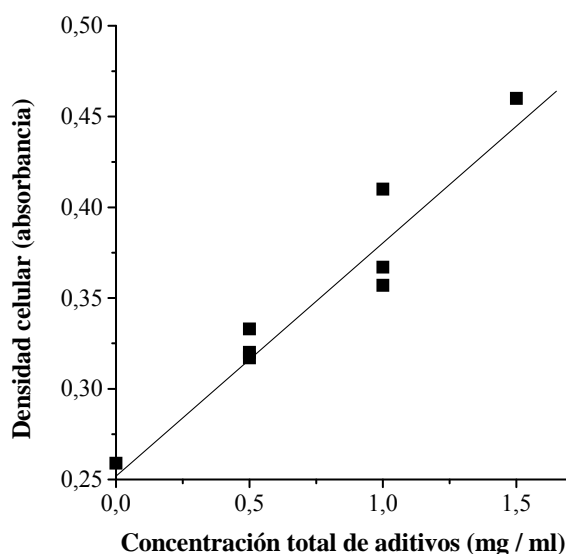


Figura IV.2.8.: Variación de la densidad celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% SFB, suplementado con distintas concentraciones totales de aditivos. Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28°C , las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm.

Habiéndose demostrado el efecto positivo de la adición de HA, HB y UFEL sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, se llevó a cabo un nuevo ensayo factorial $2 \times 2 \times 2$, con los mismos factores (suplementación con HA, HB o UFEL) y niveles (ausencia de suplementación o suplementación a una concentración de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), para evaluar la acción de estos suplementos sobre la replicación viral, utilizando como respuesta los niveles de producción volumétrica de poliedros. Para ello, células adaptadas al crecimiento en cultivos estáticos en la mezcla de medios TC-100/IPL-41 (1:1) suplementada con 10% de SFB, fueron cosechadas, cuantificadas y resuspendidas en las mezclas de suplementos a ensayar, de manera similar a como se procedió en el ensayo precedente (cuadro IV.2.3.). Como medio de cultivo base se empleó TC-100/IPL-41 (1:1) suplementado con 1% de SFB. Las células fueron sembradas por sextuplicado a una densidad inicial de 2×10^5 células viables. ml^{-1} , en pocillos de una placa para cultivo de 96 orificios ($100 \mu\text{l}$ por pocillo) e infectadas inmediatamente con AgMNPV a una multiplicidad de infección de $2 \text{ DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 4 días, al término de los cuales los

sobrenadantes de los cultivos fueron removidos de los pocillos, incorporándose en su lugar 100 µl de una solución de SDS 1%. Los extractos homogenizados se conservaron a 4° C hasta el momento de realizar el recuento de poliedros. En el cuadro IV.2.3. se presentan los promedios de las producciones volumétricas de poliedros para cada una de las condiciones ensayadas.

Cuadro IV.2.3.: Producción de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV a MOI de 2 DICC_{50%}.célula⁻¹, en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB, suplementado con distintas combinaciones de HA, HB y UFEL ((+1): 0,5 mg.ml⁻¹; (-1): 0 mg.ml⁻¹). Los cultivos celulares fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos partiendo de una densidad celular de 2x10⁵ células viables.ml⁻¹. La producción volumétrica de poliedros fue determinada luego de 4 días de incubación a 28° C. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

Producción volumétrica de poliedros			
HA	HB	UFEL	(pol .ml ⁻¹)
+1	-1	+1	1,16x10 ⁷
+1	+1	+1	8,55x10 ⁶
+1	+1	-1	7,55x10 ⁶
+1	-1	-1	6,1x10 ⁶
-1	+1	-1	6,0x10 ⁶
-1	+1	+1	5,33x10 ⁶
-1	-1	+1	4,80x10 ⁶
-1	-1	-1	4,73x10 ⁶

Todos los cultivos suplementados con al menos un hidrolizado o extracto produjeron más poliedros que el cultivo sin suplementar. En la figura IV.2.9. se puede observar que el efecto más notable fue ejercido por el hidrolizado HA, que UFEL ejerció un efecto positivo menor, y que la interacción entre ambos resultó positiva. Por el contrario, HB no demostró tener efecto sobre la replicación viral, en forma individual, pero en cambio interaccionó negativamente con los otros dos aditivos, aunque en forma no significativa.

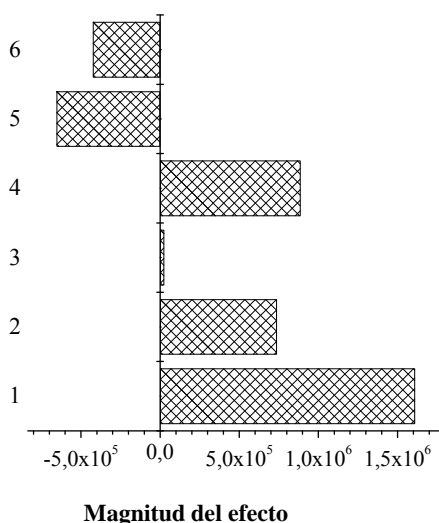


Figura IV.2.9.: Magnitud del efecto originado por la incorporación de distintas concentraciones de suplementos sobre la producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% SFB. 1- HA. 2- UFEL. 3- HB. 4- HA x UFEL. 5- HB x UFEL. 6- HA x HB. Los cultivos celulares, de densidad 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron infectados con AgMNPV a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Por cada variante evaluada fueron infectados seis cultivos celulares. La producción volumétrica de poliedros fue determinada luego de 4 días de incubación a 28° C. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

Cuando se analiza la influencia de la concentración total de aditivos sobre la producción de poliedros de AgMNPV (figura IV.2.10.), se puede observar que si bien existe una tendencia al incremento de los rendimientos con el aumento de la concentración, esta relación no presenta la linealidad que se observaba en el análisis del efecto sobre la proliferación celular, y por lo tanto la replicación viral parece estar tan influida por la composición específica de la mezcla como por su concentración total.

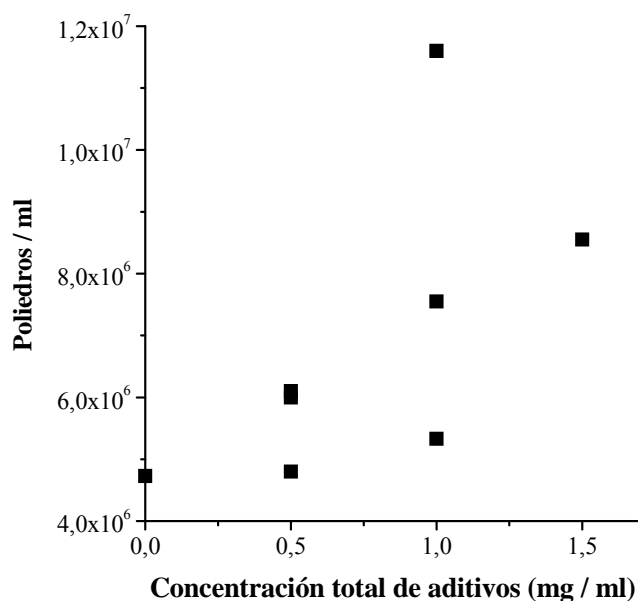


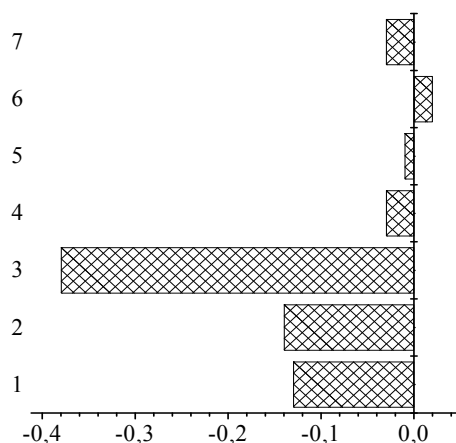
Figura IV.2.10.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% SFB, suplementado con distintas concentraciones totales de aditivos. Los cultivos celulares, de densidad 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron infectados con AgMNPV a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Por cada variante evaluada fueron infectados seis cultivos celulares. La producción volumétrica de poliedros fue determinada luego de 4 días de incubación a 28°C .

Teniendo en cuenta el incremento de los niveles de proliferación con la concentración total de aditivos, hasta $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, a través de un nuevo experimento factorial se estudió el efecto de la suplementación en un rango más extendido de concentraciones. Se utilizó en este caso un diseño de tipo 3^3 , es decir tres factores a tres niveles cada uno. Los tres factores estudiados fueron los mismos que en el experimento anterior (suplementación con HA, HB y UFEL), mientras que los niveles seleccionados en este caso fueron 0,5; 2 y $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Por tanto, el rango de concentración total de aditivos se extendió entre $1,5$ y $12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. El ensayo comprendió un total de 27 experimentos, cada uno de los cuales fue replicado seis veces. El resto de las condiciones experimentales fueron similares a las de los dos experimentos precedentes. En el cuadro IV.2.4. se presenta el diseño experimental y la respuesta promedio asociada a cada combinación de aditivos.

Cuadro IV.2.4.: Diseño factorial 3^3 utilizado para evaluar la influencia de la concentración de suplemento sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB. ((-1): 0,5 mg.ml⁻¹; (0): 2 mg.ml⁻¹; (+1): 4 mg.ml⁻¹). Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables.ml⁻¹, fueron realizados, por sextuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28° C, las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm.

HA	HB	UFEL	Concentración total de suplemento (mg.ml ⁻¹)	Absorbancia (540 nm)	10 ⁵ células viables . ml ⁻¹
0	-1	-1	3	0,429	1,66
-1	-1	-1	1,5	0,418	1,61
+1	-1	-1	5	0,407	1,57
-1	-1	0	3	0,390	1,51
-1	0	-1	3	0,390	1,51
0	0	-1	4,5	0,382	1,49
0	+1	-1	6,5	0,382	1,49
0	-1	0	4,5	0,380	1,48
+1	0	-1	6,5	0,378	1,46
-1	+1	-1	5	0,377	1,43
-1	0	0	4,5	0,350	1,36
0	0	0	6	0,330	1,28
+1	-1	0	6,5	0,319	1,27
+1	+1	-1	8,5	0,310	1,22
-1	+1	0	6,5	0,302	1,20
+1	0	0	8	0,291	1,14
0	+1	0	8	0,275	1,06
-1	-1	+1	5	0,239	0,90
+1	+1	0	8	0,231	0,86
-1	0	+1	6,5	0,224	0,83
0	-1	+1	6,5	0,216	0,81
0	0	+1	8	0,186	0,71
+1	-1	+1	8,5	0,182	0,69
-1	+1	+1	8,5	0,177	0,67
0	+1	+1	10	0,164	0,60
+1	0	+1	10	0,158	0,57
+1	+1	+1	12	0,102	0,33

En la figura IV.2.11. están representados los efectos calculados para cada uno de los tres factores analizados. En el rango de concentraciones estudiado, el incremento de la concentración de cualquiera de ellos provocó una reducción de los niveles de proliferación. El efecto inhibitorio más notable fue provocado por la suplementación con el ultrafiltrado de extracto de levaduras, seguido por el hidrolizado de caseína y el caldo triptosa fosfato, mientras que las interacciones, binarias o ternaria, en el rango de concentraciones que abarcó este experimento, resultaron no significativas. En la figura IV.2.12., se puede observar que concentraciones de suplemento superiores a 6 mg.ml⁻¹ ejercieron un efecto negativo sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, independientemente de la composición específica de la mezcla de hidrolizados.



Magnitud del efecto (relativo a la proliferación celular)

Figura IV.2.11.: Magnitud del efecto originado por la incorporación de altas concentraciones de suplementos sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, en cultivos estáticos en el medio TC-100/IPL-41 + 1% de SFB. 1-Ha; 2- Hb; 3- UFEL; 4-Ha x Hb; 5- Ha x UFEL. 6- Hb x UFEL; 7- Ha x Hb x UFEL (de acuerdo a los datos del experimento representado en el cuadro IV.2.4.). HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

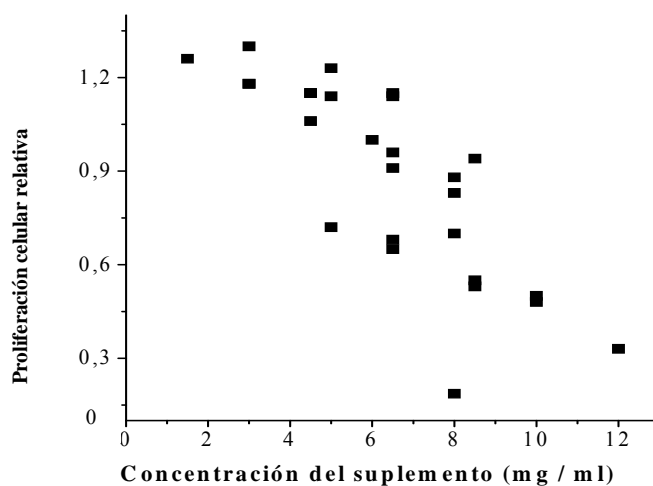


Figura IV.2.12.: Influencia de la concentración del suplemento sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, en cultivos estáticos en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1% de SFB (de acuerdo a los datos del experimento mostrados en el cuadro IV.2.4.).

IV.2.7. Efectos de la suplementación con hidrolizados proteicos y ultrafiltrado de extracto de levaduras en un medio de cultivo con baja concentración de aminoácidos y libre de suero

En el apartado IV.2.6. se demostró que el hidrolizado de caseína, el caldo triptosa fosfato y el ultrafiltrado de extracto de levadura ejercen efectos, dependientes de la concentración individual de cada aditivo y de la concentración total del suplemento adicionado, sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 cuando fueron utilizados como suplementos del medio de cultivo TC-100/IPL-41 (1:1) suplementado con 1% de SFB. En el mismo medio de cultivo, la adición de los hidrolizados y del ultrafiltrado de extracto de levaduras fue también capaz de estimular la replicación viral, determinada a través de la producción de poliedros. Por otro lado, también se demostró que las células saUFL-AG-286 pueden proliferar en un medio con una concentración significativamente reducida de aminoácidos, como el medio UNL-5, el cual podría ser utilizado como una base para la formulación de un medio libre de suero. Por lo tanto, se decidió estudiar la respuesta proliferativa de las células saUFL-AG-286 a la adición de los hidrolizados (HA, HB y UFEL), cuando estos son agregados al medio UNL-5 sin suplementar con suero fetal bovino. El ensayo se llevó a cabo utilizando un diseño experimental de tipo factorial completo 2^3 , es decir tres factores (HA, HB y UFEL) a dos niveles de concentración cada uno (0,5 y 1,5 mg.ml⁻¹). Para ello, un cultivo de células adaptadas al crecimiento en monocapa en el medio TC-100/IPL-41 (1:1), suplementado con 10% de SFB, fue cosechado y las células cuantificadas. Posteriormente, se tomó de la suspensión celular la alícuota necesaria a fin de partir de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables.ml⁻¹. La suspensión celular fue centrifugada y las células resuspendidas en el medio de cultivo UNL-5 libre de suero. Por cada una de las variantes, cuya composición se detalla en el cuadro IV.2.5., fueron sembrados 100 µl de la suspensión celular, por quintuplicado. A continuación, se adicionaron los aditivos HA, HB y UFEL de acuerdo al esquema establecido por el diseño experimental. Las placas fueron incubadas durante 120 horas en cámara húmeda en estufa a 28° C. Al cabo de ese tiempo, se procedió a la cuantificación de la proliferación celular.

Cuadro IV.2.5.: Diseño factorial 2^3 utilizado para evaluar la influencia de la concentración de suplemento sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5. ((-1): $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; (+1): $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$). Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron realizados, por quintuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28°C , las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

Variante	HA	HB	UFEL	Concentración total del suplemento (mg.ml^{-1})	Densidad celular (10^5 células viables. ml^{-1})
1	-1	-1	-1	1,5	2,66
2	-1	+1	-1	2,5	2,81
3	-1	-1	+1	2,5	2,66
4	-1	+1	+1	3,5	2,86
5	+1	-1	-1	2,5	2,80
6	+1	+1	-1	3,5	2,81
7	+1	-1	+1	3,5	3,33
8	+1	+1	+1	4,5	3,44

En la figura IV.2.13. están representadas las magnitudes de los efectos asociados a la suplementación con cada uno de los hidrolizados o el ultrafiltrado de extracto de levaduras. Como se puede observar, la suplementación con HA y con UFEL, dentro del rango de concentraciones evaluado, está asociada a un efecto positivo, estadísticamente significativo, sobre la proliferación celular. También se observa una interacción positiva estadísticamente significativa entre HA y UFEL. En cambio, la suplementación con HB sólo está asociada a un ligero efecto positivo, no significativo. La máxima proliferación celular fue registrada en el experimento identificado con el número 8, en el cual cada uno de los hidrolizados proteicos y el UFEL fueron agregados a la máxima concentración ensayada ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), y por lo tanto el rendimiento celular más alto se alcanzó a una concentración total de $4,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, que es más elevada que la concentración total de hidrolizado a la cual se alcanzó la máxima densidad celular en el medio TC-100/IPL-41 (1:1) + 1%SFB.

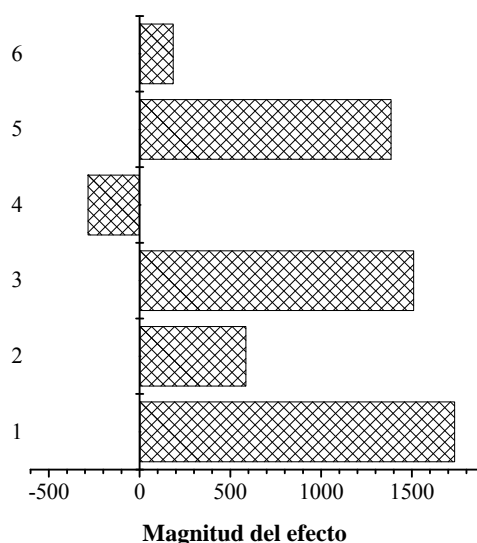


Figura IV.2.13.: Tamaño del efecto originado por la incorporación de suplementos sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, en cultivos estáticos en el medio UNL-5. 1-HA; 2- HB; 3- UFEL; 4-HA x HB; 5- HA x UFEL. 6- HB x UFEL. Los cultivos celulares, de densidad inicial 2×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron realizados, por quintuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28°C , las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

En el ensayo anterior, el máximo nivel de proliferación se obtuvo en el extremo del rango de concentraciones sometido a estudio, y por lo tanto podría ser posible que la concentración óptima de cada uno de los aditivos, o la concentración total, se encontraran por arriba de ese extremo. Por lo tanto, se llevó a cabo un nuevo ensayo, en este caso de tipo central compuesto de tal manera de poder determinar la curvatura de la respuesta, medida como la concentración total de células, frente a cambios en la concentración de los hidrolizados HA y HB y el UFEL. El resto de las condiciones experimentales fueron similares a las empleadas en el ensayo previo. El diseño experimental y la respuesta alcanzada en cada experimento se muestran en el cuadro IV.2.6.

Cuadro IV.2.6.: Proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 suplementado con distintas concentraciones de HA, HB y UFEL ((-1,68): 0,32; (-1): 1; (0): 2; (+1): 3; (+1,68): 3,68) mg.ml⁻¹. Los cultivos celulares, de densidad inicial 2x10⁵ células viables.ml⁻¹, fueron realizados, por quintuplicado, en placas de 96 pocillos. Luego de 5 días de incubación a 28° C, las células viables fueron cuantificadas directamente en cada pocillo a través de la técnica de reducción del colorante MTS, midiendo absorbancia a 540 nm. HA: hidrolizado enzimático de caseína; HB: caldo triptosa fosfato.

HA	HB	UFEL	Concentración total del suplemento (mg.ml ⁻¹)	Densidad celular (10 ⁵ células viables.ml ⁻¹)
-1	-1	-1	3	3,80
-1	+1	-1	5	3,96
-1	-1	+1	5	2,66
-1	+1	+1	7	2,76
+1	-1	-1	5	4,01
+1	+1	-1	7	3,80
+1	-1	+1	7	2,45
+1	+1	+1	9	2,29
-1,68	0	0	4,32	2,60
+1,68	0	0	7,68	3,02
0	0	-1,68	4,32	2,66
0	0	+1,68	7,68	1,67
0	-1,68	0	4,32	2,70
0	+1,68	0	7,68	2,20
0	0	0	6	2,70
0	0	0	6	2,50

Como se puede apreciar, el máximo nivel de proliferación se alcanzó a una concentración total de hidrolizados de 5 mg.ml⁻¹, con concentraciones individuales de HA, HB y UFEL iguales a 3, 1 y 1 mg.ml⁻¹, respectivamente. El comportamiento del sistema puede ser representado, de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$), por el siguiente modelo de superficie de respuesta:

$$DC \text{ (células viables.ml}^{-1}\text{)} = 37239 + 55,41x[\text{HA}] + 2410x([\text{HA}]-2)^2 - 696,24x[\text{HB}] + 1134,49x([\text{HB}]-2)^2 - 5184x[\text{UFEL}]$$

El modelo no muestra evidencia estadísticamente significativa de falta de ajuste ($p > 0,05$).

En la figura IV.2.14. se muestra el gráfico de contornos correspondiente a la variación de la densidad celular en función de la concentración de HA y UFEL, para un valor constante de HB igual a 1 mg.ml^{-1} . Los valores más elevados de densidad celular se pueden obtener por la combinación de concentraciones de HA y UFEL que están representadas en la región inferior del gráfico, que puede considerarse la región del plano de combinación de concentraciones óptimas para ambos suplementos.

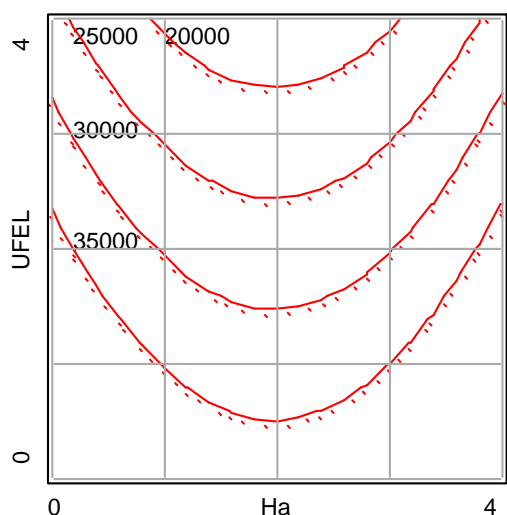


Figura IV.2.14.: Representación gráfica de contornos del modelo de variación de la densidad celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 en función de la concentración de HA y UFEL, manteniendo constante la concentración de HB (1 mg.ml^{-1}). HA: hidrolizado enzimático de caseína. HB: caldo triptosa fosfato.

IV.2.8. Evaluación de la producción viral en cultivos libres de suero y de suplementación lipídica

Una vez determinada la concentración óptima de los componentes que integran la mezcla de hidrolizados y extractos, se llevó a cabo la evaluación de la producción volumétrica de poliedros de AgMNPV en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-

AG-286 en el medio UNL-5 libre de suero y suplementado con la mezcla óptima de aditivos, a la cual se denominó “H”. A fin de establecer una comparación de las aptitudes de distintos medios básicos suplementados con H, para sostener la producción viral, también se utilizaron cultivos en los medios TC-100 y UNL libres de suero. Para llevar a cabo este experimento, se partió de distintos cultivos de células adaptadas a los medios TC-100, UNL y UNL-5 suplementados con 10% de SFB, respectivamente. Cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia entre el 80% y el 90% fueron cosechados y las células cuantificadas, centrifugadas y resuspendidas en el medio de cultivo fresco (TC-100, UNL y UNL-5, suplementados con H). Los cultivos, con un inóculo celular inicial de 4×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron infectados inmediatamente a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ y mantenidos en agitación y protegidos de la luz durante 1 hora. Posteriormente, se sembraron por triplicado 100 μl de cada cultivo en placas para cultivos celulares de 96 pocillos. Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C durante 6 días, al término de los cuales fueron descartados los sobrenadantes y las monocapas celulares tratadas con igual volumen de una solución de SDS 1%.

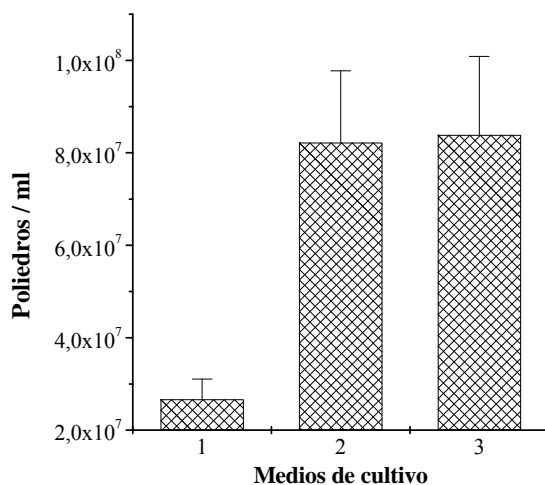


Figura IV.2.15.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en los medios TC-100 (1), UNL (2) y UNL-5 (3) suplementados con H. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$, en cultivos con una densidad celular de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Los mismos, que se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, fueron incubados a 28°C durante 6 días.

Como se puede observar en la figura IV.2.15., los cultivos en los medios UNL y UNL-5 suplementados con H produjeron tres veces mayor cantidad de poliedros de AgMNPV que los cultivos en el medio TC-100 suplementados con la misma mezcla de hidrolizados proteicos y UFEL.

En conclusión, el medio UNL-5 demostró ser superior que los medios TC-100 y UNL, tanto para sostener la proliferación celular como la producción de poliedros de AgMNPV, bien en condiciones de suplementación con suero o adicionado con la mezcla optimizada de hidrolizados proteicos y ultrafiltrado de extracto de levadura (H). Por lo tanto, se decidió utilizar el medio UNL-5, suplementado con H, para los experimentos posteriores, tendientes a una caracterización más profunda del metabolismo de la línea celular saUFL-AG-286 y el desarrollo de un medio completo libre de suero y de bajo costo.

IV.3. Estudio del metabolismo de la línea celular saUFL-AG-286: respuesta a los cambios en las concentraciones de los nutrientes principales

IV.3.1. Respuesta a los cambios en la concentración de glutamina

IV.3.1.1. Influencia de la concentración de glutamina sobre la proliferación celular

Al determinar el consumo porcentual de los nutrientes en los cultivos en suspensión agitada de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con suero, se observó que la glutamina fue el único aminoácido consumido prácticamente en forma total. En estos cultivos se había observado, además, que la caída de la viabilidad celular coincidía temporalmente con el agotamiento de la glutamina. Por estas razones, la concentración de este aminoácido se incrementó cuatro veces en el medio de cultivo UNL-5 respecto al contenido en el medio TC-100. Sin embargo, el incremento en la concentración de glutamina podría provocar un aumento en la velocidad de consumo del aminoácido y, consecuentemente, un incremento en la acumulación de amonio que, a su vez, podría ejercer un efecto tóxico y afectar tanto la viabilidad como la funcionalidad celulares. Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto de la concentración de glutamina sobre la proliferación y el metabolismo celulares y la producción volumétrica de poliedros.

Para ello, cultivos estáticos de células saUFL-AG-286 (densidad celular inicial: $3,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1}) en el medio UNL-5 + 10% SFB se suplementaron con distintas concentraciones de glutamina (0,5 mM; 9 mM y 18 mM). Los cultivos, en frascos T de 25 cm^2 , se incubaron en estufa a 28° C. Cada 24 horas, durante 14 días, los cultivos fueron resuspendidos, homogeneizados y cuantificados. Se tomaron muestras diarias de sobrenadantes de cada cultivo, las cuales fueron conservadas para la posterior determinación de las concentraciones de glucosa, glutamina y amonio.

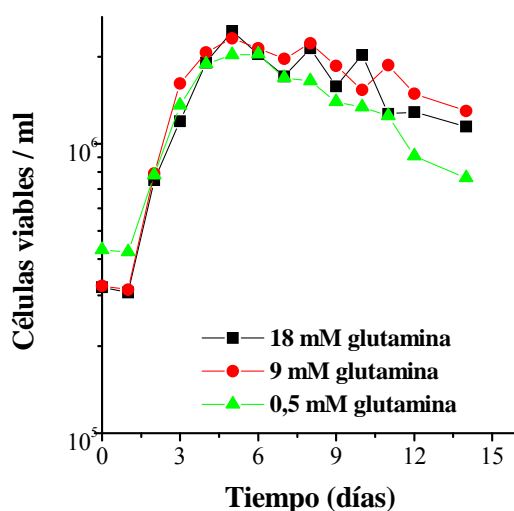


Figura IV.3.1.: Efecto de la concentración de glutamina sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 + 10% SFB. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Se observó una fase de retardo de 24 horas en los tres cultivos celulares (figura IV.3.1.). La velocidad específica de multiplicación celular varió con la concentración inicial de glutamina, con el máximo valor en los cultivos con una concentración de 9,5 mM, y el mínimo en los cultivos con la concentración más baja. Las densidades celulares máximas alcanzadas a las 120 horas de cultivo fueron similares en los tres cultivos (cuadro IV.3.1.). La fase de muerte celular se alcanzó más rápido en el cultivo con la concentración inicial de glutamina más baja.

Cuadro IV.3.1.: Densidad celular máxima y velocidad específica de multiplicación celular en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en medio UNL-5 + 10% de SFB, conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

	Concentración inicial de glutamina (mM)		
	0,5	9	18
Densidad celular máxima (células viables. ml ⁻¹)	2,04x10 ⁶	2,32x10 ⁶	2,46x10 ⁶
Velocidad específica de multiplicación celular (h ⁻¹)	0,024	0,035	0,029

En cuanto a la evolución de la concentración de glutamina, se pudo observar que (figura IV.3.2.):

- el cultivo que contenía 18 mM de glutamina experimentó un leve aumento en su concentración durante las primeras 24 horas.
- en los tres cultivos se registró una primera etapa de mayor consumo de glutamina hasta las 96 horas de cultivo, seguida de una etapa de menor consumo.
- sólo en el cultivo con una concentración inicial de 0,5 mM, la glutamina fue consumida totalmente.

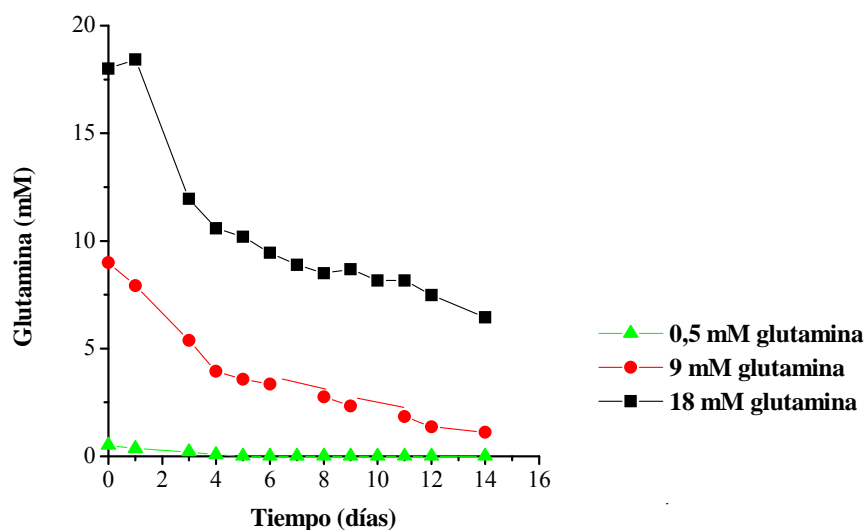


Figura IV.3.2.: Evolución de la concentración de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

La figura IV.3.3. representa la evolución temporal de la velocidad específica de consumo celular de glutamina en los distintos cultivos. Como se puede observar en la misma, esta velocidad está relacionada en forma directa con el contenido de glutamina en el medio de cultivo: a mayor concentración de glutamina, mayor velocidad de consumo. Esta relación se evidenció claramente entre las 24 y 72 horas de cultivo, excepto para los cultivos conteniendo una concentración 18 mM, durante las primeras 24 horas de cultivo, en los cuales se verificó un ligero incremento de la concentración de glutamina.

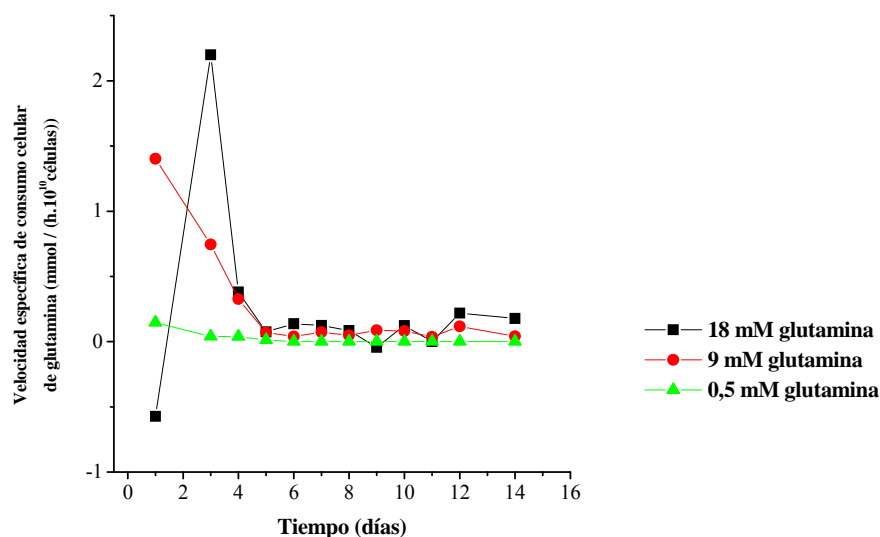


Figura IV.3.3.: Variación de la velocidad específica de consumo de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Por otro lado, en la figura IV.3.4. se puede observar que el rendimiento celular en glutamina durante la fase exponencial de crecimiento fue diez veces mayor en los cultivos con la menor concentración inicial, respecto a los que contenían 9 mM, y dieciocho veces mayor respecto a los cultivos adicionados de 18 mM de glutamina.

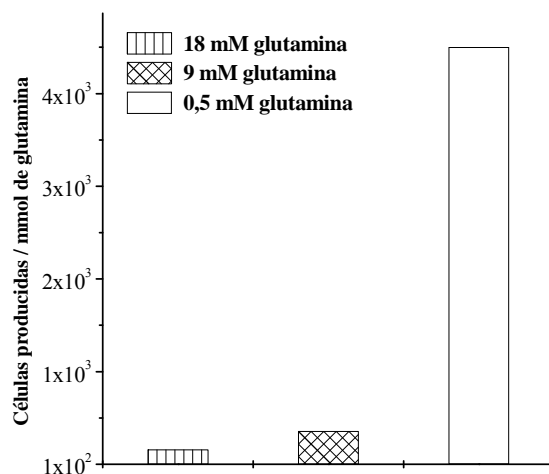


Figura IV.3.4.: Rendimiento celular por mmol de glutamina consumido en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de SFB, conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo y fueron incubados a 28° C.

Con respecto a la evolución de la glucosa, su concentración decayó rápidamente, y sin diferencias remarcables entre los tres cultivos, entre las 24 y 120 horas, tiempo coincidente con la fase de crecimiento exponencial del cultivo (figura IV.3.5.).

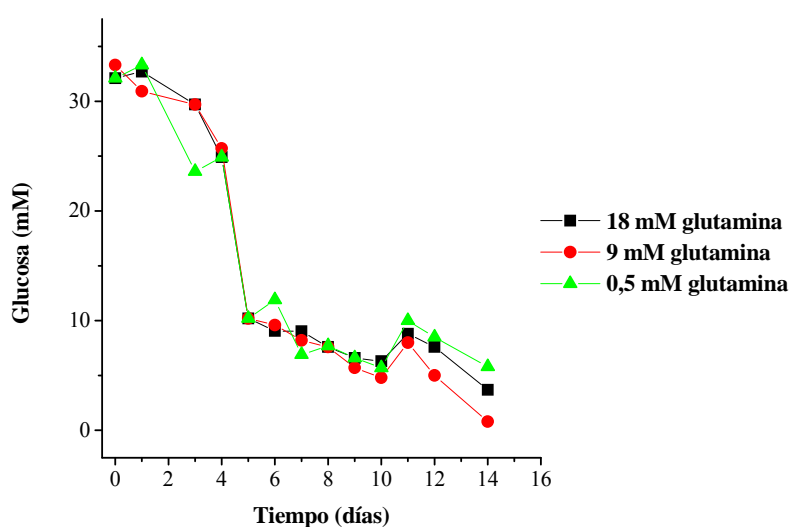


Figura IV.3.5.: Evolución de la concentración de glucosa en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

En la figura IV.3.6., que representa la evolución temporal de la velocidad específica de consumo celular de glucosa en los cultivos que contenían distintas concentraciones iniciales de glutamina, se puede observar que:

- el cultivo con concentración inicial más baja de glutamina experimentó una mayor velocidad específica de consumo celular de glucosa entre las 48 y 72 horas de incubación, respecto a los otros dos cultivos.

- en la fase de crecimiento exponencial del cultivo, la menor velocidad específica de consumo celular de glucosa fue registrada en el cultivo que contenía inicialmente 9 mM de glutamina [$(1,01 \times 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (9 mM); $1,30 \times 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (0,5 mM); $2,70 \times 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (18 mM)].

- todos los cultivos experimentaron un abrupto aumento en la velocidad específica de consumo celular de glucosa coincidentemente con el registro de la máxima densidad de células viables.

- al ingresar los tres cultivos celulares a la fase de muerte, la velocidad de consumo celular específico de glucosa decayó y permaneció prácticamente constante hasta la finalización del cultivo.

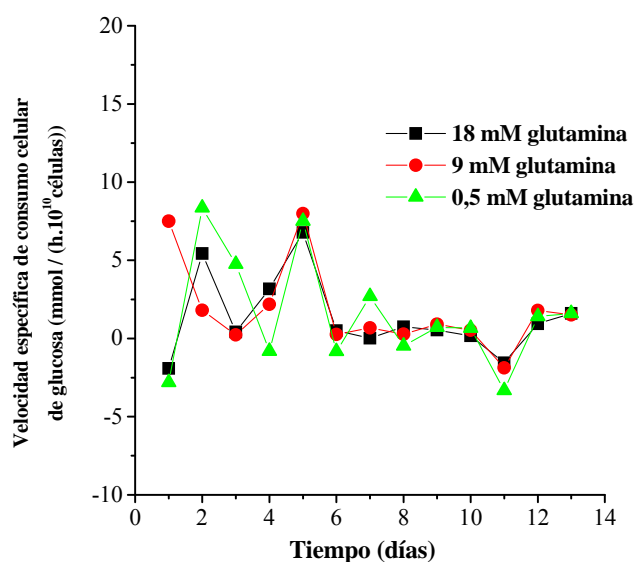


Figura IV.3.6.: Variación de la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Al analizar el rendimiento celular en función del consumo de glucosa en la fase de crecimiento exponencial del cultivo se observó que el menor valor fue registrado en el cultivo que contenía la concentración inicial de glutamina más baja, mientras que los rendimientos celulares fueron similares en los cultivos que contenían 9 mM y 18 mM de glutamina (figura IV.3.7.).

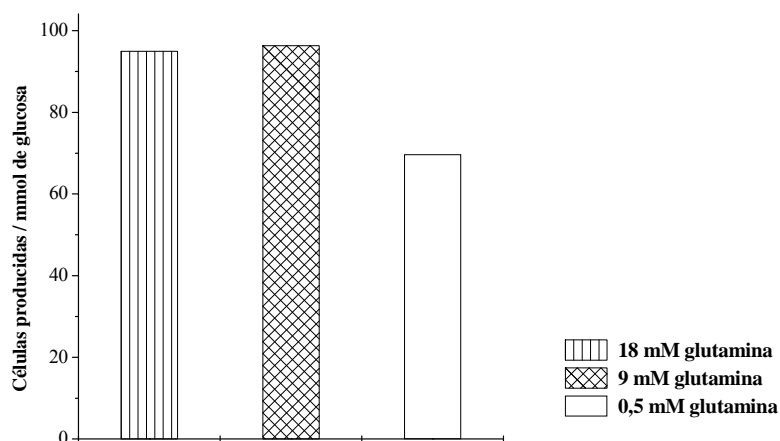


Figura IV.3.7.: Rendimiento celular por mmol de glucosa consumido en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo y fueron incubados a 28° C.

La concentración de amonio fue aumentando progresivamente en los tres cultivos, aunque con distintas velocidades. En la figura IV.3.8. se puede observar, además, que la concentración final de este metabolito se relacionó directamente con la cantidad inicial de glutamina en el medio de cultivo. Así en el cultivo suplementado con 18 mM de glutamina, la concentración final de amonio fue 6,7 veces superior a la determinada en el cultivo que contenía la concentración inicial más baja de glutamina.

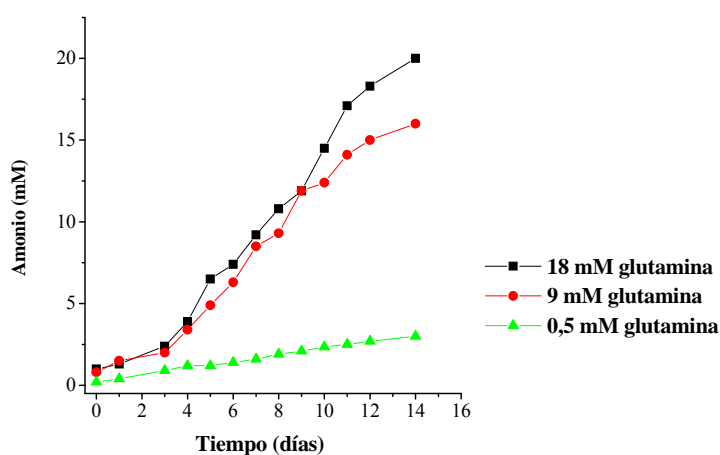


Figura IV.3.8.: Evolución de la concentración de amonio en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glutamina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Más aún, como se puede observar en la figura IV.3.9., las cinéticas de consumo de glutamina y producción de amonio se relacionaron estrechamente en cada uno de los cultivos suplementados con distintas concentraciones de glutamina. Cabe remarcar, sin embargo, que en el cultivo conteniendo la menor concentración inicial de glutamina el amonio continuó acumulándose, aunque a bajo nivel, durante los nueve días posteriores al agotamiento del aminoácido.

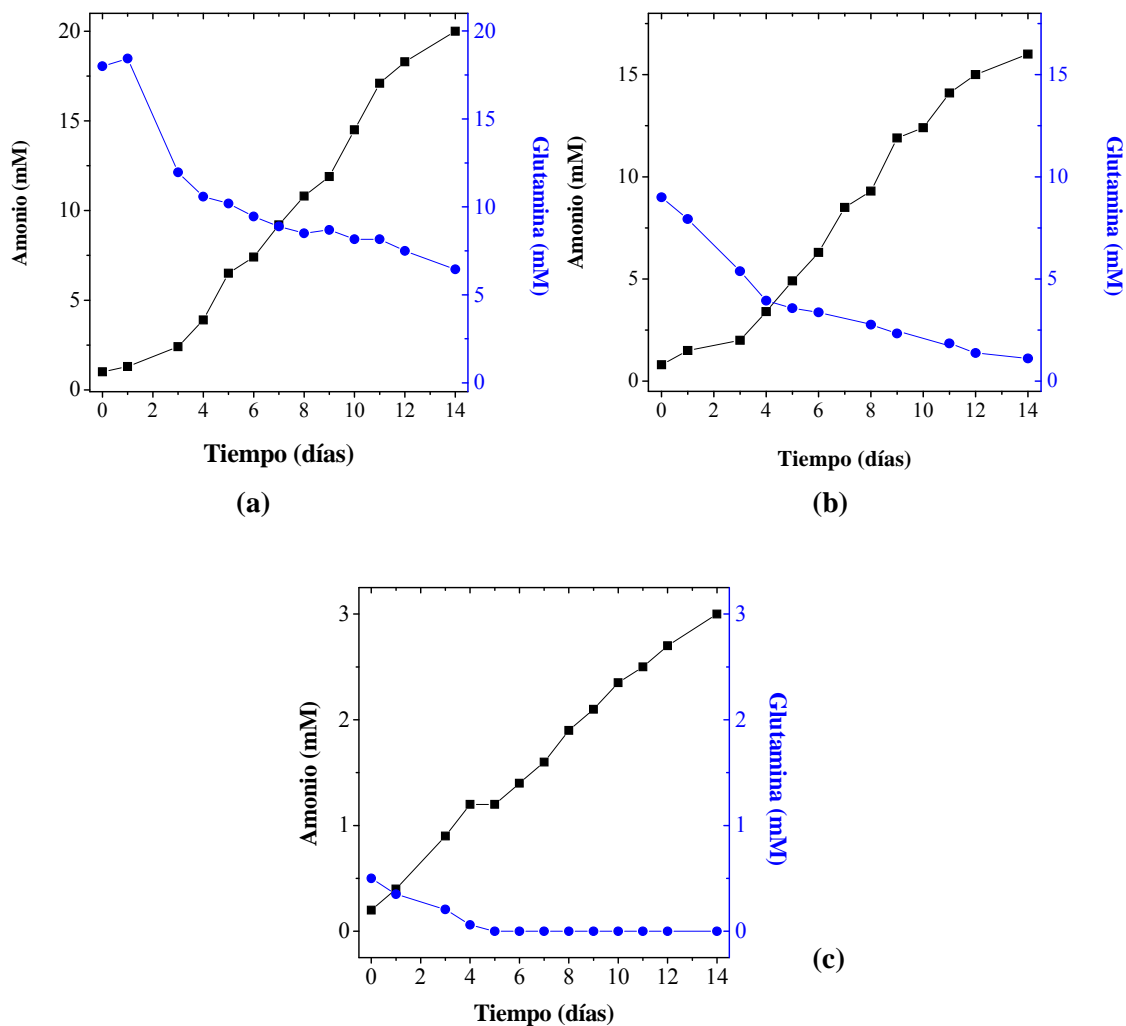


Figura IV.3.9.: Evolución de la concentración de amonio y de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones iniciales de glutamina (a- 18 mM; b- 9 mM; c- 0,5 mM). Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

IV.3.1.2. Influencia de la concentración de glutamina sobre la replicación viral

La influencia de la concentración de glutamina sobre la producción viral fue evaluada a través de la producción volumétrica de poliedros. Para ello, se utilizaron cultivos de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 suplementado con 10% de SFB. Después de haber cosechado los cultivos celulares y cuantificado las células, cinco alícuotas de la suspensión celular fueron centrifugadas y resuspendidas en el medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB (el medio de cultivo UNL-5 en este caso contenía solamente 0,5 mM de glutamina). A las alícuotas celulares (densidad celular inicial: 4×10^5 células viables. ml^{-1}) se les agregaron cantidades adicionales de glutamina para alcanzar concentraciones iniciales de 5, 9, 15 y 18 mM, e inmediatamente fueron infectadas con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Los cultivos fueron mantenidos en agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, fueron sembrados por triplicado en pocillos de una placa para cultivo celulares de 96 orificios (100 μl por pocillo). La placa fue incubada en cámara húmeda en estufa a 28° C durante 6 días, al término de los cuales los sobrenadantes de los cultivos fueron removidos de los pocillos, donde posteriormente se agregó 100 μl de una solución de SDS 1%. Las muestras fueron conservadas a 4° C hasta el momento de realizar el recuento de poliedros.

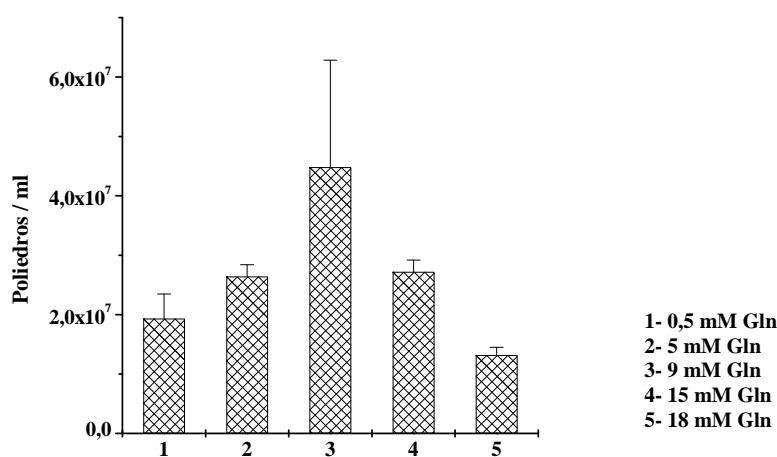


Figura IV.3.10.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB, adicionado de distintas concentraciones de glutamina. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$, en cultivos con una densidad celular de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Los mismos, que se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, fueron incubados a 28° C durante 6 días.

Como se observa en la figura IV.3.10. la producción volumétrica de poliedros fue aumentando junto con el incremento de la concentración de glutamina en el medio de cultivo. El máximo título viral, de $4,48 \times 10^7$ poliedros. ml^{-1} , fue obtenido en el cultivo con una concentración inicial de 9 mM de glutamina. Cuando la concentración inicial se incrementó por encima de ese valor, el resultado obtenido fue una disminución en la producción volumétrica de poliedros. Así, en el cultivo con una concentración inicial de 18 mM de glutamina, la producción viral disminuyó 3,4 veces, respecto al cultivo que contenía la mitad de la concentración inicial de este aminoácido.

En función de los resultados obtenidos (parámetros cinéticos, metabólicos y de producción volumétrica de poliedros de AgMNPV) se decidió que la formulación básica del medio de cultivo UNL-5 contuviera 9 mM de glutamina.

IV.3.2. Respuesta a los cambios en la concentración de glucosa

En los cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con suero, la concentración de glucosa tendió a agotarse hacia el final del cultivo, coincidiendo este hecho con el comienzo de la fase de muerte celular. Para evaluar la esencialidad de la glucosa en el cultivo de la línea celular saUFL-AG-286, y verificar la respuesta celular a los cambios en la concentración, como así también optimizar la concentración en el medio de cultivo UNL-5, se estudió la cinética de proliferación celular, la cinética de consumo de glucosa y de glutamina, y la cinética de producción de amonio, en cultivos que contenían distintas concentraciones de glucosa.

Para ello, cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB (densidad celular inicial: 2×10^5 células viables. ml^{-1}) se iniciaron con distintas concentraciones de glucosa: 0mM; 22mM y 44 mM. Los cultivos se sembraron en frascos T de 25 cm^2 y se incubaron en estufa a 28° C. Cada 24 horas, durante 14 días, los cultivos fueron resuspendidos y homogeneizados, separando una alícuota de la suspensión celular para su cuantificación y posterior determinación de la concentración de glucosa, glutamina y amonio en el medio de cultivo.

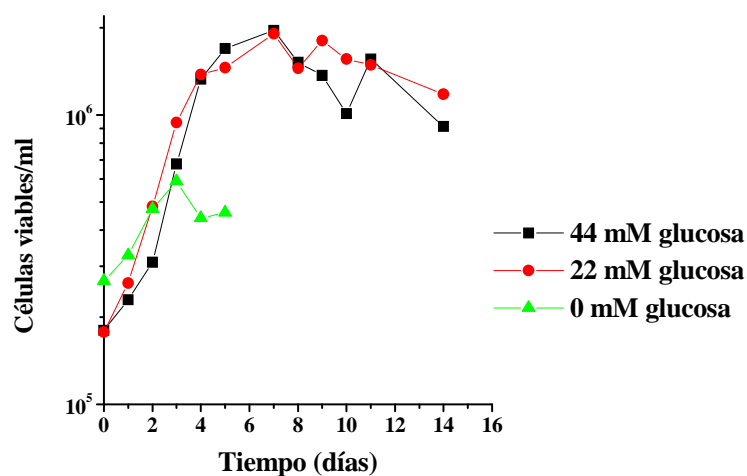


Figura IV.3.11.: Efecto de la concentración de glucosa sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

En la figura IV.3.11., se puede observar que ninguno de los tres cultivos presentó fase de retardo. En el cultivo sin glucosa sólo se observó proliferación durante tres días, alcanzando una densidad celular máxima de $5,9 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹. Posteriormente ingresó en fase de muerte celular, concluyendo el cultivo al quinto día de su siembra. Distinto comportamiento presentaron los cultivos iniciados con 22mM y 44 mM de glucosa, en los cuales la fase de crecimiento exponencial se extendió hasta el séptimo día de cultivo. Además, la cinética de proliferación celular y la máxima densidad celular fueron similares en ambos cultivos (cuadro IV.3.2.).

Cuadro IV.3.2.: Densidad celular máxima y velocidad específica de multiplicación celular en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en medio UNL-5 + 10% de SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

	Concentración inicial de glucosa (mM)		
	0	22	44
Densidad celular máxima (células viables. ml ⁻¹)	5,90x10 ⁵	1,91x10 ⁶	1,97x10 ⁶
Velocidad específica de multiplicación celular (h ⁻¹)	0,011	0,022	0,025

Analizando las curvas de evolución de la concentración de glucosa (figura IV.3.12.) se puede observar que los valores de concentración se mantuvieron constantes durante los primeros días. A partir de las 72 horas, la concentración de glucosa decayó constantemente en ambos cultivos, observándose el agotamiento de este hidrato de carbono en el cultivo suplementado con 22 mM de glucosa.

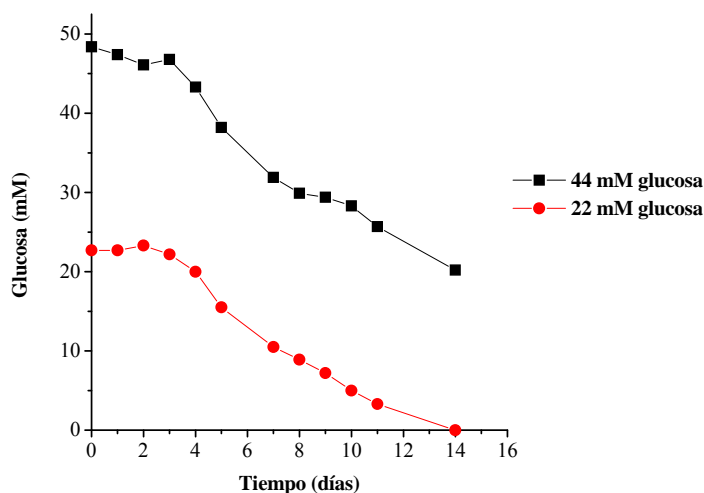


Figura IV.3.12.: Evolución de la concentración de glucosa en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

La figura IV.3.13. representa la evolución temporal de la velocidad específica de consumo celular de glucosa en los cultivos suplementados con 22 o 44 mM del hidrato de carbono. Como se puede observar en la misma, la velocidad específica inicial de consumo celular de glucosa en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB está relacionado en forma directa con el contenido de glucosa en el medio de cultivo. A mayor concentración de glucosa, mayor velocidad inicial de consumo. Esta relación se evidenció claramente en las primeras 48 horas de cultivo. Más aún, al analizar este parámetro cinético durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo, se determinó que su valor se duplicó en el cultivo que contenía inicialmente 44 mM ($1,03 \times 10^{-10}$ mmol.cel⁻¹.h⁻¹), respecto al cultivo adicionado de 22 mM de glucosa ($5,67 \times 10^{-11}$ mmol.cel⁻¹.h⁻¹).

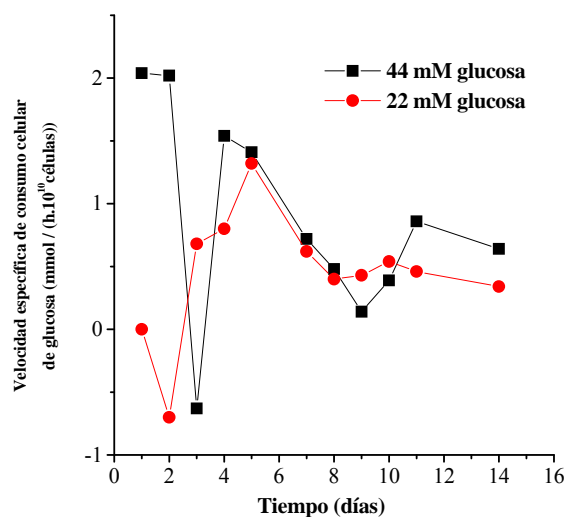


Figura IV.3.13.: Variación de la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Por otra parte, en la figura IV.3.14. se puede observar que el rendimiento celular en glucosa durante la fase exponencial de crecimiento fue 1,65 veces mayor en el cultivo celular que contenía inicialmente 22 mM de glucosa, respecto al cultivo conteniendo 44 mM de glucosa.

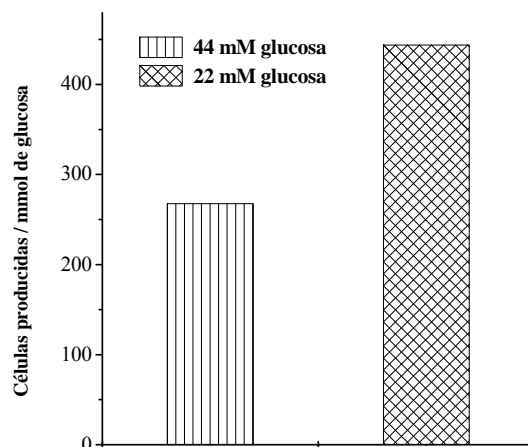


Figura IV.3.14: Rendimiento celular por mmol de glucosa consumido en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

La glutamina fue consumida constantemente en los tres cultivos desde el momento inicial. En los cultivos conteniendo 22 mM y 44 mM de glucosa se observó una etapa de mayor consumo comprendida entre las 48 y 120 horas de cultivo, mientras que en el cultivo sin glucosa el consumo de glutamina se interrumpió al mismo tiempo que la proliferación.

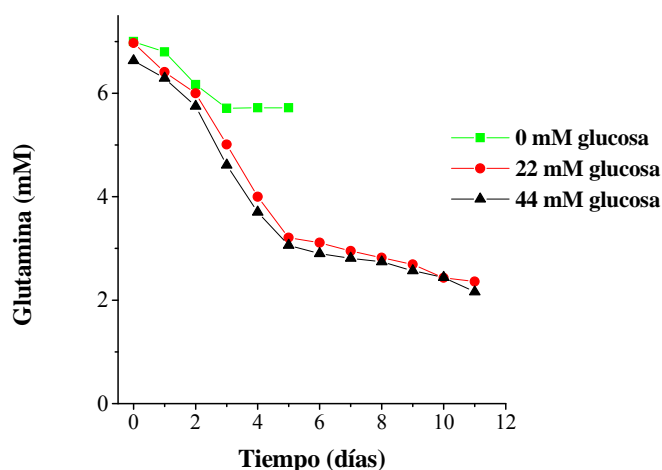


Figura IV.3.15.: Evolución de la concentración de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

En cuanto a la evolución temporal de la velocidad específica de consumo celular de glutamina (figura IV.3.16.) se puede observar que:

- La menor velocidad inicial de consumo se verificó en el cultivo libre de glucosa. Posteriormente, aumentó a las 48 horas, para finalmente decaer abruptamente hasta tornarse nula a los cuatro días de cultivo.

- En los cultivos conteniendo glucosa, la velocidad de consumo de glutamina, en las primeras 24 horas, fue inversamente proporcional al contenido inicial de glucosa en el medio de cultivo.

- Entre las 24 y 96 horas de cultivo, la velocidad de consumo de glutamina fue menor en el cultivo que contenía inicialmente 22 mM de glucosa, respecto al que contenía 44 mM. Luego, ambas velocidades se igualaron.

- En la etapa de crecimiento exponencial del cultivo, el pico de velocidad de consumo de glutamina se verificó en el cultivo que contenía inicialmente 22 mM de glucosa ($6,50 \times 10^{-11} \text{ mmol.cel}^{-1}.\text{h}^{-1}$), aunque no difirió significativamente del valor máximo determinado en el cultivo suplementado con 44 mM de glucosa ($6,24 \times 10^{-11} \text{ mmol.cel}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

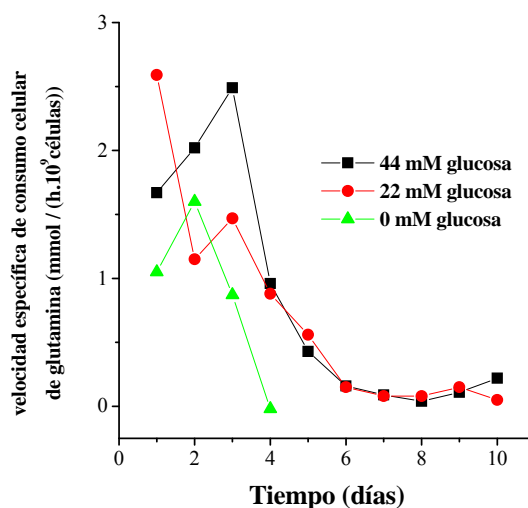


Figura IV.3.16.: Variación de la velocidad específica de consumo de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo.

En la etapa de crecimiento exponencial del cultivo, el rendimiento celular en glutamina no difirió significativamente en los cultivos conteniendo distintas concentraciones iniciales de glucosa (22 o 44 mM). Sin embargo, fue marcadamente menor en los cultivos libres de glucosa.

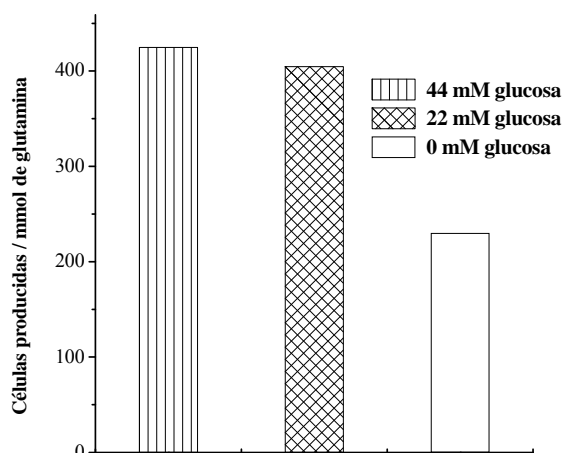


Figura IV.3.17.: Rendimiento celular por mmol de glutamina consumido en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo.

Con respecto a la evolución de la concentración de amonio, todos los cultivos presentaron aumentos constantes en su concentración (Figura IV.3.18.). El mayor valor de concentración de amonio (15,9 mM), fue determinado en el cultivo conteniendo 22 mM de glucosa, a los 11 días de cultivo, coincidentemente con el agotamiento de la concentración de glucosa (figura IV.3.12.).

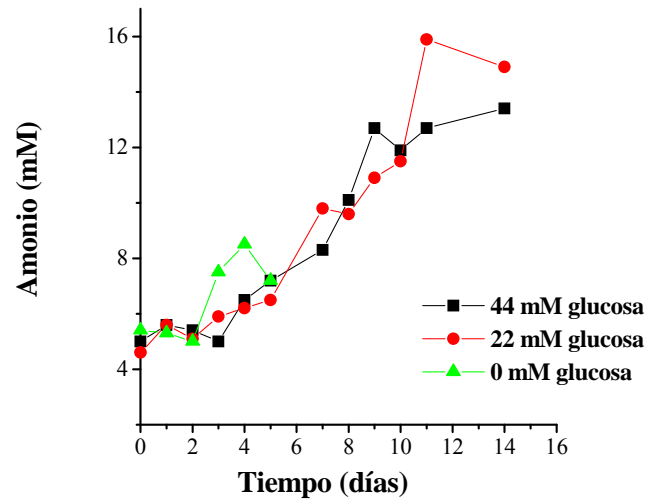


Figura IV.3.12.: Evolución de la concentración de amonio en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo. Los mismos fueron incubados durante 14 días a 28° C.

Al comparar en los tres cultivos las cinéticas de consumo de glutamina y producción de amonio se puede observar una evolución paralela en los cultivos conteniendo glucosa, hasta el momento en que el hidrato de carbono se agotó en el cultivo que contenía 22 mM de concentración inicial, en que produjo un agudo pico de producción de amonio. Este mismo pico se observó, en forma más temprana, en el cultivo libre de glucosa.

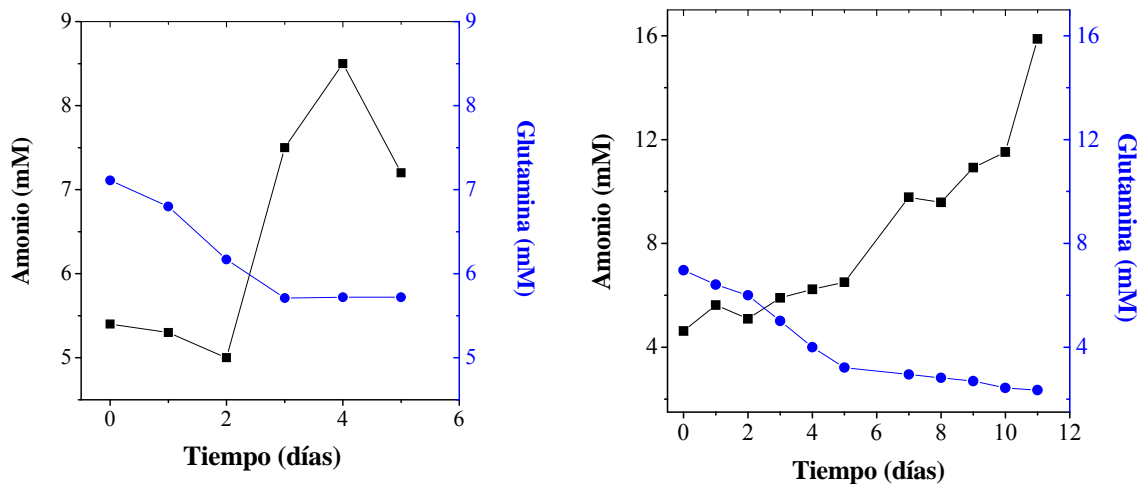
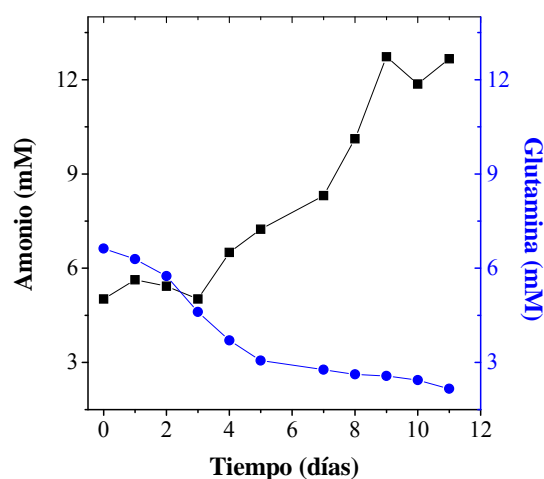


Figura IV.3.19.: Evolución de la concentración de amonio y de glutamina en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB conteniendo distintas concentraciones de glucosa (a- 0mM; b- 22 mM; c- 44 mM). Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en frascos de 25 cm² con 5 ml de volumen de cultivo.



(c)

Figura IV.3.19.: Continuación

Si bien los parámetros cinéticos fueron similares en los cultivos suplementados con 22 mM y 44 mM de glucosa, en el primero de ellos el hidrato de carbono se agotó antes de la finalización del cultivo. Concomitantemente, el agotamiento de glucosa fue seguido por un pico de producción de amonio, que podría resultar tóxico o interferir con la funcionalidad celular. En función de estos resultados, se decidió que en la formulación habitual del medio de cultivo UNL-5 la concentración inicial de glucosa fuera de 44 mM.

IV.3.3. Influencia de la concentración de amonio sobre la producción de poliedros

Como se demostró previamente, las células saUFL-AG-286 producen activamente amonio. Por otro lado, también se observó que la producción de poliedros de AgMNPV disminuye cuando los cultivos infectados son suplementados con elevadas concentraciones de glutamina. Esta acción inhibitoria podría ser la consecuencia de la acumulación de elevados niveles de amonio. Para demostrar esta hipótesis, se llevó a cabo un experimento en el cual los cultivos fueron suplementados con distintas concentraciones de amonio al momento de la infección.

Cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 adaptados al crecimiento en el medio UNL-5 + 10% SFB, con una densidad inicial de 4×10^5 células viables. ml^{-1} , se suplementaron con cloruro de amonio para obtener distintas concentraciones iniciales

del catión: 11, 20, 25, 30, 35, 40 mM. Inmediatamente, se infectaron con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 2 $\text{DICCC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ y se mantuvieron en agitación durante 1 hora protegidos de la luz. Posteriormente, se sembraron por triplicado alícuotas de 100 μl en placas para cultivo de células de 96 pozos. Los cultivos infectados se incubaron durante 6 días en estufa a 28° C. Cumplido ese tiempo, se eliminaron los sobrenadantes de los cultivos y las monocapas celulares se trataron con una solución de SDS 1%. Para descartar que las variaciones en la producción de poliedros se debieran al aumento progresivo en la osmolaridad del medio, se realizaron cinco cultivos de control, los cuales se suplementaron con distintas cantidades de una solución de cloruro de sodio, para alcanzar idénticas concentraciones molares a las ensayadas anteriormente cuando el medio de cultivo fue suplementado con cloruro de amonio. Como control se utilizó un cultivo en el medio UNL-5 + 10% SFB sin el agregado de ningún componente extra. En este cultivo, se determinó una concentración basal de amonio igual a 5,5mM.

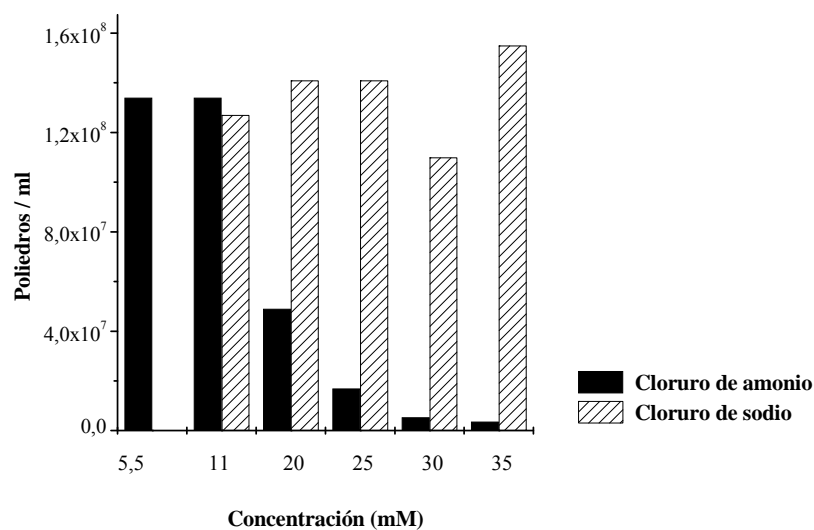


Figura IV.3.20.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% SFB suplementados con distintas concentraciones de cloruro de sodio o de amonio. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 2 $\text{DICCC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$, en cultivos con una densidad celular de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Los mismos, que se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, fueron incubados a 28° C durante 6 días.

En la figura IV.3.20. se puede observar que la producción de poliedros permaneció inalterada para concentraciones de amonio inferiores, o igual, a 11 mM, pero cayó más de tres veces cuando la concentración aumentó a 20 mM, y se redujo a menos del 5% para una concentración de 30 mM. Se puede observar, también, que el efecto inhibitorio no fue provocado por el aumento de osmolaridad concomitante, ya

que la producción de virus no fue afectada por la adición de cloruro de sodio, ni aún a la máxima concentración evaluada.

IV.4. Cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en medios libres de suero y optimización de la composición de un nuevo medio de cultivo completo

IV.4.1. Estudio de la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y la producción de AgMNPV en el medio de cultivo Sf-900II

El desarrollo de medios de cultivo libres de suero ha cobrado en los últimos años gran importancia sobre todo en lo referente a los procesos de producción a gran escala. El medio de cultivo Sf-900 II es uno de los medios libres de suero más utilizado en el cultivo de células de insectos, pero su utilidad específica para el cultivo de la línea celular UFL-AG-286 no había sido evaluada previamente, como tampoco su aptitud para sostener la replicación de AgMNPV.

La adaptación de las células saUFL-AG-286 al cultivo estático en el medio Sf-900II fue llevada a cabo, en forma progresiva, a partir de células en la mezcla TC-100 / IPL-41 (1:1) suplementada con 10% de SFB. Así, a través de sucesivos pasajes celulares fue incrementándose en los cultivos la proporción del medio Sf-900 II respecto al medio suplementado con suero. Este proceso condujo a una disminución paulatina de la concentración total de suero, hasta su completa eliminación cuando las células fueron cultivadas exclusivamente en Sf-900II. Una vez adaptadas las células a este medio, se determinó la cinética de proliferación en cultivos estáticos. Para ello, un cultivo de células adaptadas al crecimiento en monocapa en el medio Sf-900 II fue cosechado y las células cuantificadas. Posteriormente, se tomó de la suspensión celular la alícuota necesaria a fin de partir de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables.ml⁻¹. Luego de su centrifugación y resuspensión en medio de cultivo fresco, alícuotas de 500 µl se dispensaron en placas de cultivo de 24 pozos que se incubaron en estufa a 28° C. A partir del primer día de cultivo y posteriormente cada 48 horas se cosecharon dos pozos para cuantificación de células totales y viables.

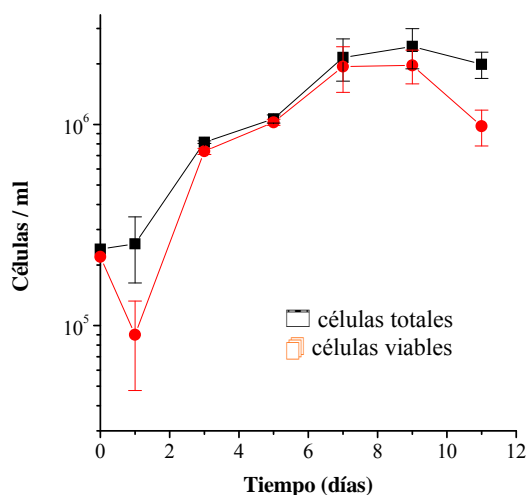


Figura IV.4.1.: Curva de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio Sf-900II. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de cultivos de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables. ml^{-1} . Las placas fueron incubadas a 28°C durante 11 días.

Una importante caída de la viabilidad celular se observó a las 24 horas de cultivo. Este fenómeno podría atribuirse a la metodología utilizada para resuspender la monocapa celular, que en los primeros días de cultivo, en este medio libre de suero, se encuentra firmemente adherida a la superficie de la placa. Posteriormente, el cultivo ingresó a la fase de crecimiento exponencial la que se extendió hasta las 167 horas. En esta etapa, la velocidad específica de multiplicación celular fue de $0,021 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de duplicación: 33 horas). La densidad celular máxima, alcanzada a las 216 horas de cultivo, fue de $2,33 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . A partir del noveno día de cultivo, la viabilidad celular decayó abruptamente.

Luego de determinar la cinética de proliferación celular se procedió a evaluar la aptitud del medio de cultivo Sf-900 II respecto a la producción de AgMPNV. Para ello, se partió de un cultivo estático de células adaptadas al medio Sf-900 II. Una vez cosechadas, las células se infectaron inmediatamente a una multiplicidad de infección de $2 \text{ DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. El cultivo se mantuvo en agitación durante 1 hora. Transcurrido el mismo se sembró en una placa para cultivos celulares de 24 pozos y se incubó en estufa a 28°C . Cada 24 horas se procesaron dos pocillos, extrayendo su sobrenadante y adicionando el mismo volumen de una solución de SDS 1%. Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de realizar el recuento de poliedros.

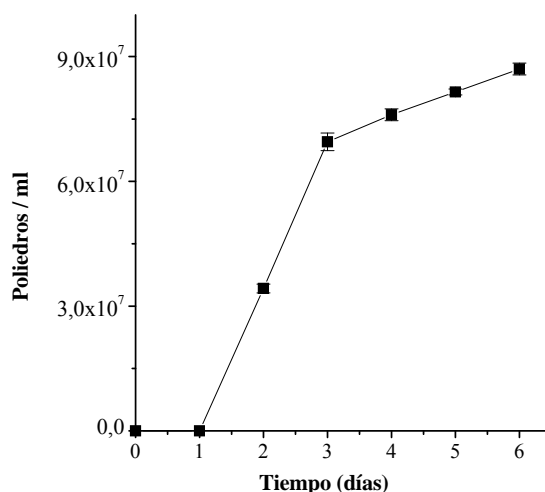


Figura IV.4.2.: Evolución de la producción volumétrica de poliedros a partir de un cultivo estático de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio Sf-900II infectado con AgMNPV a una MOI de 2 $DICC_{50\%} \cdot célula^{-1}$. Los cultivos celulares se realizaron en placas de 24 pozos y fueron incubados a 28° C.

Los primeros poliedros virales se detectaron a las 48 horas post-infección. Posteriormente, se observó una etapa importante de producción viral que se extendió hasta las 72 horas. A partir de allí, la velocidad de producción de poliedros decayó significativamente, aunque el ligero incremento verificado entre las 72 y 144 horas permitió alcanzar una concentración máxima de $8,6 \times 10^7$ poliedros. ml^{-1} a los 6 días post-infección.

IV.4.2. Adaptación de la línea celular saUFL-AG-286 al crecimiento en el medio de cultivo UNL-5 libre de suero

El medio de cultivo UNL-5 fue diseñado según los requerimientos nutricionales de la línea celular saUFL-AG-286. La suplementación de este medio de cultivo con 10% de SFB permitió obtener mayor densidad celular y producción viral respecto a las registradas en el medio de cultivo TC-100 suplementado con la misma concentración de suero (figuras IV.2.4. y IV.2.5.).

Si se reemplaza el suero fetal bovino, en razón de las desventajas que acarrea su utilización, es necesario enriquecer el medio de cultivo, ya sea a través del agregado de distintos componentes o de la optimización de la concentración de los ya existentes. En la sección IV.2. fueron identificados tres compuestos de naturaleza proteica como sustitutos parciales del SFB.

Sin embargo, para poder cultivar en forma permanente las células en un medio libre de suero es necesario introducir al mismo una fuente exógena de lípidos y esteroides. Por lo tanto, el medio UNL-5 fue suplementado con 1% de un concentrado de lípidos y esteroides de origen comercial (GIBCO[®], cat. 11905-031), y se evaluó la capacidad del mismo para el cultivo de células saUFL-AG-286 previamente adaptadas al medio Sf-900 II.

Células adaptadas al crecimiento en cultivos estáticos en el medio Sf-900 II fueron sucesivamente cultivadas en mezclas de Sf-900 II y UNL-5, que contenían concentraciones crecientes de este último medio, hasta obtener un cultivo adaptado al medio UNL-5 suplementado con 10% de Sf-900 II. Estas células fueron utilizadas para realizar la optimización de la composición del medio UNL-5.

La primera etapa en el proceso de optimización fue la realización de un ensayo de *screening* para identificar posibles limitaciones en la concentración de los componentes del medio UNL-5. Se diseñó entonces un experimento de tipo Plackett-Burman, de diez factores a dos niveles con un punto central (cuadro IV.4.1.). Un cultivo de células adaptadas al crecimiento en cultivos estáticos en el medio UNL-5 + 10% Sf-900 II se cosechó y cuantificó. Se tomaron trece alícuotas similares de la suspensión celular, las cuales se centrifugaron por separado. Luego de la centrifugación, cada *pellet* de células se resuspendió en medio de cultivo UNL-5 suplementado con los distintos compuestos a diferentes concentraciones, según el esquema que se muestra en el cuadro IV.4.1.

Cuadro IV.4.1.: Diseño experimental de tipo Plackett-Burman, de diez factores a dos niveles con un punto central utilizado en la identificación de los componentes en defecto en el medio de cultivo UNL-5 + H. Concentraciones analizadas: UFEL (+1: 4 mg.ml⁻¹; 0: 2,5 mg.ml⁻¹); HA (+1: 5 mg.ml⁻¹; 0: 4 mg.ml⁻¹); HB (+1: 3 mg.ml⁻¹; 0: 2 mg.ml⁻¹); lípidos (+1: 1,5%; 0: 1,25%); solución de aminoácidos (+1: 20%; 0: 15%); cloruro de colina (+1: 30 mg.ml⁻¹; 0: 25 mg.ml⁻¹); solución de vitaminas (+1: 1,5%; 0: 1,25%); oligoelementos (+1: 0,137 Fe⁺² / 0,01 Mo⁺¹ / 0,0125 Co⁺¹ / 0,039 Cu⁺² / 0,005 Mn⁺¹ / 0,005 Zn⁺¹; 0: 0,069 Fe⁺² / 0,005 Mo⁺¹ / 0,0062 Co⁺¹ / 0,0195 Cu⁺² / 0,0025 Mn⁺¹ / 0,0025 Zn⁺¹) mg.l⁻¹; solución de ácidos orgánicos (+1: 0,5%; 0: 0,25%). En todas las variantes (-1) significó la no adición extra del componente analizado. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de 1,5x10⁵ células viables.ml⁻¹. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28° C. HA: hidrolizado enzimático de caseína. HB: caldo triptosa fosfato. UFEL: ultrafiltrado de extracto de levadura. Lp: emulsión lipídica. AA: solución de aminoácidos. ClCol: cloruro de colina. Vit: solución de vitaminas. Oligo: solución de oligoelementos. AcOrg: solución de ácidos orgánicos.

Expto.	UFEL	HA	HB	Lp	AA	ClCol	Vit	Oligo	AcOrg	Respuesta (10 ⁵ células viables.ml ⁻¹)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	1,50
2	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	1,70
3	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	2,60
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	3,03
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,33
6	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0,66
7	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	4,8
8	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	0,63
9	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	0,30
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	2,20
11	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	3,33
12	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	4,51
13	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0,58

En placas de cultivos de 24 pozos se dispensaron, por duplicado, 500 µl de cada suspensión celular conteniendo 1,5x10⁵ células viables.ml⁻¹. Los cultivos se incubaron en estufa a 28° C durante 5 días. Al cabo de ese tiempo, las células se cosecharon y cuantificaron. Como se puede observar en el cuadro IV.4.1. las mayores densidades celulares fueron obtenidas en los cultivos suplementados con la emulsión lipídica y con el cloruro de colina. Más aún, a través del análisis de la figura IV.4.3. se determinó que el cloruro de colina fue el componente que ejerció el mayor efecto positivo sobre la proliferación celular. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). Otros componentes que ejercieron un efecto positivo fueron la emulsión lipídica y las soluciones de ácidos orgánicos, aminoácidos y oligoelementos.

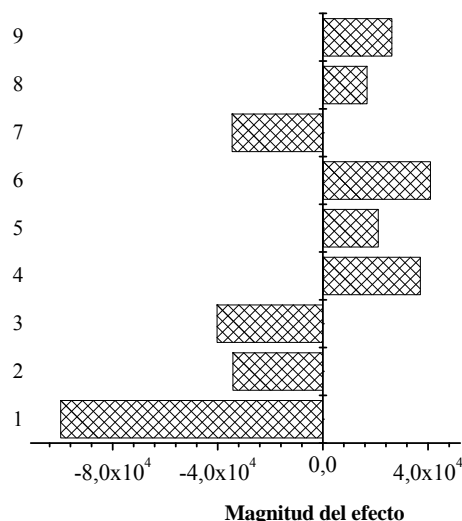


Figura IV.4.3.: Magnitud del efecto originado por la incorporación de distintos componentes sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5. 1-UFEL; 2- hidrolizado de caseína; 3- caldo triptosa fosfato; 4-lípidos; 5- solución de aminoácidos; 6- cloruro de colina; 7- solución de vitaminas; 8- oligoelementos; 9- solución de ácidos orgánicos.

Por otro lado, el aumento de la concentración del UFEL ejerció un claro efecto negativo sobre la proliferación celular. En forma menos marcada, también los aumentos en las concentraciones del hidrolizado de caseína y del caldo triptosa fosfato, y de la solución de vitaminas, ejercieron un efecto negativo sobre la proliferación celular.

IV.4.3. Adaptación de la línea celular saUFL-AG-286 a concentraciones elevadas de ultrafiltrado de extracto de levaduras

En todos los experimentos realizados hasta aquí, el efecto ejercido por el ultrafiltrado de extracto de levaduras sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 dependió de su concentración: estimulante a concentraciones iguales o inferiores a 0,1%, e inhibitorio a concentraciones mayores. Sin embargo, en cultivos de otras líneas celulares de insectos el UFEL es utilizado como un aditivo con efecto estimulante a niveles de concentración de 0,3 % a 0,4% (Schlaeger, 1996; Ikononou y

col. 2001). Esta diferencia de comportamiento podría ser la expresión de una propiedad característica de las células saUFL-AG-286, o bien, teniendo en cuenta que estas células nunca habían sido cultivadas en forma permanente en presencia de concentraciones de UFEL superiores a 0,1%, ser la consecuencia de la necesidad de adaptación a concentraciones más elevadas. Para evaluar esta posibilidad, células adaptadas al medio UNL-5 + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900 II, fueron cultivadas en ese mismo medio suplementado con 0,3% adicional de UFEL, en frascos de 25 cm².

En el primer pasaje el crecimiento resultó inicialmente más lento que en el control sin UFEL adicional, pero al cabo de seis días la densidad celular comenzó a aumentar más rápidamente, y al décimo día la superficie de la botella estaba totalmente cubierta de células, además de que una gran cantidad de ellas sobrenadaba en el medio de cultivo. Luego, en ulteriores pasajes, la velocidad inicial de crecimiento en el cultivo suplementado con UFEL resultó cada vez más elevada, hasta evolucionar de la misma manera que el control, pero alcanzando finalmente densidades celulares más altas.

Para verificar cuantitativamente esta diferencia, partiendo de cultivos de células adaptadas al medio UNL-5 + 1% emulsión lipídica + 0,3% UFEL + 10% Sf-900 II, se sembraron placas de 24 pocillos con $1,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹, en el medio UNL-5 + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900 II, suplementado con 0,3% adicional de UFEL (concentración final de UFEL: 0,4%), o no (concentración final de UFEL: 0,1%). Los cultivos se incubaron a 28° C durante 7 días, al cabo de los cuales se cosecharon y se cuantificaron las células viables.

Como se puede observar en la figura IV.4.4., la densidad final alcanzada en los cultivos que contienen 0,4% de UFEL fue casi cuatro veces mayor que la obtenida en los cultivos que contenían 0,1% de UFEL. En consecuencia, al igual que otras líneas celulares de insectos, la línea saUFL-AG-286 puede tolerar, con una respuesta proliferativa positiva, concentraciones más elevadas de UFEL.

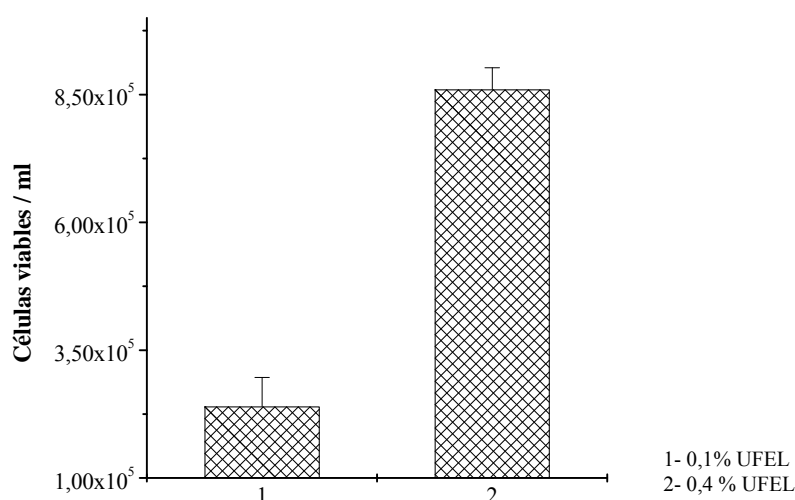


Figura IV.4.4.: Proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900 II conteniendo distintas concentraciones de UFEL. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de $1,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} . Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28°C .

IV.4.4. Efecto de la adición de cloruro de colina sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286

Como se determinó en el experimento cuyos resultados se muestran en la figura IV.4.3., la adición de cloruro de colina parece ejercer un efecto positivo sobre la proliferación de las células saUFL-AG-286. Para verificar ese efecto, partiendo de un cultivo adaptado al medio UNL-5 + 0,3% UFEL + 10% Sf-900 II, se tomaron cuatro alícuotas de una suspensión celular, que luego de centrifugadas se resuspendieron en el mismo medio de cultivo (densidad celular inicial: $1,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1}). A cada una de las alícuotas se le adicionó la cantidad necesaria de cloruro de colina para alcanzar las siguientes concentraciones: 0,020, 0,10, 1 o 10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Las distintas suspensiones celulares se dispensaron, por duplicado, en placas de cultivo de 24 pozos. Las placas se incubaron en estufa a 28°C durante 7 días, al término de los cuales se cosecharon determinándose las respectivas densidades celulares.

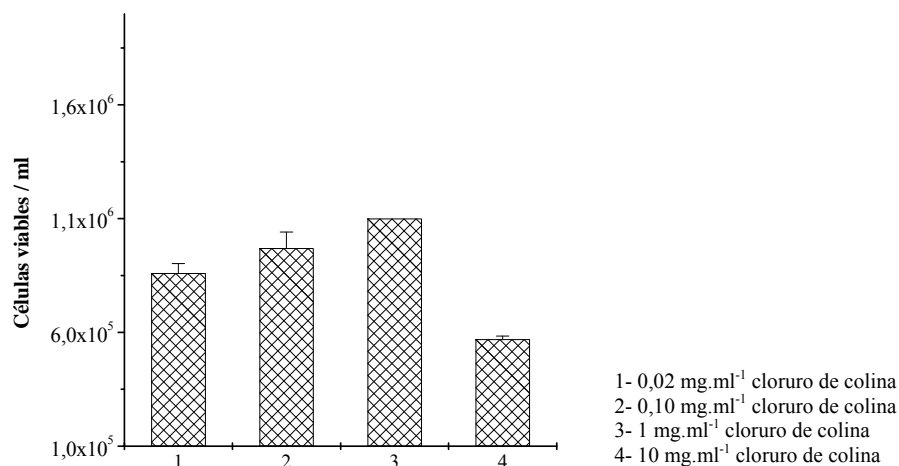


Figura IV.4.5.: Proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 + 0,3% UFEL + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900 II conteniendo distintas concentraciones de cloruro de colina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de $1,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28° C.

A los efectos de acotar el rango de concentraciones de cloruro de colina en el intervalo que presenta mayor actividad estimulante de la proliferación celular, se realizó un nuevo ensayo utilizando condiciones experimentales similares a las usadas en el experimento previo pero variando la concentración de cloruro de colina entre 0,02 y 2,00 mg.ml⁻¹. En la figura IV.4.6. se pueden observar los resultados alcanzados.

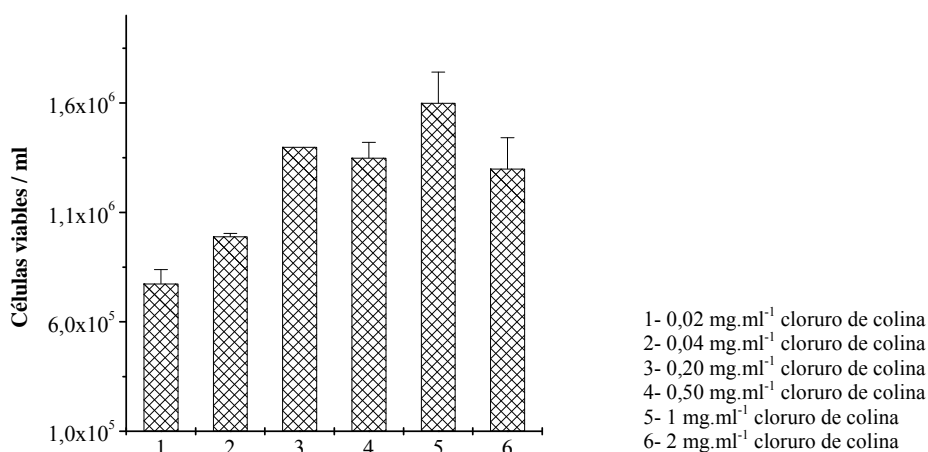


Figura IV.4.6.: Proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 + 0,3% UFEL + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900 II conteniendo distintas concentraciones de cloruro de colina. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de $1,5 \times 10^5$ células viables.ml⁻¹. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28° C.

Como se observó en el experimento anterior, la proliferación celular se incrementó conforme aumentó la concentración de cloruro de colina en el medio de cultivo. La mayor densidad celular fue alcanzada cuando la concentración de este compuesto fue de 1 mg.ml^{-1} . En cambio, se registró un descenso en la proliferación celular cuando al medio de cultivo se lo suplementó con 2 mg.ml^{-1} de cloruro de colina.

IV.4.5. Sustitución del ultrafiltrado de extracto de levadura por el extracto de levadura

El ultrafiltrado de extracto de levadura es un componente de alto costo que incide en forma directa sobre el valor final del medio de cultivo. El reemplazo del ultrafiltrado por el extracto de levaduras, de costo mucho menor, podría representar una significativa reducción del costo final del medio de cultivo. Si bien en experimentos iniciales (figura IV.2.6.) el extracto de levaduras ejerció un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células saUFL-AG-286, estas células no habían sido previamente adaptadas a ese suplemento. Se decidió entonces evaluar la aptitud de la línea celular saUFL-AG-286 para proliferar en un medio de cultivo donde el ultrafiltrado fuera reemplazado por el extracto de levadura completo, y verificar si en estas condiciones era posible prescindir de la suplementación con el medio de cultivo libre de suero comercial.

Así, en primer lugar, células provenientes de cultivos estáticos en el medio UNL-5 (conteniendo 1 mg.ml^{-1} de cloruro de colina) + 1% emulsión lipídica + 10% Sf-900II debieron ser adaptadas al cultivo en el mismo medio, pero libre de UFEL y Sf-900 II, y suplementado con distintas concentraciones de extracto de levadura (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 mg.ml^{-1}). La adaptación de las células se llevó a cabo en frascos T de 25 cm^2 . Cada pasaje fue realizado partiendo de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables. ml^{-1} . Luego de diez subcultivos en cada medio, se determinó la cinética de proliferación celular. Para ello, se tomaron seis alícuotas de suspensión celular, provenientes de los cultivos cuyos medios estaban suplementados con 0; 0,5; 1; 2; 3 ó 4 mg.ml^{-1} de extracto de levadura, que luego de ser centrifugadas se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente (densidad celular inicial: 2×10^5 células viables. ml^{-1}). Posteriormente, alícuotas de $500 \mu\text{l}$ se dispensaron en placas de cultivo de 24 pozos que

se incubaron en estufa a 28° C. A partir del primer día de cultivo y posteriormente cada 48 horas se cosecharon dos pozos para cuantificación de células totales y viables.

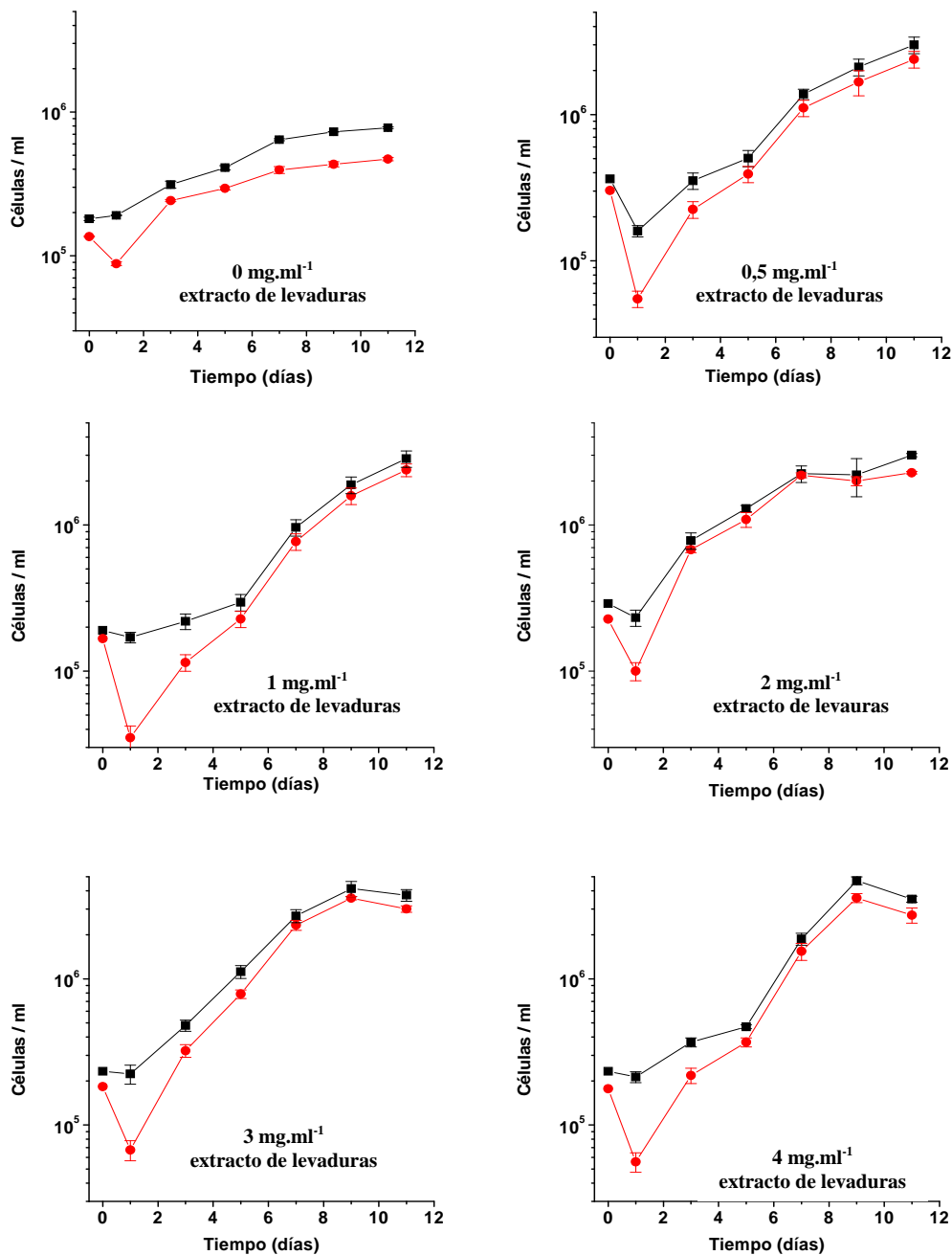


Figura IV.4.7.: Curva de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos estáticos en el medio UNL-5 (libre de UFEL) + 1% emulsión lipídica, suplementado con distintas concentraciones de extracto de levaduras. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de cultivos de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables.ml⁻¹. Las placas fueron incubadas a 28° C durante 11 días.

Todos los cultivos presentaron una fase inicial caracterizada por una importante caída de la viabilidad celular. Este fenómeno podría atribuirse, al igual que para los cultivos en el medio Sf-900 II (figura IV.4.1.), a la metodología empleada para resuspender la monocapa celular. La fase de crecimiento exponencial se desarrolló con diferente velocidad específica de proliferación, dependiendo de la presencia de extracto de levaduras, mientras que la máxima densidad celular alcanzada en cada caso varió con la concentración del suplemento. En el cuadro IV.4.2. se presentan los valores de ambos parámetros en los distintos cultivos.

Cuadro IV.4.2.: Velocidad específica de multiplicación celular y máxima densidad celular alcanzada en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 (libre de UFEL) + 1% emulsión lipídica, suplementado con distintas concentraciones de EL. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en placas de cultivos de 24 pozos partiendo de un inóculo celular inicial de 2×10^5 células viables. ml^{-1} . Las placas fueron incubadas a 28°C durante 11 días.

UNL-5 (libre de UFEL) + 1% emulsión lipídica, suplementado con extracto de levaduras	Máxima densidad celular. (Células viables. ml^{-1})	Velocidad específica de multiplicación celular (horas $^{-1}$)
0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$4,62 \times 10^5$	0,010
0,5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$2,61 \times 10^6$	0,020
1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$2,55 \times 10^6$	0,021
2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$2,31 \times 10^6$	0,020
3 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$3,64 \times 10^6$	0,024
4 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ EL	$3,76 \times 10^6$	0,021

El agregado de extracto de levaduras provocó un marcado incremento de la velocidad específica de proliferación, respecto al control sin agregado del suplemento. Sin embargo, en el rango de concentraciones evaluado, la velocidad de proliferación no se modificó con los cambios en la concentración del extracto. Por otro lado, el agregado del suplemento también produjo un incremento de la máxima densidad celular, pero en este caso de una manera dependiente de la concentración. Por otro lado, estos resultados demostraron la factibilidad del cultivo ininterrumpido de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5, libre de suero y de la suplementación con un medio de cultivo comercial.

IV.4.6. Influencia de la concentración de extracto de levadura sobre la producción viral

En el apartado anterior se demostró que la suplementación con extracto de levadura en un medio libre de suero ejerce un efecto positivo sobre la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 (figura IV.4.7.). Sin embargo, se desconocía su efecto sobre la producción viral. Para evaluar el mismo, se llevó a cabo un ensayo de infección en el cual se trabajó con cinco cultivos celulares adaptados previamente al crecimiento en monocapa en el medio UNL-5 + H (libre de UFEL) + 1 mg.ml⁻¹ de cloruro de colina + 1% de emulsión lipídica, y suplementado con distintas concentraciones de extracto de levadura (0; 1; 2; 3; 4 mg.ml⁻¹). Cada cultivo, de inóculo celular inicial igual a 4x10⁵ células viables.ml⁻¹, se sembró en un frasco para cultivo celular de 25 cm² y se infectó con stock de AgMNPV a una multiplicidad de infección de 2 DICC_{50%} . célula⁻¹. Los cultivos se cosecharon luego de siete días de incubación a 28° C. Luego de centrifugar, el *pellet* celular se resuspendió en una solución de SDS 1%, para la posterior cuantificación de viriones ocluidos.

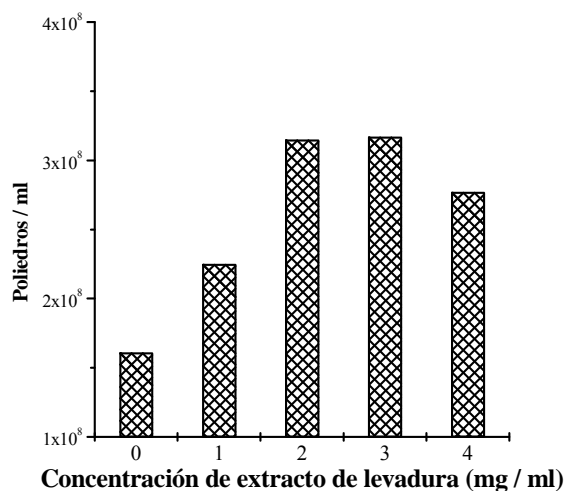


Figura IV.4.8.: Producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + (libre de UFEL) + 1mg.ml⁻¹ cloruro de colina + 1% de emulsión lipídica, adicionado de distintas concentraciones de extracto de levadura. La infección con AgMNPV se realizó a una MOI de 2 DICC_{50%} . célula⁻¹ en cultivos con una densidad celular de 4x10⁵ células viables.ml⁻¹. Los mismos, que se realizaron en frascos de 25 cm², fueron incubados a 28° C durante 7 días.

El extracto de levadura ejerció un efecto positivo sobre la producción viral. Así, la producción volumétrica de poliedros fue incrementándose conforme aumentó la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo. El mayor título de poliedros se obtuvo en el cultivo suplementado con 3 mg.ml^{-1} de este componente ($3,17 \times 10^8$ poliedros. ml^{-1}).

Al medio UNL-5 suplementado con 3 mg.ml^{-1} de hidrolizado enzimático de caseína, 1 mg.ml^{-1} de caldo tiptosa fosfato, 3 mg.ml^{-1} de extracto de levadura, 1 mg.ml^{-1} de cloruro de colina y 1% de emulsión lipídica se lo denominó UNL-8, y fue utilizado para la realización de los experimentos posteriores.

IV.4.7. Evaluación de la actividad de los componentes del medio libre de suero sobre la producción de poliedros de AgMNPV

Más allá de la aptitud del medio libre de suero para soportar la proliferación celular, también es necesario que posea capacidad para sostener la producción viral. Para determinar la existencia de limitaciones que podrían afectar la producción de poliedros de AgMNPV, se llevó a cabo un ensayo de Plackett-Burman con seis factores, a dos niveles y un punto central. Para ello, se partió de células adaptadas al cultivo estático en el medio UNL-8. Luego de la cuantificación celular, se tomaron las alícuotas necesarias a fin de iniciar catorce cultivos una densidad inicial de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Las suspensiones celulares se centrifugaron y los *pellets* se resuspendieron en el mismo medio. A cada cultivo se le adicionó una mezcla de componentes, de acuerdo al esquema presentado en el cuadro IV.4.3. Inmediatamente, los cultivos se infectaron con AgMNPV a una multiplicidad de infección de $2 \text{ DIC}_{50\%}.\text{célula}^{-1}$, permaneciendo en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se dispensó por triplicado $100 \mu\text{l}$ por pocillo de cada muestra, en placas para cultivos celulares de 96 orificios. Los cultivos se incubaron a 28°C durante seis días. Transcurrido ese tiempo, los sobrenadantes se descartaron y en su lugar se adicionó idéntica cantidad de una solución de SDS 1% para extraer los poliedros, los cuales fueron posteriormente contados en cámara de Neubauer. En el cuadro IV.4.3. se muestra la respuesta de cada cultivo, medida en pol.ml^{-1} .

Cuadro IV.4.3.: Diseño experimental de tipo Plackett-Burman a seis factores en dos niveles y un punto central, empleado para la identificación de los componentes del medio de cultivo UNL-8 que ejercen un efecto positivo sobre la producción volumétrica de poliedros. Concentraciones ensayadas: lípidos (+1: 2%; 0: 1,5%); solución de aminoácidos (AA) (+1: 20%; 0: 15%); cloruro de colina (+1: 2mg.ml⁻¹; 0: 1,5mg.ml⁻¹); solución de vitaminas (+1: 1,5%; 0: 1,25%); oligoelementos (Oligoel.) (+1: 0,137 Fe⁺² / 0,01 Mo⁺¹ / 0,0125 Co⁺¹ / 0,039 Cu²⁺ / 0,005 Mn⁺¹ / 0,005 Zn⁺¹ ; 0: 0,069 Fe⁺² / 0,005 Mo⁺¹ / 0,0062 Co⁺¹ / 0,0195 Cu²⁺ / 0,0025 Mn⁺¹ / 0,0025 Zn⁺¹) mg.l⁻¹; solución de ácidos orgánicos (Ac. Org.) (+1: 1,5%; 0: 1,25%). En todas las variantes (-1) significa la no adición extra del componente analizado.

Expto.	Lp	AA	ClCol	Vit	Oligo	AcOrg	Respuesta (Pol.ml ⁻¹)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2,24x10 ⁸
2	-1	-1	-1	+1	-1	-1	2,24x10 ⁸
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	2,00x10 ⁸
4	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2,49x10 ⁸
5	-1	+1	-1	+1	+1	+1	1,76x10 ⁸
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	1,98x10 ⁸
7	+1	+1	+1	-1	-1	-1	1,95x10 ⁸
8	0	0	0	0	0	0	1,76x10 ⁸
9	+1	-1	-1	+1	-1	+1	2,21x10 ⁸
10	-1	+1	-1	-1	+1	-1	1,19x10 ⁸
11	0	0	0	0	0	0	2,33x10 ⁸
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	2,28x10 ⁸
13	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1,83x10 ⁸
14	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2,4x10 ⁸

Lp: emulsión lipídica; AA: solución de aminoácidos; ClCol: cloruro de colina; Vit: solución de vitaminas; Oligo: solución de oligoelementos; AcOrg: solución de ácidos orgánicos.

Los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente utilizando el *software* JMP 4. En la figura IV.4.9. se puede apreciar la respuesta discriminada frente a cada uno de los factores ensayados.

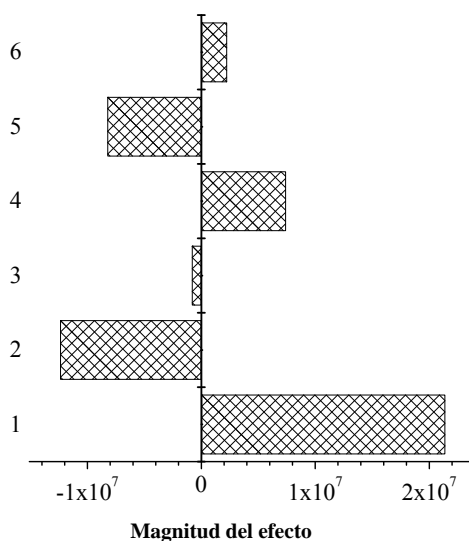


Figura IV.4.9.: Magnitud del efecto originado por la incorporación de distintos componentes del medio UNL-8 sobre la producción volumétrica de poliedros en cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en medio UNL-8. 1- emulsión lipídica. 2- aminoácidos. 3- cloruro de colina. 4- vitaminas. 5- oligoelementos. 6- ácidos orgánicos. Los cultivos celulares, de densidad 4×10^5 células viables. ml^{-1} , fueron infectados con AgMNPV a una MOI de 2 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Por cada variante evaluada fueron infectados tres cultivos celulares. La producción volumétrica de poliedros fue determinada luego de 6 días de incubación a 28°C .

La microemulsión lipídica y las vitaminas ejercieron un efecto positivo sobre la producción volumétrica de poliedros, pero sólo la primera ejerció un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Por otro lado, el aumento en la concentración de aminoácidos, cloruro de colina y vitaminas ejerció un efecto negativo. Por lo tanto, si bien el medio UNL-8 es capaz de sostener el cultivo continuo de la línea celular saUFL-AG-286, y también la producción de elevados rendimientos de poliedros en cultivos infectados con AgMNPV, debe aún optimizarse la concentración de la emulsión lipídica. Este aspecto es considerado en el apartado siguiente.

IV.5. Crecimiento, metabolismo y producción de AgMNPV en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en un medio libre de suero

IV.5.1. Crecimiento y metabolismo de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión en el medio UNL-8 libre de suero

Como se describió en el apartado previo, el medio UNL-8 es capaz de sostener el cultivo continuo de la línea saUFL-AG-286, y también la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos infectados. Sin embargo, debido a que el desarrollo de este nuevo medio se realizó, por razones de practicidad y economía, en cultivos estáticos y a pequeña escala, no se conocía su aptitud para soportar la proliferación celular y la replicación viral en cultivos en suspensión agitada. Para investigar esta capacidad, cultivos estáticos de células saUFL-AG-286 adaptadas al medio UNL-8 se desprendieron de la superficie de la botella plástica mecánicamente. Se cuantificaron las células y se tomó la alícuota necesaria para partir de un cultivo con un inóculo inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} en un volumen final de trabajo de 10 ml. Los cultivos se realizaron en botellas de vidrio de 100 ml de capacidad, y se mantuvieron en agitación (100 rpm), a 28° C. Los subcultivos se realizaron cuando la densidad celular alcanzada en el cultivo estaba comprendida entre 1×10^6 y $1,5 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . Los primeros pasajes en suspensión se caracterizaron por la presencia de pequeños cúmulos celulares, los que fueron desapareciendo rápidamente después de los primeros pasajes, sin necesidad de realizar una selección.

Para determinar los parámetros de los cultivos de células saUFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en suspensión en el medio UNL-8, un cultivo se diluyó en medio de cultivo fresco a una densidad inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} . El cultivo se incubó en un agitador orbital a 28° C. Cada 24 horas, se tomó una alícuota de la suspensión celular para su cuantificación y posterior determinación de nutrientes y metabolitos (glucosa, lactato, glutamina y amonio).

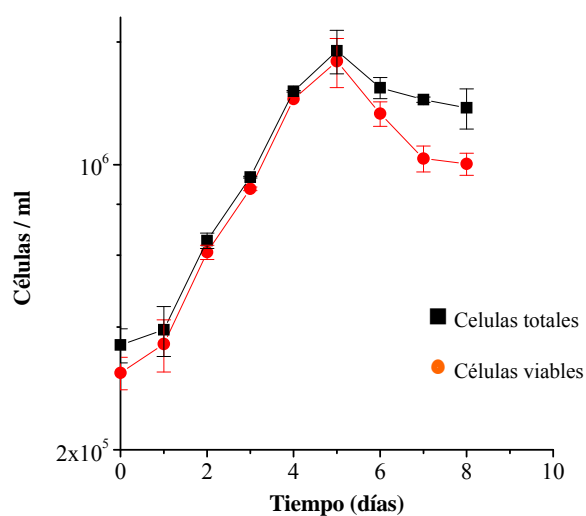


Figura IV.5.1.: Curva de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en botellas de vidrio partiendo de un inóculo celular inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} , en un volumen final de trabajo de 10 ml. Las botellas fueron incubadas en agitación a 28°C y 100 rpm, durante 8 días.

El cultivo presentó una corta fase “lag”, ingresando rápidamente a la fase de crecimiento exponencial, que se extendió hasta las 120 horas. La velocidad específica de multiplicación celular fue de $0,018 \text{ horas}^{-1}$ (tiempo de duplicación: 37 horas). La densidad celular máxima, alcanzada a las 120 horas de cultivo, fue de $1,79 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . La viabilidad del cultivo se mantuvo en porcentajes comprendidos entre el 90 y el 95% hasta las 120 horas, descendiendo luego rápidamente.

Como se puede observar en la figura IV.5.2., la concentración de glucosa descendió durante las primeras 24 horas, para volver a elevarse a las 48 horas. Posteriormente, la concentración de glucosa decayó en forma constante hasta la etapa final del cultivo. La velocidad específica de consumo celular de glucosa experimentó una inversión en su valor a las 48 horas de cultivo. A partir de las 72 horas este parámetro fue descendiendo y, finalmente, luego del quinto día de cultivo permaneció prácticamente constante (figura IV.5.3.).

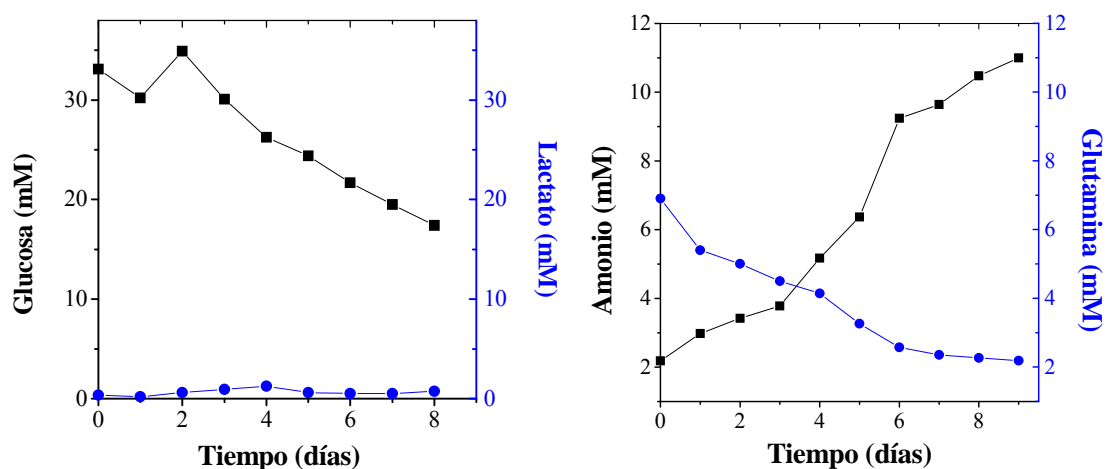


Figura IV.5.2.: Evolución de la concentración de glucosa, lactato, glutamina y amonio en cultivos en suspensión de la línea celular saUFLAg-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en botellas de vidrio partiendo de un inóculo celular inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} , en un volumen final de trabajo de 10 ml. Las botellas fueron incubadas en agitación a 28°C y 100 rpm, durante 8 días.

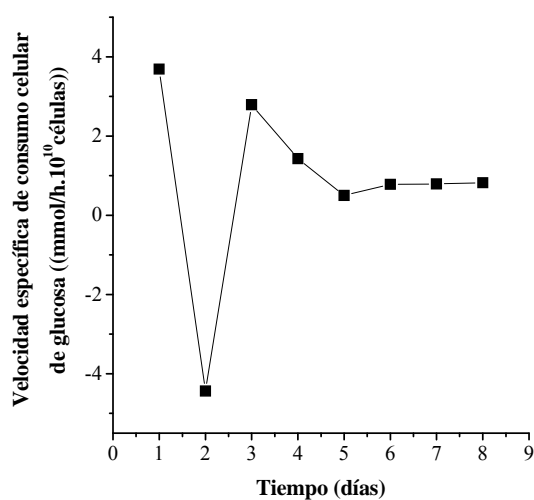


Figura IV.5.3.: Variación de la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en botellas de vidrio partiendo de un inóculo celular inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} , en un volumen final de trabajo de 10 ml. Las botellas fueron incubadas en agitación a 28°C y 100 rpm durante 8 días.

La glutamina no fue consumida de manera constante durante el cultivo. Así se pudo observar una primera etapa, correspondiente a las primeras 24 horas, en la cual fue máxima la velocidad específica de consumo celular ($1,91 \times 10^{-10}$ mmol.célula⁻¹.h⁻¹), seguida por una segunda, entre las 24 y las 48 horas, en que decayó abruptamente. Finalmente, entre las 48 y las 144 horas la velocidad de consumo de este aminoácido se mantuvo casi constante en un valor de $3,67 \times 10^{-11}$ mmol.célula⁻¹.h⁻¹ (figura IV.5.4.).

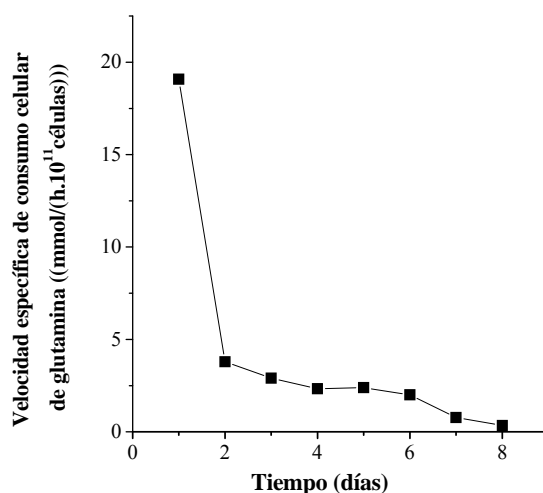


Figura IV.5.4.: Variación de la velocidad específica de consumo de glutamina en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en botellas de vidrio partiendo de un inóculo celular inicial de 3×10^5 células viables.ml⁻¹, en un volumen final de trabajo de 10 ml. Las botellas fueron incubadas en agitación a 28° C y 100 rpm, durante 8 días.

La concentración de lactato se mantuvo prácticamente constante durante el cultivo. Solo una leve producción de este metabolito fue registrada entre las 48 y las 96 horas, pero posteriormente, fue consumido casi totalmente (figura IV.5.2.).

Por último, si bien la concentración de amonio fue aumentando durante el cultivo alcanzando un valor máximo de 11 mM, la mayor etapa de producción coincidió con la fase de crecimiento exponencial del cultivo, donde la velocidad específica de producción celular fue de $4,42 \times 10^{-11}$ mmol.célula⁻¹.h⁻¹ (figura IV.5.2.).

IV.5.2. Cultivo en suspensión en “spinner flasks”

Con el objetivo de comparar el comportamiento en diferentes sistemas de cultivo, y determinar la cinética de proliferación en el mismo sistema en el cual se realizó la caracterización inicial de la línea celular, un cultivo en suspensión de 10 ml de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 se cosechó cuando su densidad celular era del orden de $1,5 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . De este cultivo, se tomó la alícuota de suspensión celular necesaria para comenzar un nuevo cultivo con un inóculo de 3×10^5 células viables. ml^{-1} en 30 ml de volumen final de trabajo. La nueva suspensión se cultivó en un “spinner flask” de 1000 ml de capacidad, con agitación pendular, a 28° C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular comprendida entre $1,5 \times 10^6$ y $2,0 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} , se realizó un nuevo pasaje celular. A fin de determinar si los parámetros cinéticos sufrían modificaciones en el transcurso de los sucesivos pasajes celulares, se siguió la evolución de los cultivos durante los primeros seis pasajes, hasta que se estabilizó la velocidad específica de proliferación.

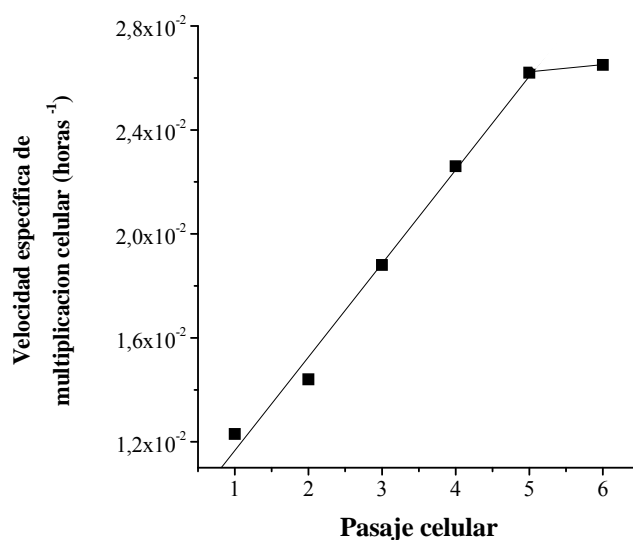


Figura IV.5.5.: Velocidad específica de multiplicación celular en función del número de pasajes de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivo en suspensión en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron en frascos tipo *spinner* partiendo de un inóculo celular inicial de 3×10^5 células viables. ml^{-1} , en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los frascos fueron incubados en agitación, a 28° C y 80 rpm.

En la figura IV.5.5. se puede observar como, a medida que aumentó el número de pasajes en el nuevo sistema de cultivo, se produjo un aumento de la velocidad específica de multiplicación celular. Luego de los cinco primeros sub-cultivos sucesivos la velocidad de multiplicación se mantuvo constante, indicando la culminación del proceso de adaptación.

Una vez adaptados los cultivos al nuevo sistema, se estudió la cinética de proliferación celular y la evolución temporal de los parámetros de consumo y producción de glucosa y amonio, respectivamente, en cultivos iniciados a dos densidades celulares diferentes: 3×10^5 y 1×10^5 células viables. ml^{-1} de cultivo.

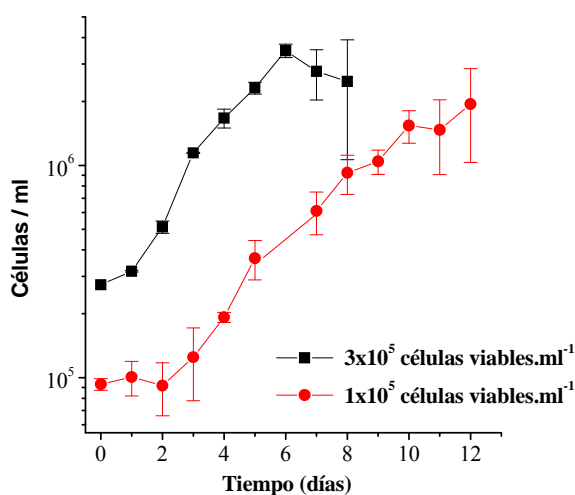


Figura IV.5.6.: Curvas de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28° C y agitados a 80 rpm.

En la figura IV.5.6., se puede observar que el cultivo iniciado a la menor densidad presentó una fase “lag” de 48 horas, y que la fase de crecimiento exponencial se extendió hasta el día 10, alcanzando una densidad celular máxima de $3,1 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . En este cultivo se determinó una velocidad específica de proliferación

celular de $0,016 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de duplicación: 44 horas). Por otro lado, el cultivo iniciado a una densidad celular mayor presentó una fase “lag” menos evidente al comienzo del cultivo, y su crecimiento exponencial se extendió hasta los 6 días, cuando alcanzó una densidad máxima de $3,5 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} . La velocidad específica de proliferación celular fue de $0,019 \text{ h}^{-1}$ (tiempo de duplicación: 36 horas). Se debe hacer notar que, en otros experimentos no mostrados la velocidad específica de proliferación en este mismo sistema de cultivo osciló entre $0,019 \text{ h}^{-1}$ y $0,026 \text{ h}^{-1}$.

En cuanto a la evolución de la concentración de glucosa en ambos cultivos, se puede observar en la figura IV.5.6. que comenzó a decaer a partir del quinto día en el cultivo iniciado a la mayor densidad celular, y recién tres días después en el cultivo comenzado a menor densidad. No se observó agotamiento de glucosa en ninguno de ellos.

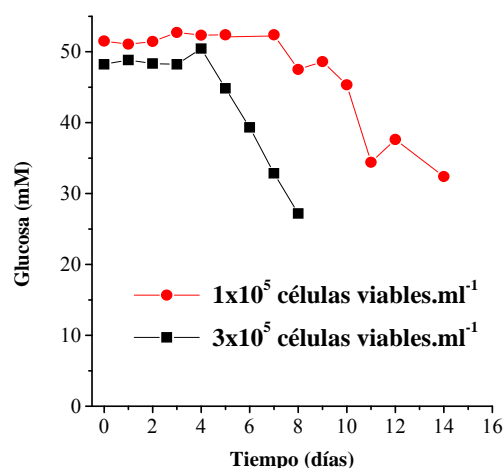


Figura IV.5.7.: Evolución de la concentración de glucosa en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28°C y agitados a 80 rpm.

La figura IV.5.8. representa la evolución temporal de la velocidad específica de consumo celular de glucosa en ambos cultivos. Como se puede observar, la velocidad inicial de consumo de glucosa se relacionó en forma inversamente proporcional con la densidad celular inicial. A mayor densidad celular inicial, menor velocidad específica inicial de consumo de glucosa. Además, en tanto que en el cultivo de baja densidad celular inicial la velocidad específica de consumo celular de glucosa fue oscilante, en el cultivo que se inició a 3×10^5 células viables. ml^{-1} osciló levemente durante los primeros tres días y luego se mantuvo constante a partir del cuarto día.

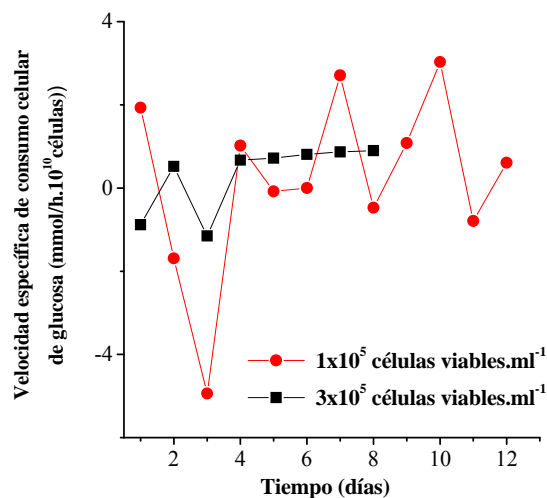


Figura IV.5.8.: Variación de la velocidad específica de consumo de glucosa en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28° C y agitados a 80 rpm.

Por otra parte, en la figura IV.5.9. se puede observar que el rendimiento celular en glucosa durante la fase exponencial de crecimiento fue 28 veces mayor en el cultivo celular iniciado a 3×10^5 células viables.ml⁻¹, respecto al cultivo de baja densidad.

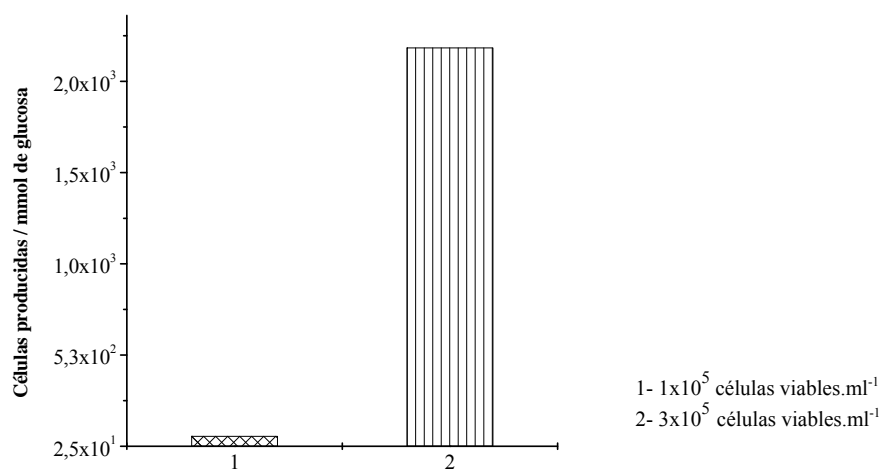


Figura IV.5.9.: Rendimiento celular por mmol de glucosa consumida en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28° C y agitados a 80 rpm.

Con respecto a la evolución de la concentración de amonio, se observó un aumento progresivo en los dos cultivos (figura IV.5.10.). La concentración máxima alcanzada fue significativamente más alta en el cultivo iniciado a la menor densidad celular (aproximadamente 14 mM), que en el cultivo iniciado a una densidad mayor (aproximadamente 10 mM).

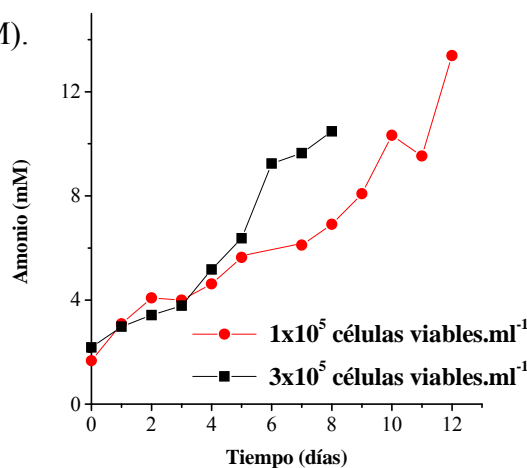


Figura IV.5.10.: Evolución de la concentración de amonio en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28° C y agitados a 80 rpm.

La velocidad específica inicial de producción celular de amonio dependió del inóculo celular del cultivo. A menor densidad celular inicial, mayor velocidad inicial de producción. Luego, al igual que lo observado con la velocidad de consumo de glucosa, en el cultivo iniciado a la densidad celular más elevada se observó una evolución más estable de la velocidad de producción de amonio, respecto al comportamiento oscilante del cultivo comenzado a menor densidad celular inicial.

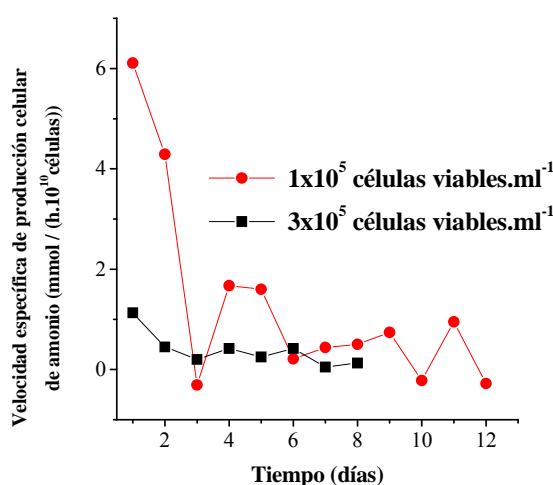


Figura IV.5.11.: Variación de la velocidad específica de producción de amonio en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28° C y agitados a 80 rpm.

Finalmente, en la figura IV.5.12 se puede observar que la producción celular por mmol de amonio producido en la fase exponencial de crecimiento fue prácticamente dos veces mayor en el cultivo que se inició a una densidad de 3×10^5 células viables. ml^{-1} .

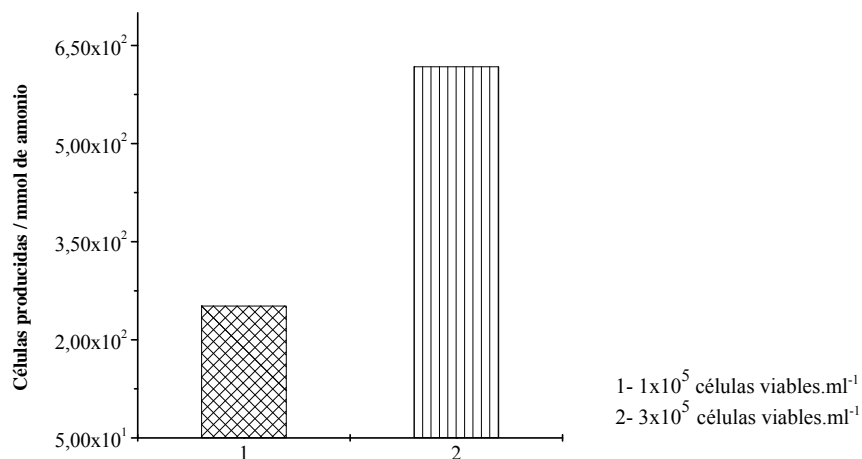


Figura IV.5.12.: Rendimiento celular por mmol de amonio producido en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares se realizaron, por duplicado, en “spinner flasks” partiendo de dos densidades celulares diferentes, en un volumen final de trabajo de 30 ml. Los “spinner flasks” fueron incubados a 28°C y agitados a 80 rpm.

IV.5.3. Estudio de la influencia de los parámetros de infección sobre la replicación de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8

La producción viral en cultivos celulares depende tanto de factores relacionados con las características del cultivo celular (línea celular, composición del medio de cultivo, sistema de cultivo, etc.), como también de las características del virus y de los parámetros de infección. Previamente se mostró como el rendimiento viral puede ser influenciado por la concentración de determinados nutrientes y catabolitos en el medio de cultivo. En esta sección se presentarán resultados que muestran la influencia de los parámetros de infección sobre la producción viral en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-8. Para evaluar la influencia de los parámetros multiplicidad y tiempo de infección, se utilizó como estrategia experimental un diseño factorial del tipo central compuesto.

El experimento se llevó a cabo partiendo de cuatro cultivos de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 adaptadas al crecimiento en suspensión en botellas de 100 ml, en un volumen de trabajo de 10 ml. Los cultivos fueron incubados en un agitador orbital termostatzado a 28° C y agitados a 100 rpm. Cuando estos cultivos alcanzaron una densidad de $1,5 \times 10^6$ células viables. ml^{-1} fueron cosechados, y a partir de esta suspensión celular se iniciaron diez cultivos con una densidad de 3×10^5 células viables. ml^{-1} en un volumen final de 10 ml. Una vez alcanzada la densidad celular correspondiente a cada experimento, los cultivos fueron infectados con AgMNPV (cuadro IV.5.1.) continuando la etapa de incubación bajo idénticas condiciones de temperatura y de velocidad de agitación.

Cuadro IV.5.1.: Diseño factorial de tipo central compuesto para dos variables: multiplicidad de infección y densidad celular del cultivo (Ci). A partir de una suspensión celular proveniente de cuatro cultivos en botellas de vidrio de la línea celular sa UFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en suspensión en el medio UNL-8, se iniciaron diez cultivos de densidad 3×10^5 células viables. ml^{-1} en un volumen final de trabajo de 10 ml. Los cultivos se siguieron en el tiempo, y una vez alcanzada la densidad celular correspondiente a cada experimento, se infectaron con AgMNPV. Todos los cultivos se incubaron en un agitador orbital termostatzado a 100 rpm y 28° C.

	Ci (cél. v. ml^{-1})	MOI (DICC _{50%} .cél. ⁻¹)	DCM (cél. t. ml^{-1})	RVP (Pol. ml^{-1})	REP (Pol.cél. ⁻¹)	RVVB (DICC _{50%} . ml^{-1})	REVB (DICC _{50%} .cél. ⁻¹)
1	$4,00 \times 10^5$	0,30	1,64	$1,47 \times 10^8$	90	$9,57 \times 10^3$	0,0058
2	$1,30 \times 10^6$	0,30	1,84	$1,30 \times 10^8$	71	632	0,0003
3	$4,00 \times 10^5$	1,30	1,62	$9,60 \times 10^7$	59	$6,32 \times 10^3$	0,0039
4	$1,30 \times 10^6$	1,30	1,75	$1,62 \times 10^8$	93	$6,32 \times 10^3$	0,0036
5	$8,50 \times 10^5$	0,09	2,11	$1,58 \times 10^8$	75	135	$6,4 \times 10^{-5}$
6	$8,50 \times 10^5$	1,51	1,89	$1,34 \times 10^8$	71	632	0,0003
7	$2,14 \times 10^5$	0,8	4,36	$1,34 \times 10^7$	26	$8,43 \times 10^7$	165
8	$1,49 \times 10^6$	0,8	1,54	$1,55 \times 10^8$	101	$4,74 \times 10^3$	0,0031
9	$8,5 \times 10^5$	0,8	1,60	$1,97 \times 10^8$	123	$6,32 \times 10^5$	0,3900
10	$8,5 \times 10^5$	0,8	1,70	$2,10 \times 10^8$	123	$9,57 \times 10^5$	0,5620

Ci: densidad celular inicial; MOI: multiplicidad de infección; DCM: densidad celular máxima; RVP: rendimiento volumétrico de poliedros; REP: rendimiento específico de poliedros; RVVB: rendimiento específico de virus brotado; REVB: rendimiento específico de virus brotado.

Cada 24 horas se tomaron muestras para la cuantificación celular y posterior determinación de la producción de poliedros y de virus no ocluido. El tiempo de cosecha final de cada experimento dependió de la viabilidad celular porcentual. Cuando se determinaron porcentajes menores al 40% de viabilidad, el cultivo fue cosechado y el experimento terminado.

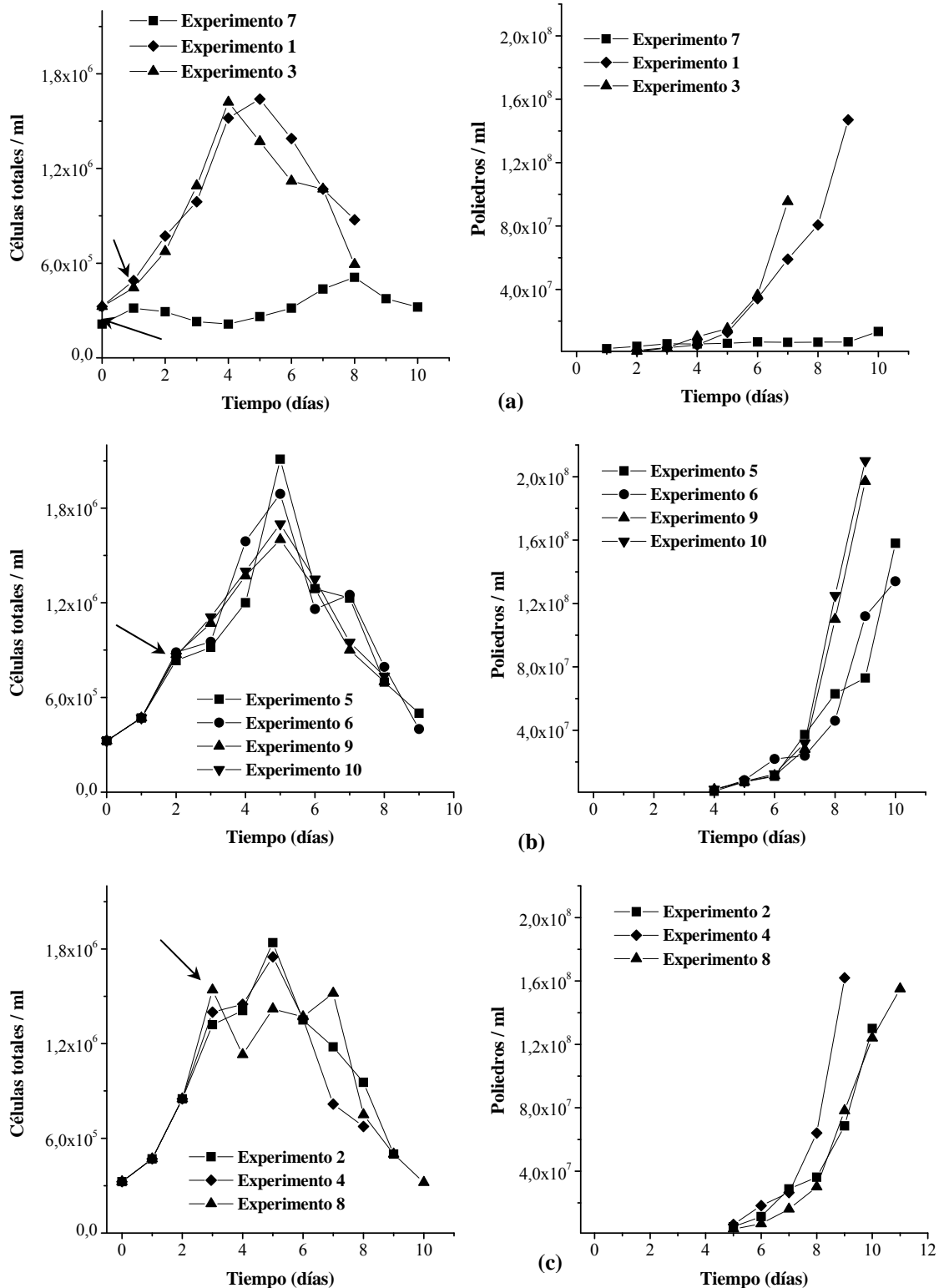


Figura IV.5.13: Evolución de la densidad celular y de la producción volumétrica de poliedros en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8, infectados con AgMNPV a distintas densidades celulares y multiplicidades de infección (la flecha indica el momento de la infección del cultivo). Los cultivos fueron incubados a 28° C y agitados a 100 rpm. Los experimentos se agruparon de acuerdo a la densidad celular del cultivo al momento de su infección.

En la figura IV.5.13. se puede observar que todos los cultivos presentaron un aumento importante en la densidad celular después de su infección. Sólo el cultivo celular del experimento 7, infectado inmediatamente después de su siembra, no presentó un incremento significativo en la densidad celular. Por otra parte, en todos los experimentos se evidenció un alto porcentaje de lisis celular en los últimos días de cultivo.

En el cuadro IV.5.1. se puede observar que la mayor producción volumétrica de poliedros fue obtenida cuando el cultivo celular fue infectado en la etapa media de la fase de crecimiento ($8,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1}) a una multiplicidad de infección intermedia ($0,8 \text{ DICCC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$). El modelo de superficie de respuesta representado en la figura IV.5.14. permite apreciar que la producción volumétrica de poliedros varió más fuertemente con los cambios en la densidad celular en el momento de la infección.

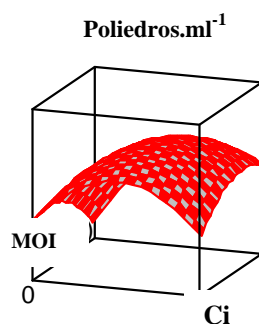


Figura IV.5.14.: Representación gráfica del modelo de superficie de la respuesta de producción volumétrica de poliedros obtenidas en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 infectados con AgMNPV.

El comportamiento del sistema puede ser representado, de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$), por el siguiente modelo de superficie de respuesta:

$$\text{PVP (poliedros.ml}^{-1}\text{)} = 1,44 \times 10^8 + 75,11 \times \text{Ci} - 2,63 \times 10^{-4} \times (\text{Ci} - 8,86 \times 10^5)^2 - 7,93 \times 10^6 \times \text{MOI} - 1,017 \times 10^8 \times (\text{MOI} - 0,8)^2$$

En la figura IV.5.15. se muestra el gráfico de contornos correspondiente a la variación de la producción volumétrica de poliedros en función de la densidad celular del cultivo y de la multiplicidad de infección. Los valores más elevados de producción volumétrica de poliedros se pueden obtener por la combinación de las dos variables de infección que están representadas en la región central del gráfico.

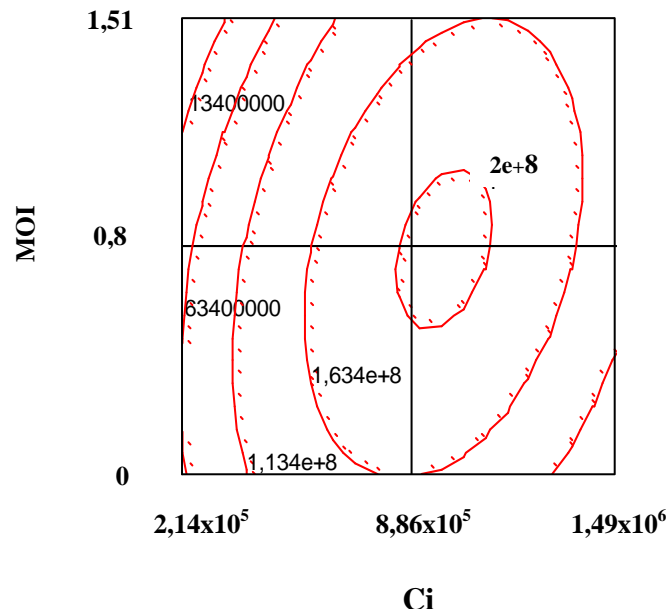


Figura IV.5.15.: Representación gráfica de contorno del modelo de variación de la producción volumétrica de poliedros de AgMNPV en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8, en función de la densidad celular del cultivo al momento de su infección y de la multiplicidad de infección.

Por otro lado, sólo se alcanzó un rendimiento aceptable de viriones brotados en el cultivo infectado a la menor densidad celular. En el resto de los cultivos el título final de virus brotado resultó notablemente bajo.

IV.5.4. Determinación de los componentes en defecto en un medio de cultivo libre de suero y su relación con la producción de virus no ocluido

Al analizar los resultados de producción de virus brotado obtenidos en los cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8, se observó que sólo se alcanzaron títulos elevados en los cultivos infectados a muy baja densidad celular, en la fase temprana de crecimiento exponencial, apreciándose una marcada reducción de los títulos virales con el incremento de la densidad celular (cuadro IV.5.1.). Este comportamiento podría ser consecuencia de una restricción nutricional en el medio UNL-8, aunque no se debería descartar la posibilidad de que el descenso del título viral se deba a una combinación de factores nutricionales, metabólicos y fisicoquímicos.

Para investigar la existencia de una restricción nutricional capaz de afectar la producción de virus brotado en cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-8 cuando estos cultivos son infectados a una densidad celular intermedia, se realizó un experimento de suplementación nutricional, empleando un diseño de Plackett-Burman.

Para llevar adelante este ensayo, se partió de catorce cultivos en suspensión de células en el medio UNL-8 en botellas de 100 ml, con 10 ml de volumen de trabajo. Los cultivos, de inóculo celular inicial 3×10^5 células viables. ml^{-1} , se infectaron con AgMNPV a un multiplicidad de infección de $0,8 \text{ DICCC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ cuando alcanzaron una densidad de $8,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} . Inmediatamente, se adicionó a cada cultivo una mezcla de distintos componentes que forman parte del medio de cultivo UNL-8, de acuerdo a lo detallado en el cuadro IV.5.2. Cada 24 horas, se tomaron muestras de los cultivos celulares para recuento de células totales y viables. Cuando la viabilidad celular fue menor a un 40% los cultivos fueron cosechados y centrifugados y los sobrenadantes conservados a -80°C para posterior cuantificación de virus brotados.

Cuadro IV.5.2.: Diseño factorial de tipo Plackett-Burman empleado para identificar los componentes del medio de cultivo UNL-8 que se encuentran en defecto, en cultivos de la línea celular saUFLAg-286 al momento de su infección con AgMNPV y que afectan la producción de virus no ocluido. Concentraciones analizadas: lípidos (+1: 1%; 0: 0,5%), solución de aminoácidos (+1: 1%; 0: 0,5%), cloruro de colina (+1: 1 mg.l⁻¹; 0: 0,5 mg.l⁻¹), solución de vitaminas (+1: 1%; 0: 0,5%), solución de oligoelementos (+1: 0,137 Fe⁺² / 0,01 Mo⁺¹ / 0,0125 Co⁺¹ / 0,039 Cu²⁺ / 0,005 Mn⁺¹ / 0,005 Zn⁺¹ ; 0: 0,069 Fe⁺² / 0,005 Mo⁺¹ / 0,0062 Co⁺¹ / 0,0195 Cu²⁺ / 0,0025 Mn⁺¹ / 0,0025 Zn⁺¹) mg.l⁻¹; solución de ácidos orgánicos (+1: 0,5%; 0: 0,25%), hidrolizados proteicos y extractos naturales (H. Proteicos, Extr. Nat.) (+1: 1,5 Ha / 0,5 Hb / 1,5 E.L.; 0: 0,75 Ha / 0,25 Hb / 0,75 E.L.) mg.ml⁻¹. Para todos los casos (-1) significa la no adición extra del componente analizado al momento de la infección del cultivo

Expto.	Lp	AA	ClCol	Vit	Oligo	AcOrg	H	Respuesta RVVB (DICC _{50%} . ml ⁻¹)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	4,00x10 ⁵
2	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	4,00x10 ⁴
3	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	4,74x10 ³
4	0	0	0	0	0	0	0	6,32x10 ⁴
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	6,32x10 ³
6	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	7,96x10 ⁴
7	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	4,00x10 ⁵
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	4,74x10 ⁷
9	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	7,96x10 ⁶
10	0	0	0	0	0	0	0	6,32x10 ⁴
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	4,00x10 ⁶
12	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	6,32x10 ⁴
13	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	4,74x10 ⁵
14	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1,35x10 ⁵

Lp: emulsión lipídica; AA: solución de aminoácidos; ClCol: solución de cloruro de colina; Vit: solución de vitaminas; Oligo: solución de oligoelementos; H: solución conteniendo hidrolizado enzimático de caseína, caldo triptosa fosfato y extracto de levadura.

A partir del análisis estadístico de los títulos virales, se observó la existencia de una correlación positiva, aunque no significativa ($p > 0,05$) entre la adición de la microemulsión lipídica y el incremento del título viral (figura IV.5.16.). También se observó un efecto positivo, aunque de menor magnitud, en relación a la adición de las soluciones de ácidos orgánicos y aminoácidos.

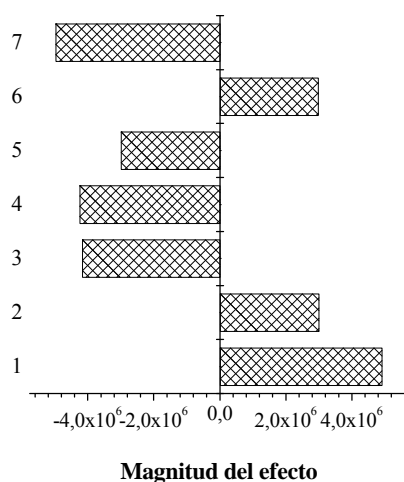


Figura IV.5.16.: Magnitud del efecto asociado a la suplementación con componentes del medio de cultivo UNL-8 relativo a la producción de virus brotado, en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV. 1- lípidos; 2- aminoácidos; 3- cloruro de colina; 4- vitaminas; 5- oligoelementos; 6- ácidos orgánicos; 7- hidrolizados proteicos y extractos naturales.

A los efectos de corroborar el efecto positivo de la suplementación lipídica, y determinar su nivel óptimo, se llevó a cabo un nuevo experimento, en el cual se partió de seis cultivos en suspensión bajo las mismas condiciones del ensayo anterior. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de $8,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} , se infectaron con AgMNPV a una multiplicidad de infección igual a $0,8 \text{ DICCC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$. Inmediatamente, se adicionaron distintas concentraciones de lípidos (0,5; 1; 2; 4 y 8 %), respecto a la concentración inicial. Como control se infectó un cultivo sin adición extra de lípidos.

A los 9 días post-infección, los cultivos se cosecharon y los sobrenadantes se separaron por centrifugación, conservándose a -80°C para posterior cuantificación de virus brotado, mientras que los *pellets* celulares fueron extraídos para la cuantificación de la producción de poliedros virales en cada condición.

Cuadro IV.5.3.: Rendimientos virales obtenidos con suplementación con distintas concentraciones lipídicas al momento de la infección con AgMNPV de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Los cultivos celulares fueron realizados en botellas de 100 ml e infectados a una MOI de 0,8 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ cuando alcanzaron una densidad de $8,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} . Las botellas fueron incubadas en agitación a 28° C y 100 rpm.

Concentración de lípidos adicionada (%)	RVVB ($\text{DICC}_{50\%}/\text{ml}$)	RVP ($\text{pol} \cdot \text{ml}^{-1}$)
0	$7,14 \cdot 10^3$	$1,56 \cdot 10^8$
0,5	$7,14 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^8$
1	$4,74 \cdot 10^6$	$1,17 \cdot 10^8$
2	$4,74 \cdot 10^7$	$1,10 \cdot 10^8$
4	$7,14 \cdot 10^4$	$1,09 \cdot 10^8$
8	$1,05 \cdot 10^5$	$9,42 \cdot 10^7$

RVVB: rendimiento volumétrico de virus brotado; RVP: rendimiento volumétrico de poliedros.

La adición de lípidos suplementarios en el momento de la infección de los cultivos produjo una respuesta positiva y creciente sobre la producción de virus brotado. Este fenómeno fue observado hasta un nivel de suplementación igual al doble de la concentración inicial de lípidos que contenía originalmente el medio de cultivo UNL-8. El incremento del título final de virus brotados de AgMNPV fue de más de tres órdenes de magnitud ($4,74 \times 10^7 \text{ DICC}_{50\%} \cdot \text{ml}^{-1}$), respecto al cultivo control ($7,14 \times 10^3 \text{ DICC}_{50\%} \cdot \text{ml}^{-1}$), confirmando la conclusión del experimento previo. Sin embargo, al mismo tiempo la producción de poliedros se redujo a medida que se incrementó la concentración de lípidos, casi un 30% para la concentración que permitió obtener el rendimiento más elevado de virus brotado, y más del 50% para la concentración de lípidos ensayada en este experimento.

Este último resultado parece contradictorio con la conclusión del experimento mostrado en la figura IV.4.9, en la cual se puede observar como la adición de lípidos producía un efecto positivo sobre la producción de poliedros de AgMNPV en infecciones de cultivos estáticos de saUFL-AG-286. Por otro lado, la reducción de la producción de poliedros asociada al incremento de la producción de virus brotado, puede significar que la suplementación lipídica no produzca un incremento neto de la

replicación viral, sino sólo una redistribución del potencial replicativo entre ambas progenies virales, virus brotado y virus ocluido. Si esto fuera así, la adición de lípidos no sólo podría reducir el rendimiento cuantitativo de poliedros, sino que también podría afectar su virulencia, a través de una disminución de la cantidad de viriones ocluidos por poliedro. Por lo tanto, a los efectos de evaluar esta posibilidad, y verificar si el mismo comportamiento se reproduce en cultivos infectados a menor densidad celular y mayor multiplicidad de infección, asemejando las condiciones de infección a las del experimento mostrado en la figura IV.4.9., se infectaron cultivos en diferentes condiciones de densidad celular, multiplicidad de infección y nivel de suplementación lipídica, y los poliedros producidos en cada uno de estos experimentos fueron utilizados para evaluar la actividad biológica del virus sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Para ello, se cosecharon cuatro cultivos en suspensión en el medio UNL-8 provenientes de botellas de vidrio, con 10 ml de volumen de trabajo. A partir de esta suspensión celular se iniciaron cuatro cultivos en “spinner flasks” con una densidad de 4×10^5 células viables. ml^{-1} . Dos de estos cultivos fueron infectados inmediatamente con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 10 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ y, a su vez, uno de ellos fue suplementado con 2% extra de lípidos. Los otros dos cultivos fueron infectados a una multiplicidad de infección de 0,8 $\text{DICC}_{50\%} \cdot \text{célula}^{-1}$ cuando alcanzaron una densidad de $8,5 \times 10^5$ células viables. ml^{-1} ; inmediatamente uno de estos cultivos fue suplementado con 2% de lípidos, respecto a su concentración inicial. Luego de nueve días de incubación a 28° C, los cultivos se cosecharon y los sobrenadantes se separaron por centrifugación, conservándose a -80° C para posterior cuantificación de virus brotado. Los *pellets* celulares se resuspendieron en un mínimo volumen de medio de cultivo fresco, para luego realizar la extracción y cuantificación de poliedros, y posterior determinación de su actividad biológica. Los poliedros se liberaron mediante sonicado (1 pulso de potencia 4 durante 60”, con 50% de silencio), se cuantificaron y se enviaron al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola con sede en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar, Argentina). En esta prueba, se utilizaron larvas de *Anticarsia gemmatalis* de tercer estadio, a las que se les suministraron, *per os*, dosis de 100, 300 y 900 poliedros. La DL_{50} se estimó utilizando la metodología de trabajo descripta por Hughes y Wood (1981).

Cuadro IV.5.4.: Evaluación del efecto combinado de los parámetros de infección y la suplementación lipídica sobre los rendimientos de virus brotado y poliedros, y la actividad biológica de éstos últimos, en cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-8. Los cultivos celulares fueron realizados en frascos “spinner”, con un volumen de trabajo de 30 ml, e infectados en las condiciones indicadas en el cuadro. Para la determinación de actividad biológica se utilizaron larvas de *Anticarsia gemmatalis* de 3º estadio. La infección se llevó a cabo, *per os*, en larvas que se habían mantenido en ayunas durante 12 horas de ayuno.

Ci	MOI	Adición Lp	RVVB (DICC _{50%} .ml ⁻¹)	RVP (pol.ml ⁻¹)	DL _{50%} (pol./larva)	RVAB (DL _{50%} .ml ⁻¹)	RVAB/ RVVB (DL _{50%} / DICC _{50%})
4.10 ⁵	10	-	4. 10 ⁷	1,24. 10 ⁸	432	2,85. 10 ⁵	7,13.10 ⁻³
4.10 ⁵	10	2%	4. 10 ⁷	1,88. 10 ⁸	230	8,27. 10 ⁵	2,06.10 ⁻²
8,5.10 ⁵	0,8	-	5. 10 ⁵	1,03. 10 ⁸	238	4,33. 10 ⁵	0,87
8,5.10 ⁵	0,8	2%	4. 10 ⁶	5,50. 10 ⁷	485	1,16. 10 ⁵	2,90.10 ⁻²

Ci: densidad celular inicial; MOI: multiplicidad de infección; Lp: emulsión lipídica; RVVB: rendimiento volumétrico de virus brotado; RVP: rendimiento volumétrico de poliedros; RVAB: rendimiento volumétrico de actividad biológica.

Como se puede observar en el cuadro IV.5.4., los poliedros de AgMNPV producidos en las cuatro condiciones ensayadas fueron activos en larvas de *Anticarsia gemmatalis* del 3^{er} estadio, aunque con diferencias de más de 100% entre los extremos. Las muestras que presentaron una mayor actividad biológica, exhibieron valores ligeramente inferiores a los de los poliedros producidos en larvas (168 poliedros/larva) (Alicia Sciocco, comunicación personal). La suplementación lipídica parece ejercer distintos efectos, de acuerdo a las condiciones de infección de los cultivos suplementados. En los cultivos infectados más tardíamente, y a menor multiplicidad de infección, la adición de lípidos provocó, confirmando el resultado del experimento previo, un aumento de la síntesis de virus brotado, acompañado de una reducción de la producción de poliedros y, además, una disminución de la actividad biológica de los poliedros producidos. Por el contrario, cuando el cultivo fue infectado más temprano, y a mayor multiplicidad de infección, el agregado de lípidos adicionales no modificó el rendimiento volumétrico de virus brotado, pero aumentó tanto el rendimiento de poliedros (más del 50%), confirmando el resultado mostrado en la figura IV.4.9., como también su actividad biológica (mas del 80%). Por otro lado, los resultados de este experimento permiten apreciar como en los cultivos “batch” infectados a baja densidad celular y a elevada multiplicidad de infección, es decir sincrónicamente temprano, la replicación viral se orienta preferencialmente a la síntesis de virus brotado, denotada por un bajo valor de la relación RVAB/RVVB, mientras que en los cultivos infectados a

mayor densidad celular y baja MOI, es decir asincrónicamente tardíos, el proceso de replicación orienta un volumen mayor de su potencial a la producción de virus ocluido, lo cual se manifiesta por un incremento de más de 100 veces de la relación RVAB/RVVB.

V. Discusión

Si bien la línea celular UFL-AG-286 parecía constituir un sustrato celular promisorio para el desarrollo de un proceso de producción del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, al comenzar esta tesis era escasa la información publicada acerca de sus características cinéticas, nutricionales y metabólicas como así también acerca de los cambios que, en cada uno de esos aspectos, se asocian a la infección con AgMNPV. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis se discutirán a continuación en el marco del conocimiento existente en el campo de los cultivos de células animales, más específicamente de los cultivos de células de lepidópteros, y de los procesos de producción de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos. Esta sección, a los efectos de una mejor integración del análisis de los resultados obtenidos en distintas etapas del trabajo, se ha ordenado en seis apartados, a saber: cinética de crecimiento de cultivos en suspensión de células UFL-AG-286, características metabólicas, análisis de la influencia de la infección con AgMNPV sobre la nutrición y el metabolismo celular, la formulación de un nuevo medio de cultivo básico, la preparación de un medio de cultivo completo, y la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286.

a) Sobre el crecimiento de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286

Un paso necesario en el proceso de producción *in vitro* de un baculovirus con fines bioinsecticidas es su producción a partir de cultivos celulares en suspensión. Por esta razón, se propuso como primer objetivo la adaptación de la línea celular UFL-AG-286 al cultivo en suspensión agitado. La formación de agregados celulares de gran tamaño fue una de las características más notables durante el proceso de adaptación al crecimiento en suspensión, a partir de cultivos estáticos adherentes en el medio TC-100 suplementado con suero. Este mismo comportamiento fue descrito por Rhiel y col., (1997) en la línea celular Tn-5 durante su adaptación a cultivos en suspensión en el medio TNM-FH suplementado con 10% de SFB y 0,1% de Pluronic F-68. Para obtener cultivos en suspensión de células aisladas de esta línea celular se utilizaron diversos procedimientos, entre ellos el agregado de sulfato de dextrán (Dee y col., 1997) . El procedimiento empleado en este trabajo con la línea celular UFL-AG-286, aplicando

sedimentación diferencial para separar los agregados celulares de mayor tamaño antes de cada sub-cultivo, permitió seleccionar en un tiempo relativamente reducido una sub-población de células capaces de proliferar aisladas en suspensión bajo agitación. Por el contrario, cuando los agregados no fueron separados antes de cada sub-cultivo, la línea celular no modificó significativamente su comportamiento original, permaneciendo prácticamente constante la proporción de cúmulos celulares y su tamaño. La posibilidad de separar una sub-población celular con características diferenciales podría ser una evidencia de la complejidad poblacional de la línea celular UFL-AG-286, establecida originalmente a partir de embriones de *Anticarsia gemmatalis*. Si bien en el proceso de establecimiento de una línea celular se selecciona una sub-población particular entre los diferentes tipos de células presentes en un cultivo primario heterogéneo, es aún posible la coexistencia de diferentes sub-poblaciones en una línea celular establecida, tal como se ha demostrado previamente en cultivos de la línea celular Sf-21 (Pasumathy y Murhammer, 1994). El proceso de separación de células con capacidad de proliferar en suspensión agitada sin formar agregados celulares podría haber seleccionado, entre la población original (UFL-AG-286), una sub-población celular (saUFL-AG-286) con características diferentes a la línea parental.

La línea seleccionada conserva la habilidad de ser cultivada alternativamente en forma estática adherente o en suspensión de células aisladas, si bien deben transcurrir unos pocos pasajes hasta que desaparecen algunos escasos agregados celulares observados inicialmente cuando las células saUFL-AG-286, mantenidas en cultivos adherentes, son transferidas a suspensión, aunque sin necesidad de aplicar sedimentación diferencial. De la misma manera, cuando células saUFL-AG-286 cultivadas en suspensión en botellas en agitación orbital se transfirieron a frascos “spinner”, se requirieron seis sub-cultivos sucesivos hasta la estabilización de la velocidad de proliferación. Ambos hechos son reveladores de la capacidad de la sub-línea saUFL-AG-286 para adaptarse a entornos con diferentes características mecánicas y/o hidrodinámicas, si bien la transferencia entre diferentes sistemas de cultivo requiere de cortos períodos de exposición a las nuevas condiciones antes de que las células expresen completamente el conjunto de características fenotípicas más apropiadas para sobrevivir y proliferar en el nuevo entorno.

La velocidad de multiplicación celular específica determinada en esta tesis para cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en frascos con agitación magnética pendular ($0,024 \text{ h}^{-1}$ en el medio TC-100 y $0,026 \text{ h}^{-1}$ en el medio UNL-8) es similar a la determinada para cultivos en suspensión de otras líneas de células de lepidópteros, como las líneas Sf-9, Sf-21, Tn-5 y TN-368 (Hink, 1970; Vaughn y col. 1977 (Rhiel y col., 1997). Sin embargo, este valor es marcadamente más alto que el determinado por Sieburth y Maruniak, en cultivos estáticos, cuando establecieron la línea parental ($0,0043 \text{ h}^{-1}$) (Sieburth y Maruniak, 1988a). Tomando en consideración que la velocidad de proliferación actual de los cultivos estáticos de la línea UFL-AG-286 es también más elevada que la determinada originalmente por quienes la establecieron, se puede conjeturar que en esta diferencia podría jugar un rol principal el número de sub-cultivos al que fue sometida la línea UFL-AG-286, desde el año 1986 hasta la realización de estos experimentos. Como antecedentes de similar patrón de evolución de la velocidad de proliferación con la cantidad de sub-cultivos a que se someten las líneas de células de insectos lepidópteros, se pueden citar los trabajos realizado por Donaldson y Shuler (1998a), quienes observaron un significativo aumento de la velocidad de proliferación cuando compararon el comportamiento de cultivos de la línea celular Tn-5 sometidos a un creciente número de sub-cultivos, y más recientemente por Calles y col. (2006), quienes determinaron que cultivos de células Sf-9 sometidos a más de 100 pasajes proliferaban más rápido que cultivos sometidos a menos de 40 repiques.

Si bien la forma de la cinética de proliferación de los cultivos de saUFL-AG-286 en distintos sistemas en suspensión fue similar, los parámetros de cultivo (velocidad específica de proliferación y densidad celular máxima) fueron significativamente más elevados en los cultivos realizados en frascos con agitación magnética pendular rotatoria que en aquellos cultivos llevados a cabo en botellas en agitador orbital, utilizando UNL libre de suero como medio de cultivo. Por otro lado, los parámetros resultaron similares para cultivos llevados a cabo en frascos con agitador magnético suspendido, en medio UNL y en medio TC-100 suplementado con suero, si los cultivos fueron iniciados a similar densidad celular. Estos resultados parecen indicar que la proliferación de las células sa-UFL-AG-286 en cultivos en suspensión es sensible a las características del sistema, específicamente a la forma de agitación y a los parámetros de diseño y la geometría del recipiente de cultivo. Si bien existe información publicada

en relación a la utilización de diferentes tipos de reactores para el cultivo de células de insectos (Agathos, 1996; Claus y Sciocco, 2001), la influencia de las características de los sistemas de cultivo a escala de volúmenes reducidos (agitadores orbitales, frascos con agitación magnética, etc.), y la comparación de diferentes sistemas sobre el desempeño de los cultivos de células animales, en general, son problemas que han sido escasamente abordado como temas de investigación (Müller y col., 2005). Rodas y col. (2005) estudiaron la cinética de crecimiento de cultivos de células Sf-9 en frascos tipo “spinner” y en botellas tipo “Schott” bajo agitación orbital, y demostraron que, a pesar de una superior transferencia de oxígeno en éstas últimas, la velocidad de proliferación celular resultó más elevada en los primeros, hecho que los autores vincularon al efecto adverso del estrés mecánico al que están sometidas las células en los cultivos en agitador orbital. Los experimentos de esta tesis fueron llevados a cabo con volúmenes de cultivo no superiores al 10% del volumen total del recipiente, tanto en las botellas con agitación orbital como en los frascos “spinner”, por lo que se puede suponer que en ninguno de los dos sistemas se produjeron deficiencias en el aporte de oxígeno. Por lo tanto parece probable que, también en este caso, la agitación orbital imponga sobre las células saUFL-AG-286 un nivel de estrés mecánico que, sin alterar su viabilidad, perturbe su funcionalidad, perturbación que se expresaría en la alteración de los parámetros de cultivo.

Los parámetros cinéticos de los cultivos de saUFL-AG-286 no fueron modificados sustantivamente por los cambios en las concentraciones de los nutrientes principales en el medio de cultivo. En los experimentos realizados en cultivos estáticos, la velocidad específica de proliferación y la densidad celular máxima no variaron con concentraciones iniciales de glucosa de 22 y 44 mM en medio UNL, mostrando un comportamiento similar al descrito en cultivos “batch” de la línea Sf-9, cuyos parámetros cinéticos fueron también insensibles a los cambios en las concentraciones iniciales del hidrato de carbono (Drews y col., 1995). Cabe señalar aquí que debe existir un valor mínimo límite de la concentración inicial de glucosa, por debajo del cual no se produce proliferación, como se desprende de la limitación del crecimiento de los cultivos privados inicialmente de glucosa. Por otro lado, los cambios en la concentración de glutamina tampoco produjeron cambios significativos en los rendimientos finales de células, aunque si se verificó una disminución de la velocidad específica de proliferación a concentraciones muy elevadas de glutamina, efecto que

podría estar asociado con la acumulación de niveles más elevados de amonio, como se discutirá más adelante. Tampoco se verificaron diferencias significativas de los parámetros de proliferación entre los cultivos en suspensión realizados en frascos “spinner”, en los medios TC-100 -suplementado con suero- y UNL -libre de suero- a pesar de que ambos difieren en las concentraciones iniciales de glucosa y glutamina. Esta independencia de la velocidad de proliferación respecto a la concentración de los nutrientes limitantes, en cultivos de células animales, ha sido previamente analizada por Doverskorg y col. (1997), quienes señalaron que en estas células la proliferación está primariamente asociada al desarrollo de los eventos del ciclo celular. Como se discutirá más adelante, es posible que la evolución del ciclo celular sea principalmente regulado por factores autocrinos, que actuarían principalmente a nivel del ingreso a la fase de mitosis (Doverskorg y col, 2000).

En los experimentos iniciales de esta tesis, cuando se estudió la cinética de proliferación de la sub-línea saUFL-AG-286 en cultivos en suspensión en el medio TC-100+10% SFB, se observó una remarcable estabilidad de la velocidad específica a lo largo de la fase de crecimiento exponencial de cultivos iniciados a una densidad celular inicial de $3 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Este mismo patrón de comportamiento se observó también en los cultivos en suspensión realizados en el medio UNL libre de suero, tanto en botellas en agitación orbital como en frascos “spinner”, a condición de que la densidad celular inicial no fuera inferior a $3 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Tal estabilidad de la velocidad específica de proliferación contrasta con la variabilidad observada en cultivos de otras líneas de células de insectos lepidópteros, en los cuales la velocidad específica de proliferación se incrementa hasta un máximo durante la etapa temprana de la fase de crecimiento exponencial en cultivos en suspensión, para luego decrecer (Drews y col., 1995; Doverskog y col., 1997). El nivel de variabilidad de la velocidad específica de proliferación puede considerarse como una expresión de la sensibilidad de los mecanismos de regulación de la proliferación celular a los cambios ocurridos en la biomasa y en el ambiente como consecuencia de las actividades celulares en el cultivo. En cultivos de la línea celular Sf-9, donde la variabilidad de la velocidad es especialmente notable, la misma ha sido atribuida al agotamiento de nutrientes o la acumulación de metabolitos (Bedard y Kamen, 1997) o, alternativamente, por la dependencia de la actividad de factores de crecimiento autocrinos (Doverskog y col., 1997). De cualquier manera, la regulación de los mecanismos de proliferación de la

línea saUFL-AG-286 parece ser relativamente menos sensible a las modificaciones celulares y ambientales que determinan la variación de la velocidad específica de proliferación en otras líneas de células de insectos, la que no se modifica sustantivamente por la presencia de suero o sus sucedáneos en el medio, aunque si es influida por la densidad inicial del cultivo.

La magnitud del inóculo celular, que determina la densidad inicial, afectó significativamente diferentes parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286. Por un lado, la velocidad específica de proliferación durante la fase de crecimiento exponencial alcanzó un valor máximo más bajo cuando la densidad celular inicial se redujo de 3 a $1 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹, y en este caso los cultivos mostraron además una evolución variable de este parámetro similar a la observada en cultivos de otras líneas de células de lepidópteros. Por otro lado, en los cultivos iniciados a menor densidad inicial se observó la existencia de una prolongada fase lag inicial, tal como fue también observado, entre otros, por Doverskorg y col. (1997) y Rodas y col. (2005) en cultivos de la línea celular Sf-9. Además, la densidad máxima alcanzada finalmente por estos cultivos resultó más baja que la obtenida en cultivos iniciados a mayor densidad inicial. Estas diferencias, asociadas a la magnitud del inóculo celular, se expresaron también a nivel del metabolismo: las velocidades específicas de consumo de los principales nutrientes, glucosa y glutamina, mostraron un mayor nivel de variabilidad durante los cultivos comenzados a menor densidad celular inicial, y la utilización de ambos resultó más eficiente en su transformación final en biomasa cuando los cultivos fueron iniciados con un inóculo celular mayor. Por lo tanto, la magnitud del inóculo celular no sólo impactó sobre las características cinéticas iniciales de los cultivos “batch” de saUFL-AG-286, sino que condicionó su evolución en todo su transcurso. Durante el desarrollo de esta tesis no se ha obtenido información concreta que permita establecer cuáles son los mecanismos que median el vínculo entre el tamaño del inóculo celular y la evolución cinética y metabólica, aunque se podría conjeturar acerca de la existencia de factores autocrinos, que podrían ser aportados por el medio condicionado del cultivo antecesor y/o ser producidos *in situ* por las propias células del nuevo cultivo; en cualquier caso, la reducción del inóculo implicaría una concentración inicial más baja de estos factores, lo cual podría traducirse en diferencias a nivel de la regulación de la proliferación y del metabolismo. La existencia de factores autocrinos que podrían regular la proliferación de las células de insectos lepidópteros en cultivo fue

inicialmente postulada por Kioukia y col. (1995), y posteriormente por Doverskorg y col. (1997). Luego, este último grupo demostró que la velocidad específica de crecimiento de cultivos “batch” de Sf-9 se incrementaba por adición de una fracción de medio condicionado, de naturaleza peptídica y bajo peso molecular, cuyo principal blanco de regulación estaría localizado a nivel del ingreso del ciclo celular a la fase de mitosis (Doverskorg y col., 2000), mientras que, por otro lado, identificó una metaloproteinasa como el único factor responsable de la estimulación de la proliferación presente en el medio condicionado en cultivos libres de suero de células High Five® (Eriksson y col., 2005). Ninguno de estos factores ha sido identificado en los cultivos de UFL-AG-286 o de saUFL-AG-286, pero el comportamiento de esta sub-línea parece ser también compatible con una regulación autocrina de la proliferación celular.

Una de las características relevantes de la curva de proliferación de saUFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con suero fue la inmediata caída de la viabilidad celular luego de la finalización de la fase de crecimiento exponencial, sin que pudiera advertirse la fase estacionaria que es característica en las curvas de crecimiento de cultivos en suspensión de otras líneas de células de lepidópteros (Drews y col. 1995; Öhman y col., 1995; Doverskog y col. 1997; Mendonça y col. 1999). En primera instancia este comportamiento podría asociarse con el agotamiento de glucosa, el único carbohidrato presente en la formulación del medio TC-100, si se toman en consideración, por un lado, la demostración de la esencialidad de la glucosa para la supervivencia y proliferación de las células saUFL-AG-286, y, por otro lado, los resultados obtenidos en cultivos de otras líneas de células de lepidópteros, en los cuales se advirtió un incremento de la mortalidad luego del agotamiento de los hidratos de carbono en el medio de cultivo (Drews y col., 1995; Mendonça y col., 1999; Meneses-Acosta y col., 2001; Palomares y Ramírez, 1996). Se ha indicado que la carencia de glucosa induce el desencadenamiento de fenómenos característicos de procesos de muerte celular programada (Liu y col., 2007). Sin embargo, la rápida caída de la viabilidad de los cultivos de saUFL-AG-286 al final de la fase de crecimiento exponencial también se verificó en los cultivos en suspensión realizados en el medio UNL, libre de suero, tanto en botellas bajo agitación orbital como en frascos “spinner”, a pesar de que en estos cultivos la concentración de glucosa se encontraba en exceso al comienzo de la fase de muerte celular. Por lo tanto, si bien el agotamiento de glucosa puede ser una causa principal del aumento de la mortalidad, deben existir otras causas

que producen el desencadenamiento de este fenómeno cuando existe un exceso en la concentración del hidrato de carbono. El agotamiento de glutamina, el otro nutriente consumido en alta proporción en los cultivos de saUFL-AG-286, tampoco parece constituir una causa principal del abrupto aumento de mortalidad, ya que, como se demuestra en esta tesis, estas células pueden sobrevivir en un medio privado de este aminoácido, tal como ha sido descrito también que sucede con las células de la línea Sf-9 (Öhmann y col., 1996), aunque la depleción de glutamina podría contribuir a acelerar el aumento de la mortalidad, como se puede observar en los cultivos en medio libre de este aminoácido. La acumulación de metabolitos tóxicos puede ser otra causa de aumento de la mortalidad. En este sentido se debe descartar la actividad tóxica del lactato, ya que este producto metabólico no se acumula en los cultivos de saUFL-AG-286. En cambio, estas células producen activamente amonio, que se acumula a concentraciones relativamente elevadas hacia el final de la fase de crecimiento exponencial, contemporáneamente con el inicio de la fase de muerte celular. La actividad tóxica del amonio ha sido bien establecida en cultivos de células de mamíferos (Ozturk y col., 1992; Ryll y col., 1994), y aunque las células de insectos parecen ser menos sensibles (Bédard y col., 1993), en esta misma tesis se demuestra que la acumulación de este producto se asocia a una restringida capacidad de las células saUFL-AG-286 para la replicación viral, una evidencia de alteración de la funcionalidad celular que podría estar asociada a la actividad tóxica del amonio. Sin embargo, no se puede afirmar, sobre la base de los resultados de esta tesis, que el rápido descenso de la viabilidad celular al fin de la fase de crecimiento exponencial sea provocado directamente por la acumulación de amonio. No se debe descartar, además, la influencia de otros factores, como el agotamiento de otros nutrientes no evaluados en esta tesis, por ejemplo lípidos y esteroides, cuya carencia podría causar la interrupción de la progresión del ciclo celular y la activación de mecanismos de muerte celular programada; o el impacto del estrés mecánico asociado a la agitación de las células en suspensión, considerando que la caída de la viabilidad fue más rápida en los cultivos en suspensión que en los cultivos estacionarios adherentes. En conclusión, la abrupta caída de la viabilidad de las células saUFL-AG-286 al final de la fase exponencial podría estar provocada por la acción alternativa, aditiva o sinérgica, de factores nutricionales, tóxicos y mecánicos, cuya contribución relativa debe aún evaluarse, y por mecanismos que aún no han sido dilucidados.

b) Sobre las características metabólicas de las células saUFL-AG-286

Los hidratos de carbono y la glutamina constituyen la principal fuente de carbono y energía en los cultivos de células animales. La glucosa es el único carbohidrato presente en los medios TC-100 y UNL-8, y resultó el nutriente consumido en mayor extensión en los cultivos de las células saUFL-AG-286 en ambos medios de cultivo. Por otro lado, el veloz aborto de la proliferación, y la rápida caída de la viabilidad, en los cultivos en un medio sin contenido inicial de glucosa, demuestran que, cuando ésta es el único hidrato de carbono presente en el medio, resulta esencial para sostener la supervivencia y proliferación de estas células en cultivo. La velocidad específica de consumo de glucosa en estos cultivos varió de acuerdo a las distintas condiciones experimentales empleadas. En cultivos en suspensión con agitación magnética pendular, en frascos “spinner”, iniciados a una densidad celular de 3×10^5 células.ml⁻¹, tanto en medio TC-100 suplementado con suero como en medio UNL libre de suero, la velocidad específica de consumo de glucosa fue menor que las velocidades máximas medidas en cultivos de otras líneas de células de lepidópteros (Bédard y col., 1993; Drews y col, 1995; Mendonça y col., 1999; Rhiel y col., 1997), aunque en el medio UNL resultó ligeramente mayor que en el medio TC-100. Por otro lado, tanto en cultivos estáticos como en cultivos en suspensión con agitación orbital, en medio suplementado con suero o libre de él, la velocidad específica de consumo del carbohidrato fue más elevada, alcanzando valores similares, o aún más elevados, a los determinados previamente para las otras líneas de células de lepidópteros. Es posible que en los frascos “spinner” las células saUFL-AG-286 encuentren un entorno particularmente favorable, con una adecuada transferencia de oxígeno y un bajo nivel de estrés mecánico, condiciones que se traducirían en una elevada velocidad de proliferación, como se discutió más arriba, y también en una menor velocidad de consumo de glucosa, indicativa de una más eficiente utilización de la principal fuente de energía. Esta conjunción de condiciones favorables no se produciría en los cultivos estáticos, donde el nivel de estrés mecánico es muy bajo, pero con limitaciones para la transferencia de oxígeno que harían menos eficiente la utilización de la glucosa como fuente de energía, lo cual obligaría a las células a incrementar la velocidad de consumo del carbohidrato. Este mismo efecto se produciría en los cultivos bajo agitación orbital, pero por causas diferentes: en los mismos la transferencia de oxígeno sería apropiada, pero el mayor nivel de estrés mecánico podría imponer a las células un mayor

requerimiento energético, que se saldaría a expensas de una mayor velocidad de consumo de glucosa.

La velocidad específica de consumo de glucosa en los cultivos de células saUFL-AG-286 también se modificó con las variaciones en el nivel de carbohidratos en el medio de cultivo. En los cultivos estáticos realizados en el medio UNL suplementado con suero, la velocidad de consumo de glucosa se incrementó con el aumento de su concentración inicial. En este mismo sentido, la velocidad específica de consumo fue más elevada, para un mismo sistema de cultivo (suspensión en frascos “spinner”) en el medio UNL, con una concentración de glucosa siete veces más alta, que en el medio TC-100. Estos resultados, que describen un fenómeno repetido en los cultivos de células de mamíferos (Hu y col., 1987; Millar y Blanch, 1991), concuerdan también con las observaciones realizadas por Bédard y col. (1993) en cultivos de células de insectos, quienes determinaron, para dos líneas distintas de células de lepidópteros, que ambas consumieron hidratos de carbono a una menor velocidad específica cuando fueron cultivadas en el medio TNM-FH, respecto a los cultivos en otros medios de cultivo con concentraciones más elevadas de hidratos de carbono. Como la variación en la concentración inicial de glucosa de 22 a 44 mM no produjo cambios en el rendimiento final de biomasa, la mayor velocidad de consumo del hidrato de carbono terminó traduciéndose en un menor rendimiento de células por unidad de glucosa consumida, observación que ratifica que las células saUFL-AG-286 pueden regular el metabolismo de la glucosa más o menos eficientemente de acuerdo a la disponibilidad de carbohidratos en el medio de cultivo.

La regulación de la velocidad específica de consumo de glucosa resultó afectada por la magnitud del inóculo celular. En los cultivos de células saUFL-AG-286 en suspensión, iniciados a una densidad celular mínima de 3×10^5 células.ml⁻¹, se observó una remarcable estabilidad de la velocidad de consumo de glucosa, tanto en medio libre de suero como en medio adicionado con este suplemento animal, desde el comienzo de los cultivos y a lo largo de la evolución de la fase de crecimiento exponencial. En cambio, en cultivos iniciados a densidades celulares más bajas, este parámetro presentó marcadas oscilaciones, que podrían revelar una más dificultosa regulación del consumo y metabolismo del hidrato de carbono cuando el inóculo celular es menor. Tal como se discutió anteriormente sobre la relación entre la magnitud del inóculo celular y la

variación de la velocidad específica de proliferación, también el metabolismo de la glucosa, como principal fuente de carbono y energía, podría estar sometido a una hipotética regulación autocrina, cuya naturaleza debe aún ser desentrañada.

Por otro lado, la velocidad específica de consumo de glucosa no resultó significativamente afectada por los cambios en la concentración inicial de otro nutriente principal, la glutamina. Este hallazgo concuerda con los obtenidos por Mendonça y col. (1999), quienes en cultivos de células Sf-9 alimentados con glutamina observaron que no se producían cambios en la velocidad específica de consumo del carbohidrato respecto a cultivos sin alimentar con el aminoácido. La insensibilidad de la velocidad específica de consumo de glucosa a los cambios en la concentración de glutamina, y la imposibilidad de sobrevivir y proliferar en un medio carente de glucosa, a pesar de la presencia de glutamina, parecen ratificar que, para las células saUFL-AG-286, la glucosa (o potencialmente otro monosacárido) constituiría una fuente insustituible de carbono y/o energía, y que, como tal, no puede ser reemplazada por la glutamina o por cualquier otro aminoácido.

La glutamina ha sido considerada, en los trabajos pioneros sobre el metabolismo de las células de insectos en cultivo, como un aminoácido de aporte exógeno esencial (Ferrance y col., 1993; Mitsuhashi, 1989; Stavroulakis y col., 1991). Sin embargo, esta presunción inicial fue desafiada por los resultados obtenidos por Öhman y col. (1996), quienes demostraron que la línea celular Sf-9 es capaz de proliferar en un medio de cultivo libre de glutamina, glutamato y aspartato, siempre y cuando exista disponibilidad de una fuente de amonio, sustrato para la síntesis endógena del aminoácido. Los resultados obtenidos en esta tesis sugerirían que el aporte exógeno de glutamina, a pesar de ser uno de los dos nutrientes consumidos a mayor nivel, tampoco resulta esencial para las células saUFL-AG-286, ya que éstas pudieron proliferar en un medio de cultivo deficiente de glutamina en su composición, aunque no absolutamente libre de este aminoácido. La carencia de glutamina en los medios de cultivo utilizados en este trabajo de tesis debe relativizarse, ya que la inclusión de hidrolizados proteicos (hidrolizado de caseína y caldo triptosa), no permiten asegurar que esos hidrolizados no aporten trazas del aminoácido. Aún teniendo en cuenta esta prevención, resulta claro que si el aporte exógeno de glutamina es esencial para estas células, lo es a un muy bajo nivel de demanda. Considerando que la glutamina resulta esencial como sustrato para la

síntesis de nucleótidos, Öhman y col. (1995) sugirieron que las células Sf-9 eran capaces de sintetizar glutamina. Los resultados de esta tesis no permiten dilucidar si las células saUFL-AG-286 poseen la capacidad de sintetizar glutamina a partir de la fijación de nitrógeno inorgánico, o utilizan una fuente exógena de composición química no definida para satisfacer sus demandas esenciales, pero demuestran que, cuando el aporte exógeno del aminoácido es limitado, se resiente la capacidad celular para sostener la proliferación: tanto la velocidad específica de proliferación como la densidad celular máxima resultaron menores en los cultivos carentes de glutamina, comparados con aquellos suplementados con el aminoácido. Esta conclusión contradice lo observado por Öhman y col. (1996) en cultivos de células Sf-9, pero coincide con los hallazgos de Mendonça y col. (1999) en cultivos de la misma línea celular. Esta contradicción puede deberse a que los primeros adicionaron amonio al medio de cultivo libre de glutamina, glutamato y aspartato, mientras que los segundos, al igual que en este trabajo, no agregaron una fuente de amonio al medio libre de glutamina. En definitiva, si bien es posible cultivar células saUFL-AG-286 en un medio no adicionado de glutamina, la carencia de este aminoácido se traduce en alteraciones de la funcionalidad celular que se expresan en la curva de proliferación de los cultivos. Otra evidencia de la importancia de la presencia de glutamina en los medios de cultivo sobre la funcionalidad de esta línea celular es la limitación de la replicación viral observada en cultivos con una concentración muy baja de glutamina.

Por otro lado, el agregado de una elevada concentración de glutamina al medio UNL se tradujo en una ligera reducción de la velocidad específica de proliferación durante la fase exponencial, aunque no impactó sobre la densidad celular máxima, al menos en cultivos estáticos. Sin embargo, el efecto de la adición de altas concentraciones de glutamina fue más evidente sobre la replicación viral: la producción de poliedros de AgMNPV fue significativamente reducida en presencia de una concentración inicial de 18 mM, en comparación con los cultivos con una concentración inicial de 9 mM. Este fenómeno podría estar relacionado con la variación de la velocidad específica de consumo de glutamina: este parámetro se incrementa a medida que se aumenta la concentración inicial del aminoácido en el medio de cultivo. La relación entre la velocidad de consumo celular específica de glutamina y su concentración en el medio de cultivo fue descrita anteriormente para los cultivos de las líneas celulares Sf-9 y Sf-21, y podría indicar que las células de insectos son capaces de

regular el metabolismo de la glutamina de forma similar a las células de mamíferos (Öhman y col., 1995; Neerman y Wagner, 1996; Mendonça y col., 1999). El vínculo entre el incremento de la velocidad específica de consumo de glutamina y la alteración de la funcionalidad celular, expresada por la limitación en la replicación viral, podría estar mediada por el incremento en la velocidad específica de producción de amonio, que, como se discutirá más adelante, constituiría el único producto catabólico proveniente del metabolismo de los compuestos nitrogenados en esta línea celular. Por lo tanto, a través de la actividad tóxica del amonio producido en exceso, las altas concentraciones de glutamina, que a su vez inducen una mayor velocidad específica de consumo del aminoácido, interferirían con la funcionalidad celular.

De lo analizado en los dos párrafos precedentes surge como conclusión la necesidad de optimizar el valor de la concentración inicial de glutamina en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos en esta tesis llevaron a seleccionar una concentración inicial de 9 mM para el medio UNL. Esta concentración es más elevada que la presente en otros medios de cultivo para células de insectos lepidópteros, pero debe tomarse en consideración que el medio UNL posee una concentración muy inferior del resto de los aminoácidos (entre el 10 y el 40% respecto a la concentración en el medio TC-100), de tal manera que el aumento de la concentración de glutamina supliría una parte importante de la demanda del resto de los aminoácidos, especialmente aquella fracción del consumo destinada al aporte energético. De hecho, los cultivos de células saUFL-AG-286 en el medio TC-100 produjeron niveles más elevados de amonio que en el medio UNL, a pesar de la concentración más elevada de glutamina de este último. Por lo tanto, el análisis de la importancia de la concentración inicial de glutamina no puede realizarse sin tomar en consideración el nivel de la concentración total de aminoácidos, dada la plasticidad para su utilización que parecen mostrar las células de la línea saUFL-AG-286.

La velocidad específica máxima de consumo de glutamina en los cultivos de saUFL-AG-286, en los diferentes medios de cultivo ensayados en esta tesis, mostró una evolución en el tiempo similar para todos los casos: un pico de consumo durante la fase exponencial temprana, seguida por una declinación rápida, y luego más lentamente hasta anularse con la finalización de esa fase, aún cuando quedara una concentración remanente del aminoácido disponible en el medio de cultivo. Este perfil es similar al

descrito por Neermann y Wagner (1996) en cultivos “batch” de distintas líneas de células de mamíferos, y difiere del que los mismos autores describieron en cultivos de la línea celular IPLB-Sf-21 en medio TC-100, en los cuales el pico de velocidad específica de consumo se produjo en la mitad de la fase de crecimiento exponencial, luego del pico en la velocidad de consumo de glucosa, para luego decrecer. Además, los valores máximos de la velocidad específica de consumo de glutamina en los cultivos de saUFL-AG-286 fueron más elevados que los determinados en cultivos de otras líneas de células de lepidópteros (Bédard y col., 1993; Rhiel y col., 1997; Mendonça y col., 1999). Ambos datos, en conjunto, parecen evidenciar que esta línea celular exhibe una mayor avidez inicial por utilizar glutamina como fuente de energía, en comparación con otras líneas de células de lepidópteros, que empezarían a consumir a mayor nivel este aminoácido luego del pico inicial de consumo de glucosa.

La evaluación del consumo de aminoácidos en los cultivos de saUFL-AG-286 en medio TC-100 suplementado con suero mostró que ningún otro de los aminoácidos cuya concentración fue determinada, se consumió en la misma proporción que glutamina. Sólo asparagina (31%), metionina (28%) y leucina (20%) fueron consumidos en proporciones significativas en relación a su concentración inicial en el medio de cultivo. En general, el exceso en la concentración de aminoácidos de los medios de cultivo, en relación a las demandas celulares, es una característica común a los cultivos de todas las líneas de células de insectos lepidópteros (Bédard y col., 1993; Ferrance y col., 1993), aunque en esta línea celular la desproporción entre oferta y demanda, para la mayoría de los aminoácidos, parece ser más amplia que en otras. Por otro lado, el perfil de evolución del consumo de algunos aminoácidos muestra características particulares. Notablemente la alanina, un aminoácido que es acumulado en los sobrenadantes de los cultivos de todas las líneas de células de lepidópteros analizadas hasta el presente (Bédard y col., 1993; Ferrance 1993; Drews y col. 1995; Öhman y col., 1995; Doverskog y col. 1997; Mendonça y col. 1999), es consumido, si bien a bajo nivel, en los cultivos de células saUFL-AG-286. Como se discutirá más adelante, este comportamiento podría estar relacionado con los altos niveles de amonio que se acumulan en los sobrenadantes de cultivo de estas células. Por otro lado, los aminoácidos ácidos, glutamato y aspartato, que son consumidos en elevadas proporciones en cultivos de células Sf-9 (Bédard y col., 1993; Ferrance y col., 1993), aquí lo fueron sólo marginalmente. Sin embargo, como contrapartida se verificó un

consumo relativamente más elevado de asparagina, aunque en menores proporciones que en cultivos de células High Five®, donde este aminoácido es consumido como una fuente de energía principal, inclusive con preferencia sobre la glutamina (Rhiel y col., 1997). Se debe destacar que la mayor proporción de asparagina fue consumida, en cultivos en medio TC-100 suplementado con suero, luego de la finalización de la fase de crecimiento exponencial y del agotamiento de glucosa y glutamina en el medio de cultivo, por lo cual podría actuar como una fuente de energía alternativa ante el agotamiento de aquellas, aunque su utilización no permita sostener la viabilidad celular.

El medio UNL posee una composición de aminoácidos diferente a la del medio TC-100, y un contenido total de aminoácidos significativamente reducido respecto a éste último. Sin embargo, las células saUFL-AG-286 son capaces de proliferar en ambos medios con valores similares de velocidad específica de multiplicación, alcanzan también niveles similares de densidades celulares máximas y, como se discutirá más adelante, pueden soportar la replicación viral con mayor nivel de eficiencia. Como se mencionó más arriba, esta capacidad pone en evidencia la plasticidad de estas células para adaptar sus demandas de aminoácidos a la composición nutricional del medio de cultivo; más aún, ratifica que esas demandas pueden ser satisfechas con concentraciones mucho más bajas de prácticamente la totalidad de los aminoácidos, frente al contenido de los medios de cultivo estándar para células de lepidópteros. Existen muy pocos antecedentes acerca de medios de cultivo para células de insectos lepidópteros con una concentración de aminoácidos tan reducida como el medio UNL (Ferrance y col, 1993; Lua y Reid, 2003), y, por otro lado, no existe aún evidencia acerca de si otras líneas celulares pueden adaptarse a esta baja concentración de aminoácidos como lo hace la línea saUFL-AG-286. Considerando que la mezcla de aminoácidos constituye uno de los componentes de mayor costo en la formulación de un medio de cultivo básico, la utilización del medio UNL para el cultivo de células saUFL-AG-286, en lugar de los medios de cultivo habituales para células de lepidópteros, puede implicar una significativa disminución de costos en los procesos que hagan uso de los cultivos de esta línea celular.

Los análisis destinados a optimizar la composición del medio cultivo libre de suero para las células saUFL-AG-286 revelaron la existencia de limitaciones nutricionales adicionales a las debidas al agotamiento de carbohidratos o aminoácidos.

En este sentido, la más notable es la limitación asociada a la concentración de cloruro de colina. La colina es una amina vital que juega un rol en la integridad estructural de las membranas celulares, en el metabolismo de los grupos metilo, en la señalización transmembrana y en el transporte y metabolismo de lípidos y esteroides (Blusztajn, 1998). Es un precursor para la síntesis de fosfatidilcolina y esfingomiélin, dos fosfolípidos que son componentes esenciales de las membranas biológicas y precursores de mensajeros intracelulares como la ceramida y el diacilglicerol, y además la colina puede acetilarse a acetilcolina u oxidarse a betaína. En la mayoría de los tejidos animales, el 95% del total de colina se encuentra en forma de fosfatidilcolina (Li y Vance, 2008). Ésta, a su vez, es precursora en la síntesis de fosfatidilserina y fosfatidiletanolmina, éste último el fosfolípido más abundante, seguida por fosfatidilcolina, en las células Sf-9 y Tn-5 (Marheineke y col., 1998; Yeh y col., 1997). No se posee información específica acerca de la composición de fosfolípidos de las células de la línea celular UFL-AG-286. Mientras que en humanos y otros mamíferos la colina es un nutriente esencial (Li y Vance, 2008), en los insectos se han descrito diversas consecuencias asociadas a la deficiencia de colina. Si bien existen evidencias de que la carencia de colina, o fosfatidilcolina, se asocia al disparo de procesos de muerte celular programada en células de mamíferos cultivadas *in vitro*, (Holmes-McNary y col., 2001; Yen y col. 2002) no se han descrito hasta el presente consecuencias de la limitación de colina en cultivos de células de insectos. Todos los medios para células de insectos, desarrollados y utilizados para el cultivo de otras líneas celulares, contienen colina en su composición, pero con concentraciones entre 50 y 500 veces menores que la concentración óptima determinada en esta tesis para el medio UNL aplicado al cultivo libre de suero de la sub-línea saUFL-AG-286. Si bien no puede descartarse que estas células expresen un requerimiento específicamente más alto por la amina, parece más probable que la necesidad de adicionar altas concentraciones de colina esté revelando la existencia de un balance nutricional particular en la composición del medio UNL. A este respecto, se debe tener en cuenta, por un lado, que el medio UNL no está suplementado con suero fetal, y éste es una fuente de colina y fosfatidilcolina (Esko y Matsnoka, 1983), de tal manera que la adición con altas concentraciones de colina podría estar compensando la carencia asociada a la eliminación del suero. Por otro lado, el medio UNL posee menores concentraciones de metionina y serina que otros medios utilizados en el cultivo de células de insecto: como estos aminoácidos son precursores de la síntesis de fosfatidilcolina y

fosfatidiletanolamina (Vance y Ridgway, 1988; Li y Vance, 2008), la suplementación con colina podría suplir deficiencias de esos aminoácidos, deficiencias que limitarían la síntesis de fosfolípidos. Por lo tanto, la necesidad de suplementación con altas concentraciones de colina podría estar poniendo en evidencia una limitación, ya sea en la disponibilidad de fosfolípidos y/o su síntesis en las células saUFL-AG-286.

La línea celular saUFL-AG286 exhibe un patrón de producción de productos del metabolismo caracterizado por la producción de amonio y la falta de acumulación de lactato y alanina. Este patrón, que es diferente al que muestran otras bien caracterizadas líneas de células de insectos lepidópteros (Rhiel y col., 1997; Benslimane y col., 2005), podría ser el resultado de la expresión de un ordenamiento específicamente particular de vías metabólicas. Si bien esta hipótesis requeriría de la realización de estudios que involucren la medición de actividades enzimáticas y el seguimiento de trazadores, una comparación con la información obtenida en estudios llevados a cabo en otras líneas celulares podría permitir especular acerca de las características metabólicas de las células de la línea saUFL-AG-286.

La falta de acumulación de lactato, un producto del metabolismo de los monosacáridos que se acumula en cultivos de células de mamíferos, y también en cultivos de algunas células de insectos lepidópteros, podría considerarse un indicio de que las células saUFL-AG-286 podrían metabolizar la glucosa en forma tan eficiente como la que caracteriza a las líneas celulares derivadas de ovarios de *Spodoptera frugiperda*, IPLB-Sf-21 y Sf-9. Neermann y Wagner (1996) llevaron a cabo un estudio en el cual compararon el metabolismo de la glucosa, a través de la determinación de actividades enzimáticas y el seguimiento de los flujos metabólicos utilizando marcadores radiactivos, en cultivos de células de mamíferos -primarios y líneas transformadas- y en la línea celular IPLB-Sf-21, que también se caracteriza por no acumular lactato en los sobrenadantes de cultivo. En dicho estudio encontraron que, mientras las células de mamíferos transforman una gran proporción de la glucosa consumida en lactato (relación lactato producido / glucosa consumida superior a 1 mol/mol), en los cultivos de IPLB-Sf-21 la misma relación es aproximadamente igual a 0,02. Adicionalmente, encontraron que, en estas últimas células, la tasa de conversión de la glucosa en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos alcanzaba al 60% del total de glucosa consumida, contra menos del 1% medido en líneas de células de

mamíferos. En un estudio posterior, Benslimane y col. (2005) compararon los flujos metabólicos en cultivos de células Sf-9 y Tn-5, determinando en las primeras una tasa de oxidación completa de glucosa a dióxido de carbono, mediante su procesamiento en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, de 2,7%, contra 0,7% en los cultivos de Tn-5, que son activos productores de lactato. Ambos estudios evidencian que la falta de acumulación de lactato en cultivos de células de *Spodoptera frugiperda* se asocia a una mayor eficiencia para la oxidación completa de la glucosa, propiedad que podría caracterizar también a las células saUFL-AG-286.

Aún considerando que una fracción de toda la glucosa consumida similar a la encontrada en células Sf-9 es oxidada completamente a dióxido de carbono, y teniendo en cuenta que, de acuerdo a lo determinado en otras líneas de células de lepidópteros, otra fracción no superior al 15% podría ser metabolizada a través del ciclo de las pentosas-fosfato para satisfacer los requerimientos asociados a la síntesis de nucleótidos (Benslimane y col., 2005), aún resta saber como es utilizada la mayor parte de la glucosa consumida por las células saUFL-AG-286. En los cultivos de otras líneas de células de insectos, específicamente IPLB-Sf-21 y Sf-9, parte del esqueleto de carbono de la glucosa es utilizado para la síntesis de alanina, una vía para la detoxificación del amonio (Drews y col., 2000). Las células Tn-5 también producen alanina, y se supone que la glucosa es también el precursor del esqueleto de carbono para su síntesis (Benslimane y col., 2005). Pero las células saUFL-AG-286 no parecen producir alanina, por lo cual persiste la incógnita acerca de cuál es el destino de la mayor parte de la glucosa consumida. Sobre este aspecto se podría especular acerca de la producción de otros productos metabólicos, como el glicerol y el etanol, cuya presencia ha sido detectada en los sobrenadantes de cultivos de otras líneas de células de lepidópteros (Drews y col., 2000). Una vía posible es la transformación del piruvato en acetaldehído, y posteriormente en etanol, por acción de las enzimas piruvato carboxilasa y alcohol deshidrogenasa, respectivamente. El etanol, que fue identificado como producto de la glicólisis en cultivos de distintas líneas celulares de insectos (Takahashi y col, 1995; Benslimane y col., 2005), no fue cuantificado en este trabajo de tesis.

Como se mencionó en el párrafo anterior, los cultivos de células saUFL-AG-286 no acumulan alanina en los sobrenadantes. Por el contrario, aunque en una baja proporción, la consumen a partir del aporte exógeno del medio de cultivo. Esta es una

característica única entre las líneas de células de lepidópteros cuyo metabolismo ha sido estudiado hasta el presente. En cultivos de la línea celular Sf-9 se observaron dos comportamientos diferentes, dependientes de la presencia o no de glucosa: activa síntesis y secreción de alanina, sin acumulación de amonio, en presencia de un exceso de glucosa, o bien falta de producción de alanina y acumulación de amonio cuando la glucosa se agota (Doverskorg y col. 1995). En estas mismas células, Drews y col. (2000) mostraron que, en exceso de glucosa, el nitrógeno amídico de la glucosa consumida se incorpora a alanina, y que la enzima clave en este proceso es la glutamato sintasa, que transfiere el nitrógeno amídico de la glutamina a la posición amino en la molécula de glutamato, a partir de la cual es transaminado a piruvato (proveniente del procesamiento de la glucosa a través de la vía glicolítica) para formar alanina, reacción catalizada por la enzima alaninaaminotransferasa; en cambio, en los cultivos limitados en glucosa, la hidrólisis de la glutamina se llevaría a cabo por la actividad sucesiva de la glutaminasa, que libera el nitrógeno amídico, y de la glutamato deshidrogenasa, que rinde el nitrógeno amínico, ambos en forma de amonio que es excretado y se acumula en el sobrenadante de cultivo. La glutamato sintasa (GOGAT) es una enzima que forma parte del sistema de asimilación de nitrógeno inorgánico en procariotas, levaduras, hongos y plantas, y cuya presencia no había sido identificada en células animales, hasta su hallazgo en el gusano de seda (Hirayama y col, 1997; 1998), y posteriormente demostrada su actividad en extractos de células Sf-9 (Doverskorg y col., 2000). La falta de detección de producción de alanina no implica que las células saUFL-AG-286 carezcan de la expresión de GOGAT o alguna otra de las enzimas involucradas en el metabolismo de la glutamina o la síntesis de alanina, como la alaninaaminotransferasa, ya que podría estar limitado, por otro lado, el aporte del piruvato proveniente de la vía glicolítica.

En definitiva, la falta de capacidad de producción de alanina parece ser una característica única entre las líneas de células de lepidópteros que han sido estudiadas hasta el presente, característica que resultaría de la expresión de arreglos metabólicos particulares que deberán ser analizados en el futuro. Es importante remarcar, por otro lado, que la aparente incapacidad de síntesis de alanina le impide a las células saUFL-AG-286 contar con la vía más importante para la detoxificación del amonio, y que, como se analizará más adelante, esta incapacidad puede imponer importantes

consecuencias sobre la utilización de los cultivos de esta línea celular en procesos biotecnológicos.

La falta de capacidad de síntesis de alanina parece estar asociada a la acumulación de amonio en los sobrenadantes de los cultivos de células saUFL-AG-286. Las distintas líneas de células de insecto cuyo metabolismo ha sido analizado hasta el presente no presentan un comportamiento uniforme en relación a la producción de amonio. Mientras que las líneas derivadas de ovarios de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-Sf-21 y Sf-9) sólo acumulan amonio bajo condiciones de carencia de glucosa en el medio de cultivo, en los cultivos de células Tn-5 el amonio se acumula aún en presencia de exceso de glucosa (Bedard y col., 1993; Takeyuki y col., 1996; Rhiel y col., 1997; Mendonça y col., 1999; Benslimane y col., 2005). A diferencia de lo que ocurre con la producción de lactato, la producción de amonio en los cultivos de células saUFL-AG-286 presenta un perfil similar, aunque no idéntico, al de las células Tn-5, y totalmente diferente al de las células IPLB-Sf-21 o Sf-9. La acumulación de amonio ocurrió en todos los medios y condiciones de cultivo que fueron empleados en este trabajo de tesis, aunque la magnitud de la acumulación del metabolito fue influido por distintos factores.

Por un lado, se verificó una relación entre la acumulación de amonio y la concentración inicial de glutamina en el medio de cultivo, que evidenciaría que el amonio es un producto de la utilización de este aminoácido. Más aún, en casi todas las condiciones estudiadas, el monto total de amonio acumulado equivalió a la suma de las concentraciones molares del nitrógeno amídico y amínico correspondiente a la glutamina consumida, por lo que podría plantearse como plausible la hipótesis de una hidrólisis de la glutamina por vías idénticas a las que operan en las células de *Spodoptera frugiperda* en un medio limitado en glucosa, es decir a través de la actividad sucesiva de una glutaminasa y una glutamato dehidrogenasa (Drews y col., 2000). Sin embargo, la acumulación de amonio, aunque en menor magnitud, también se verificó en cultivos en medios no adicionados de glutamina, hecho que indicaría que otros aminoácidos, como la asparagina, podrían ser también utilizados y metabolizados con liberación de amonio libre, tal como la metabolizan las células Tn-5 (Rhiel y col., 1997).

Por otro lado, aunque la acumulación de amonio se produjo aún en presencia de exceso de glucosa, los picos más agudos en la velocidad de acumulación de amonio siempre coincidieron, temporalmente, con las limitaciones en el nivel de glucosa. Esta relación podría inducir a considerar que, ante la limitación en la disponibilidad de energía a través de la utilización de monosacáridos, se produciría un incremento de la velocidad de consumo de aminoácidos como fuente alternativa, y que su metabolismo daría lugar a la aceleración en la producción de amonio. Sin embargo, como el pico de producción de amonio no estuvo precedido o acompañado de un aumento significativo de la velocidad de consumo de la mayoría de los aminoácidos, es posible plantear una hipótesis alternativa que considera la expresión de una vía diferente para la detoxificación del amonio. La síntesis de ácido úrico constituye el principal mecanismo de disposición no tóxica del amonio en los insectos terrestres. Stavroulakis y col. (1991) demostraron que una línea celular establecida a partir de tejidos del gusano de seda (*Bómbix mori*) producía ácido úrico como catabolito nitrogenado principal. La vía uricotélica para la síntesis de ácido úrico es compleja y requiere de una contribución energética, mientras que, por otro lado, el ácido úrico puede ser degradado a través de la vía uricolítica, que lleva a la producción de amonio (Lehninger, 1979). Así, podría ser postulada la existencia de dos estadios diferentes en relación a la eliminación de amonio en las células de la sub-línea saUFL-AG-286: un estadio inicial, caracterizado por la síntesis de ácido úrico durante la fase de crecimiento exponencial, en presencia de recursos energéticos suficientes para sostener la síntesis, luego seguido de un segundo estadio caracterizado por la degradación de ácido úrico y la consecuente producción de amonio, cuando los recursos energéticos se tornan escasos. De esta manera, estas células expresarían también, como otras células de insecto, un mecanismo de detoxificación de amonio. En ensayos preliminares, utilizando una técnica de baja sensibilidad, no se ha podido detectar ácido úrico en el sobrenadante de los cultivos de células saUFL-AG-286, por lo que será necesario realizar nuevas determinaciones, con metodologías más sensibles, tanto en sobrenadantes de cultivo como en extractos celulares, para verificar si estas células pueden expresar, efectivamente, este mecanismo alternativo de detoxificación.

c) Sobre la nutrición y el metabolismo en cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV

La infección de una célula por un virus impone sobre la primera, en la mayoría de los casos, profundas transformaciones estructurales y funcionales. Por otro lado, la concreción eficiente del proceso de replicación viral puede implicar la necesidad de que se produzcan alteraciones de la fisiología y del metabolismo celular que permitan satisfacer requerimientos específicos de dicho proceso. En todo caso, una población de células infectadas, en las cuales se desarrolla un activo proceso de replicación viral, debería exhibir un comportamiento fisiológico diferente al de una población de células no infectadas. Siendo la nutrición un aspecto central de la fisiología celular, es esperable que la infección y replicación virales sean acompañadas por cambios en los requerimientos de los distintos nutrientes. Si estos requerimientos superan las posibilidades del medio a partir del cual se nutren las células, o dicho medio no posee un balance adecuado a la condición fisiológica característica de las células infectadas, la replicación viral puede limitarse. En los estudios llevados a cabo en células saUFL-AG-286 infectadas sincrónicamente con AgMNPV en la fase exponencial temprana, en medio TC-100 suplementado con suero, no pudieron detectarse limitaciones nutricionales obvias, ya que ninguno de los nutrientes principales evaluados (glucosa y aminoácidos) resultó agotado durante la infección. Además, los resultados obtenidos en esos experimentos demuestran que la demanda nutricional global de las células infectadas fue reducida luego de la infección, principalmente durante las primeras 24 horas posteriores a la infección, coincidente con el período de producción de viriones brotados. Los efectos de las infecciones con baculovirus sobre las demandas nutricionales de las células de insectos fueron estudiados bajo diferentes condiciones experimentales, con resultados contradictorios. En algunos trabajos se informó que las velocidades de consumo de los principales nutrientes aumentaban luego de la infección (Sugiura y Amman, 1996; Radford y col., 1997; Rodas y col., 2005), mientras que en otros, por el contrario, se mostró que esas velocidades no se modificaban (Wong y col., 1994; Kamen y col., 1996; Palomares y col., 2004), o inclusive se reducían (Rhiel y Murhammer, 1995). La explicación para esta contradicción podría radicar en las diferentes condiciones experimentales (líneas celulares, virus, medios de cultivo, tiempo y multiplicidad de infección, etc.) empleadas en los diferentes trabajos. En este sentido, Rhiel y col. (1997) demostraron que los cambios en las demandas nutricionales luego de

la infección viral dependen de la línea celular y el medio de cultivo. Por otro lado, es posible que la respuesta celular a la infección, en términos de velocidad de demanda de nutrientes, también sea influida por el estado metabólico y nutricional previo: cultivos de células que se encuentran en estado de activa división, y por lo tanto en un período de elevada velocidad de consumo y acumulación de nutrientes, probablemente muestren una caída de esa velocidad, debida a la interrupción de la multiplicación celular y a los distintos efectos de la infección viral sobre la fisiología celular, que podrían interferir con la normal nutrición celular; por el contrario, en un cultivo infectado al final de la fase de crecimiento, en el cual las velocidades de consumo son más bajas, y las reservas de los principales nutrientes y fuentes de energía se encuentran reducidas, o incluso agotadas, es posible que las necesidades surgidas de la infección puedan incrementar la velocidad de demanda de algunos nutrientes, o que no puedan verificarse cambios en la misma luego de la infección. La marcada reducción de la velocidad de consumo de los principales nutrientes durante las primeras 24 horas post-infección, verificada en los experimentos de esta tesis, podría ser explicada, entonces, por la abrupta interrupción de la multiplicación de una población celular que se encontraba en activo estado de proliferación, en un contexto de amplia disponibilidad de nutrientes. La rémora en la captación de nutrientes abarcó a la mayoría de los que fueron evaluados en este trabajo, aunque la velocidad de consumo de algunos aminoácidos (alanina, lisina y asparagina) se incrementó selectivamente. A pesar de la marcada reducción de las velocidades específicas de consumo de glucosa y glutamina, la síntesis de viriones brotados se llevó a cabo con alta eficiencia, lo cual indicaría que este proceso presenta una menor demanda energética que la requerida para sostener la proliferación celular, o bien que en el momento de la infección las células se encontraban suficientemente abastecidas de recursos energéticos. La etapa posterior, dominada por la síntesis masiva de poliedrina y la producción de poliedros, estuvo acompañada por un incremento de la velocidad específica de consumo de glucosa, hasta un nivel aproximadamente similar al de las células de un cultivo no infectado, lo que indicaría, por un lado, que la inhibición de la incorporación de glucosa, característica de las primeras 24 horas, es reversible, y que esta etapa podría requerir un mayor aporte energético. En relación a la glutamina, su velocidad específica de consumo permaneció en un nivel similar al de las primeras 24 horas, hasta la finalización del experimento. Además de la glutamina, también asparagina, alanina, lisina y triptofano fueron consumidos en forma constante en cultivos de saUFL-AG-286 durante la fase de síntesis de poliedrina y ensamblaje de

poliedros. Sorprendentemente, el resto de los aminoácidos presentó un balance de consumo negativo, es decir, incrementaron su concentración en el sobrenadante, a pesar de que también la producción de poliedros fue eficiente. Este hecho parece confirmar que la infección sincrónica, en medio TC-100, de un cultivo en la fase de crecimiento exponencial se desarrolla en un contexto de amplia disponibilidad celular de reserva de aminoácidos, suficiente para cubrir las exigencias inherentes a la hiperexpresión de la proteína poliedrina.

Los resultados comentados en el párrafo anterior mostraban que la velocidad específica de consumo de glutamina, por parte de las células saUFL-AG-286, se reduce luego de la infección con AgMNPV en medio TC-100. Sin embargo, los experimentos realizados en medio UNL mostraron que la carencia de glutamina, o una concentración inferior a la óptima, producen una limitación de la replicación viral, verificable a través de la reducción en la producción de poliedros. En este mismo sentido, Palomares y col. (2004) demostraron, en cultivos de células Sf-9 infectados con un baculovirus modificado, que la glutamina es requerida para sostener una adecuada síntesis de proteína recombinante. La marcada reducción (menos del 50%) de la producción de poliedros en el medio UNL deficiente en glutamina puede estar vinculada al menor contenido del resto de los aminoácidos en el medio UNL, lo cual podría aumentar la demanda de glutamina, en relación a los cultivos realizados en medio TC-100, tal como sucede también en los cultivos no infectados. Por el contrario, cuando la concentración inicial de glutamina en el medio UNL superó el valor óptimo de 9 mM, la consecuencia fue una reducción de la producción viral. Taticek y Shuler (1997) no encontraron efectos negativos de la adición de glutamina, sobre la producción de una proteína recombinante en cultivos de células Sf-9, hasta una concentración de 13 mM. Considerando, como se discutió previamente, que existe una relación directa entre la concentración inicial de glutamina en el medio UNL y la acumulación de amonio, es posible que sea éste el agente tóxico responsable de la limitación de la replicación viral en cultivos infectados de saUFL-AG-286 con elevadas concentraciones de glutamina. Esta presunción se refuerza por los resultados que demuestran el efecto negativo creciente de las concentraciones de amonio superiores a 11 mM sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL. Un efecto similar del amonio fue descrito previamente sobre la producción de proteínas recombinantes en cultivos de otra línea celular que produce activamente amonio, la

línea Tn-5 (Yang y col., 1996; Donaldson y col., 1999). Si bien el amonio puede interferir con la normal fisiología celular, y esto podría ser una causa de la limitación de la multiplicación viral, es también un conocido agente inhibidor de la replicación a través de la interferencia con los procesos de fusión de membrana dependientes de pH que se producen durante la penetración y desnudamiento de virus que ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptores, inclusive los viriones brotados de los baculovirus (Hefferon y col., 1999). Cualquiera sea la causa, la sensibilidad de la replicación de AgMNPV a la inhibición por altas concentraciones de amonio, junto con la inhabilidad de las células saUFL-AG-286 para detoxificarlo, impone restricciones sobre la utilización de los cultivos “batch” de esta línea celular para la producción de poliedros virales, ya que acumulan elevadas concentraciones de amonio cuando alcanzan altas concentraciones celulares, obligando a diseñar estrategias de cultivo e infección que minimicen la exposición celular al tóxico durante la infección viral.

La infección de cultivos en suspensión “batch” de células saUFL-AG-286 en medio UNL libre de suero, utilizando distintas combinaciones de los parámetros multiplicidad y tiempo de infección, permitió observar que sólo los cultivos infectados muy temprano, a muy baja densidad celular, eran capaces de producir viriones brotados en niveles aproximadamente similares a los alcanzados en los cultivos en medio TC-100 suplementado con suero, y que aún a densidades celulares en las cuales no se registra acumulación significativa de amonio, se produce una marcada reducción de la producción de esta progenie viral. El análisis de un ensayo de “screening” diseñado para evaluar si tal deficiencia estaba asociada a una limitación nutricional, reveló que la carencia de algún componente contenido en la emulsión de lípidos probablemente constituyera el factor causal de mayor relevancia. Esta presunción luego fue confirmada mediante experimentos de suplementación con cantidades adicionales de la emulsión lipídica, que permitieron alcanzar rendimientos volumétricos de viriones brotados similares a los obtenidos en cultivos infectados a muy baja densidad celular, aunque aún con rendimientos específicos más bajos. Por otro lado, la producción de poliedros de AgMNPV en medio UNL libre de suero también mostró una respuesta positiva a la adición de cantidades suplementarias de emulsión lipídica, cuando las infecciones se llevaron a cabo en cultivos estáticos de células saUFL-AG-286. Estos resultados, en su conjunto, indican que la suplementación con la emulsión lipídica de origen comercial, en la proporción sugerida por el fabricante para su utilización en cultivos de células de

insectos, si bien parece suficiente para sostener la normal proliferación celular, no lo es para sustentar la replicación viral. Por otro lado, la diferencia en los requerimientos de suplementación con la emulsión de acuerdo al momento de la infección, parece indicar que la carencia observada en cultivos infectados a mayor densidad celular podría derivar del activo consumo de uno de los componentes de la emulsión durante la proliferación celular.

La emulsión lipídica utilizada en este trabajo, de composición química definida, pero no revelada por su fabricante, probablemente derive de la formulada originalmente por Maiorella y col. (1988) e Inlow y col. (1989), que contenía fuentes de ácidos grasos (ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao y Tween 80), colesterol y acetato de α -tocoferol, disueltos en etanol y emulsionados en el polialcohol Pluronic F-68. Los resultados obtenidos en esta tesis no permiten discriminar cuál, o cuáles, de los componentes de la emulsión es el limitante de la replicación de AgMNPV pero es posible plantear una hipótesis en relación al rol de los ácidos grasos. Si las células saUFL-AG-286 poseen una composición lipídica semejante a la de otras líneas de células de lepidópteros que han sido analizadas previamente, en las que se encontraron valores significativamente mayores para la relación de concentraciones fosfolípidos:colesterol que los hallados en células de mamíferos (Marheineke y col., 1998; Yeh y col., 1997), considerando además que las células de insectos tienen una limitada capacidad para sintetizar, desaturar y elongar ácidos grasos (Öhmann y col., 1995), y que los requerimientos de colina de esta línea celular parecen ser más elevados que en otras células, podría ser posible que la respuesta frente a la adición de cantidades suplementarias de la emulsión lipídica constituya la expresión de una limitación en el abastecimiento de ácidos grasos requeridos para la síntesis de los fosfolípidos requeridos para el ensamblado de las envolturas virales. Se ha descrito que la privación de lípidos en cultivos celulares infectados es causa de la producción de baculovirus carentes de infectividad (Goodwin, 1991), pero no existen otras referencias previas en relación a las demandas específicas de estos nutrientes para sostener la replicación de baculovirus en cultivos de células de insectos. Por otro lado, si bien parece menos probable la existencia de una deficiencia de colesterol, dado que las células de insectos parecen requerirlo en menor medida que las células de mamíferos, existen antecedentes de limitaciones en la replicación de baculovirus debidas a la carencia de esteroides (Gilbert y col., 1996) .

d) Sobre la formulación de un nuevo medio de cultivo básico para la línea celular UFL-AG-286

La composición de la mayoría de los medios de cultivo básicos para células de lepidópteros, como se describió en la introducción de esta tesis, está basada en la composición química de la hemolinfa de estos insectos. Sin duda, esta estrategia ha resultado exitosa para la formulación y el uso de medios destinados a cultivos celulares utilizados a baja escala. Sin embargo, el desarrollo de procesos industriales, en los cuales el costo del medio de cultivo tiene una importante influencia sobre la factibilidad económica del proceso, impone la necesidad de que la composición de los medios se ajuste, de la manera más estricta, a los requerimientos del proceso. La producción de un baculovirus insecticida en cultivos de células de insecto, por las razones que ya fueron expuestas en la introducción, requiere del empleo de medios de bajo costo. Ahora bien, no todos los medios de cultivos básicos presentan una formulación que posibilite su empleo sin la suplementación con costosos aditivos, como el suero fetal bovino. En consecuencia, estos medios de cultivo dejan de ser económicamente competitivos cuando deben ser utilizados en procesos industriales a mayor escala. Para esta clase de procesos se requiere el desarrollo de medios optimizados, que presenten un balance ajustado entre la oferta nutricional, las demandas celulares y las exigencias de los procesos productivos a los cuales serán aplicados.

Los medios utilizados en el cultivo de células animales, en general, y también de células de insectos, en particular, tienen una composición química muy compleja, con decenas de componentes de distinta naturaleza química, cuyas funciones específicas están, con frecuencia, pobremente establecidas. Los criterios utilizados para el diseño de los medios conocidos han sido casi totalmente empíricos, y provienen más del conocimiento de la composición de los fluidos biológicos de los animales de los cuales derivan las células, que del conocimiento de los requerimientos nutricionales y metabólicos de las células en cultivo, cuya fisiología *in vitro* es necesariamente diferente a la de sus precursoras *in vivo*. El desarrollo totalmente racional de un medio de cultivo requeriría del conocimiento detallado de los distintos requerimientos fisicoquímicos, nutricionales y metabólicos que caracterizan a las células adaptadas al cultivo *in vitro*, y además de manera dinámica, ya que esos requerimientos varían con el tiempo y con la variedad de condiciones a las que se deben enfrentar las células durante

la evolución de cultivos en diferentes condiciones ambientales. En el caso de cultivos celulares que serán aplicados a la producción de virus, la infección viral introduce elementos adicionales de análisis, debido al profundo efecto que ejerce sobre la fisiología celular. Por lo tanto, la adopción de una estrategia racional analítica para el diseño de un nuevo medio de cultivo requeriría de recursos humanos, materiales y temporales, cuya cuantía es incompatible con la formulación de un medio de bajo costo. En este trabajo de tesis, el enfoque racional de diseño para la formulación de un nuevo medio de cultivo para la línea celular UFL-AG-286 se ha reservado al análisis de los principales nutrientes y metabolitos: hidratos de carbono y aminoácidos, y los productos de su metabolismo, en condiciones de cultivo “batch”, no infectados e infectados con el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*. Dado que esta línea celular no había sido caracterizada previamente, la información requerida para este diseño debió ser obtenida durante el desarrollo de este trabajo de tesis. Estos resultados han sido discutidos previamente, y sólo serán comentados en esta sección aquellos aspectos vinculados directamente con la política de formulación del nuevo medio de cultivo.

En los últimos años se ha generalizado la aplicación de distintos métodos estadísticos, propios del análisis multivariado, para la resolución de problemas complejos cuya resolución es, *de facto*, inabordable por otras metodologías (Plackett y Burman 1947; Khuri y Cornell, 1987; Kalil y col. 2000). Estas metodologías se han aplicado al diseño y optimización de procesos fermentativos que utilizan bacterias y hongos (Chen y col, 1992, Gomes y col. 1994; Pham y col. 1998), pero sólo excepcionalmente al diseño de medios de cultivo para células animales (Gaertner y Dhurjati, 1993; Kim y col. 1999), y nunca a la formulación de un medio de cultivo para células de insectos lepidópteros. En este trabajo se han empleado métodos de “screening” para la identificación de compuestos, o grupos de compuestos agrupados de acuerdo a su naturaleza química, cuyas concentraciones limitaban la proliferación celular y/o la replicación viral. Una vez identificados, las concentraciones de esos compuestos o grupos de compuestos fueron optimizadas mediante ensayos de suplementación individual o conjunta. Es importante remarcar que, para los componentes cuya concentración se reveló crítica la respuesta del sistema frente a la suplementación nutricional se evaluó en términos de proliferación celular y, de resultar necesario, de capacidad para sustentar la replicación viral.

La primera etapa en la formulación del nuevo medio de cultivo fue la selección de la base del mismo. Existen dos bases probadas en cultivos de células de lepidópteros, la del medio de Grace, a partir de la cual se han formulado luego los medios TC-100 y TNM-FH, a la cual estaban adaptadas las células UFL-AG-286 en el momento de comenzar los experimentos de esta tesis, y la del medio IPL-41, a partir del cual se han originado posteriormente la mayoría de los medios de cultivo libres de suero conocidos en la actualidad. Ambas bases fueron evaluados en este trabajo, observándose que las células UFL-AG-286 no son hábiles para proliferar en una base de medio IPL-41, pero lo pueden hacer en una mezcla 1:1 de TC-100 e IPL-41, incluso más rápido y con mayores rendimientos celulares que en el medio TC-100. Es probable que la inhabilidad para proliferar en medio IPL-41 sea consecuencia de la carencia de caldo triptosa, sí presente en el medio TC-100, que, como se discutirá más adelante, tiene actividad promotora de la proliferación de estas células. Por otro lado, el rendimiento superior de la mezcla TC-100-IPL-41 1:1, respecto al TC-100, podría explicarse por el aporte de ácidos orgánicos y oligoelementos inorgánicos, no presentes en la formulación del medio TC-100, como así también por una concentración más elevada de vitaminas. A partir de estos resultados se decidió trabajar con una formulación básica similar a la del medio TC-100, con el agregado de las concentraciones de ácidos orgánicos y oligoelementos presentes en la mezcla TC-100-IPL-41 1:1, y reforzando la concentración de la mezcla de vitaminas. Este medio, suplementado con 10% de suero fetal bovino, permitió alcanzar un rendimiento celular similar al de la mezcla TC-100-IPL-41 1:1 (resultado no mostrado), y fue luego utilizado como base para los estudios destinados al diseño del medio libre de suero.

Como se comentó previamente, los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía, y también de carbono, para las células de insecto. Los distintos medios de cultivo básicos para células de lepidópteros poseen diferentes composiciones cualitativas y cuantitativas de hidratos de carbono. La más simple es la del medio TC-100, que sólo posee glucosa a una concentración de 1 g/l, mientras que otros medios (IPL-41, TNM-FH) incorporan otros monosacáridos, como fructosa, y también disacáridos, como maltosa y sacarosa. Si bien se ha comprobado en cultivos de otras líneas de células de lepidópteros que la fructosa y la maltosa son consumidas, esto siempre ocurre luego del agotamiento de la glucosa (Ferrance y col., 1993). En cambio, la sacarosa nunca es consumida, y su función en la composición del medio de cultivo

probablemente se limite al mantenimiento de la osmolaridad (Ferrance y col., 1993). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sabiendo que las células saUFL-AG-286 pueden proliferar en un medio conteniendo glucosa como único hidrato de carbono, que no lo pueden hacer en absoluto en un medio carente de glucosa, y tomando en consideración que la incorporación de un único hidrato de carbono en la formulación podría facilitar el posterior análisis de la demanda nutricional, se decidió que la glucosa fuera el único hidrato de carbono incorporado a la formulación del nuevo medio. Ahora bien, ¿cuál debería ser la concentración óptima de glucosa?. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el agregado de una concentración de glucosa tan alta como 44 mM no produce efectos negativos, ni sobre la proliferación celular ni sobre los rendimientos virales, ni tampoco induce la formación de lactato. Por otro lado, el agregado de esta alta concentración permite que se produzca un leve incremento del rendimiento celular en glutamina, evidenciando un uso más eficiente de este aminoácido, y, principalmente, que se reduzcan significativamente los niveles de amonio acumulados durante el cultivo de las células saUFL-AG-286, previniendo sus efectos tóxicos y su acción inhibitoria sobre la producción viral. En comparación con el medio TC-100, en el cual se acumula amonio hasta una concentración superior a 20mM, en el medio UNL, para la misma densidad celular máxima, sólo se acumula 12 mM. Si bien la formulación con 22 mM de glucosa permite alcanzar un rendimiento más eficiente en biomasa con respecto al consumo del hidrato de carbono, a esta concentración inicial de glucosa aún se acumula amonio a una concentración de 16 mM. En definitiva, la utilización más eficiente de glutamina y la prevención de la acumulación de amonio son las razones que justifican la selección de una concentración inicial de glucosa de 44 mM, que además, de acuerdo a los rendimientos de biomasa en glucosa en el medio UNL, podría soportar, teóricamente, el crecimiento de un cultivo de células saUFL-AG-286 hasta una densidad celular máxima de 1.10^7 células.ml⁻¹.

La glutamina es la otra fuente principal de energía en los cultivos de células saUFL-AG-286, y junto con la glucosa fueron los nutrientes más consumidos en los experimentos iniciales de esta tesis. Además, en un medio donde el resto de los aminoácidos se encuentran a concentraciones inferiores a las presentes en otros medios de cultivo, la glutamina es también la principal fuente de nitrógeno. Como se discutió previamente, estas células pueden proliferar en un medio libre de glutamina, pero con un significativo resentimiento de los niveles de producción viral. Para las dos

concentraciones de glutamina evaluadas en esta tesis, 9 y 18 mM, no hubo diferencias significativas en la eficiencia de la utilización del propio aminoácido, y tampoco en la de la glucosa. Sin embargo, a la concentración más alta de glutamina se acumularon niveles más elevados de amonio, y también se produjo una muy significativa reducción de la producción viral. Por lo tanto, la decisión de fijar la concentración de glutamina del medio UNL en un valor de 9 mM se tomó, principalmente, en función de los mayores rendimientos virales alcanzados.

Se ha demostrado repetidamente que los medios de cultivo clásicos para células de insectos se encuentran sobredimensionados en su contenido de aminoácidos, frente a los requerimientos de distintas líneas de células de lepidópteros (Bedard y col., 1993; Ferrance y col., 1993). A pesar de estos antecedentes, con muy pocas modificaciones se siguen utilizando las mismas bases de aminoácidos desarrolladas para los medios de Grace e IPL-41, y no existen casi antecedentes publicados acerca de la evaluación de nuevos medios de cultivo con un contenido de aminoácidos más ajustado a los reales requerimientos celulares (Ferrance y col., 1993). En este trabajo de tesis, además de verificarse que también la línea celular saUFL-AG-286 expone requerimientos de aminoácidos marcadamente inferiores en relación a las posibilidades nutricionales del medio TC-100, se demostró que estas células pueden cultivarse en forma indefinida, sin desmedro de su sensibilidad y permisividad a la replicación con AgMNPV, en un medio en el cual las concentraciones de la mayoría de los aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, prolina, treonina, triptofano, valina) fueron reducidas al 10% de su concentración inicial en el medio TC-100, otros cuatro a porcentajes inferiores al 20% (alanina, asparagina, leucina y serina) y uno más (metionina) al 40%, mientras que sólo la concentración de glutamina se incrementó dos veces respecto a su concentración en el medio TC-100. En su conjunto, la concentración de aminoácidos totales del medio UNL es entre 3 y 5 veces inferior a la de los otros medios de cultivo conocidos para células de insectos lepidópteros (Grace, 1962; Gardiner y Stockdale, 1975; Weis y col., 1981). La composición de aminoácidos del medio UNL presenta dos claras ventajas específicas, para la línea saUFL-AG-286 y la producción de AgMNPV en cultivos de la misma, frente a los otros medios utilizados en el cultivo de células de insectos: un balance nutricional que reduce la producción y acumulación de amonio, previniendo sus efectos tóxicos sobre la producción viral, y por otro lado la reducción del costo del medio de

cultivo. Ambas ventajas pueden ser críticas en la definición de la factibilidad económica de un proceso que haga uso de este medio para el cultivo de UFL-AG-286 y saUFL-AG-286 y la producción de poliedros de AgMNPV. La factibilidad de utilizar este medio, con esta particular composición de aminoácidos, para el cultivo de otras líneas de células de lepidópteros, o aplicado a la producción de otros virus o proteínas recombinantes, debe aún evaluarse.

Los medios de cultivo formulados para células de insectos lepidópteros contienen diferentes concentraciones de cloruro de colina. Mientras el medio TC-100 carece absolutamente de la amina, y el medio de Grace presenta una concentración de $2 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$, los medios IPL-41 y KBM 10 (Doverskog y col., 1997) fueron formulados con una concentración de $0,02 \text{ g.L}^{-1}$. Significativamente, estos dos últimos medios, al igual que el desarrollado en este trabajo de tesis, han sido utilizados como base para el desarrollo de medios completos libres de suplementación con suero fetal bovino. El medio UNL contiene una concentración de colina 50 veces superior a los dos últimos, la cual fue determinada como óptima para promover la proliferación celular, en experimentos de suplementación de un medio libre de suero que fueron discutidos anteriormente.

En conclusión, el medio básico UNL presenta un balance de nutrientes novedoso en relación a la composición de otros medios utilizados para el cultivo de líneas celulares de insectos lepidópteros. La composición del medio UNL fue establecida sobre la base de estudios destinados, por un lado, a identificar los consumos de los principales nutrientes y la producción de los principales metabolitos potencialmente tóxicos, y por otro lado, a cuantificar las respuestas frente a la suplementación con componentes previamente identificados como limitantes de la proliferación celular y/o la producción viral, en ensayos de “screening”. Las principales diferencias, en relación a otros medios básicos, radican en la menor concentración de aminoácidos en general, y en las concentraciones más elevadas de glucosa, glutamina y colina. Es probable que la composición actual del medio UNL no sea óptima para el cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 y/o la replicación de AgMNPV, ya que la identificación de limitaciones se realizó trabajando con conjuntos de nutrientes, en los que podrían quedar ocultos los efectos ejercidos por componentes individuales. Una posterior optimización requerirá del análisis individualizado de esos efectos ocultos.

e) Sobre la formulación de un nuevo medio de cultivo completo, libre de suero, para la línea celular saUFL-AG-286

En general, las líneas de células animales, incluidas las de insectos, son capaces de proliferar en medios de cultivo básicos suplementados con proporciones variables de suero fetal bovino. Como se mencionó en la introducción, este suplemento ejerce múltiples funciones nutricionales, regulatorias, mecánicas, etc., cuyo reemplazo ha planteado, y aún lo hace, complejos problemas a la tecnología de cultivos celulares. En la mayoría de los medios de cultivo libres de suero para células de insectos lepidópteros cuya composición es conocida, el suero ha sido reemplazado por una mezcla de hidrolizados proteicos, extractos microbianos y una fuente de lípidos y esteroides (Röder, 1982; Maiorella y col., 1988; Vaughn y Fan, 1997; Donaldson y Shuler, 1998; Wu y Lee, 1998; Franek y col. 2000; Ikonou y col., 2001). Considerando que estos suplementos han sido utilizados con éxito en el cultivo de distintas líneas, se decidió seguir la misma estrategia, evaluando la competencia de distintos hidrolizados y extractos, y mezclas de los mismos, para promover la proliferación en cultivos de células saUFL-AG-286, y la replicación de AgMNPV, y completando el reemplazo sérico con una fuente convencional de lípidos.

En los experimentos iniciales de “screening” se identificaron dos hidrolizados de origen animal, de origen enzimático, con capacidad individual para promover significativamente la proliferación de cultivos de saUFL-AG-286: un hidrolizado de caseína, y el caldo triptosa fosfato. Por otro lado, ninguno de los hidrolizados ácidos, incluido el de caseína, mostró actividad (no se muestra), lo que indicaría que los efectos de promoción de la proliferación estarían asociados a la presencia de péptidos, más que al aporte adicional de aminoácidos libres. En este sentido, Franek y col. (2000) sugirieron que los péptidos aportados por los hidrolizados podrían ejercer actividades de factores de crecimiento y anti-apoptóticas. Los hidrolizados enzimáticos de caseína no están entre aquellos que han sido utilizados previamente para la formulación de suplementos libres de suero para cultivos de células de insectos, aunque se han publicado trabajos que demostraron que estos hidrolizados exhiben propiedades características de factores de crecimiento sobre cultivos de células de insectos (Mendonça y col., 2007). Por el contrario, el caldo triptosa, o el caldo triptosa fosfato, son muy utilizados en tecnología de cultivos de células de insectos, ya que forman parte

de la composición del medio TC-100, y su actividad promotora de la proliferación celular y la replicación de baculovirus ha sido descripta previamente en cultivos de otras líneas de células de insectos (Munderloh y Kurttí, 1989; Deutschmann y Jäger, 1994; Vaughn y Fan, 1997).

Resulta sorprendente, sin embargo, que otros hidrolizados muy utilizados en la formulación de medios de cultivo para células de insectos no hayan mostrado actividad para promover la proliferación de las células saUFL-AG-286, particularmente el hidrolizado enzimático de lactoalbúmina y el digesto enzimático de carne bovina conocido como Primatone[®]. El hidrolizado enzimático de lactoalbúmina forma parte de la composición del medio TNM-FH, y también fue utilizado en la formulación de suplementos de reemplazo sérico (Mitsubishi, 1989). Por su parte, Primatone[®] fue señalado como una fuente de factores de crecimiento para el desarrollo de medios de cultivo libres de suero (Schlaeger, 1996; Ikonomou y col., 2001). La falta de respuesta de las células saUFL-AG-286 podría resultar la expresión de un cierto nivel de selectividad en la actividad de los péptidos presentes en estos hidrolizados. Sin embargo, no puede descartarse que los mismos resulten activos a concentraciones diferentes a la única evaluada en el ensayo de “screening” en el que se seleccionaron los hidrolizados activos para esta línea celular en particular, ya que, como se discutirá más adelante, los efectos de la suplementación con los hidrolizados proteicos varían con sus concentraciones. Esta hipótesis deberá ser evaluada en ensayos de proliferación que abarquen una variedad de concentraciones para cada hidrolizado.

Entre los extractos microbianos ensayados en el “screening” inicial, la adición de extracto de levaduras y un ultrafiltrado del mismo extracto produjo efectos opuestos. Mientras el ultrafiltrado mostró la mayor actividad promotora de la proliferación de células saUFL-AG-286 entre todos los productos ensayados, el extracto de levaduras, adicionado a la misma concentración, ejerció un fuerte efecto inhibitorio. El extracto es el producto de la autólisis de levaduras, proceso que puede ser inducido por distintos procedimientos (Ikonomou y col., 2003), mientras que el ultrafiltrado es el producto obtenido luego de la separación de los componentes de mayor peso molecular del primero, cuando son retenidos por una membrana con un corte de 10 kDa (Eriksson y Häggström, 2005). Tanto el extracto como su ultrafiltrado fueron repetidamente utilizados como suplementos con efectos estimulantes de la proliferación celular, tanto

en cultivos de células de mamíferos como de insectos, y sus efectos han sido invariablemente referidos como positivos (Wu y Lee, 1998; Ikonomou y col., 2001). Por lo tanto, resultó sorprendente el fuerte efecto negativo del extracto, ya que la concentración evaluada está en el mismo orden que la utilizada anteriormente en cultivos de otras células de lepidópteros. Posteriormente, como se discutirá más adelante, se determinó que también el extracto de levaduras era capaz de estimular fuertemente la proliferación de las células saUFL-AG-286, pero luego de un período de adaptación celular.

Existen muy pocas referencias acerca del estudio sistematizado de los efectos del agregado de distintas mezclas de hidrolizados y extractos en cultivos de células de insectos (Ikonomou y col., 2003; Mendonça y col., 2007). En este trabajo se han evaluado, mediante la utilización de ensayos de diseño factorial, los efectos de la adición conjunta de los hidrolizados y extractos que resultaron activos en el ensayo inicial de “screening”. Por un lado, estos ensayos permitieron confirmar que el hidrolizado enzimático de caseína, el caldo triptosa fosfato y el ultrafiltrado de extracto de levaduras pueden ejercer un efecto positivo sobre la proliferación celular. Mayormente, las interacciones entre los componentes de la mezcla fueron aditivas, aunque también se pudo apreciar la existencia de una interacción sinérgica entre el hidrolizado enzimático de caseína y el ultrafiltrado de extracto de levaduras. Por otro lado, se observó que el efecto positivo estuvo condicionado por la concentración total de aditivos, ya que, superado un determinado límite, el efecto de la suplementación se tornó fuertemente negativo. Este efecto negativo parece ser inespecífico, ya que se verificó en forma independiente de la proporción de los distintos componentes de la mezcla de hidrolizados y extractos. Cabe destacar, además, que el efecto de la mezcla de hidrolizados y extractos también depende de la composición global del medio de cultivo. En este trabajo se verificó que el medio UNL-5 muestra una mayor tolerancia a la suplementación con altas concentraciones de hidrolizados que la mezcla TC-100 – IPL-41 (1:1), probablemente debido a la menor concentración total de aminoácidos del primero, ya que el mismo efecto negativo pudo ser reproducido por el agregado de altas concentraciones de aminoácidos (resultados no mostrados). El efecto negativo de las elevadas concentraciones de hidrolizados o aminoácidos no parece estar asociado a un incremento de la osmolaridad, ya que las células saUFL-AG-286 pueden soportar niveles de osmolaridad más elevados sin menoscabo de su funcionalidad.

La producción de poliedros de AgMNPV en cultivos infectados de células saUFL-AG-286 también fue sensible a la suplementación con mezclas de hidrolizados y extractos. El hidrolizado enzimático de caseína y el ultrafiltrado de extracto de levaduras demostraron ejercer un efecto positivo individual, y además se verificó la existencia de sinergia entre ambos. Por otro lado, la adición de caldo triptosa fosfato no ejerció ningún efecto individual, e interaccionó negativamente con el agregado de los otros dos componentes de la mezcla, aunque estos efectos negativos no presentaron significación estadística, al menos en las condiciones en que se desarrollaron estos experimentos. En la definición de la composición de la mezcla de hidrolizados se planteó entonces un conflicto entre los efectos opuestos del caldo triptosa fosfato sobre la proliferación celular y la producción viral. Si bien es posible utilizar medios de composición diferente para las etapas de proliferación celular e infección viral, esto implicaría realizar un reemplazo del medio de cultivo, una operación dificultosa cuando se debe ampliar la escala de producción. Considerando la importancia del caldo triptosa fosfato en la estimulación de la proliferación celular, se decidió incluirlo en el suplemento de hidrolizados, manteniendo su concentración en 1 mg.ml^{-1} .

En los experimentos de optimización se determinó que, impuesta una concentración de 1 mg.ml^{-1} de caldo triptosa fosfato, las concentraciones de hidrolizado enzimático de caseína y de ultrafiltrado de extracto de levaduras que permitían alcanzar la máxima densidad celular eran, respectivamente, 3 mg.ml^{-1} y 1 mg.ml^{-1} . Sin embargo, luego se determinó que, superado un período de adaptación, y en presencia de los dos hidrolizados (caseína y triptosa fosfato), el agregado de hasta 4 mg.ml^{-1} de ultrafiltrado de extracto de levadura provocaba un fuerte efecto estimulante de la proliferación celular. Además, el ultrafiltrado pudo ser reemplazado por una solución del extracto completo –de menor costo– cuya adición al medio UNL produjo efectos positivos, tanto sobre la proliferación celular como sobre la producción viral. El estudio cuantitativo de los efectos de la adición de extracto de levaduras sobre la proliferación en cultivos de células saUFL-AG-286 demostró un fuerte efecto estimulante de la velocidad específica de proliferación celular, que es independiente de su concentración, por lo menos en el rango de concentraciones de $0,5$ a 4 mg.ml^{-1} . Por otro lado, también mostró un efecto estequiométrico, ya que su agregado provocó un incremento de la máxima densidad celular. De esta manera, a pesar de las diferencias en su origen y composición, y seguramente también en los mecanismos de acción responsables, el extracto de

levaduras y el suero fetal bovino parecen ejercer un efecto similar sobre la proliferación de cultivos de células de lepidópteros (Ikonomou y col., 2001; Shen y col., 2007). Si a esto se suma su capacidad de estimular la producción de poliedros de AgMNPV, el extracto de levaduras aparece como un componente relevante de un sustituto económico y seguro del suero fetal para el cultivo de células saUFL-AG-286 destinadas a la producción de AgMNPV, tal como ha sido utilizado también para el cultivo libre de suero de otras líneas de células de lepidópteros y la producción de baculovirus y proteínas recombinantes (Batista y col., 2005; Donaldson y Shuler, 1998; Hink, 1991; Kim y col., 2000; Maiorella y col., 1998; Mendonça y col., 2007; Schlaeger y col., 1993; Vaughn y Fan 1997; Wu y Lee, 1998). Las razones por las cuales el extracto de levaduras, o su ultrafiltrado, son capaces de estimular la proliferación celular y la replicación viral (o la producción de proteína recombinante), no son bien conocidas, y tampoco se han identificado los componentes responsables de esos efectos, aunque en los últimos años se ha avanzado en la separación de fracciones activas del extracto (Mendonça y col., 2007; Shen y col., 2007), y se ha aislado un factor, con un peso molecular aproximado de 35 kDa, esencial para la proliferación de células High Five en un medio libre de suero (Eriksson y Häggström, 2005). La concentración de extracto de levaduras finalmente seleccionada para el medio UNL-8, de 3 mg.ml⁻¹, que permite alcanzar la máxima velocidad específica de proliferación y los rendimientos virales más elevados, es un 33% menor que la presente en los medios formulados por Maiorella y col. (1998) y por Doverskog y col. (1997), y la mitad de la que contiene el medio ISYL (Donaldson y Shuler, 1998).

Como se señaló ya en la Introducción de esta tesis, una de las funciones principales del suero como componente de medios de cultivo para células animales, es el aporte de lípidos y esteroides. Dada la naturaleza hidrofóbica de estos componentes, su provisión en medios libres de suero ha significado un problema tecnológico difícil de resolver. Sin embargo, desde los trabajos de Inlow y col. (1989) y Maiorella y col. (1998), las microemulsiones de ácidos grasos (frecuentemente ésteres metílicos de aceite de hígado de bacalao), Tween 80, acetato de α -tocoferol y colesterol, en una solución de Pluronic F68, han sido utilizadas como fuente de lípidos y esteroides en la formulación de medios de cultivo libres de suero para células de insectos. Se han utilizado otros suplementos con este propósito (Vaughn y Fan, 1989), pero ninguno ha resultado tan práctico y ha dado tan buenos resultados como las microemulsiones. En

este trabajo se ha empleado una microemulsión de origen comercial, químicamente definida, adicionada inicialmente en la concentración de 1% sugerida por el fabricante (Invitrogen-GICO, cat. 11905-031), la misma concentración que ha sido utilizada también en la formulación de otros medios de cultivo libres de suero para células de *Spodoptera frugiperda* (Inlow y col., 1989; Maiorella y col., 1988; Schlaeger, 1996). Los resultados obtenidos muestran que es posible mantener en forma permanente la línea celular UFL-AG-286 en un medio de cultivo libre de suero y suplementado con 1% de una microemulsión de lípidos y esteroides, de la misma manera que otras líneas de células de lepidópteros. Sin embargo, los experimentos de “screening” revelaron que esa concentración era limitante de la densidad celular máxima para cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-8. Además, los experimentos de infección con AgMNPV en cultivos en suspensión en el mismo medio, mostraron que la concentración de 1% de emulsión lipídica era también limitante para la producción viral, resultando la producción de virus brotado especialmente sensible a la deficiencia de la microemulsión. Por tal razón, se decidió utilizar el rendimiento del fenotipo de virus brotado como respuesta indicadora para establecer el nivel óptimo de la concentración de microemulsión en el medio UNL-8, determinándose que una concentración de 2%, el doble de la sugerida por el fabricante, era la que permitía obtener los máximos títulos de virus brotado. Como se discutirá en el último apartado de esta Discusión, el agregado adicional de emulsión lipídica al medio UNL-8, en otras condiciones de infección, puede asociarse también una mayor producción de poliedros de mayor actividad biológica. Parece probable que las células saUFL-AG-286 presenten requerimientos más elevados para alguno/s de los componentes de la microemulsión, en comparación con los de la línea celular Sf-9, tal como Donaldson y Shuler (1998) lo demostraron también para la línea celular Tn5 durante el desarrollo del medio de cultivo libre de suero ISYL. Sin embargo, ni de este último trabajo, ni de los experimentos de esta tesis, es posible extraer conclusiones acerca de la identidad del/los componente/s de la microemulsión sobre el cual ambas líneas podrían presentar mayores requerimientos que las células de *Spodoptera frugiperda*. Para tal fin será necesario realizar experimentos utilizando microemulsiones suplementadas con componentes individuales.

El medio de cultivo UNL-8, formulado a partir del medio básico UNL adicionado de una mezcla de dos hidrolizados de origen animal (hidrolizado enzimático

de caseína y caldo triptosa fosfato), extracto de levaduras y una microemulsión comercial de lípidos y esteroides, cuyas concentraciones fueron optimizadas en este trabajo de tesis, permite cultivar en forma permanente la línea celular saUFL-AG-286, tanto en cultivos adherentes como en suspensión agitada. Los parámetros de la curva de crecimiento de los cultivos en suspensión no difieren de los obtenidos en cultivos de la misma línea en el medio de cultivo estándar TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino. En cuanto a la producción viral, los cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-8 producen rendimientos más elevados de poliedros virales que en el medio TC-100 suplementado con suero, aunque, por lo contrario, los rendimientos de virus brotado obtenidos en el medio UNL-8 son consistentemente más bajos que en el medio estándar suplementado con suero. Los poliedros virales producidos en los cultivos de saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 son biológicamente activos, aunque esta actividad es menor a la de los poliedros producidos en larvas infectadas.

f) Sobre la multiplicación de AgMNPV en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286

La obtención de la línea saUFL-AG-286, adaptada al cultivo en suspensión agitada, implicó el riesgo de seleccionar una sub-población celular con una aptitud diferente para sostener la replicación viral, en relación a la población original. Sin embargo, la infección de los cultivos de saUFL-AG-286 con AgMNPV siguió un patrón de evolución similar al descrito para los cultivos infectados en monocapa de la línea celular parental. (Castro y col., 1997; Sieburth y Maruniak, 1998b). Por lo tanto, la sub-población seleccionada parece exhibir una susceptibilidad al baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* similar a la de la línea de origen. Por otro lado, los rendimientos obtenidos para ambas progenies virales, en las distintas condiciones de cultivo e infección ensayadas en esta tesis, demuestran que las células saUFL-AG-286 han conservado su permisividad para la replicación de AgMNPV.

Los rendimientos específicos de poliedros AgMNPV en los cultivos de saUFL-AG-286 resultaron consistentemente más elevados que los descritos previamente para cultivos de otras líneas celulares infectados con el mismo virus. Mientras en este trabajo se alcanzaron rendimientos específicos de 64 poliedros por célula en cultivos en el medio estándar suplementado con suero, y de hasta 180 poliedros por célula en el medio UNL-8, libre de suero, en cultivos de células de *Spodoptera frugiperda*, en distintos

medios, se obtuvieron entre 2 y 52 poliedros por célula (Visnovsky y Claus, 1994; Batista y col., 2005; Rodas y col., 2005; Zhang y col., 2005), y en otra línea celular establecida a partir de tejidos de *Anticarsia gemmatalis*, BCIRL-AG-M1, sólo se obtuvieron 14 poliedros por célula (Grasela y McIntosh, 1998). La comparación de los rendimientos específicos revela que saUFL-AG-286 parece presentar un potencial superior al de otras líneas celulares para su utilización como sustrato celular para la producción *in vitro* de poliedros de AgMNPV, coincidentemente con las conclusiones obtenidas por Castro y col. (2006), quienes compararon la infectividad de AgMNPV para diferentes líneas celulares, incluyendo UFL-AG-286. Por otro lado, la posibilidad de alcanzar rendimientos volumétricos de poliedros superiores a $2 \times 10^{11} \text{ l}^{-1}$, por encima del valor de $1,7 \times 10^{11} \text{ l}^{-1}$ definido por Rhodes (1996) como límite para que un proceso de producción de poliedros de baculovirus en cultivos celulares resulte económicamente factible, permitiría proyectar el empleo de esta línea celular como soporte para la producción de este bioinsecticida viral a escala industrial.

No existen muchas referencias publicadas acerca de rendimientos en la producción de poliedros de otros baculovirus, con potencial uso bioinsecticida, en cultivos celulares. Chakraborty y col. (1999) produjeron poliedros del virus de la poliedrosis nuclear simple de *Helicoverpa armigera* en cultivos libres de suero de la línea celular BCIR-HZ-AM1, obteniendo rendimientos específicos de 27 poliedros por célula en un medio suplementado con suero, y 112 poliedros por célula en un medio libre de suero. Para el mismo virus, en la misma línea celular cultivada en el medio libre de suero comercial Sf900II, se alcanzaron rendimientos específicos máximos entre 161 (Lua y Reid, 2000) y 222 poliedros por célula (Lua y col., 2002). Por otro lado, también trabajando con diferentes medios libres de suero, McKenna y col. (1997) alcanzaron rendimientos específicos de hasta 185 poliedros por célula del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* en cultivos infectados de la línea celular Tn-5. Por lo tanto, el desempeño de los cultivos de saUFL-AG-286 en la producción de poliedros de AgMNPV es similar al de otras líneas celulares utilizadas en el desarrollo de procesos de producción *in vitro* de poliedros de otros baculovirus bioinsecticidas.

La comparación de los rendimientos específicos de poliedros de AgMNPV en cultivos de saUFL-AG-286 infectados en el medio estándar suplementado con suero, y en el medio UNL-8 libre del suplemento, permite apreciar el superior potencial de este

último para sostener la producción de poliedros. Este resultado coincide con lo observado por Chakraborty y col. (1999), quienes alcanzaron rendimientos específicos de poliedros de HaSNPV significativamente más elevados en cultivos celulares en un medio comercial libre de suero que en un medio control suplementado. Sin embargo, por otro lado, Vaughn y col. (1991) y Claus y col. (1993), habían observado una reducción del rendimiento de poliedros en cultivos celulares cuando el suero fetal bovino era reemplazado por emulsiones lipídicas en la suplementación de un mismo medio de cultivo básico. Esta discordancia podría explicarse por la diferencia conceptual entre desarrollar un medio de cultivo completo, con una composición global optimizada para un fin determinado, y el mero reemplazo del suero fetal por otro suplemento, sin tomar en cuenta la necesidad de establecer nuevos balances nutricionales, tanto en la composición del suplemento como en la del medio básico. En el caso específico del desarrollo del medio UNL-8, el rendimiento de poliedros fue tomado como uno de los criterios de respuesta para la optimización de su composición, y por lo tanto su elevada aptitud para sostener la producción de los cuerpos de oclusión podría considerarse como una evidencia satisfactoria de éxito en la selección de la estrategia de desarrollo utilizada.

Sin embargo, el medio UNL-8 presenta un comportamiento menos satisfactorio en relación a la producción de la otra progenie viral. Los rendimientos de virus brotado en los cultivos de saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 resultaron consistentemente más bajos que en el medio TC-100 suplementado con suero fetal bovino, aún en aquellos experimentos en que se aumentó la concentración del suplemento lipídico, que, como se discutió anteriormente, aparece como un limitante principal de la síntesis de virus brotado en algunas condiciones de cultivo e infección. La producción, durante la replicación de los baculovirus, de dos fenotipos diferentes que comparten la misma nucleocápside, implica que el potencial total de síntesis de esta última debe distribuirse para abastecer la morfogénesis de ambas progenies virales. Por lo tanto, la capacidad de producción de uno de los dos fenotipos no sólo va a estar determinada por el potencial replicativo total del virus, sino también por la proporción en que se reparten las nucleocápsides entre las dos progenies. Llevando este análisis al caso específico de la replicación de AgMNPV en células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8, respecto al medio TC-100, es posible suponer que los elevados rendimientos de poliedros podrían estar asociados a una mayor retención de nucleocápsides en el núcleo celular, para su

posterior ensamblaje en los cuerpos de oclusión, independientemente del efecto de la composición del medio sobre el potencial replicativo total. Inversamente, en los cultivos en el medio TC-100 suplementado con suero, las nucleocápsides podrían orientarse en mayor proporción hacia su egreso desde el núcleo, tránsito citoplasmático y brotación, orientación que resentiría la capacidad celular para el ensamblaje de poliedros. Un efecto similar fue observado en los experimentos de infección en el medio UNL-8 en cultivos en suspensión de saUFL-AG-286: en los cultivos en los cuales la infección de las células se llevó a cabo temprano y sincrónicamente, se verificó una tendencia a orientar la replicación hacia la producción de virus brotado, mientras que, cuando las células fueron infectadas más tarde, como resultado de la infección a mayor densidad celular y menor multiplicidad de infección, el balance se orientó hacia la producción de virus ocluido. La compensación, o competencia, entre la síntesis de ambas progenies virales durante la replicación *in vitro* de los baculovirus ha sido previamente sugerida (Claus y col., 1993; King y col., 1991). Por otro lado, existe un ejemplo natural de la capacidad de las células de lepidópteros, infectadas con baculovirus, para orientar la replicación viral preferencialmente hacia la síntesis de una u otra progenie: es un hecho demostrado que, durante la infección natural con baculovirus, las células del epitelio intestinal de las larvas infectadas, donde se produce la replicación primaria y se amplifica el inóculo viral que invadirá el resto del organismo, producen casi exclusivamente virus brotado, mientras que en el resto de los tejidos del insecto infectado, al incremento de la capacidad de ensamblaje de poliedros se une la disminución de la capacidad de síntesis de virus brotado. No se conoce cuáles son los mecanismos moleculares que están involucrados en la regulación de la distribución del potencial replicativo entre ambos fenotipos virales, pero recientemente se describió que la expresión del gen *p13* del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Leucania separata* (LsMNPV) (Wang y col., 1995) durante la replicación del virus AcMNPV, que naturalmente carece de él, como todos los virus de poliedrosis nuclear del grupo I, producía como efecto una fuerte represión de la síntesis de poliedros, acompañada de un incremento del rendimiento de virus brotado, tomando como referencia la replicación del virus “wild-type” (Du y col., 2007). Si bien no ha sido descrito un gen análogo a *p13* en el genoma de AgMNPV, es probable que otros productos de la expresión del genoma puedan cumplir el rol de regular la distribución del potencial replicativo del virus entre ambas progenies, y que tal regulación pueda ser afectada por factores

celulares, por ejemplo la etapa del ciclo celular, y ambientales, como la concentración de nutrientes y catabolitos.

Los cultivos celulares “batch” son sistemas dinámicos, en los cuales tanto el sustrato celular como el ambiente (medio de cultivo), van modificándose con el tiempo. Estos cambios pueden, a su vez, determinar alteraciones de la susceptibilidad y/o la permisividad celulares cuando un virus es introducido al sistema, de tal manera que el tiempo de infección constituye, *a priori*, un parámetro que puede ser manipulado para obtener un determinado efecto sobre la multiplicación viral. Por otro lado, la proporción de virus por célula introducido inicialmente en un cultivo celular “batch” (multiplicidad de infección) determina que proporción de la población celular resulta inicialmente infectada, y por lo tanto la magnitud de las dos sub-poblaciones que coexistirán a partir de la introducción del virus al sistema: la de células infectadas y la de células no infectadas. Éstas últimas, a su vez, podrán infectarse en un tiempo posterior, lo cual implica que la multiplicidad de infección puede manipularse para determinar la proporción de células de la población de un cultivo “batch” que resultan infectadas a distintos tiempos de infección. Si bien se ha demostrado previamente que la producción de poliedros de baculovirus o proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos lepidópteros es sensible a las variaciones del tiempo y la multiplicidad de infección (Licari y Bailey, 1992; Visnovsky y Claus, 1994; Wong y col., 1996), no resulta posible predecir, en función de estos antecedentes, cuál es la combinación óptima de ambos parámetros para un determinado sistema (célula – medio de cultivo – virus) diferente. En este trabajo de tesis se ha empleado un diseño de tipo central compuesto para estudiar la influencia del tiempo y la multiplicidad de infección sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-8, trabajando dentro de rangos de valores de los parámetros que resultan compatibles con las posibilidades de desarrollo de un proceso industrial utilizando la línea celular saUFL-AG-286. Los resultados obtenidos muestran que el rendimiento volumétrico de poliedros virales resulta más sensible a los cambios en el tiempo de infección que a las variaciones de multiplicidad de infección, por lo menos en el rango $0,09 - 1,51 \text{ DICC}_{50\%} \cdot \text{cél.}^{-1}$ abarcado en este estudio. Por otro lado, se pudo determinar la existencia de una región de la superficie de respuesta que permite maximizar ese rendimiento, alcanzando valores superiores a 2×10^{11} poliedros.l⁻¹. Estos máximos se alcanzan infectando los cultivos a densidades celulares cercanas a $8 \times$

10^5 células. ml^{-1} y una multiplicidad de infección de 0,8 $\text{DICC}_{50\%}\cdot\text{célula}^{-1}$, aunque con una amplia tolerancia en relación a la variación de este último parámetro. Como se mencionó anteriormente, esta combinación óptima de parámetros es propia de este sistema particular, y es esperable que la modificación de alguno de los componentes del mismo, por ejemplo la composición de nutrientes del medio de cultivo, provoque un cambio de los parámetros óptimos. La densidad celular óptima para el sistema AgMNPV – saUFL-AG-286 – UNL-8 es ligeramente más alta que la utilizada para la producción de poliedros de HaSNPV, otro baculovirus bioinsecticida, mientras que la multiplicidad de infección es menor (Chakraborty y col., 1995; Chakraborty y col., 1999; Lua y col., 2002). La posibilidad de trabajar a multiplicidades de infección relativamente bajas es importante para el desarrollo de procesos económicamente factibles para la producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares, ya que implica una reducción de la demanda de “stock” viral

Un proceso de escala industrial para la producción de un baculovirus bioinsecticida en cultivos celulares necesariamente requerirá de una sucesión de etapas de infección de cultivos, de escala creciente, para producir la cantidad de virus brotado suficiente para infectar las células contenidas en el reactor donde finalmente se producirán los poliedros virales (Rhodes, 1996). Por lo tanto, tan importante como definir las condiciones óptimas para la producción de poliedros, es definir las también para la amplificación de virus brotado, aunque este es un aspecto al que se le ha prestado poca atención hasta el momento. Los experimentos de infección con distintas combinaciones de tiempo y multiplicidad de infección no sólo permitieron ubicar la región óptima de combinación de ambos parámetros para maximizar el rendimiento de poliedros, sino que también permitieron definir condiciones para la producción del “stock” de virus en el medio UNL-8: sólo las células saUFL-AG-286 infectadas muy temprano, a una multiplicidad de infección relativamente baja, en cultivos “batch” de muy baja densidad celular, produjeron rendimientos específicos de virus brotado relativamente elevados. Esta combinación de condiciones es apropiada para la producción de “stock”, ya que la manipulación de cultivos de muy baja densidad celular es más simple y económica que la de cultivos de alta densidad, por un lado, y la productividad más alta, por la reducción del tiempo total insumido hasta la cosecha, por otro. Además, la infección a baja multiplicidad de infección tiende a reducir el riesgo de generación de partículas defectivas interferentes, una cuestión que debe considerarse

cuidadosamente en el diseño de un proceso de producción de baculovirus en cultivos celulares, ya que afecta el rendimiento cuantitativo y la calidad del producto (Krell, 1996; Kompier y col., 1988).

Como se comentó previamente, no es infrecuente que la replicación de baculovirus en cultivos celulares de lugar a la generación y selección de distintas variantes genómicas de menor virulencia y, en consecuencia, reducida potencia insecticida (Lua y col., 2002; Pedrini y col., 2006). Por lo tanto, la preservación de la calidad del virus, y el control de la misma, son factores que deben ser cuidadosamente considerados en un proceso de producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares. La actividad biológica de los poliedros virales sobre el blanco de la acción insecticida constituye una referencia insoslayable en relación al control de calidad del virus producido y, en el caso del desarrollo de un nuevo proceso es, en definitiva, el parámetro que determinará su factibilidad. En este trabajo se ha evaluado la actividad de los poliedros de AgMNPV producidos en células saUFL-AG-286 en medio UNL-8, bajo diferentes condiciones de cultivo e infección. La selección de condiciones se realizó considerando los parámetros óptimos para maximizar los rendimientos volumétricos de poliedros, así como también el efecto, sobre la producción de viriones brotados, de la suplementación del medio de cultivo con cantidades adicionales de la emulsión lipídica. La hipótesis que se deseaba evaluar era que la suplementación lipídica adicional no sólo estimula la producción del fenotipo de virus brotado, sino también la de virus ocluido, produciendo por lo tanto poliedros con mayor contenido de viriones y mayor actividad biológica. Al mismo tiempo se evaluó la actividad biológica de poliedros producidos en cultivos infectados temprana y sincrónicamente, con y sin suplementación lipídica adicional, para verificar si a los cambios en los parámetros de infección se asociaba una modificación de la actividad biológica. Los resultados obtenidos muestran que los poliedros obtenidos en todas las condiciones fueron biológicamente activos, con una variación de la DL_{50} entre valores extremos de 230 y 485 poliedros.larva⁻¹. Teniendo en cuenta que para los poliedros de la misma cepa de AgMNPV, producidos *in vivo* en larvas de *Anticarsia gemmatalis*, la DL_{50} es de 168 poliedros.larva⁻¹ (Alicia Sciocco, comunicación personal), la actividad insecticida de los poliedros producidos *in vitro* resultó entre 1,3 y 2,9 veces menor que la de los poliedros producidos *in vivo*. Estas diferencias, si bien no parecen ser importantes, teniendo en cuenta que los intervalos de confianza para las determinaciones de actividad biológica

suelen ser muy amplios, no pueden dejar de considerarse como un problema potencial a superar para el desarrollo de un proceso industrial, y sus causas deben ser identificadas.

La mayoría de los trabajos publicados hasta el presente muestran que los cuerpos de oclusión de diferentes baculovirus producidos en cultivos de células de insectos son menos virulentos que los producidos en larvas de insectos susceptibles. Chakraborty y col. (1999) produjeron poliedros de HaSNPV en cultivos celulares que resultaron entre 2 y 5 veces menos activos, según fueron producidos en medio con suero o libre de él, que el control de virus propagado en larvas, adjudicando como una causa posible de la menor actividad a la extracción de los poliedros con una solución de SDS. Esta causa debe ser excluida como explicación de la menor actividad de los poliedros de AgMNPV producidos en este trabajo de tesis, ya que los mismos fueron extraídos de las células infectadas mediante sonicado. Por otro lado, McKenna y col. (1997) produjeron poliedros de AcMNPV en cultivos de células High Five[®] en cuatro medios de cultivo libres de suero diferentes, los cuales resultaron entre 1,6 y 2,4 veces menos activos que los poliedros del mismo virus producidos en larvas; en este caso, los autores postularon que la diferencia de virulencia podía asociarse a la presencia adicional de cuerpos de oclusión inmaduros en las muestras de poliedros obtenidas de larvas. Por otro lado, Bonning y col. no advirtieron diferencias de DL_{50} entre poliedros de AcMNPV producidos en cultivos de células High Five[®] o en larvas de *Heliothis virescens*, aunque observaron un incremento del tiempo letal 50% para la actividad de los poliedros producidos en cultivos celulares, especulando que esta diferencia podía asociarse a una menor estabilidad de los cuerpos de oclusión producidos en cultivos. Una causa frecuente de reducción de la actividad biológica de los cuerpos de oclusión de baculovirus producidos *in vitro* es la selección de variantes virales defectivas, como las obtenidas por Rodas y col. (2005) por pasajes repetidos de AgMNPV-2D en cultivos de células Sf-9, o por Pedrini y col. (2006) por pasaje *in vitro* de HaSNPV y HzSNPV en cultivos de células BCIRL-HZ-AM1. Sin embargo, en estos últimos dos casos la generación de las variantes de menor virulencia estuvo acompañada de una reducción en los rendimientos de poliedros y virus brotado, características no advertidas en los experimentos llevados a cabo en este trabajo. Para evaluar la posibilidad del enriquecimiento de los “stocks” en variantes defectivas, se deberá implementar un control rutinario de la integridad genómica del virus utilizado como semilla, y su seguimiento a través de las sucesivas etapas de amplificación que podrían resultar

necesarias hasta alcanzar el volumen de inóculo del reactor de producción, en un eventual proceso industrial.

En relación a la variación de la actividad biológica de los poliedros producidos en las diferentes condiciones de cultivo e infección ensayadas, y aún teniendo en cuenta que la falta de ensayos repetidos no permite realizar un análisis estadístico de los resultados, como así también que la amplitud de los intervalos de confianza para la determinaciones de actividad biológica es muy grande, no puede dejar de soslayarse en el análisis que las variaciones observadas estuvieron acompañadas por cambios en las capacidades de producción de ambas progenies virales. En primer término, cabe destacar que en los cultivos infectados temprano y sincrónicamente, el agregado de lípidos provocó un incremento del rendimiento de poliedros, con una mayor virulencia, que determinaron un rendimiento de actividad insecticida por unidad de volumen de cultivo casi tres veces superior al control sin suplementar con cantidades adicionales de emulsión lipídica. Este resultado parecería confirmar la hipótesis de que el agregado de cantidades suplementarias de lípidos puede estimular globalmente la replicación viral, incrementado la síntesis del fenotipo ocluido, verificada por el aumento de la producción de poliedros, y aumentando la actividad biológica por poliedro, verificada por la reducción de la DL_{50} , aunque sin modificar el nivel de síntesis de virus brotado, al menos en estas condiciones de infección. Sin embargo, la duplicación de la concentración de emulsión lipídica en un cultivo infectado en las condiciones óptimas establecidas para un proceso de escala industrial (baja multiplicidad de infección, infección más tardía), tuvo un efecto opuesto: al incremento en la síntesis de virus brotado que ya había sido observada en los experimentos previos, se le contrapuso una reducción de la síntesis del fenotipo ocluido, verificada por la reducción de la producción de poliedros, con una menor virulencia, verificada por el aumento de la DL_{50} , determinando en definitiva una reducción de la actividad insecticida por volumen de cultivo de casi cuatro veces respecto al control. Por lo tanto, el agregado de cantidades adicionales de emulsión lipídica parece ejercer distintos efectos, variando de acuerdo a las condiciones de infección. Por un lado, en cultivos infectados sincrónicamente temprano, que mantienen una baja densidad celular en todo su transcurso, la adición suplementaria de lípidos parecería provocar una estimulación de la replicación viral, mientras que en los cultivos infectados más tardíamente, y en forma no sincrónica, que terminan alcanzando densidades celulares máximas entre tres y

cuatro veces superiores a los primeros, la adición de una cantidad suplementaria de emulsión lipídica parece provocar más un cambio en la orientación del ciclo de replicación hacia la síntesis de virus brotado que un incremento neto de la multiplicación viral. Es posible que, en estos cultivos que alcanzan mayores densidades celulares, la incapacidad para responder a la suplementación lipídica con un incremento neto de la replicación viral esté poniendo de manifiesto la existencia de una limitación adicional. En este sentido, cabe recordar que los resultados presentados en las figuras 4.4.9 y 4.5.16 evidenciaban la posibilidad de limitaciones sobre la producción de poliedros y de virus brotado, respectivamente, debidas a otros nutrientes diferentes a la emulsión lipídica, aunque de manera menos notable que ésta. Estas posibles limitaciones deberán evaluarse mediante experimentos adicionales.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la línea celular saUFL-AG-286 es tan susceptible y permisiva a la infección por el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* como la línea UFL-AG-286, a partir de la cual aquella fue seleccionada. Los rendimientos específicos de poliedros de AgMNPV alcanzados en los cultivos infectados de saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-8 resultaron más elevados que los obtenidos previamente para el mismo virus en cultivos de cualquier otra línea celular, y son, al menos, tan elevados como los alcanzados para otros baculovirus insecticidas producidos en procesos *in vitro* que hacen uso de otras líneas celulares. Sin embargo, el mismo medio no resultó tan apto para la producción de virus brotado. Por otro lado, los rendimientos de ambas progenies del virus AgMNPV en los cultivos de saUFL-AG-286 en UNL-8 resultaron sensibles a los cambios en los parámetros de infección, principalmente el tiempo, y se pudo identificar una combinación de parámetros que permite maximizar el rendimiento volumétrico de poliedros, como así también que la producción de stocks de virus brotado requiere necesariamente de la infección de cultivos de muy baja densidad celular. Por último, tanto los rendimientos de ambas progenies virales como la actividad biológica de los poliedros resultaron sensibles a los niveles de suplementación con emulsión lipídica, aunque los efectos de ésta variaron con las condiciones de cultivo e infección.

VI. Conclusiones

a- Se aisló una sub-población de la línea celular UFL-AG-286, a la cual se denominó saUFL-AG-286, capaz de proliferar en forma de células aisladas en cultivos en suspensión con agitación.

b- La velocidad máxima de multiplicación celular específica, de la línea celular saUFL-AG-286 es similar a la determinada para cultivos en suspensión de otras líneas de células de lepidópteros ($0,024 \text{ h}^{-1}$ en el medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino, y $0,026 \text{ h}^{-1}$ en el medio UNL-8 libre de suero).

c- El comportamiento de los cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 es significativamente afectado por la magnitud del inóculo celular. En cultivos iniciados a baja densidad celular la fase lag es más prolongada, la velocidad específica de proliferación es más reducida y oscilante, y es menos eficiente la utilización de los principales nutrientes. La susceptibilidad a la magnitud del inóculo celular podría ser una evidencia de la actividad de factores autocrinos.

d- La glucosa, único hidrato de carbono presente en los medios de cultivo evaluados en esta tesis, resulta esencial para sostener la supervivencia y la proliferación de las células saUFL-AG-286. La velocidad específica de consumo demostró ser sensible a la concentración de glucosa, y a las características del sistema de agitación, pero no fue afectada por los cambios en la concentración inicial de glutamina.

e- La falta de acumulación de lactato en los sobrenadantes de cultivo puede considerarse un indicio de que las células saUFL-AG-286 metabolizarían la glucosa con similar eficiencia que las líneas celulares Sf-21 y Sf-9.

f- Si bien la glutamina no es esencial para la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y la replicación de AgMNPV, su carencia produce alteraciones en la funcionalidad celular y limita la replicación viral. Por otro lado, las concentraciones de este aminoácido superiores a 9 mM también afectan negativamente la proliferación celular y la replicación viral, por lo cual esa concentración fue seleccionada para la formulación de un nuevo medio de cultivo.

g- La línea celular saUFL-AG-286 expone requerimientos de aminoácidos marcadamente inferiores en relación a las posibilidades nutricionales del medio TC-100. Además de glutamina, sólo asparagina, metionina y leucina fueron consumidos en proporciones significativas en relación a su concentración inicial en el medio de cultivo.

h- Las células saUFL-AG-286 presentan una gran plasticidad para adaptarse al contenido de aminoácidos del medio de cultivo, y pueden proliferar en un medio conteniendo una concentración total de aminoácidos más baja que la presente en los medios de cultivo estándar para células de insectos lepidópteros.

h- La falta de producción de alanina es una característica única entre las líneas celulares de lepidópteros descritas hasta el presente. La incapacidad de excretar alanina podría estar evidenciando que las células saUFL-AG-286 carecen de la vía más importante para la detoxificación del amonio presente en otras células de insectos lepidópteros.

i- Dependiendo del medio de cultivo utilizado, los cultivos de saUFL-AG-286 pueden acumular niveles de amonio superiores a 20 mM, una concentración que interfiere con la replicación viral.

j- La aplicación de distintos métodos estadísticos, empleados en el diseño y la optimización de procesos fermentativos, hizo posible la formulación de un nuevo medio de cultivo básico que, adecuadamente suplementado, permite la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 y la replicación de AgMNPV. Las principales diferencias en cuanto a la composición del medio de cultivo básico UNL, respecto a otros medios, radican en la menor concentración de aminoácidos en general, y en las concentraciones más elevadas de glucosa, glutamina y colina.

k- La necesidad de suplementación con altas concentraciones de colina del medio UNL libre de suero podría estar poniendo en evidencia una limitación en la disponibilidad de fosfolípidos y / o en su síntesis, debido a la ausencia de suero fetal y / o a la menor concentración de metionina y serina (precursores de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina).

l- Se identificaron dos hidrolizados de origen animal y un extracto microbiano con capacidad individual para promover significativamente la proliferación de cultivos de saUFL-AG-286. A su vez, la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos infectados de células saUFL-AG-286 también fue estimulada por la suplementación con hidrolizado de caseína y extracto de levaduras. Una mezcla óptima de los tres componentes puede ser utilizada como suplemento del medio de cultivo básico UNL.

m- El medio de cultivo UNL-8, formulado a partir del medio básico UNL, adicionado de una mezcla de hidrolizados de origen animal, extracto de levaduras y una microemulsión de comercial de lípidos y esteroides, permite cultivar en forma permanente la línea celular saUFL-AG-286, tanto en cultivos adherentes como en suspensión agitada.

n- El virus AgMNPV replica en los cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8, con rendimientos específicos de poliedros consistentemente más elevados que los descritos previamente para cultivos de otras líneas celulares infectados con el mismo virus, o de la misma línea celular en otros medios de cultivo.

o- Los cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en medio UNL-8 producen, generalmente, niveles de virus brotado más bajos que en un medio estándar suplementado con suero. Esta limitación puede ser superada mediante suplementación con una cantidad adicional de la emulsión de lípidos y esteroides.

p- Los poliedros de AgMNPV producidos en cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en el medio UNL-8 libre de suero, bajo diferentes condiciones de cultivo e infección, resultaron biológicamente activos sobre larvas de *Anticarsia gemmatilis* infectadas *per os*.

q- Las variaciones de los parámetros tiempo y multiplicidad de infección afectan los rendimientos de AgMNPV en los cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-8, aunque la producción de cada fenotipo responde de forma diferente a las variaciones de dichos parámetros. Se estableció la combinación de parámetros que permite maximizar la producción de poliedros.

r- La distribución del potencial de replicación total del virus parece distribuirse entre los dos fenotipos en respuesta a cambios en los parámetros de infección y las condiciones nutricionales del medio de cultivo durante la infección.

En definitiva, los resultados obtenidos han permitido caracterizar cinéticamente los cultivos de células saUFL-AG-286 en suspensión agitada, como así también sus principales requerimientos nutricionales y algunas de sus características metabólicas más relevantes. Esta información se ha utilizado para diseñar un nuevo medio de cultivo, libre de suero y de bajo costo, en el cual es posible cultivar en forma continua a las células saUFL-AG-286, y producir poliedros del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*. Estos resultados pueden constituir una contribución significativa al desarrollo de procesos de producción *in vitro* de bioinsecticidas basados en baculovirus.

VII. Bibliografia

Adams, J.; McClintock, J. (1991). Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1 Nuclear polyhedrosis viruses of insects. En: Adams, J. (eds). Atlas of Invertebrate Viruses. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 87 – 204.

Agathos, S. (1996). Insect cell bioreactors. Cytotechnology. 20: 173 – 189.

Aronson, A. (2002). Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cellular and Molecular Life Sciences. 59: 417 - 425.

Ayres, M.; Howard, S.; Kuzio, J.; Lopez-Ferber, M.; Possee, R. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology. 202 (2): 586 - 605.

Barnes, D.; Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. Cell. 22: 649 -655.

Batista, F.; Pereira, C.; Mendonça, R.; Moraes, A. (2005). Enhancement of Sf-9 cells and baculovirus production employing Grace's medium supplemented with milk whey ultrafiltrate. Cytotechnology. 49: 1 - 9.

Bédard, C.; Tom, R.; Kamen, A. (1993). Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. Biotechnology Progress. 9: 615 - 624.

Bédard C, Kamen AA, Tom R, Massie B. (1994) Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high density batch cultures. Cytotechnology. 15: 129 - 138.

Bédard, C.; Kamen, A. (1997). Metabolism of insect cells culture *in vitro*. En: Invertebrate cell culture. Maramorosch, K.; Mitsuhashi, J. (eds). USA. 35 - 41.

Belaich, M.; Rodríguez, V.; Bilen, M.; Pilloff, M.; Romanowski, V.; Sciocco-Cap, A.; Ghiringhelli, P. (2006). Sequencing and characterisation of p74 gene in two isolates of *Anticarsia gemmatalis* MNPV. *Virus Genes*. 32: 59 - 70.

Beniya, H.; Funk, C.; Rohrmann, G.; Weaver, R. (1996). Purification of a virus-induced RNA polymerase from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells that accurately initials late and very late transcription *in vitro*. *Virology*. 216: 12 – 19.

Benslimane, C.; Elias, C.; Hawari, J.; Kamen, A. (2005). Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radio labeling studies. *Biotechnology Progress*. 21: 78 - 86.

Benz, G. (1986). Introduction: historical perspectives. En: Granados, R.; Federici, B. (eds). *The biology of baculoviruses*, Vol I, CRC press, Boca Ratón, Florida, U.S.A. 1-36.

Blissard, G.; Rohrmann, G. (1989). Location, sequence, transcripcional mapping and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 170: 537 - 555.

Blissard, G.; Wenz, J. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*. 66: 6829 - 6835.

Blusztajn, J. (1998): Choline, a vital amine. *Science*. 281: 794 - 795.

Braunagel, S.; Burks, J.; Rosas-Acosta, G.; Harrison, R.; Summers, M. (1999). Mutations within the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus FP 25 K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and altar its intranuclear transport. *Journal of Virology*. 73 (10): 8559 - 8570.

Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M. (2001). Estructura y clasificación de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control*

biológico de plagas. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 16 – 46.

Calles, K.; Svensson, I.; Lindskog, E.; Häggström, L. (2006). Effects of conditioned medium factors and passage number of Sf-9 cell physiology and productivity. *Biotechnology Progress*. 22 (2): 394 - 400.

Carner, G.; Turnipseed, S. (1977). Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *Journal of Economic Entomology*. 70 (5): 608 - 610.

Carpes, M.; de Castro, M.; Soares, E.; Villela, A.; Pinedo, F.; Ribeiro, B.M. (2005). The inhibitor of apoptosis gene (iap-3) of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. *Archives of Virology*. 150: 1549 - 1562.

Castro, M.; Souza, M.; Araujo, S.; Bilimoria, S. (1997). Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69: 40 - 45.

Castro, M.; Ribeiro, Z.; Souza, M. (2006). Infectivity of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: morphology, viral production and protein synthesis. *Biological Control*. 36: 299 – 304.

Chakraborty, S.; Kanhaisingh, P.; Greenfield, P.; Reid, S.; Teakle, R. (1995). *In vitro* production of wild-type *Heliothis* baculoviruses for use as biopesticides. *Australian Biotechnology*. 5 (2): 82 - 86.

Chakraborty, S.; Monsour, C.; Teakle, R.; Reid, S. (1999). Yield, biological activity, and field performance of a wild-type *Helicoverpa* nucleopolyhedrovirus produced in *H. zea* cell cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 199 - 205.

Charlton, C.; Volkman, L. (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*. 197: 245 - 254.

Chen, K.; Lee, T.; Houg, J. (1992). Search method for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 14 (8): 659 - 664.

Cherry, A.; Williams, T. (2001). Control de insectos plagas mediante los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 389 -450.

Cheshenko, N.; Krougliak, N.; Eisensmith, R.; Krougliak, V. (2001). A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Therapy*. 8: 846 - 854.

Chung, I.; Shuler, M. (1993). Effect of *Trichoplusia ni* BTI-Tn 5B1-4 cell density on human secreted alkaline phosphatase production. *Biotechnology Program* 9: 675 - 678.

Claus, J.; Remondetto, G.; Guerrero, S.; Demonte, A.; Murguía, M.; Marcipar, A. (1994). *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 31: 1 - 15.

Claus, J.; Ghiringhelli, P.; Romanowski V. (1997). Environmental dependence of polyhedra yields in IPLB-Sf-21 cells infected with *Anticarsia gemmatalis* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. En: Maramorosch, K.; Mitsunashi, J. (eds.). *Invertebrate Cell Culture Novel Directions and Biotechnology Applications*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A. 165 – 171.

Claus, J.; Sciocco de Cap, A. (2001). Producción masiva de baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 257 - 312.

Clem, R. (1997). Regulation of programmed cell death by baculoviruses. En: The Baculoviruses. Miller, L. (ed.). New York. USA. 237-266.

Crook, N.; Clem, R.; Miller, L. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology*. 67: 2168 - 2174.

Cruz, P.; Moreira, J.; Carrondo M. (1997). Insect cell growth evaluation during serum free adaptation in stirred suspension cultures. *Biotechnology Techniques*. 11 (2): 117 - 120.

de Castro Oliveira, J.; Wolf, J.; Gracia-Maruniak, A.; Ribeiro, B.; Castro, M.; Souza, M.; Moscardi, F.; Maruniak, J.; Andrade Zanotto, P. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. 87: 3233 - 3250.

Dalmolin, C.; da Silva, F.; Mello, L.; Rigden D.; Castro, M. (2005). Nucleotide sequence and phylogenetic analices of DNA polymerase gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*. 110: 99 - 109.

Dee, K; Wood, H; Shuler, M. (1997). Inducing single-cell suspension of BTI-TN5B1-4 insect cells: II. The effect of sulfated polyanions on baculovirus infection. *Biotechnology and Bioengineering*. 54(3): 206 - 220.

de Gooijer, C.; Koken, R.; van Lier, F.; Kool, M.; Vlak, J.; Tramper, J. (1992). A structured dynamic model for the baculovirus infection process in insect-cell reactor configurations. *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 537 - 548.

Derksen, A.; Granados, R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*. 167: 242 - 250.

Deutschmann S.; Jäger, V. (1994). Optimization of the growth conditions of Sf21 cells for high density perfusion culture in stirred-tank reactors. *Enzyme and Microbial Technology*. 16: 506 - 512.

Donaldson, M.; Shuler, M. (1998). Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnology Progress*. 14: 573 - 579.

Donaldson, M.; Wood, A.; Kulakosky, M.; Shuler, M. (1999). Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*. 63(3): 255 - 262.

Doverskog, M.; Ljunggren, J.; Öhman, L.; Häggström, L. (1997). Physiology of cultured animal cells. *Journal of Biotechnology*. 59: 103 - 115.

Doverskog, M.; Jacobsson, U.; Chapman, B.; Kuchel, P.; Häggström, L. (2000). Determination of NADH – dependent glutamate synthase (GOGAT) in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells by a selective $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ NMR *in vitro* assay. *Journal of Biotechnology*. 79: 87 - 97.

Drews, M.; Paalme, T.; Vilu, R. (1995). The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf-9 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 40: 187 - 198.

Du E.; Yan F.; Jin W.; Lu N.; Xiao H.; Lu S.; Qi Y. (2007). P13 of *Leucania separata* multiple nuclear polyhedrosis virus affected the polyhedra and budded virions yields of AcMNPV. *Virus Research*. 124: 160 - 167.

Drews, M.; Doverskog, M.; Öhman, L.; Chapman, B.; Jacobsson, U.; Kuchel, P.; Häggström, L. (2000). Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ NMR. *Journal of Biotechnology*. 78: 23 - 37.

Elias, C.; Zeiser, A.; Bédard, C.; Kamen, A. (2000). Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of $5,2 \times 10^7$ cells per ml and production of β -galactosidase at high cell density by fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 68 (4): 382 - 388.

Engelhard, E.; Kam-Morgan, L.; Washburn, J.; Volkman, L. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 3224 - 3227.

Eriksson, U.; Häggström, L. (2005). Yeast extract from Express Five serum-free medium contains factors at about 35 kDa, essential for growth of *Trichoplusia ni* insect cells. *Biotechnology Letters*. 27: 1623 - 1627.

Esko, J.; Matsnoka, K. (1983). Biosynthesis of phosphatidylcholine from serum phospholipids in Chinese Hamster Ovary cells deprived of choline. *Journal of Biological Chemistry*. 258 (10): 3051 - 3057.

Faulkner, P.; Kuzio, J.; Williams, G.; Wilson, J. (1997). Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *Journal of General Virology*. 78: 3091 - 3100.

Federici, B. (1986). Ultrastructure of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. I. Granados, R; Federici, B. (eds.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA. 62 – 88.

Ferrance, J.; Goel, A.; Atai, M. (1993). Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flow within the primary pathways and medium development. *Biotechnology and Bioengineering* 42: 697 - 707.

Fertig, G.; Rahn, H.; Angermann, A.; Klöppinger, M.; Miltenburger, H. (1993). Biotechnological aspects of the production of human pro-kallikrein using the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus – baculovirus- expression system. *Cytotechnology*. 11(1): 67 - 75.

Franek, F.; Hohenwarter, O.; Katinger, H. (2000). Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells culture. *Biotechnology Progress*. 16: 688 - 692.

Fraser, M. (1986). Ultra structural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*. 95: 189 - 195.

Funk, C.; Braunagel, S.; Rohrmann, G. (1997). Baculovirus structure. En: *The baculoviruses*. Miller, L. (ed). Plenum Press, New York, USA. 7 - 27.

Gardiner, G; Stockdale, H. (1975). Two tissue culture media for production of Lepidopteran polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 25: 363 - 370.

Gaertner, J.; Dhurjati, P (1993). Fractional factorial study of hibridoma behavior. 1. Kinetics of growth and antibody production. *Biotechnology Program*. 9 (3): 298 - 308.

Garcia-Maruniak, A.; Pavan O.; Maruniak, J. (1996). A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. *Virus Research*. 41: 123 - 132.

Gilbert, R.; Nagano, Y.; Yokota, T.; Hwan, S.; Fletcher, T.; Lydersen, K. (1996). Effect of lipids on insect cell growth and expression of recombinant proteins in serum-free medium. *Cytotechnology*. 22 (3): 211 - 216.

Gombart, A.; Pearson, M.; Rohrmann, G.; Beaudreau, G. (1989). A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology*. 169 (1): 182 - 193.

Gomes, D.; Gomes, J.; Steiner, W. (1994). Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. *Journal of Biotechnology*. 37: 11 - 22.

Gong T.; Jem K.; Manning S.; Georgis R.; Montgomery T. (1997). *In vitro* production of *Anagrapha falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in two insect cell lines. Maramorosch, K.; Mitsuhashi, J. (eds.). Science Publishers Incompany, Enfield.USA,149-155.

Goodwin, R.; Vaughn, J.; Adams, J. (1970). Replication of a nuclear polyhedrosis virus in an established insect cell line. *Journal of Invertebrate Pathology*. 16: 284 - 288.

Goodwin, R (1991). Replacement of vertebrate serum with lipids and other factors in the culture of invertebrate cells, tissue, parasites and pathogens. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 24A: 470 - 478.

Grace, T. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissue grown *in vitro*. *Nature* 195: 788 - 789.

Granados, R. (1980). Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology and Bioengineering*. 22: 1377 - 1405.

Granados, R.; Williams, K. (1986). *In vivo* infection and replication of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. I. Granados, R; Federici, B. (eds.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA. 89 - 108.

Grasela, J.; McInstosh, A. (1998). *In vitro* and *in vivo* host range of *Anticarsia gemmatalis* multiple nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. 34: 79 - 83.

Gruha, M.; Buller, P.; Weaver, R. (1981). A-amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus infected *Heliothis* larval and *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*. 38: 916 - 921.

Hawtin, R.; Arnold, K.; Ayres, M. (1995). Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*. 212: 673 - 685.

Hefferon, A.; Oomens, S.; Monsma, C.; Finnerty, C.; Blissard, G. (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*. 258: 455 - 468.

Herniou, E.; Olszewski, J.; Cory, J.; O'Reilly, D. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review Entomology*. 48: 211 - 234.

Herniou, E.; Olszewski, J.; O'Reilly, D.; Cory, J. (2004). Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*. 3244 - 3251.

Hild, H.; Emery, A.; Al-Rubeai, M. (1992). The effect of pH, temperature, serum concentration and media composition on the growth of insect cell. En: *Baculovirus and recombinant protein production processes*. Vlak, J.; Schlager, E.; Bernard, A. (eds.). Roche, Basel, Suiza. 316 - 321.

Hill, J.; Kuzio, J.; Faulkner, P. (1995). Identification and characterization of the v-catch gene of the baculovirus, CfMNPV. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1264: 275 - 278.

Hinds, W.; Osterberger, B. (1931). The occurrence of *Anticarsia gemmatilis* as a soybean pest in Louisiana in 1929. *Journal of Economic Entomology*. 24:1168 - 1173.

Hink, W. (1970). Established insect cell line from the cabbage looper, *Trchoplusia ni*. *Nature*. 266: 466 - 467.

Hink W.; Strauss E.; Ramoska W. (1977). Propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture: methods for infecting cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 185 - 191.

Hink, W.; Strauss, E. (1980). Semi-continuous culture of the TN-368 cell line in fermenters with virus production in harvested cells. Kurstak, E.; Maramorosch, K.; Dubendorfer, A (eds). Elsevier / North-Holland Biomedical Press, New York, USA.

Hink, W. (1991): A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins. *In Vitro Cell*. 27A: 397 - 401.

Hirayama, C.; Konno, K.; Sinbo, H. (1997). The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombix mori*. *Journal of Insect Physiology*. 43: 959 - 964.

Hirayama, C.; Saito, H.; Cono, K.; Sinbo, H. (1998). Purification and characterization of NADH-depend glutamate synthase from the silkworm fat body (*Bombyx mori*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28 (7): 473 - 482.

Hofmann, C.; Sandig, V.; Jennings, G.; Rudolph, M.; Schlag, P.; Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Cell Biology*. 92: 10099 - 10103.

Holmes-McNary, M.; Baldwin, A.; Zeisel, S. (2001). Opposing regulation of choline deficiency induced apoptosis by p53 and nuclear factor κ B. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (44): 41197 - 41204.

Horton, H.; Burand, J. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cell and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology* 67 (4): 1860 - 1868.

Hu, W.; Dodge, T.; Frame, K.; Himes, V. (1987). Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Developments in Biological Standardization*. 66: 279 - 290.

Ibarra, J.; Del Rincón Castro, M. (2001). Capacidad insecticida de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 203 - 224.

Ignoffo, C.; Garcia, C. (1994). Antioxidant and oxidant enzyme effects of the inactivation of inclusión bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight-UV. *Environmental Entomology*. 23: 1025 - 1029.

Ikonomou, L.; Bastin, G.; Schneider, Y.; Agathos, S. (2001). Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cell*. 37: 549 - 559.

Ikonomou, L.; Schneider, Y.; Agathos, S. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 1 - 20.

Inlow, D.; Shauger, A.; Maiorella, B. (1989). Insect cell culture and baculovirus propagation in protein-free medium. *Methods in Cell Science*. 12: 13 - 16.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dB (2006). The Universal Virus Database, version 3. Büchen – Osmond, C. Columbia University, New York, USA.

Jäger, V. (1996). Perfusion bioreactors for the production of recombinant proteins in insect cells. *Cytotechnology*. 20: 191 - 198.

Jarvis, D.; García, A. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp 64 protein. *Virology* 205: 300 - 313.

Jehle, J.; Blissard, G.; Bonning, B.; Cory, S.; Herniou, E.; Rohrmann, G.; Theilmann, D.; Thien S.; Vlak, J. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*. 151: 1257 - 1266.

Kalil, S.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. (2000). Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*. 35: 539 - 550.

Kamen, A.; Tom, R.; Caron, A.; Chavarie, C.; Massie, B.; Archambault, J. (1991). Culture of insect cells in a *Helical ribbon* impeller bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 38, 619 - 628.

Kamen, A.; Bédard, C.; Tom, R.; Perret, S.; Jardin, B. (1996). On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus-infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 50: 36 - 48.

Katsuma, S.; Noguchi, Y.; Zhou, C.; Kobayashi, M.; Maeda, S. (1999). Characterization of the 25 K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus:

implications for post-mortem host degradation. *Journal of General Virology*. 80: 783 - 791.

Khuri, A.; Cornell, J. (1987). *Response surfaces designs and analysis*. Marcel Dekker, Incompany ASQC Quality Press. New York. USA.

Kim, E.; Kim, N.; Lee, G. (1999). Development of a serum-free for dihydrofolate reductase-deficient Chinese Ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 35: 178 - 182.

Kim, J.; Kim, E.; Park, T. (2000). Fed-batch culture of insect cells with exponential feeding of amino acid and yeastolate solution. *Bioprocess Engineering*. 23: 367 - 370.

King, L.; Mann, S.; Mulshaw, S.; Lawrie, A. (1991). Comparison of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in two insect cell lines, *Spodoptera frugiperda* and *Mamestra brassicae*. *Virus Research*. 19: 93 - 104.

Kioukia, N.; Nienow, A.; Emery, A.; Rubeai, M. (1995). Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *Journal of Biotechnology* 38: 243 - 251.

Kirwood, T.; Bangham, R. (1994). Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Microbiology*. 91: 8685 - 8689.

Kompier, R.; Tramper, J.; Vlak, J. (1988). A continuous process for the production of baculovirus using insect-cell cultures. *Biotechnology Letters*. 10: 849 - 854.

Kool, M.; Voncken, J.; van Lier, F.; Tramper, J.; Vlak, J. (1991). Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*. 183 (2): 739 - 746.

Kool, M.; van den Berg, P.; Tramper, J.; Goldbach, R.; Vlak, J. (1993a). Location of two putative origins of DNA replication *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 192 (1): 94 - 101.

Kool, M.; Voeten, J.; Goldbach, R.; Tramper, J.; Vlak, J. (1993b). Identification of seven putative origins of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *Journal of General Virology*. 74: 2661 - 2668.

Kost, T.; Condreay, P.; Jarvis, D. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 23 (5): 567 - 575.

Krell P. (1996) Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology* 20: 125 - 137.

Kuzio, J.; Pearson, M.; Harwood, S.; Funk, C.; Evans, J.; Slavicek, J.; Rohermann, G. (1999). Sequence and analysis of the genome of baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 253: 17 - 34.

Klöpinger, M.; Fertig, G.; Fraune, E.; Miltenburger, H. (1990). Multistage production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures. *Cytotechnology*. 4 (3): 271 - 278.

Lacey, L.; Frutos, R.; Kaya, H.; Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological Control*. 21: 230 - 248.

Lee, S.; Park, T. (1994). Growth limiting factors influencing high density culture of insect cells in Grace's medium. *Biotechnology Letters*. 16(4): 327 - 332.

Lee, S.; Park, T. (1995). Two-phase cultivation of insect cells for production of recombinant protein. *Biotechnology Techniques*. 9(10): 719 - 724.

Lee, G.; Kim, E.; Kim, N.; Yoom, S.; Ahn, Y.; Song, J. (1999). Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of

recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *Journal of Biotechnology*. 69: 85 - 93.

Lehninger, A. (1979). *Bioquímica*. Editorial: Omega. Barcelona. España.

Leist, C.; Meyer, H.; Fiechter, A. (1990). Potential and problems of animal cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*. 15: 1 – 46.

Leisy D.; Rasmussen C.; Kim H.; Rohrmann G. (1995). The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus homologous region 1a: identical sequences are essential for DNA replication activity and transcriptional enhancer function. *Virology*. 208 (2): 742 - 752.

Li, Z.; Vance, D. (2008). Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research*. Papers In Press.

Licari, P.; Bailey, J. (1991). Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system. Multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnology and Bioengineering*. 37: 238 - 246.

Licari, P.; Bailey, J. (1992). Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yield. *Biotechnology and Bioengineering*. 39:432 - 441.

Lima, L.; Pinedo, F.; Ribeiro, B.M.; Zanotto, P.; Wolf, J. (2004). Identification, expression and phylogenetic analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) *helicase*. *Virus Genes*. 29: 345 - 352.

Lison, L. (1976). *Estadística aplicada a la biología experimental*. Editorial: EUDEBA. Buenos Aires. Argentina.

Liu, J.; Maruniak, J. (1999). Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis based upon GP41 and polyhedrin genes. *Virus Res*. 64, 187 - 196.

Liu, K.; Tang, Q.; Fu, C.; Peng, J.; Yang, H.; Li, Y.; Hong, H. (2007). Influence of glucose starvation on the pathway of death in insect cell line SI: apoptosis follows autophagy. *Cytotechnology*. 54: 97 - 105.

Liss, A. (1983). *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New York.

Lua, L.; Reid, S. (2000). Virus morphogenesis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* serum-free suspension culture. *Journal of General Virology*. 81: 2531 - 2543.

Lua, L.; Pedrini, M.; Reid, S.; Robertson, A.; Tribe, D. (2002). Phenotypic and genotypic análisis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. *Journal of General Virology*. 83: 945 - 955.

Lua, L.; Reid, S. (2003). Growth, viral production and metabolism of a *Helicoverpa zea* cell line in serum-free culture. *Cytotechnology*. 42: 109 - 120.

Lynn, D.; Oberlander, H. (1983). The establishment of cell lines from imaginal wing discs of *Spodoptera frugiperda* and *Plodta interpunctella*. *Journal of Insect Physiol.* 29: 591 - 596.

Lynn, D. (1996). Development and characterization of insect cell line. *Cytotechnology* 20: 3 - 11.

Lynn, D. (2003). Comparative susceptibilities of twelve insect cell lines to infection by three baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 129 - 131.

Lynn, D.; Ferkovich, S. (2004): New cell lines from *Epehestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *Journal of Insect Science* 4: 9.

Maagd, R.; Bravo, A.; Crickmore, N. (2001). How *Bacillus Thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17: 193 - 199.

Maiorella, B.; Inlow, D.; Shauger, A.; Harano, D. (1988). Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Biotechnology*. 6: 1406 - 1410.

Marheneike, K.; Grünewald, S.; Christie, W.; Reiländer, H. (1998). Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *Federation of European Biochemical Societies*. 441(1): 49 - 52.

Maruniak, J. (1989). Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 84: 107 - 111.

Marteijn, R.; Oude-Elferink, M.; Martens, D.; de Gooijer, C.; Tramper, J. (2000). Effect of low inoculation density in the scale-up of insect cell cultures. *Biotechnology Program*. 16 (5): 795 - 799.

McKenna, K.; Shuler, M.; Granados, R. (1997). Increased virus production in suspension culture by a *Trichoplusia ni* cell line in serum-free media. *Biotechnology Progress*. 13: 805 - 809.

Mendonça, R.; Palomares, L.; Ramírez, O. (1999). An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *Journal of Biotechnology*. 72: 61 - 75.

Mendonça, R.; Oliveira, E.; Pereira, C.; Lebrun, I. (2007). Effect of bioactive peptides isolated from yeastole, lactalbumin and NZCase in the insect cell growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 30: 157 - 164.

Meneses-Acosta, A.; Mendonça, R.; Merchant, H.; Covarrubias, L.; Ramírez, O. (2001). Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 72: 441 - 457.

Miller, W.; Blanch, H. (1991). Regulation of animal cell metabolism in bioreactors. En: *Animal Cell Bioreactors*. Ho, C.; Wang, D. (eds.). Boston, USA. 119 - 161.

Miltenburger, H.; Naser, W.; Harvey, J.; Huber, J.; Huger, A. (1984). The cellular substrate: a very important requirement for baculovirus *in vitro* replication. *Z Naturforsch.* 39: 993 - 1002.

Miltenburger, H. (1985). Qualitative and quantitative aspects of animal cell *in vitro* systems. *Developments in Biological Standardization.* 60: 147 - 159.

Mitsuhashi, J.; Maramorosch, K. (1964). Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Boyce Thomson Institute.* 22: 435 - 460.

Mitsuhashi, J. (1989). Nutritional requirements of insect cells *in vitro*. En: *Invertebrate cell system applications, vol I.* Mitsuhashi, J. (ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. U.S.A. 3 - 20.

Mizrahi, A. (1977). Primatone RL in mammalian cell culture media. *Biotechnology and Bioengineering.* 19: 1557 - 1561.

Montgomery, D. (1991). *Diseño y análisis de experimentos.* Grupo Editorial Iberoamérica. México.

Moscardi, F. (1981). Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on natural incidence of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Economic Entomology.* 74: 480 - 485.

Moscardi, F. (1989): Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 84: 51 - 56.

Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annual Reviews of Entomology.* 44: 257 - 289.

Moscardi, F.; Morales, L.; Santos, B. (2002). The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil.

Proceedings of the 8th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Society for Invertebrate Pathology, Foz do Iguaçu, Brazil. Embrapa Soja, Londrina, Documents. 184: 86 - 91.

Moscardi, F.; Santos, B. (2005). Producao commercial de nucleopoliedrosis de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidóptero: Noctuidae) em laboratorio. Proceeding of the IX Simposio de Controle Biologico. Recife. Brazil. 42.

Müller, R.; Pearson, M.; Russell, R.; Rohrmann, G. (1990). A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization. *Virology*. 176 (1): 133 - 144.

Müller, N.; Girard, P.; Hacker, D.; Jordan, M.; Wurn, F. (2005). Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension. *Biotechnology and Bioengineering*. 89 (4): 400 - 406.

Munderloh, U.; Kurtti, T (1989): Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental and Applied Acarology*. 7: 219 - 229.

Murhammer, D. (1996). Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 59: 199 - 220.

Neermann, J.; Wagner, R. (1996). Comparative analyses of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of Cellular Physiology*. 166: 152 - 169.

Öhman, L.; Ljunggren, J.; Häggström, L. (1995). Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 1006 - 1013.

Öhman, L.; Alarcón, M.; Ljunggren, J.; Ramqvist, A.; Häggström, L. (1996). Glutamine is not essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnology Letters*. 18 (7): 765 - 770.

Ozturk, S.; Riley, M.; Palsson, B. (1992): Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*. 39: 418 - 431.

Pahm, P.; Taillandier, P.; Delmas, M.; Strhaiano, P. (1998). Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. using statistical experimental design. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 185 - 190.

Palomares, L.; Ramirez, O. (1996). The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*. 22: 225 - 237.

Palomares, L.; Ramírez, O. (1998). Insect cell culture: recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production. *Advances in Bioprocess Engineering II*: 25 - 52.

Palomares, L.; López, S.; Ramírez, O. (2004). Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures. *Biochemical and Engineering*. 19: 87 - 93.

Palomares, L.; Estrada-Mondaca, S.; Ramírez, O. (2005). Principles and applications of the insect cell-baculovirus expresión vector system. En: *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies (Biotechnology and Bioprocessing series)*. Taylor and Francis Group (ed.). New York. USA. 627 - 692.

Passarelli, A.; Miller, L. (1993). Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n and lef-2. *Journal of Virology*. 67 (4): 2149 - 2158.

Pasumarthy M.; Murhammer D. (1994): Clonal variation in the *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21 AE insect cell population. *Biotechnology Progress*. 10: 314 - 319.

Pearson, M.; Bjornson, R.; Pearson G.; Rohrmann, G. (1992). The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. *Science*. 257: 1382 - 1384.

Pearson M.; Rohrmann G. (1997). Splicing is required for transactivation by the immediate early gene 1 of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 235: 153 - 165.

Pearson, M.; Russell, R.; Rohrmann, G. (2001). Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virology*. 291: 22 - 31.

Pedrini, M.; Nielsen, L.; Reid, S.; Chan, L. (2005). Properties of a unique mutant of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus that exhibits a partial many Polyhedra and few Polyhedra phenotype upon extended serial passaging in suspension cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*. 41: 289 - 297.

Pedrini, M.; Christian, P.; Nielsen, L.; Reid, S.; Chan, L. (2006). Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type *Heliothis* nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell culture. *Journal of Virological Methods*. 136: 267 - 272.

Pilloff, M.; Bilen, M. ; Belaich, M.; Lozano, M., Ghiringhelli, P. (2003). Molecular cloning and sequence analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus GP64 glycoprotein. *Virus Genes*. 26: 57 - 69.

Pirt, S. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. John Willey and Sons. New York. USA.

Plackett, R.; Burman, J. (1947). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 33: 305 - 325.

Pombo, V.; Velloso, L.; Ribeiro, B.; Bão, S. (1998). Structural and ultrastructural changes during the infection of UFLAg-286 cell with the baculovirus AgMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72: 239 - 245.

Radford, K.; Reid, S.; Greenfield, P. (1997). Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnology and Bioengineering*. 56: 32 - 44.

Razuck, F., Ribeiro, B.; Vargas, J.; Wolf, J.; Ribeiro, B.M. (2002). Characterization of the *p10* gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*. 24, 243 - 247.

Reuveny, S.; Kim, Y.; Kemp, C.; Shiloach, J. (1993). Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 42: 235 - 239.

Reuveny, S.; Kim, Y.; Kemp, C.; Shiloach, J. (1993). Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38: 619 - 623.

Rhiel, M.; Murhammer D. (1995). The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE clonal isolate. *Biotechnology and Bioengineering*. 47: 640 - 650.

Rhiel, M.; Mitchell-Logean, C.; Murhammer, D. (1997). Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 55 (6): 909 - 920.

Rhodes, D. (1996). Economics of baculovirus-insect cell production systems. *Cytotechnology*. 20: 291 - 297.

Rodas, V.; Marques, F.; Honda, M.; Soares, D.; Jorge, S.; Antoniazzi, M.; Medugno, C.; Castro, M.; Ribeiro, B.; Souza, M.; Tonso, A.; Pereira, C. (2005). Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Citotechnology* 48: 27 - 39.

Röder, A. (1982). Development of a serum-free medium for cultivation of insect cells. *Naturwissenschaften* 69: 92 - 93.

Rodrigues, J.; de Souza, M.; O'Reilly, D.; Velloso, L.; Pinedo, F.; Razuck, F.; Ribeiro, B.; Ribeiro, B.M. (2001). Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*. 22: 103 - 112.

Rohrmann, G. (1992). Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology*. 73: 749 - 761.

Romanowski, V.; Ghiringhelli, D. (2001). Biología molecular de los baculovirus (replicación y regulación de la expresión génica). En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 119 - 142.

Ryll, T.; Valley, U.; Wagner, R. (1994): Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mamalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 184 - 193.

Sciocco de Cap, A. (2001). Biología y patogénesis de los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 47 - 72.

Schlaeger, E.; Schumpp, B. (1992). Propagation of a mouse myeloma cell line J558L producing immunoglobulin G1. *Journal of Immunology Methods*. 146: 111 - 120.

Schlaeger, E. (1996a). Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20: 57 - 70.

Schlaeger, E. (1996b). The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *Journal of Immunological Methods*. 194: 191 - 199.

Schnepf, H. (1995). *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 305 - 312.

Schumpp, B.; Schlaeger, E. (1990). Optimization of culture conditions for high cell density proliferation of HL-60 human leukemia cells. *Journal of Cell Science*. 97: 639 - 647.

Shen C.; Kiyota, T.; Jardin, B.; Konishi, Y.; Kamen, A. (2007). Characterization of yeastole fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology*. 54: 25 - 34.

Sieburth, P.; Maruniak, J. (1988a). Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 24 (3): 195 - 198.

Sieburth, P.; Maruniak, J. (1988b). Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52: 453 - 458.

Slack, J.; Shapiro, M. (2004). *Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus *v-trex* gene encodes a functional 3' to 5' exonuclease. *Journal of General Virology*. 85: 2863 - 2871.

Slack, J.; Ribeiro, B.M.; de Souza, M. (2004). The *gp64* locus of *Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks *v-cath* and *ChiA* genes. *Journal of General Virology*. 85: 211 - 219.

Stavroulakis, D.; Kalogerakis, N.; Behie, L. (1991). Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 116 -126.

Stockdale, H.; Gardiner, G. (1977). The influence of the condition of cells and medium on production of polyhedra of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis *in vitro*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 330 - 336.

Sugiura, T.; Amman, E. (1996). Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 51: 494 - 499.

Summers MD (1971). Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructural Research*. 35: 606 - 625.

Summers, M.; Volkman, L. (1976). Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host systems. *Journal of Virology*. 17 (3): 962 - 972.

Szewczyk, B.; Hoyos-Carvajal, L.; Paluszek, M.; Skrzecz, I.; Lobo do Souza, M. (2006). Baculoviruses: re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*. 24 (2): 143 - 160.

Takahashi, M.; Kono, Y.; Matsushita, K.; Mitsuhashi, J. (1995). Production of ethanol by cultured insect cells. *In Vitro Cell*. 31: 876 - 879.

Takeyuki, S.; Egon, A. (1996). Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 51 (4): 494 - 499.

Taticek, R.; Shuler, M. (1997). Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnology and Bioengineering*. 54 (2): 142 - 152.

Taticek, R.; Choi, C.; Phan, S.; Palomares, L.; Shuler, M. (2001). Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnology Progress* 17: 676 - 684.

Trager, W. (1935). Cultivation of the virus of grasserie in silkworm tissue cultures. *Journal of experimental Medicine*. 61: 501 - 514.

Tsao, E.; Mason, M.; Cacciuttolo, M.; Bowen, S. (1996). Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 130 - 138.

Uren, A.; Coulson, E.; Vaux, D. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeast. *Trends Biochemical Sciences*. 23: 159 - 162.

Vance, D.; Ridgway, N. (1988). The methylation of phosphatidylethanolamine. *Progress in Lipid Research*. 27, 61 - 79.

van der Valk, J.; Mellor, D.; Brands, R.; Fischer, R.; Gruber, F.; Gstraunthaler, G.; Hellebrekers, L.; Hyllner, J.; Jonker, F.; Prieto, P.; Thalen, M.; Baumans, V.; (2003). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free and tissue culture. *Toxicology in Vitro*. 18: 1 - 12.

van Lier, F.; van den End, E.; de Gooijer, C.; Vlak, J.; Tramper, J. (1990). Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33 (1): 43 - 47.

van Lier, F.; van der Meijs W.; Grobben, N.; Olie, R.; Vlak, J.; Tramper, J. (1992). Continuous beta-galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 22 (3): 291 - 298.

van Lier, F.; van Duijnhoven, G.; de Vaan M.; Vlak, J.; Tramper, J. (1994). Continuous beta-galactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in a two-stage bioreactor system. *Biotechnology Program*. 10 (1): 60 - 64.

Vaughn, J. (1976). The production of nuclear polyhedrosis virus in large volume cell cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 28: 233 - 237.

Vaughn, J.; Godwin, R.; Tompkins, G. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*. 13: 213 - 217.

Vaughn J.; Fan F.; Dougherty E.; Adams J.; Guzo D.; McClintock J. (1991). The use of commercial serum replacements in media for the in vitro replication of nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 297 - 304.

Vaughn, J.; Fan, F. (1997). Differential requirements of two insect cell lines for growth in serum-free medium. *In Vitro Cell*. 33: 479 - 482.

Velez, D.; Reuvenys, S.; Miller, L.; Macmillan, J. (1986). Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *Journal Immunology Methods*. 86: 46 - 52.

Visnovsky, G.; Claus, J. (1994). Influence of time and multiplicity of infection on the batch production of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in lepidopteran insect cell cultures. *Advances in Bioprocess Engineering*. 123 - 128.

Visnovsky, G.; Claus, J.; Merchuk, J. (2003). Airlift reactor as a tool for insect cells and baculovirus mass production. *Latin-America Applied Research*. 33: 117 - 121.

Volkman, L.; Goldsmith, P. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*. 143: 185 - 195.

Wang, J.; Qi, W.; Huang, Y.; Li, S. (1995). Nucleotide sequence of a 1446 base pair *SalI* fragment and structure of a novel early gene of *Leucania separata* nuclear polyhedrosis virus. *Archives of Virology*. 140: 2283 - 2291.

Wang, S.; Bentley, W.; Liu, C.; Wang, M. (1999). The use of glucose to regulate pH values of culture media and increase the production of baculovirus (BmNPV) and foreign protein (HbsAg). *Process Biochemistry*. 34: 295 - 301.

Weiss, S.; Smith, G.; Kalter, S.; Vaughn, J. (1981). Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. *In Vitro*. 17(6): 495 - 502.

Weiss S.; Orr T.; Smith G.; Kalter S.; Vaughn J.; Dougherty, E. (1982). Quantitative measurement of oxygen consumption in insect cell culture infected with polyhedrosis virus. *Biotechnology and Bioengineering*. 24: 1145 -1154.

Whitford, M., Faulkner, P. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*. 66 (8): 4763 - 4768.

Wilkie, G.; Stockdale H.; Pirt, S. (1980). Chemically-defined media for production of insect cells and viruses *in vitro*. *Developmental in Biological Standardization*. 46: 29 - 37.

Wong, T.; Nielsen, L.; Greenfield P.; Reid S. (1994). Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of Sf-9 insect cells infected with recombinant baculovirus. *Cytotechnology*. 15: 157 - 167.

Wong, K.; Peter, C.; Greenfield, P.; Reid, S. (1996). Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 659 - 666.

Wood H.; Johnston L.; Burand J. (1982). Inhibition of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in high-density *Trichoplusia ni* cell cultures. *Virology*. 119: 245 - 254.

Wu, J.; King, G.; Daugulis, A.; Faulkner, P.; Bone, D.; Goosen, M. (1988). Engineering aspects of insect cell suspension culture. *Application Microbiology Biotechnology*. 32: 249 - 255.

Wu, S.; Dale, B.; Liao, J. (1993). Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 41: 104 - 110.

Wu, J.; Lee, K. (1998): Growth promotion by yeastolate and related components on insect cells. *Biotechnology Techniques*. 12 (1): 67 - 70.

Wyatt, G. (1961). The biochemistry of insect hemolymph. *Annual Review of Entomology*. 6: 75.

Yamaji, H.; Tagai, S.; Fukuda, H. (1999): Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87 (5): 636 - 641.

Yang, J.; Gecik, P.; Collins, A.; Czarnecki, S. (1996). Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. *Biotechnology and Bioengineering*. 52: 696 - 706.

Yen, C.; Mar, M.; Craciunescu, C.; Edwards, L.; Zeisel, S. (2002). Deficiency in methionine, tryptophan, isoleucine or choline induces apoptosis in cultured cells. *Journal of Nutrition*. 132: 1840 - 1847.

Zanotto, P.; Sampaio, M.; Johnson, D.; Rocha, T.; Maruniak, J. (1992). The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *Journal of General Virology*. 73: 1049 - 1056.

Zanotto, P.; Kessing, B., Maruniak, J. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 62: 147 - 164.

Zhang, Y.; Enden, G.; Merchuk, J. (2005). Insect cells-baculovirus system: factors affecting growth and low MOI infection. *Biochemical Engineering Journal*. 27: 8-16.

Zoon, K.; Bridgen, P.; Smith, M. (1979). Production of human lymphoblastoid interferon by Namalwa cells cultured in serum-free media. *Journal of General Virology*. 44: 227 - 229.

