

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para acceder al grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“Rol de los esteroides en la determinación de las propiedades estructurales, dinámicas y funcionales de la membrana plasmática en células de insecto. Su relación con la infección con baculovirus.”

Bioq. BAQUÉ MARÍA ALEJANDRA

Director de Tesis: Dr. CLAUS JUAN DANIEL

Co-director de Tesis: Dra. CASADO NIEVES

**Lugar de realización: Laboratorio de Virología y Departamento de Física –
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – U.N.L.**

- 2019 -

A la memoria de mamá y papá.

A mi familia y amigos.

*“En lugar de ser un hombre exitoso, busca ser un hombre valioso, lo demás
llegará naturalmente.”*

Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a los directores, por su apoyo y continua orientación, seguimiento y supervisión.

A mi director, Dr. Juan Daniel Claus, por haber guiado con sus conocimientos e ideas este trabajo y por darme la oportunidad de realizar parte de esta tesis doctoral en el laboratorio de Virología.

A mi co-directora, Dra. Nieves Casado, por brindarme su incondicional apoyo, por la invaluable tarea realizada en mi formación docente y profesional, por aportar todo lo que estuvo a su alcance y más, y por su increíble intuición y firmeza ante cada resultado inesperado.

A la Dra. Ana María Gennaro, por su activa participación en este trabajo, por su enorme calidez e interés en mis avances, por compartir su sabiduría para lograr interpretar cada resultado de EPR, por su espíritu crítico, por su orientación científica, y por brindarme un lugar en el laboratorio de Biomembranas del Departamento de Física.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la U.N.L., por permitirme realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones y por brindarme el apoyo académico necesario para llevar a cabo mi formación doctoral.

Al Departamento de Física de la FBCB, a todos los profes y compañeros que me han acompañado en este tiempo de descubrimiento y que me han alentado siempre. A Rosana y Liliana, por haberme acompañado durante todos estos años no sólo en lo profesional, sino también en lo personal.

A Verónica, por su valiosa colaboración desde el comienzo en el laboratorio de Virología, por enseñarme las artes y los secretos de las células de insecto y del AgMNPV. Por ubicarme en el laboratorio y enseñarme los primeros pasos. A Gabriela y a Nacho, por brindarme siempre su ayuda, el material necesario y facilitarme el trabajo.

A mi grupete de amigos del laboratorio del Hospital de Niños, en especial a Noni, Cacho, Cachu, Virginia, Noni, Moni, Claudia, Laura, Jorgelina, María Rosa y Erika, porque hicieron estos años más fáciles.

A mi hermano Edgardo y a Mariana, por compartir conmigo su hermosa familia. A Alberto, por su cariño, por su comprensión y por acompañarme.

A mis padres, ya que su recuerdo, ejemplo y apoyo incondicional me ayudaron a confiar en mis capacidades y perseverar.

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

Y por último, a todas aquellas personas que de alguna u otra forma ayudaron, incentivaron y se pusieron felices por los logros obtenidos, gracias!!!

Publicación

Parte de los contenidos de esta tesis han sido publicados en la siguiente revista internacional con referato:

MA Baqué, VV Gioria, GA Micheloud, NMC Casado, JD Claus, AM Gennaro. (2018). Spin label EPR suggests the presence of cholesterol rich domains in cultured insect cell membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 505: 1038-1042. Publicación online final: 30-OCT-2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.011.

Índice de contenidos

1. Introducción	2
1.1 Cultivos de células de insectos	2
1.1.1 Líneas establecidas de células de lepidópteros	2
1.1.2 Línea celular UFL-AG-286	3
1.2 Medios de cultivo para líneas de células de insecto	4
1.2.1 Medios de cultivo básicos para células de insectos	5
1.2.2 Medios de cultivo suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB)	6
1.2.3 Medios de cultivo libres de suero	7
1.2.4 Medios de cultivo sin contenido de origen animal	8
1.3 Baculovirus	8
1.3.1 Características generales	8
1.3.2 Taxonomía	9
1.3.3 Estructura de viriones brotados, viriones derivados de cuerpos de oclusión, y cuerpos de oclusión	10
1.3.4 Ciclo natural	12
1.3.5 Ciclo de replicación	13
1.3.6 Aplicaciones biotecnológicas	15
1.3.6.1 Uso de baculovirus en el control biológico de plagas	15
1.3.6.2 Expresión de proteínas recombinantes	16
1.3.6.3 Vehículos de transferencia génica	16
1.3.7 Virus de la poliedrosis nuclear múltiple de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , AgMNPV	17
1.4. Membranas celulares	18
1.4.1 Aspectos generales de estructura y organización de las membranas de células animales	18
1.4.2 Organización de los lípidos	20
1.4.3 Organización de las biomembranas	22
1.4.4 Composición de lípidos y esteroides de las membranas de células de insectos	26
1.4.5 Rol del colesterol de membrana en las infecciones virales	28
1.5 Fluidez de membrana	28
1.5.1 ¿A qué llamamos fluidez de membrana?	28
1.5.2 Evaluación de la fluidez de membrana por Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Marcadores de espín.	30
1.5.2.1 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	30

1.5.2.2 Determinación del orden dinámico de membranas por Espectroscopia de EPR	32
1.6 Justificación	36
1.7 Hipótesis	37
2. Objetivos	39
2.1 Objetivo general	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. Materiales y métodos	41
3.1 Línea celular UFL-AG-286	41
3.1.1 Cultivos con células adheridas	41
3.1.2 Recuento de células totales, no viables y viables	41
3.1.3 Evaluación de la proliferación celular por el ensayo de reducción de MTS	42
3.2 Medios de cultivo libres de suero fetal bovino	42
3.2.1 Medio de cultivo básico	42
3.2.2 Suplementos de composición química no definida que se agregan al medio de cultivo base	44
3.2.2.1 Hidrolizados proteicos	44
3.2.2.2 Extractos microbianos	44
3.2.2.3 Emulsiones lipídicas	45
3.3 Evaluación de la proliferación celular	46
3.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de multiplicación celular	46
3.3.2 Determinación del diámetro celular	47
3.3.3 Análisis de nutrientes y productos metabólicos	47
3.3.3.1 Dosaje de la concentración de glucosa	47
3.3.3.2 Dosaje de la concentración de glutamina	48
3.3.3.3 Dosaje de la concentración de lactato	48
3.3.3.4 Dosaje de la concentración de amonio	49
3.4 Virus	50
3.4.1 Preparación de <i>stock</i> de AgMNPV	50
3.4.2 Titulación de virus brotado de AgMNPV (Titulación por dilución límite)	50
3.4.3 Cuantificación de poliedros de AgMNPV	51
3.4.3 Cálculo de los porcentajes de unión de AgMNPV	51
3.5 Membranas modelo	51

3.6 Reducción del contenido de colesterol celular	52
3.7 Reincorporación de esteroides a las células tratadas con MβCD	53
3.8 Determinación de fluidez de membrana por EPR	53
3.8.1 Preparación de muestras	53
3.8.1.1 Cantidad de marcador a incorporar	53
3.8.1.2 Vesículas unilamelares (LUVs)	54
3.8.1.3 Células UFL-AG-286	54
3.8.1.4 Muestras policristalinas	55
3.8.2 Mediciones de EPR	55
4. Resultados	57
4.1 Desarrollo de un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular UFL-AG-286	57
4.1.1 Efecto de hidrolizados de proteínas de origen vegetal sobre la proliferación de células UFL-AG-286	57
4.1.2 Proliferación de la línea celular UFL-AG-286 en medios de cultivo suplementados con microemulsiones preparadas a partir de aceites vegetales	58
4.1.3 Efecto de aceites vegetales sobre la replicación de AgMNPV en cultivos de células UFL-AG-286	59
4.1.4. Evaluación de un medio suplementado con hidrolizado de proteína de soja y microemulsión de aceite de soja	60
4.2 Adaptación de la línea celular UFL-AG-286 a medios de cultivo libres de componentes de origen animal con diferente composición de esteroides	63
4.2.1 Evaluación de la proliferación de las células UFL-AG-286 en medios con distintos contenidos de esteroides	64
4.2.2 Caracterización del consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con distinto contenido de esteroides	65
4.2.2.1 Consumo de nutrientes	65
4.2.2.2 Producción de metabolitos	66
4.2.3 Determinación del diámetro de las células adaptadas a los medios con contenido diferente de esteroides	67
4.3 Replicación de AgMNPV en cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con diferente contenido de esteroides	68
4.3.1 Producción de progenies virales de AgMNPV en los cultivos infectados	69

4.3.2 Efecto de la concentración de microemulsión sobre la proliferación celular en medios con diferente contenido de esteroides	69
4.3.3 Efecto de la concentración de microemulsión sobre cultivos infectados	70
4.3.3.1 Proliferación post infección	70
4.4 Unión del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de <i>Anticarsia gemmatilis</i> sobre células UFL-AG-286 con diferente contenido de esteroides	73
4.4.1 Unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 tratadas con metil- β -ciclodextrina (M β CD)	73
4.4.2 Cinética de unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 adaptados a distintas fuentes de esteroides	74
4.4.3 Cinética de inactivación de viriones brotados de AgMNPV en medios con diferente contenido de esteroides	76
4.5 Aplicación de la técnica de EPR al estudio del orden dinámico y la funcionalidad de membranas	77
4.5.1 Determinación de la fluidez en membranas modelo por EPR	78
4.5.1.1 Marcadores de espín n-SASL	78
4.5.1.2 Marcador de espín Colestano (CSL)	84
4.5.2 Determinación de la fluidez de membrana en células de la línea UFL-AG-286 por EPR	86
4.5.2.1 Preparación de las muestras	86
4.5.2.1.1 Células tratadas con M β CD	86
4.5.2.1.2 Incorporación de colesterol o sitosterol en las células tratadas con M β CD	87
4.5.2.1.3 Incorporación del marcador de espín CSL a las células de la línea UFL-AG-286	88
4.5.2.2 Mediciones de EPR	90
4.5.2.2.1 Marcadores de espín n-SASL	90
4.5.2.2.2 Marcadores de espín CSL	94
4.5.2.2.2.1 Células adaptadas a crecer en medio suplementado con emulsión de colesterol	94
4.5.2.2.2.2 Resultados de mediciones de EPR para interpretar el espectro colapsado	95
5. Discusión general	105
6. Conclusiones	122
7. Bibliografía	125

Abreviaturas y símbolos

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*

A_{MAX}: parámetro hiperfino A máximo

A_{MIN}: parámetro hiperfino A mínimo

BVs: viriones brotados

CSL: 3 β -5 α -doxil colestano

DPS: digesto papaínico de soja

EPR: Resonancia Paramagnética Electrónica

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

Lc: fase líquido desordenada o líquido cristalina

LMVs: vesículas multilamelares

Lo: fase líquido ordenada

LUVs: vesículas (liposomas) unilamelares

MOI: multiplicidad de infección

MTS: Reacción de reducción de la sal Tetrazólica

M β CD: metil- β -ciclodextrina

n-SASL: marcador n-doxil-ácido esteárico

OBS: cuerpos de oclusión

ODVs: viriones derivados de los cuerpos de oclusión

PBS: buffer fosfato

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PI: fosfatidilinositol

PMS: metosulfato de fenazina

PS III: Peptona de soja III

PS: fosfatidilserina

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: suero fetal bovino

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

SM: esfingomielina

TCID: dosis infectiva para cultivo celular

TCR: receptor de células T

Tm: temperatura de transición

UNL: medio de cultivo básico

VLPs: partículas virales similares al virus

Resumen

Los esteroides son componentes esenciales en todas las células eucariotas, donde cumplen un rol principal como integrantes de la estructura de las membranas, contribuyendo además a la regulación de su funcionalidad. Mientras que existe abundante información sobre los requerimientos y roles de los esteroides en células de mamíferos, no ocurre lo mismo en células de insecto, donde el conocimiento es escaso y contradictorio. El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos contribuir a la elucidación de las demandas cualitativas y cuantitativas de esteroides en células de insectos lepidópteros, analizar su rol en la determinación de las propiedades estructurales y funcionales de la membrana plasmática, así como también valorar la participación e importancia de estas propiedades, determinadas por los esteroides, en los procesos de infección y replicación de virus específicos de insectos. Para tales fines se utilizó a la línea celular UFL-AG-286, que fuera establecida a partir de tejidos embrionarios del insecto *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae), como modelo experimental. Esta línea celular es el hospedero preferencial para la infección y replicación *in vitro* del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), el agente de control biológico de plagas agrícolas que ha sido utilizado a mayor escala en todo el mundo, y que en este trabajo de tesis fue empleado como modelo para los experimentos de infección con baculovirus.

Los insectos lepidópteros son fundamentalmente fitófagos que obtienen la totalidad de sus nutrientes a partir de los vegetales que ingieren. Sin embargo, casi todos los medios de cultivo formulados para el cultivo *in vitro* de células de lepidópteros contienen componentes de origen animal, incluyendo las fuentes de péptidos, lípidos y esteroides. A los efectos de contar con un medio cuya composición pudiera emular *in vitro* las condiciones en que se desenvuelven las células de un insecto lepidóptero en su ambiente natural, como primer parte de este trabajo se procedió a desarrollar una nueva formulación libre de nutrientes de origen animal para la línea celular UFL-AG-286, sustituyendo dichos nutrientes por componentes de origen vegetal, principalmente de soja, una fuente abundante y barata de lípidos y derivados proteicos, y uno de los alimentos predilectos de *Anticarsia gemmatalis*. De esta manera, los hidrolizados de proteínas animales que son utilizados como fuente de péptidos promotores de la proliferación celular *in vitro* fueron reemplazados por un hidrolizado enzimático de proteína de soja (peptona de soja III), mientras que como fuente principal de ácidos grasos se empleó una emulsión de aceite de soja, en reemplazo de los aceites de origen animal usados habitualmente en los medios de cultivo libres de suero para células de lepidópteros.

El nuevo medio de cultivo basado en materias primas obtenidas de la soja, de bajo costo y libre de suero y de componentes de origen animal, fue utilizado como base para estudiar los requerimientos cuali y cuantitativos de esteroides de la línea celular UFL-AG-286. Con este propósito, tres sub-líneas diferentes de la misma fueron obtenidas por adaptación paulatina al nuevo medio, una

en ausencia de cualquier suplementación con esteroides, la segunda suplementada con colesterol, y la tercera con sitosterol, el esteroide de origen vegetal más abundante en el aceite de soja. Las sub-líneas adaptadas en estas condiciones fueron cultivadas cada una por más de 200 pasajes sucesivos, al cabo de los cuales presentaron similares cinéticas de proliferación, de consumo de nutrientes y de producción de catabolitos, si bien el tamaño de las células adaptadas en medio conteniendo colesterol fue significativamente mayor que el de las células que fueron cultivadas en los medios libre de esteroides o conteniendo sitosterol. Estos resultados permiten concluir que la demanda de esteroides para cubrir las necesidades celulares vinculadas a la supervivencia y la proliferación son mínimas, y que pueden satisfacerse por un esteroide vegetal en reemplazo del colesterol. Sin embargo, cuando se ensayó la capacidad de las tres sub-líneas para multiplicar *AgMNPV* en cultivos infectados, se observó que el virus sólo se replicó en las células cultivadas en el medio suplementado con colesterol, produciendo rendimientos de las dos progenies virales -virus brotados y cuerpos de oclusión- comparables con los alcanzados en medios suplementados con nutrientes de origen animal. Los cultivos infectados en los medios sin esteroides o suplementado con sitosterol sólo presentaron evidencias de efecto citopático en un ínfimo porcentaje de células aisladas, y no mostraron inhibición de la proliferación, en comparación con los controles sin infectar. Estos resultados indican que es posible alcanzar altos rendimientos virales en un medio libre de componentes animales, siempre que esté suplementado con colesterol, y por lo tanto que éste es esencial para la replicación de *AgMNPV* en células UFL-AG-286. La imposibilidad de reemplazar al colesterol por sitosterol en los cultivos infectados, a pesar de la estrecha similitud estructural entre ambas moléculas, sugiere que las funciones celulares y virales que deben expresarse para llevar a término el ciclo de replicación son sutilmente dependientes de la naturaleza del esteroide. Por otro lado, la ausencia prácticamente total de efecto citopático y de retraso en el crecimiento de los cultivos infectados sin colesterol sugieren que en ausencia de éste la replicación viral se bloquea en una etapa temprana del ciclo, previa a la expresión de los mecanismos de daño que conducen a las manifestaciones de efecto citopático y a la muerte celular asociadas a una infección permisiva.

La sospecha de un bloqueo temprano en la replicación en ausencia de colesterol, sumado a la importancia de éste en la estructura y la función de la membrana plasmática, y al involucramiento directo de la misma en la adsorción, etapa inicial del ciclo de replicación, condujeron a formular como hipótesis que el bloqueo podría radicarse a ese nivel. A los efectos de verificar si la unión viral a la célula era afectada por el tipo y contenido de esteroides, se realizó una evaluación de la cinética de unión de *AgMNPV* sobre células UFL-AG-286 adaptadas a los tres medios de cultivo. Sorprendentemente, el virus fue capaz de unirse a las células en todos los casos, independientemente del tipo y contenido de esteroide presente en las células y en el medio, registrándose sólo mínimas diferencias en la cinética y en la magnitud final de la unión viral a favor de las células que contienen

colesterol. Estos resultados permiten concluir que AgMNPV puede adsorberse sobre las células UFL-AG-286 en ausencia de colesterol, aunque de manera ligeramente menos eficiente, y que el bloqueo de la replicación, en estas condiciones, no se produciría a nivel de la adsorción viral sobre la membrana. Sin embargo, dado que ésta también interviene activamente en la etapa subsecuente del ciclo, la internalización, no se puede descartar que la presencia o ausencia de colesterol podría determinar modificaciones de propiedades estructurales y funcionales de la membrana plasmática que afecten el tránsito viral y la continuidad del ciclo de replicación, luego de la adsorción.

Es sabido, principalmente a partir de estudios realizados sobre células de mamíferos, que el colesterol juega un rol central en la determinación de propiedades como la fluidez y la rigidez de la membrana plasmática. También se sabe que las moléculas de colesterol tienden a agruparse en el interior de la membrana en nanodominios, y que la existencia de estos dominios puede ser relevante para que la interacción virus-célula conduzca a un ciclo de replicación productivo. A este respecto, es muy escasa la información existente sobre la distribución de las moléculas de colesterol en la membrana plasmática de las células de lepidópteros, y su importancia en la determinación de las propiedades dinámicas de la membrana. Para verificar de qué manera la presencia o ausencia de esteroides, y en particular de colesterol, afecta propiedades de la membrana plasmática de las células UFL-AG-286 que podrían ser relevantes en la determinación de la productividad de la infección viral, se analizaron los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), usando dos marcadores de espín con diferentes afinidades químicas: sondas del tipo n-SASL, de estructura similar a las cadenas de los fosfolípidos, y colestano (CSL), con estructura afín al colesterol. En paralelo, se estudió además el comportamiento de estos marcadores en membranas modelo. En ambos sistemas, los resultados obtenidos con los marcadores n-SASL muestran que la fluidez de membrana aumenta con la disminución del contenido de esteroides. Los estudios en membranas modelo también mostraron que el colesterol es más eficaz que el sitosterol en reducir la fluidez de membrana, aunque las diferencias solo pueden observarse a concentraciones de esteroles mayores que las encontradas en las células UFL-AG-286. Por otro lado, los resultados muestran que la distribución del marcador 12-SASL en las células de insecto es similar al de membranas modelo, pero la distribución de CSL en las células UFL-AG-286 difiere de la determinada en las membranas modelo, sugiriendo la existencia de pequeños dominios ricos en colesterol, no observables en las membranas artificiales o en células carentes de colesterol. Adicionalmente, cuando se extrajo el colesterol de las membranas de las células UFL-AG-286 utilizando metil- β -ciclodextrina, los cambios en la señal de EPR del marcador CSL reflejaron la desaparición o ruptura de algunos de esos dominios, recuperándose una señal resuelta análoga a la obtenida en las membranas modelo. Estos resultados sugieren fuertemente la existencia de nanodominios enriquecidos en moléculas de colesterol en la membrana plasmática de las células UFL-AG-286.

No existen evidencias directas que permitan vincular la existencia de los nanodominios enriquecidos en colesterol en la membrana plasmática con la capacidad para conducir la infección viral hasta la culminación del ciclo de replicación y la producción de progenies. Sin embargo, se puede dejar planteada una hipótesis que, sustentada en la escasa información existente sobre la interacción entre los viriones brotados de los nucleopolihedrovirus y la superficie celular, permita asimismo explicar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. GP64 es la única glicoproteína de la envoltura de los viriones brotados de los nucleopolihedrovirus del grupo I, dentro del cual se clasifica AgMNPV. Dentro de la estructura de la GP64 del virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), prototipo de los nucleopolihedrovirus del grupo I, se ha descrito la presencia de un sitio de unión a colesterol, y se ha propuesto que este sitio interacciona con dominios ricos en colesterol de la membrana celular. Esta interacción adsortiva conduciría a la formación de endosomas, al desnudamiento de los viriones y al ingreso del genoma viral al núcleo celular, para darle continuidad a las etapas posteriores del ciclo de replicación. El secuenciamiento de *gp64* de AgMNPV ha permitido deducir la conservación del sitio de unión a colesterol descrito en AcMNPV, y por lo tanto es posible que, en membranas donde existen dominios ricos en colesterol, los viriones de AgMNPV se adsorban sobre los mismos a través de GP64 y luego penetren en la célula por endocitosis, conduciendo a un ciclo de replicación productivo. ¿Pero qué sucede cuando no existen dominios ricos en colesterol en la membrana plasmática? Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los viriones de AgMNPV son también capaces de adsorberse sobre las membranas que carecen de los dominios de colesterol. Esta unión podría efectuarse a través de una interacción alternativa, que involucraría otros sitios de la molécula de GP64 que son ricos en residuos de aminoácidos básicos, capaces de vincularse electrostáticamente con moléculas ácidas de la superficie celular, como los proteoglicanos. Este tipo de interacción inespecífica ha sido descrita entre viriones brotados de baculovirus y células de mamíferos, pero hasta el momento no ha sido demostrado como un mecanismo de adsorción alternativo en células de insectos lepidópteros. Es interesante remarcar que, en células de mamíferos, este tipo de interacción no conduce a una endocitosis adsortiva sino a vías alternativas de internalización, como la fagocitosis, que no conducirían al genoma viral hasta el núcleo. Si esta forma de relación alternativa es operativa en células de lepidópteros, y particularmente en las células UFL-AG-286, resulta comprensible que, a pesar de existir unión viral sobre la superficie celular, el ciclo de replicación aborta prematuramente cuando los viriones son internalizados a una vía muerta.

En conclusión, una línea de células de insecto lepidóptero ha podido adaptarse a diversos medios de cultivo libres de componentes de origen animal, el primero con estas características para la línea celular UFL-AG-286, demostrándose además que ésta puede sobrevivir y proliferar en un medio libre de esteroides. Sin embargo, el colesterol es esencial para que las células puedan replicar un

baculovirus, y no puede reemplazarse por un esteroil vegetal. A través del análisis de los espectros de resonancia paramagnética electrónica, utilizando marcadores con afinidad estructural por ácidos grasos o colesterol, se han obtenido fuertes evidencias a favor de la distribución de las moléculas de colesterol de la membrana plasmática en dominios discretos, los cuales podrían estar involucrados en los procesos de adsorción e internalización virales que conducen a un ciclo de replicación completo, a la síntesis de progenies virales y al daño y muerte celulares. Por otro lado, se ha demostrado que las células que carecen de esteroides, o en las cuales el colesterol ha sido reemplazado por un esteroil vegetal, pueden adsorber igualmente viriones por una vía independiente de colesterol, pero ésta conduciría precozmente al aborto del ciclo de replicación, a la continuidad de la supervivencia y proliferación celular y a la falta de producción de progenies virales.

Summary

Sterols are essential components in all eukaryotic cells, where they play a major role in the structure of the membranes, also contributing to the regulation of their functionality. While there is abundant information on the requirements and roles of sterols in mammalian cells, the same does not occur in insect cells, where knowledge is scarce and contradictory. The objective of this thesis was to contribute to the elucidation of the qualitative and quantitative demands of sterols in lepidopteran insect cells, to analyze their role in the determination of the structural and functional properties of the plasma membrane, as well as to assess the importance of these properties, determined by sterols, in the infection and replication process of insect-specific viruses. For this purpose, the cell line UFL-AG-286, which was established from embryonic tissues of the insect *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae), was used as an experimental model. This cell line is the preferential host for the infection and *in vitro* replication of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), the biological control agent of agricultural pests that has been used on a larger scale throughout the world. In this thesis AgMNPV was used as a model for baculovirus infection experiments.

Lepidopteran insects are fundamentally phytophagous that obtain all their nutrients from the plants they ingest. However, almost all media formulated for the *in vitro* culture of lepidopteran cells have components of animal origin, including the sources of peptides, lipids and sterols. In order to obtain a medium whose composition could emulate *in vitro* the conditions under which lepidopteran insects feed in its natural environment, a new formulation free of nutrients of animal origin was developed for the cell line UFL-AG-286. In this new medium, the components of animal origin were replaced by nutrients obtained from soybean, which is an abundant and cheap source of lipids and protein derivatives, and also one of the favorite foods of *Anticarsia gemmatalis*. In this way, animal protein hydrolyzates were replaced by an enzymatic hydrolyzate of soy protein (soybean peptone III), while an emulsion of soybean oil was employed as the main source of fatty acids.

The new medium was used as a basis to study the qualitative and quantitative requirements of sterols of the cell line UFL-AG-286. For this purpose, three different sub-lines were obtained by gradual adaptation to the new medium, one in the absence of any supplementation with sterols, the second supplemented with cholesterol, and the third with beta-sitosterol, the most abundant plant sterol in the soy oil. The sub-lines adapted under these conditions were cultivated by more than 200 successive passages, at the end of which they presented similar kinetics of proliferation, nutrient consumption and production of catabolites, although the size of the cells adapted in the medium containing cholesterol was significantly higher than that of cells that were cultured in the sterol-free media or containing beta-sitosterol. These results allow us to conclude that the demand for sterols to

cover the cellular needs linked to survival and proliferation are minimal, and that they can be met by a plant sterol in replacement of cholesterol. However, when the ability of the three sub-lines to replicate AgMNPV in infected cultures was tested, it was observed that the virus only replicated in the cells cultured in medium supplemented with cholesterol, giving yields of the two viral progenies - budded viruses and occlusion bodies - comparable with those achieved in media supplemented with nutrients of animal origin. The cultures infected in the media without sterols or supplemented with beta-sitosterol only showed evidence of cytopathic effect in a very small percentage of isolated cells, and showed no inhibition of cellular proliferation. These results indicate that it is possible to achieve high viral yields in a medium free of animal components, provided that it is supplemented with cholesterol, and therefore that this nutrient is essential for the replication of AgMNPV in UFL-AG-286 cells. The impossibility of replacing cholesterol with beta-sitosterol in infected cultures, despite the close structural similarity between both molecules, suggests that the cellular and viral functions that must be expressed to complete the replication cycle are subtly dependent on conservation of the chemical structure of the sterol molecule. On the other hand, the almost total absence of both cytopathic effect and growth retardation of the infected cultures without cholesterol suggest that viral replication is blocked at an early stage of the cycle, prior to the expression of the mechanisms of damage that lead to manifestations of cytopathic effect and cell death associated with a permissive infection.

The suspicion of an early blockade of the viral replication in the absence of cholesterol, added to its importance in the structure and function of the plasma membrane, and the direct involvement of this membrane in the virus adsorption, the initial stage of the replication cycle, led us to formulate as a hypothesis that the blockade could lie at that level. In order to verify if the viral binding to the cell was affected by the type and content of sterol, an evaluation of the binding kinetics of AgMNPV was carried out on UFL-AG-286 cells adapted to the three culture media. Surprisingly, the virus was able to bind to the cells in all cases, regardless of the type and content of sterol present in the cells and in the medium, with only minimal differences in the kinetics and in the final magnitude of the viral binding. These results allow us to conclude that AgMNPV can be adsorbed on UFL-AG-286 cells in the absence of cholesterol, although in a slightly less efficient way, and that the blocking of replication, under these conditions, would not occur at the level of viral adsorption on the plasma membrane. However, given that this membrane also participates actively in the subsequent stage of the cycle -internalization- it cannot be ruled out that the presence or absence of cholesterol could determine modifications of structural and functional properties of the plasma membrane that affect the viral transit and the continuity of the replication cycle.

It is known, mainly from studies carried out on mammalian cells, that cholesterol plays a central role in the determination of properties of the plasma membrane such as fluidity and rigidity. It is also known that cholesterol molecules tend to cluster in the interior of the membrane in micro- or

nanodomains, and that the existence of these domains may be relevant for the virus-cell interaction to lead to a productive replication cycle. In this regard, there is very little information available on the distribution of cholesterol molecules in the plasma membrane of lepidopteran cells, and their importance in determining the dynamic properties of the membrane. To verify in which way the presence or absence of sterols, and in particular of cholesterol, affects properties of the plasma membrane of UFL-Ag-286 cells that could be relevant in determining the productivity of viral infection, Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectra were obtained. To do that, two spin labels with different chemical affinities were used: n-SASL type probes, similar in structure to the phospholipid chains, and cholestane (CSL), with a structure similar to cholesterol. In parallel, the behavior of these labels in artificial model membranes was also studied. In both systems, the results obtained with n-SASL labels show that membrane fluidity increases with the decrease of the sterol content. Studies in model membranes also showed that cholesterol is more effective than sitosterol in reducing membrane fluidity, although differences can only be observed at higher sterol concentrations than those found in UFL-AG-286 cells. On the other hand, the results show that the distribution of the 12-SASL marker in the insect cells is similar to that of the model membranes, but the distribution of CSL in the cells differs from that determined in the model membranes, suggesting the existence of small domains rich in cholesterol, not observable in artificial membranes or in cells lacking cholesterol. Additionally, when cholesterol was extracted from the membranes of UFL-AG-286 cells using methyl- β -cyclodextrin, the changes in the EPR signal of the CSL marker reflected the disappearance or rupture of these domains, recovering a resolved signal analogous to the one obtained in the model membranes. These results strongly suggest the existence of micro- or nanodomains enriched in cholesterol molecules in the plasma membrane of UFL-AG-286 cells.

There is no direct evidence to link the existence of small membrane domains enriched in cholesterol with the capacity to drive viral infection until the completion of the replication cycle and the production of progenies. However, a hypothesis can be raised that, based on the limited information available about the interaction between the budded virions and the cell surface, would also allow to explain the results obtained in this thesis. GP64 is the only envelope glycoprotein of the budded virions of group I nucleopolyhedrovirus, within which AgMNPV is classified. A cholesterol binding site has been described within the structure of GP64 of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus (AcMNPV), the prototype of group I nucleopolyhedrovirus. It has been proposed that this site interacts with cholesterol-enriched domains of the cell membrane. The adsorption to those domains would lead to the formation of endosomes, and subsequently to the uncoating of virions and entry of the viral genome into the cell nucleus, to give continuity to the later stages of the replication cycle. The sequencing of *gp64* in the genome of AgMNPV has allowed to deduce that the cholesterol-binding site is preserved, in such a manner that AgMNPV could be also

adsorbed on cholesterol-enriched domains through GP64, driving to endocytosis and to a productive replication cycle. But what happens with the viral adsorption when cholesterol is absent from the plasma membranes? The results obtained in this thesis show that AgMNPV virions are also able to bind to membranes that lack the cholesterol domains. This binding could be explained through an alternative interaction, which would involve other sites of the GP64 molecule that are rich in basic amino acid residues capable of being electrostatically linked with acidic molecules of the cell surface, such as proteoglycans. This type of non-specific interaction has been described between budded virions of baculoviruses and mammalian cells, but so far it has not been demonstrated as an alternative adsorption mechanism on lepidopteran insect cells. It is interesting to note that, in mammalian cells, this type of interaction does not lead to endocytosis but to alternative internalization pathways, such as phagocytosis, that would not lead to the viral genome to the nucleus. If this form of alternative relationship is operative in lepidopteran cells, and particularly in UFL-AG-286 cells, it is understandable that, despite the existence of viral binding on the cell surface, the replication cycle aborts prematurely when the virions are internalized to a dead way.

In conclusion, a lepidopteran insect cell line has been successfully adapted to different culture media free of components of animal origin, the first ones with these characteristics developed specifically for the cell line UFL-AG-286. It has been demonstrated that UFL-AG-286 cells can survive and proliferate in a cholesterol-free medium. However, cholesterol is essential for cells to replicate the AgMNPV baculovirus, and cannot be replaced by a plant sterol. Through the analysis of the electron paramagnetic resonance spectra, using labels with structural affinity for fatty acids or cholesterol, strong evidence has been obtained in favor of the distribution of cholesterol molecules in the plasma membrane in discrete domains, which could be involved in the processes of viral adsorption and internalization that lead to a complete replication cycle, to the synthesis of viral progenies and to cellular damage and death. On the other hand, it has been shown that cells lacking sterols, or in which cholesterol has been replaced by a plant sterol, can also adsorb virions via a cholesterol-independent route, but this would lead early to the replication cycle abortion, to the continuity of cell survival and proliferation, and to the lack of production of viral progenies.

Introducción

Aquí se exponen los contenidos previamente aceptados que se utilizan en el planteo de la hipótesis, en el desarrollo e interpretación de los resultados experimentales y en las conclusiones alcanzadas en esta tesis.

Al ser un trabajo interdisciplinario se relacionan contenidos de las áreas de virología y de biofísica. En primer lugar se exponen las líneas celulares generalmente empleadas para la producción de baculovirus, analizando en particular la UFL-G-286 utilizada en esta tesis. Los medios de cultivo históricamente empleados, las modificaciones propuestas y su efecto sobre la infección viral. Desde otro punto de vista, se analiza a nivel molecular la composición de la membrana plasmática de las células eucariotas, en particular la organización de los lípidos y su posible efecto sobre la infección viral. Se explica además la técnica de EPR como metodología para evaluar el orden dinámico de los lípidos de membrana.

En este contexto, se plantea la hipótesis de trabajo y su justificación.

1. Introducción

1.1 Cultivos de células de insectos

1.1.1 Líneas establecidas de células de lepidópteros

Ross Granville Harrison, biólogo y anatomista estadounidense, fue quien realizó los primeros esfuerzos en establecer cultivos *in vitro* de células de vertebrados en 1902. Su metodología de trabajo impulsó las investigaciones de Goldschmidt y de Glaser, pioneros en el cultivo de tejidos y de células de insectos [1]. Estos investigadores empleaban 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 *Antherae eucalypti*, utilizando similar al empleado por Wyatt. Posteriormente, se observó que estas células podían ser mantenidas un medio de cultivo en un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino en reemplazo de la tradicional hemolinfa [2]. Actualmente, existen cientos de líneas celulares establecidas, la mayoría de ellas pertenecientes a los órdenes Díptera y Lepidóptera.

Las primeras líneas de células de insectos fueron establecidas con el propósito de aplicarlas al estudio de la fisiología de los insectos, como así también para amplificar virus *in vitro*, principalmente para utilizarlos como agentes de control de plagas agrícolas, y estudiar su replicación. Posteriormente, a partir de la década de 1980, la irrupción de la tecnología de expresión de proteínas recombinantes en baculovirus impulsó nuevos desarrollos tecnológicos en el cultivo de células de insectos, como el diseño de nuevos medios de cultivo libres de suero [3,4], los cultivos en suspensión de alta densidad, el incremento de la productividad basado en la optimización de las condiciones de cultivo y la composición de los medios, y el desarrollo de líneas celulares modificadas genéticamente para expresar nuevas funciones, entre otros.

Actualmente, además de miles de proteínas recombinantes utilizadas con los más diversos propósitos (vacunas, diagnóstico de laboratorio, investigación, etc.), el sistema baculovirus – células de insecto se ha convertido en una plataforma tecnológica para la producción de partículas pseudovirales (VLPs) utilizadas como vacunas, y se encuentran en desarrollo nuevas aplicaciones de estos virus en terapia génica.

1.1.2 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 (Lepidóptera: Noctuidae) [5]. El cultivo primario se estableció utilizando TC-100, como medio de cultivo base, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 50 mg.L⁻¹ de gentamicina. La melanización de las células se previno incorporando una solución 0,1 M de cisteína. La suspensión celular fue colocada en una botella de cultivo de 25 cm² y 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 su caracterización. Así se determinó que un cultivo estático tenía que tener un inóculo celular inicial mínimo de 2x10⁵ 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 (3x10⁵ células viables.mL⁻¹ y 2x10⁵ 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 *Blatella germanica* (120 horas), pero mayores a los reportados para la línea celular IPLB-Sf-21 (entre 26 y 30 horas) [5].

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 *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) o con *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) [6]; sin embargo, por otro lado, era semipermisiva a la infección con *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) [7]. 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) [8].

El reconocimiento que UFL-AG-286 podría ser un sustrato celular promisorio para la producción de poliedros de AgMNPV, un virus utilizado a gran escala para el control de la oruga de las leguminosas, una plaga principal de los cultivos de soja en Brasil, impulsó el desarrollo de un proceso de producción de AgMNPV en esa línea celular. En una primera etapa se realizó la selección de una sub-población de la línea celular UFL-AG-286 (saUFL-AG-286), capaz de proliferar en forma de células aisladas en cultivos en suspensión. Se determinaron los parámetros cinéticos, se evaluó la

susceptibilidad de estas células a la infección con AgMNPV y se caracterizaron los principales requerimientos nutricionales y propiedades metabólicas [9]. La información obtenida se utilizó para diseñar un nuevo medio de cultivo básico (UNL). Además, se identificaron dos hidrolizados proteicos y un extracto de levadura capaces de estimular la proliferación en los cultivos de saUFL-AG-286. Las células infectadas con AgMNPV en este medio, produjeron poliedros virales con rendimientos superiores a los alcanzados en el medio TC-100. La posterior suplementación con una emulsión comercial de lípidos y esteroides permitió obtener un medio totalmente libre de suero. El cloruro de colina y la emulsión de lípidos y esteroides fueron los nutrientes identificados como principales limitantes de la proliferación de las células saUFL-AG-286 y de la producción de poliedros de AgMNPV, respectivamente. El medio libre de suero optimizado fue denominado UNL-10. Los poliedros de AgMNPV producidos en los cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-10 fueron activos sobre larvas de la oruga de las leguminosas.

1.2 Medios de cultivo para líneas de células de insecto

Como fue mencionado, Goldschmidt en 1915 y Glaser en 1917 fueron quienes, por primera vez, desarrollaron un medio de cultivo *in vitro* de células de insectos que dependía exclusivamente de los fluidos corporales de insectos [1].

Recién en el año 1956, con el conocimiento de la composición de la hemolinfa de *Bombyx mori*, Wyatt y colaboradores formularon un medio de cultivo sintético que 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 [10].

Grace modificó el medio de cultivo formulado por Wyatt adicionándole vitaminas del complejo B y este nuevo medio, suplementado también con hemolinfa calentada, le permitió establecer la primera línea celular de invertebrados derivada de tejidos de ovarios de *Antheraea eucalypti* [11].

En 1970 Hink modificó el medio de cultivo original formulado por Grace reemplazando la hemolinfa por una combinación de lactoalbúmina, extracto de levadura y suero fetal bovino como suplementos del medio denominado TNM-FH. Por otro lado, Mitsuhashi y Maramorosch ya habían experimentado 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 [12].

Una nueva modificación del medio de cultivo Grace dio origen al medio TC-100, en el que se eliminaron los ácidos orgánicos y como única fuente de carbono se utilizó a la glucosa. En sus comienzos fue denominado como BML-TC/10 [13]. El mismo fue diseñado y optimizado para la

producción de AcMNPV en cultivos celulares derivados de *Spodoptera frugiperda*. 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 [14]. Básicamente, este medio de cultivo difiere del medio Grace original en cuanto a su mayor concentración de aminoácidos y vitaminas [15].

El empleo de hemolinfa o de suero fetal bovino para suplementar los medios de cultivo básicos es una importante limitación para el aumento en escala de los procesos de producción que hacen uso de los cultivos de células de insectos. Para sortear las desventajas que conlleva el uso de suero, Röder utilizó como suplemento una emulsión de yema de huevo [16]. Posteriormente, Inlow y colaboradores, 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 emulsión lipídica [17]. 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.

1.2.1 Medios de cultivo básicos para células de insectos

Los requerimientos nutricionales de la línea celular, antes y después de ser infectadas, determinan tanto el mantenimiento y proliferación celular como la replicación viral.

Los compuestos presentes generalmente en un medio de cultivo básico para células de insectos son:

Hidratos de carbono, que constituyen la principal fuente de energía. Los medios generalmente contienen mezclas de hidratos de carbono esenciales para cada línea. Por ejemplo, el medio de cultivo TNM-FH contiene glucosa, fructosa y sacarosa y el medio IPL-41 contiene maltosa en lugar de fructosa.

Aminoácidos, que forman parte de la estructura primaria de las proteínas celulares o son utilizados como fuentes de energía, como es el caso de la glutamina. Hay 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 [18,19]. Según estudios llevados a cabo por Mitsuhashi, 15 son los aminoácidos esenciales para el cultivo de células de insectos, arginina, cistina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano,

tirosina y valina [20]. 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 [21].

Vitaminas, que son esenciales para la proliferación celular y el mantenimiento de la viabilidad celular. La colina, la biotina y el inositol, actúan como factores promotores del crecimiento de distintas líneas celulares de insectos [20].

Ácidos orgánicos, tales como el ácido succínico, el ácido málico, el ácido fumárico y el ácido α -cetoglutárico forman parte de la formulación de medios de cultivo como Grace e IPL-41. 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 [22]. 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 [18].

Sales inorgánicas, como el potasio y el sodio, que cumplen funciones en la regulación de la presión osmótica, el pH y posibilitan el mantenimiento de los potenciales de membrana; el calcio y el magnesio, que intervienen como co-factores en las reacciones enzimáticas y en la adhesión de las células al soporte cuando se cultivan en monocapa; el bicarbonato que actúa como buffer, y trazas de iones metálicos como hierro, cobre, manganeso, cobalto, zinc y molibdeno, que actúan como co-factores enzimáticos en distintas reacciones bioquímicas [20,23].

1.2.2 Medios de cultivo suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB)

El SFB es una mezcla compleja que le aporta al medio de cultivo hormonas, factores de adhesión, proteínas transportadoras, lípidos y minerales, que por lo general no están presentes en la formulación de un medio de cultivo básico [18,24,25]. Su composición favorece 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 [25]. Hild y colaboradores 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 [26]. 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 [20]. Si bien, su utilización como suplemento presenta innegables ventajas, también trae aparejada una serie de inconvenientes, tales como riesgos de contaminación con hongos, bacterias, virus y priones, elevado costo, composición

indefinida, variabilidad de lote a lote y complejidad en los procesos de purificación de los productos de síntesis debida a la elevada concentración de proteínas que contiene el suero [27,28].

1.2.3 Medios de cultivo libres de suero

Desde hace algunos años se está trabajando en el diseño de medios de cultivo libres de SFB debido a los inconvenientes que ocasiona el uso de este suplemento.

En general, un medio de cultivo libre de suero contiene un medio básico, enriquecido con una mezcla de hidrolizados proteicos (fuente de aminoácidos o de una mezcla de di-péptidos, tri-péptidos y péptidos de mayor tamaño), extractos naturales, y una emulsión de lípidos y esterolés.

Los *hidrolizados proteicos* son obtenidos a partir de la digestión ácida o enzimática de distintos sustratos como proteínas de la leche (hidrolizado de lactoalbúmina, suero lácteo), proteínas de carne (Primate RL) y proteínas de soja [29,30]. Los dos primeros, hidrolizados de origen animal, traen aparejado inconvenientes como la potencial contaminación con micoplasmas y priones.

El *extracto de levadura*, es el producto de una digestión autolítica de levaduras, que provee aminoácidos, vitaminas, ergosterol, nucleótidos y otros nutrientes esenciales. El ultrafiltrado de levadura, contiene pequeños péptidos, que podrían ser los que actúan como factores de crecimiento en cultivos.

Y en cuanto a *los lípidos y esterolés*, dada su naturaleza hidrofóbica, su incorporación a los medios de cultivo de base acuosa ha sido un problema a superar. En los medios suplementados con suero, éste actúa como fuente natural de estos compuestos a través de la actividad de sus proteínas transportadoras de lípidos y esterolés. Sin embargo, cuando se utilizan medios libres de suero se debe recurrir a la preparación de *emulsiones* conteniendo ácidos grasos, esterolés, vitaminas liposolubles y fosfolípidos, en condiciones tales que aseguren su disponibilidad para las células en cultivo.

En el año 1982, como mencionamos, 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 [16]. Maiorella y colaboradores diseñaron una microemulsión constituida por ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao, Tween-80, colesterol y acetato de tocoferol; todos disueltos en etanol y luego emulsionados en Pluronic F-68 [31]. Claus y colaboradores 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 [32].

Los inconvenientes más importantes que se han observado como consecuencia de la eliminación del suero como suplemento radican en el incremento de la fragilidad celular, que se puede superar incorporando agentes tensoactivos como el polialcohol Pluronic F-68, el aumento de la sensibilidad celular a las bajas temperaturas, y la disminución de la proliferación celular, de la replicación viral y de la producción de proteínas recombinantes.

1.2.4 Medios de cultivo sin contenido de origen animal

El riesgo de transmisión de organismos no convencionales, como los priones, a través de materias primas de origen animal, impulsa el desarrollo de una nueva generación de medios de cultivo para células animales que han reemplazado, además de los sueros, todos sus componentes de ese origen por sustituyentes obtenidos por síntesis química, de origen vegetal o de origen microbiano. En caso de que estos medios requieran la presencia de proteínas, éstas deben ser de origen recombinante. Existen numerosos medios de este tipo que han sido desarrollados y están disponibles comercialmente para el cultivo de las principales líneas establecidas de células de mamíferos utilizadas en procesos de manufactura industrial de biofármacos y vacunas. En cambio, existen muy pocos antecedentes acerca del desarrollo de medios libres de componentes de origen animal desarrollados para cultivar líneas de células insectos lepidópteros, y casi todos han sido formulados para satisfacer los requerimientos de dos líneas establecidas, Sf9 y High 5. No existen antecedentes de cultivo de la línea celular UFL-Ag-286 en un medio de estas características.

1.3 Baculovirus

1.3.1 Características generales

La familia *Baculoviridae* agrupa a un conjunto de virus envueltos, con forma de bastón o báculo, que presentan un genoma de DNA doble cadena, circular, súper-enrollado, cuyo tamaño varía entre 80 y 230 kilo pares de bases (kpb) y codifica entre 90 y 180 genes [33–35]. Los baculovirus infectan específicamente animales artrópodos.

Los baculovirus se caracterizan por producir dos tipos de viriones con diferente fenotipo pero idéntico genotipo: los viriones brotados (BVs) y los viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), que quedan contenidos en el interior de una matriz proteica que los protege de las condiciones ambientales formando los cuerpos de oclusión (OBs). Estas progenies virales cumplen roles diferentes durante el ciclo biológico del virus [35].

1.3.2 Taxonomía

Desde la revisión taxonómica de Jehle y col. (2006), de acuerdo a las secuencias de los genomas y sus relaciones filogenéticas, se reconocen cuatro géneros dentro de la familia *Baculoviridae*: los *Alphabaculovirus* (*Nucleopolyhedrovirus*, NPVs de lepidópteros), los *Betabaculovirus* (*Granulovirus*, GV de lepidópteros), los *Gammabaculovirus* (NPVs de himenópteros) y los *Deltabaculovirus* (NPVs de dípteros) (Figura 1).

El género *Alphabaculovirus* incluye a todos los virus de poliedrosis nuclear específicos de lepidópteros. Sus miembros producen ambas progenies virales, tanto viriones brotados como viriones ocluidos, y el tamaño del genoma oscila entre 100 y 180 kpb. La especie tipo es *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV).

El género *Betabaculovirus* incluye a los anteriormente denominados *Granulovirus*, que infectan sólo lepidópteros. Comparten con los *Alphabaculovirus* la característica de producir viriones brotados y viriones ocluidos en su ciclo replicativo, y el tamaño de su genoma, que puede oscilar entre 100 y 180 kpb. La especie tipo propuesta es el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV).

El género *Gammabaculovirus* incluye a los *Nucleopolyhedrovirus* aislados de himenópteros. Presentan poliedros de 0,4 - 1,1 μm de diámetro, con una sola nucleocápside por virión. Los genomas de NeleNPV (*Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus*) y de NeseNPV (*Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus*) tienen un tamaño de 82 y 86 kpb, respectivamente. El fenotipo brotante no se ha identificado entre los virus de este grupo. La especie tipo es *Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus* (NeleNPV).

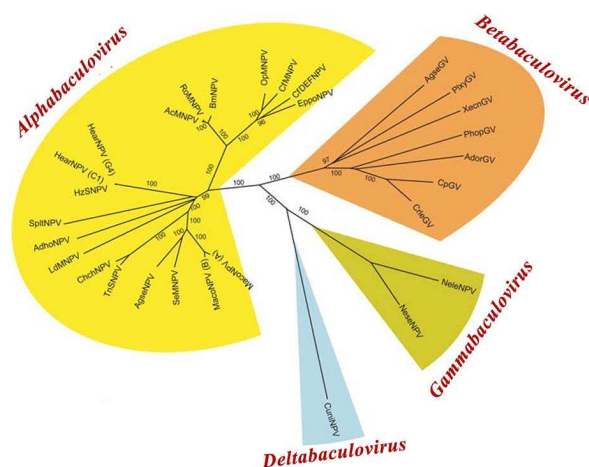


Figura 1. Árbol filogenético con géneros y especies incluidas en la Familia *Baculoviridae* (modificada de Jehle y col., 2006) [36].

El género *Deltabaculovirus* incluye a *Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus* (CuniNPV), la especie tipo, y otros baculovirus específicos de dípteros. En su ciclo natural se han encontrado tanto viriones brotados como viriones ocluidos. CuniNPV presenta cuerpos de oclusión de forma globular, de unos 400 nm de diámetro, cuya proteína constituyente no es homóloga a poliedrina ni a granulina.

1.3.3 Estructura de viriones brotados, viriones derivados de cuerpos de oclusión, y cuerpos de oclusión

El genoma viral súper-enrollado y condensado está empaquetado dentro de una cápside cilíndrica tapada en ambos extremos, proporcional al tamaño del genoma. El diámetro de dicha cápside se encuentra comprendido entre 40 y 60 nm, su longitud entre 230 y 285 nm y su estructura consiste en una serie de anillos apilados que le confieren su forma cilíndrica. Cada anillo está formado por un número constante de sub-unidades proteicas y entre anillos hay una separación de aproximadamente 4,5 nm [33,35,37]. La proteína principal de la cápside es la proteína VP39 [38], y posee homólogos en todos los genomas de baculovirus. Entre otros componentes de la cápside se han descrito la proteína básica P6,9 [39], la proteína P24 [40], la proteína P80 [41] y la fosfoproteína PP78/83 [42], además de otros componentes minoritarios, pero funcionalmente relevantes.

En el interior de la cápside viral, se encuentra el DNA genómico de doble cadena que está asociado íntimamente a la proteína P6,9, proteína que neutraliza los residuos ácidos del DNA viral y permite su compactación. Los genomas de baculovirus que han sido secuenciados hasta el presente contienen entre 140 y 180 marcos abiertos de lectura. La adquisición de distintas envolturas permite que las nucleocápsides se diferencien en dos tipos diferentes de viriones envueltos (Figura 2):

- a) Viriones brotados (BVs), cuando las nucleocápsides brotan a través de la membrana plasmática de la célula huésped y adquieren allí su envoltura. Son los responsables de diseminar la infección de célula a célula tanto en tejidos y órganos del insecto huésped como en cultivos celulares.
- b) Viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), formados a partir de nucleocápsides que permanecen en el núcleo de la célula infectada y adquieren una envoltura que, según algunos autores es a partir de su síntesis *de novo* [43], mientras que otros sostienen que el origen de la envoltura está asociado a la formación de microvesículas a partir de invaginaciones de la membrana nuclear interna [44].

En síntesis, estas progenies virales tienen en común la nucleocápside y difieren en el origen de su envoltura.

Los BVs contienen una sola nucleocápside por virión y su envoltura, que como mencionamos la obtienen por brotación de la membrana plasmática de la célula infectada, presenta dos proteínas mayoritarias: la glicoproteína GP64 con actividad fusogénica y la proteína de fusión F [45,46]. En el

género *Alphabaculovirus* se distinguen dos grupos principales, el Grupo I y el Grupo II, según el contenido de genes que codifican a proteínas de fusión de su envoltura. El Grupo I se vale de la GP64 como su proteína estructural de fusión, mientras que los virus del Grupo II, al carecer de homólogos de gp64, utilizan una proteína de fusión diferente, la proteína F. En el Grupo I, la proteína F está presente, pero se mantiene inactiva. Hay otros 11 genes además de gp64 que parecen ser encontrados sólo en el Grupo I [35]. GP64 se ubica en un extremo del virión, al que se denomina “peplómero”, que coincide con el ápice de la nucleocápside. La forma de penetración de los BVs en la célula huésped está relacionada con el origen y la composición proteica de su envoltura. 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 [47,48].

Al final del ciclo de replicación, los viriones que permanecen en las células infectadas quedan incluidos dentro de una matriz proteica que es sintetizada en la propia célula, formada por una proteína codificada en el genoma viral, que de acuerdo al género de baculovirus recibe la denominación de poliedrina o granulina, la primera en los *Alphabaculovirus* y la segunda en los *Betabaculovirus*. Esta proteína cristaliza formando los cuerpos de oclusión (OBs), con forma de gránulo o de poliedro irregular, que encierran uno (viriones simples) o más viriones ocluidos (viriones múltiples), 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. Estas características le confieren a los OBs capacidad de resistencia y persistencia en el medio ambiente. En el intestino de algunos insectos las condiciones alcalinas (pH: 9 - 11) permiten solubilizarlo, facilitándose la liberación de los ODVs que comienzan la infección en el insecto huésped [33]. En consecuencia los ODVs 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, está presente en la membrana de los ODVs y ausente en los BVs, es la responsable de la unión y la fusión de las membranas del virión a la célula huésped [49]. Entre la nucleocápside y la membrana de estos viriones existe una zona, que fue denominada tegumento, donde se ubica la glicoproteína GP41 cuya función aún es desconocida [50].

Los viriones ocluidos dentro de la matriz proteica del OB poseen una envoltura constituida por diversas proteínas designadas como ODV-E, aunque se sugirió que la ODV-E66 en AcMNPV (Ac46) es un “per os infectivity factor”, PIF, proteínas encontradas en la envoltura que rodea a los ODV y se asocian a la infección de los insectos por vía oral [51]. Se identificaron numerosos genes *pif* en AcMNPV, que incluyen los denominados *p74-pif* (Ac138), Ac 22 (*pif-2*), Ac115 (*pif-3*), Ac96 (*pif-4*), Ac119 (*pif-1*), Ac148 (ODV-E56, *pif-5*), Ac68 (*pif-6*), y Ac83 [35].

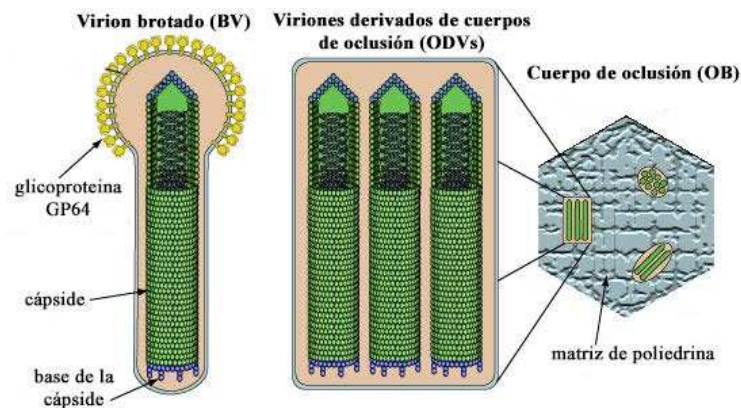


Figura 2. Estructuras de las progenies virales de la familia Baculoviridae. (Modificada de Swiss Institute of Bioinformatics, 2008). Izquierda: estructura de los viriones brotados (BV) con su característica envoltura, en la parte apical se encuentra la glicoproteína mayoritaria, GP64. Derecha: esquema de un cuerpo de oclusión (OB), "paquete" de viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), embebidos en una matriz de poliedrina.

1.3.4 Ciclo natural

El ciclo natural de infección de los *Alphabaculovirus* y *Betabaculovirus* comienza cuando los cuerpos de oclusión son ingeridos al alimentarse por las larvas de un insecto lepidóptero susceptible, continúa con la diseminación del virus dentro del insecto y finaliza con la muerte y licuación del huésped que libera nuevos cuerpos de oclusión al medio ambiente. El ciclo biológico de los *Alphabaculovirus* se encuentra esquematizado en la Figura 3 [35].

Las larvas, que son el estadio más susceptible del lepidóptero, se infectan al ingerir los OBs presentes como contaminantes en su alimento (A). Dichos OBs son rápidamente disueltos al alcanzar el intestino medio del insecto, dada la elevada alcalinidad de los jugos intestinales ($\text{pH} > 9,5$) y la acción de proteasas alcalinas. Una vez liberados, los ODVs se unen a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante la fusión a sus membranas, y las nucleocápsides contenidas en su interior penetran en el citosol. En esta etapa las proteínas presentes en la envoltura del ODV, las P74 y pifs, juegan un rol importante en la fusión a las células del intestino medio [52]. Las nucleocápsides liberadas se dirigen al núcleo celular, inyectando el DNA viral desnudo a través de los poros nucleares (B). El núcleo se hipertrofia y se inicia la expresión y replicación del material genético con formación de nuevas nucleocápsides que salen del núcleo por brotación, adquiriendo una envoltura de dicha membrana. Las nucleocápsides formadas son transportadas a la membrana celular, desde donde emergen a través de la membrana basal como BVs (C). 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.

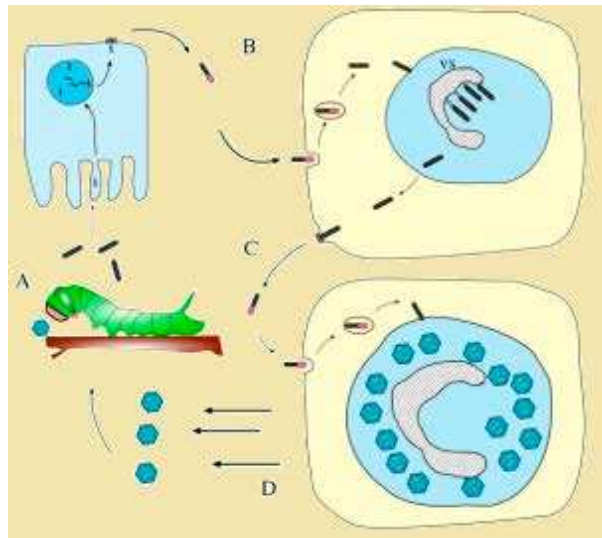


Figura 3. Ciclo natural del baculovirus que produce infección sistémica. Los cuerpos de oclusión ingeridos por la larva del insecto se disuelven en la luz intestinal, liberan los viriones derivados del cuerpo de oclusión que luego infectan las células epiteliales del intestino medio (A). El virión brota de la célula en una dirección basal e inicia una infección sistémica (B). Al principio de la infección sistémica se producen más BVs que propagan la infección a través del insecto (C). En la infección tardía se producen viriones ocluidos y la célula muere liberando los cuerpos de oclusión (D). (modificada de Rohrmann, 2013) [35].

Finalizada la etapa de infección primaria, comienza la diseminación de los BVs hacia las células vecinas o de otros tejidos (D), etapa de infección secundaria. Mientras la penetración de los ODVs en las células del epitelio intestinal se produce por fusión de membranas, los BVs, producto de la infección primaria, penetran a las células mediante endocitosis mediada por receptores (interacción de GP64/F con receptores de la superficie celular). Durante el proceso de infección secundaria se produce una abundante progenie de ODVs que quedan confinados en el núcleo celular, atrapados en la matriz proteica de poliedrina, formando los OBs. Las larvas de los lepidópteros infectadas por los baculovirus muestran signos visibles de la infección tales como un cambio gradual de color, reducción del apetito, cese de la alimentación y, previo a su muerte, en muchos casos se desplazan a la parte aérea de las plantas donde mueren colgadas de sus propatas anales. Finalmente, el insecto muere, se licúa y libera los OBs, que dan origen a un nuevo ciclo de infección [53,54].

1.3.5 Ciclo de replicación

A diferencia de lo que ocurre en la infección natural, el ciclo de infección en cultivos celulares comienza por la adsorción de los BVs a la superficie celular. Los BVs entran por endocitosis mediada por receptor y se fusionan con la membrana del endosoma liberando las nucleocápsidas al citosol. Esta vía de ingreso depende de la GP64 viral, que actúa como anti-receptor y responsable de la fusión mediada por pH [55]. Los receptores celulares para GP64 o sus análogos aún no se han identificado. Sin embargo, investigaciones han sugerido que tanto en las células de insectos como en

las de vertebrados, la entrada viral es mediada por GP64 a través endocitosis mediada por clatrina [56]. Otras investigaciones han obtenido evidencias que indican que en la endocitosis de AcMNPV en la membrana plasmática de células de mamíferos estaría implicada dinamina, además de clatrina [57] y colesterol [58]. Se ha sugerido que las formas transitorias de GP64 desencadenan endocitosis independiente de moléculas receptoras específicas [59]. Esta falta de receptores específicos y la afinidad de GP64 por las membranas celulares podrían explicar su capacidad para facilitar la entrada de AcMNPV en una amplia variedad de diferentes tipos de células. Luego de la unión viral a los receptores situados en la superficie de las estructuras revestidas con clatrina, la membrana se invagina en el citoplasma de la célula, formando un endosoma. Éste, a continuación se acidifica, proceso que dispara la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma y la consecuente liberación de la nucleocápside hacia el citosol. Una vez que las nucleocápsides se liberan desde las vesículas endocíticas al citoplasma, filamentos polimerizados de F-actina inducidos por la infección vehiculizan su transporte al núcleo [35,60], donde penetran a través de los poros nucleares, se desnudan y exponen el genoma viral que queda en condiciones de expresarse, replicarse y ensamblarse en nuevas nucleocápsides [61].

La infección de cultivos de células de insectos lepidópteros con AcMNPV resultó un modelo adecuado para el estudio de la transcripción del genoma de los baculovirus [42].

La expresión de los genes virales ocurre de manera secuencial, en forma de cascada en la que se distinguen tres fases principales: fase temprana que es anterior a la replicación del DNA viral, fase tardía y fase muy tardía. Cada fase requiere de la transcripción de genes de las fases anteriores. Haciendo una breve descripción, las fases se pueden resumir en:

- Fase temprana: 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 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. Para el virus prototipo AcMNPV, esta fase se extiende hasta unas 6 u 8 horas post-infección [62].

- Fase tardía: la replicación del DNA parece ser una condición para el comienzo de la expresión de los genes tardíos de los baculovirus. 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 [63,64]. 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 [62], y durante la misma se produce una acumulación exponencial de virus brotado en el medio de cultivo sobrenadante.

- Fase muy tardía: 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 [35,62]. Finalmente, a partir de las 72 horas post-infección, se inicia el proceso de lisis celular y, en consecuencia, la liberación de los cuerpos de oclusión al medio de cultivo [61].

1.3.6 Aplicaciones biotecnológicas

Entre las aplicaciones tecnológicas más relevantes de los baculovirus se deben mencionar el control biológico de plagas agrícolas, la producción de proteínas recombinantes y la vehiculización génica.

1.3.6.1 Uso de baculovirus en el control biológico de plagas

Los baculovirus actúan exclusivamente sobre insectos, con una elevada especificidad sobre el organismo blanco, y por lo tanto no afectan a aquellos que son depredadores de las plagas, o a otros benéficos como las abejas. Otra característica que se destaca para su utilización como pesticidas es su persistencia en el medio ambiente, lo que posibilita su acción como un factor regulador de las poblaciones del insecto huésped. Sin embargo, su uso como agentes de control de plagas presenta también algunas limitaciones, como la inactivación por agentes ambientales (lluvia, radiación UV), a pesar de su resistencia, y desventajas comerciales, como su elevada especificidad que condiciona la amplitud del espectro de acción de estos plaguicidas. Por otro lado, los métodos de producción en larvas infectadas, que pueden alcanzar altos rendimientos, no son aplicables a la producción de todos los baculovirus y ofrecen un producto de baja calidad, mientras que los procesos de producción en cultivos celulares no han alcanzado todavía un estado de desarrollo que haga posible un suceso comercial. La limitación más importante respecto a la utilización de baculovirus silvestres como insecticidas es su lento modo de acción, ya que un insecto infectado tarda entre 5 y 10 días en morir,

continúa alimentándose y causa daño al cultivo por un lapso de tiempo superior al aceptable económicamente. Avances en el conocimiento de la biología molecular de los baculovirus permitió la obtención de virus recombinantes con un mayor efecto virulento comparado con los virus silvestres, pero su aplicación a campo nunca ha sido autorizada por las autoridades regulatorias [65]. Entre los ejemplos más destacados de utilización de baculovirus como plaguicidas debe mencionarse al programa de control de *Anticarsia gemmatilis* con el baculovirus AgMNPV, implementado a gran escala en Brasil durante dos décadas [66,67].

1.3.6.2 Expresión de proteínas recombinantes

Distintos sistemas de expresión de proteínas se han desarrollado en células eucariotas en los últimos 30 años, de los cuales el sistema de expresión célula de insecto-baculovirus (IC-BEVS) es uno de los más empleados. En este sistema, en su versión clásica, las proteínas son producidas luego de infectar un cultivo de células de insecto con el baculovirus recombinante en cuyo genoma se ha incorporado el gen de la proteína a expresar. Además del elevado nivel de expresión potencialmente alcanzable, las principales ventajas de este sistema residen básicamente en 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 alta capacidad para recibir múltiples genes a la vez y su inocuidad para mamíferos [68,69]. El sistema de expresión de baculovirus es especialmente útil para sintetizar partículas pseudo-virales recombinantes, a partir de la expresión de la/las proteínas estructurales que forman las cápsides virales. La proteína recombinante de la cápside tiene la capacidad de autoensamblarse, es decir, de unirse entre sí formando una estructura con un número alto de copias. Las estructuras que se forman son tan parecidas a los viriones, que se las ha llamado “pseudo-partículas virales (VLPs)”, y constituyen una importante herramienta en el campo de la vacunología. Como ventajas de las VLPs se pueden mencionar: la estabilidad de su estructura, la capacidad de estimular una fuerte respuesta inmune debido a que son antigénicamente indistinguibles de los virus de los que se derivan, y su inocuidad y seguridad ya que no contienen DNA y por lo tanto no pueden desencadenar una infección productiva. Hay descritas hasta 110 VLPs de 35 familias virales distintas [70]. Estas partículas son empleadas para la producción de vacunas contra el virus del papiloma humano (HPV) con demostrados beneficios clínicos en la prevención de las infecciones [68,71,72].

1.3.6.3 Vehículos de transferencia génica

Los viriones brotados de baculovirus tienen la capacidad introducir genes en células de mamíferos que no se hallan en división, característica que hace posible su utilización como vectores en terapia génica [71]. Sin embargo, como pueden ser inactivados por el sistema complemento de la

sangre, los baculovirus recombinantes deberían ser inyectados directamente en tejidos tales como el músculo esquelético y el cerebro, o eventualmente en tumores sólidos.

1.3.7 Virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, AgMNPV

Este *Alphabaculovirus* fue aislado en Brasil en el año 1977 y desde 1980 es utilizado como bioinsecticida para el control específico de la isoca de las leguminosas en los cultivos de soja en Brasil. En 2006 se publicó la secuencia completa del genoma de AgMNPV [73]. 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 [74]. AgMNPV es principalmente infectivo hacia *A. gemmatalis*, aunque otras especies como *Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia nu* y *Spodoptera sp.*, resultan ser susceptibles pero a dosis superiores. Los baculovirus son capaces de modular la respuesta inmune de los mamíferos; *in vitro* aumentan la fagocitosis, la producción de NO₂ y la respuesta tipo Th1. Según investigaciones recientes, AgMNPV podría considerarse más útil como un vector de vacuna o adyuvante inmunológico que AcMNPV [75].

En Brasil, el método de producción *in vivo* de AgMNPV consistía en la aplicación del virus en parcelas de cultivos de soja con elevada infestación de larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Las larvas muertas por acción del virus, eran colectadas y conservadas en cámaras de frío hasta el momento de su procesamiento y formulación [76]. Sin embargo, a finales de la década del noventa, la creciente demanda de este bioinsecticida evidenció la insuficiente producción del virus, y a pesar del desarrollo de bio-fábricas que incrementaron su escala de producción *in vivo*, resultó escaso para cubrir las áreas sembradas. El desarrollo alternativo de un proceso de producción *in vitro* podría resultar una alternativa tecnológica para su producción.

La línea celular UFL-AG-286, establecida por Sieburth y Maruniak en 1986, presenta niveles de sensibilidad y permisividad a la replicación de AgMNPV que la muestran como una candidata para desarrollar un proceso de producción *in vitro* de AgMNPV [5,77,78]. Sin embargo, esta línea no había sido adaptada a crecer en suspensión, condición necesaria para el desarrollo de procesos de producción de un bioinsecticida de bajo costo. Los cultivos se efectuaban en medios convencionales, suplementados con suero. Tampoco se conocía su aptitud de adaptación a un medio libre de suero de bajo costo ni sus características metabólicas particulares, conocimiento valioso para encarar el diseño de un proceso de producción viral en cultivos celulares. En 2006 se publicaron estudios del Laboratorio de Virología de la FBCB-UNL, que demuestran que la línea celular saUFL-AG-286 (variante celular en suspensión) 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

fue seleccionada [9]. Posteriormente, se desarrolló un nuevo medio de libre de suero específico para la línea saUFL-AG-286 (UNL-10), y se demostró que, luego de la optimización de los parámetros de infección, se obtienen rendimientos de poliedros de AgMNPV superiores a los descritos previamente para cualquier otro proceso de producción de baculovirus *in vitro* [79]. Avances en dichos estudios concluyeron que los rendimientos de ambas progenies virales como la actividad biológica de los poliedros resultaron sensibles a los niveles de suplementación del medio de cultivo libre de suero con emulsión lipídica, aunque los efectos de ésta variaron con las condiciones de cultivo e infección. Posteriormente se demostró que los cultivos de las células saUFL-AG-286 en el medio UNL-10 pueden adaptarse a las condiciones imperantes en procesos fermentativos característicos de la industria productora de agro-biológicos, ya que los cultivos de éstas se escalaron en distintos formatos de bio-reactores, donde los cultivos infectados con AgMNPV produjeron elevados rendimientos volumétricos de cuerpos de occlusión virales [80].

1.4. Membranas celulares

1.4.1 Aspectos generales de estructura y organización de las membranas de células animales

La membrana plasmática separa los compartimientos intra y extra celular y actúa como primera barrera contra la infección viral, allí se desarrolla el proceso de adsorción y penetración viral. Numerosas investigaciones sobre los mecanismos moleculares en esas etapas del ciclo de infección viral mostraron la importancia del rol de los lípidos de membrana [81].

Todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común: una fina capa de moléculas lipídicas y proteicas, que se mantienen unidas por interacciones de tipo no-covalentes. Su composición, básicamente de lípidos y proteínas, es altamente compleja.

Los principales lípidos de membrana en las células animales, son los fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol. Las dos colas hidrofóbicas de los fosfolípidos son ácidos grasos y pueden tener diferente longitud, de 14 a 24 átomos de carbono, una de ellas presenta típicamente una o dos insaturaciones y la otra se mantiene sin dobles enlaces. Cada doble enlace genera una curvatura en la cadena del ácido graso que constituye el fosfolípido, por lo que la presencia de insaturaciones y las diferencias de longitud son importantes en el modo en que se empaquetan las moléculas unas con otras. Los principales fosfolípidos de las membranas celulares son los fosfoglicéridos y en el caso de las membranas de la mayoría de células animales se distinguen la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidilcolina (PC), que junto con otro fosfolípido importante como es la esfingomielina (SM), constituyen más de la mitad de la masa de lípidos. Sólo la PS lleva una carga

neta negativa en su cabeza polar, los otros fosfolípidos mencionados son eléctricamente neutros a pH fisiológicos, llevan una carga positiva y una negativa. La hemicapa o monocapa externa contiene una cantidad más alta de SM, PC, colesterol y glicosfingolípidos y la interna de PS, PE y fosfatidilinositol (PI). Así, la PS, de carga negativa, está localizada en la monocapa interior, por lo que existe una importante diferencia de carga entre las mitades de la bicapa [82].

En las células animales las moléculas de colesterol se orientan en la bicapa con su grupo hidroxilo cerca de los grupos polares de las moléculas adyacentes de fosfolípidos, intercalando su esqueleto esterano en la región de las cadenas hidrocarbonadas. Sin intentar ofrecer una descripción detallada de la diversidad de lípidos en distintos organismos o tipos celulares, es relevante indicar que existen importantes diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática y de las membranas correspondientes a las organelas celulares. El colesterol, que está universalmente presente en la membrana plasmática de todos los animales (como el sitosterol lo está en las plantas y el ergosterol en las levaduras), varía en cantidades que abarcan desde 20 a 50% del total de lípidos, mientras que en las organelas su proporción es mucho menor (5% en membranas mitocondriales, aproximadamente 8% en las membranas del Golgi; y alrededor de 10% en retículo endoplasmático) [82].

Los glicolípidos se ubican en la monocapa no citosólica de la bicapa lipídica, como parte fundamental del glicocalix, actúan en el reconocimiento celular y como receptores antigénicos [82].

Las proteínas de membrana son muy variables en cuanto a estructura y en cuanto a la manera en la que se asocian con la bicapa lipídica, lo que refleja la variedad de sus funciones. Las moléculas proteicas, de mayor tamaño que las lipídicas, se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del tipo membrana y de célula. En el caso de las membranas plasmáticas que tienen un 50% de proteína en masa, la proporción aproximada es de 50 moléculas de lípido por cada molécula de proteína [83,84]. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica, algunas son de paso único, donde su cadena de polipéptidos cruza la bicapa como una sola hélice α y otras son proteínas de paso múltiple, donde su cadena polipeptídica cruza la bicapa varias veces, en series de hélices α o como láminas β en forma de barril (proteínas de transmembrana). Algunas proteínas no atraviesan la bicapa y están unidas a una u otra cara de la membrana, ya sea por interacciones no-covalentes con otras proteínas de transmembranas o por medio de enlaces covalentes con grupos lipídicos. La mayoría de las proteínas transmembrana de las células animales están glicosiladas, por lo que carbohidratos recubren la superficie de todas las células eucariotas, ya sea porque los oligosacáridos se unan covalentemente a las proteínas de membrana formando las glucoproteínas o a los lípidos formando los glucolípidos.

Una densa red de filamentos proteicos soporta mecánicamente a las membranas celulares y restringe la difusión de las proteínas de membrana que se unen a ella. Constituyen el denominado

citoesqueleto, base estructural del diseño de cada tipo de célula. Esta red contiene tres tipos principales de filamentos; los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los filamentos intermedios proporcionan fuerza y resistencia al estrés mecánico, los microtúbulos determinan las posiciones de las organelas y dirigen el transporte intracelular, y los filamentos de actina determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción.

1.4.2 Organización de los lípidos

Los fosfolípidos, de naturaleza anfipática, con una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas, forman un arreglo cilíndrico, y en un entorno acuoso se disponen en una estructura de doble capa asimétrica. Las interacciones de van der Waals y el efecto hidrofóbico causan que las colas no polares de los fosfolípidos se agreguen espontáneamente.

Las cadenas acílicas saturadas tienen mayor tendencia a agregarse, empaquetándose muy apretadamente como en una red cristalina, en un estado tipo “gel o sólido-ordenado”. En esta bicapa altamente organizada y gelatinosa no hay difusión lateral y hay escasa superposición de las colas no polares en las dos hemicapas, con un área molecular baja, del orden de $0,4 \text{ nm}^2$.

Los fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos cortas, que tienen menos superficie de interacción, forman bicapas más fluidas. En aquellos lípidos con cadenas acílicas que presentan insaturaciones, los quiebres producidos por sus dobles enlaces crean interacciones de van der Waals menos estables con otros lípidos, y por lo tanto, también forman bicapas más fluidas. Cuando una bicapa muy ordenada en estado tipo gel se calienta, el aumento de movimientos moleculares de las colas de ácidos grasos provoca una transición a una fase más fluida y desordenada, denominada “líquido cristalina” (Lc) o líquido desordenado” (Figura 4), dentro de un rango de temperatura de sólo unos pocos grados. Esta fase se caracteriza por una disminución del orden conformacional en las cadenas de carbono (bajo orden interno), una alta difusión lateral y un aumento en el área por lípido a unos $0,6 \text{ nm}^2$ aproximadamente debido tanto al incremento en la hidratación como a la movilidad rotacional. Cada fosfolípido se caracteriza por una temperatura de transición (T_m) a la cual se produce esta transición de fase. A medida que las cadenas se desordenan, la bicapa también disminuye de espesor.

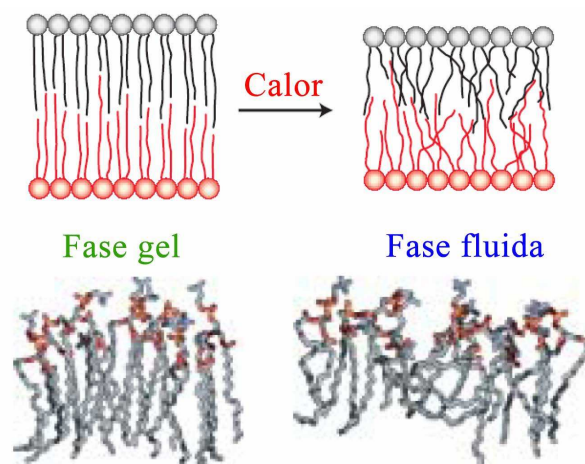


Figura 4. Estados gel y fluido de la bicapa lipídica. (Arriba) Representación de la transición gel-fluido. (Abajo) Modelos moleculares de monocapas de fosfolípidos en los estados de gel y fluido, según lo determinado por los cálculos de la dinámica molecular (modificada de Lodish y col., 2013) [85].

El colesterol no puede formar por sí solo una bicapa, pero el sustituyente hidroxilo de uno de los anillos le da la característica anfipática que necesita para permitir su incorporación en las bicapas lipídicas. Sus dimensiones moleculares hacen que una molécula de colesterol ocupe el espesor de una monocapa de la bicapa lipídica y restrinja así el movimiento aleatorio de las cabezas de los fosfolípidos en la superficie de la hemicapa exterior. Su efecto sobre el movimiento de las largas colas hidrofóbicas de los fosfolípidos depende de su concentración en la membrana [82].

Considerando los diferentes tipos de ordenamiento molecular de los lípidos que componen la bicapa, es razonable suponer que la presencia de colesterol afecte estructuralmente las propiedades globales de la membrana. En las concentraciones habituales de colesterol en membranas, la interacción del anillo esteroide con los fosfolípidos restringe el movimiento de las colas hidrofóbicas exhibiendo conformaciones ordenadas y más estables, difusión lateral intermedia y baja área molecular del orden de $0,45 \text{ nm}^2$ [86].

En la fase líquido-desordenada o líquido cristalina (Lc) de la bicapa fosfolipídica, existe suficiente espacio intermolecular para acomodar el colesterol. Con el aumento de la concentración de colesterol, el espesor de la membrana aumenta y este incremento provee una estructura de bicapa mecánicamente cohesiva y menos flexible, que aumenta su rigidez reteniendo la fluidez requerida para conservar su funcionalidad. A partir de una concentración de colesterol de alrededor del 30% aparece una nueva fase, la “fase líquido-ordenada”, que fue propuesta en 1987 por el biofísico danés John H. Ipsen [87]. La fase líquido-ordenada se puede describir como un líquido genuino, en el cual todavía hay un alto orden conformacional como en la fase gel, pero la movilidad lateral es intermedia. No existen otras moléculas conocidas que causen este drástico efecto en bicapas lipídicas excepto por otros esteroides, como el sitosterol y el ergosterol [88].

Las bicapas lipídicas presentan un comportamiento de fase que implica dos procesos distintos, pero cooperativos o acoplados, uno de orden-desorden, en términos de embalaje cristalino de las cadenas lipídicas y sus grados de libertad y el otro en términos de orden conformacional de las cadenas lipídicas y grados internos de libertad [89]. La bicapa lipídica es un fluido bidimensional; sin embargo, los diferentes tipos de moléculas lipídicas, aunque pueden desplazarse en el plano de la membrana, no se distribuyen al azar. Las distintas clases de moléculas anfipáticas optan por separarse de aquellos que son químicamente diferentes resultando en regiones con distinto empaquetamiento lateral en la misma membrana. Simplemente, el fenómeno puede describirse como que los lípidos de un mismo tipo molecular experimentan interacciones más fuertes entre sí que con aquellos que son químicamente diferentes [82]. Sin embargo, en ciertas mezclas de moléculas lipídicas, diferentes moléculas pueden permanecer juntas transitoriamente generando una mezcla dinámica.

Lípidos como el colesterol, los esfingolípidos y los glicerofosfolípidos de cadenas saturadas, pueden empaquetarse más estrechamente que los que poseen insaturaciones (Figura 5) [90]. La insaturación presente en la parte alta de la esfingosina, en los esfingolípidos, no impide el estiramiento de la cadena.

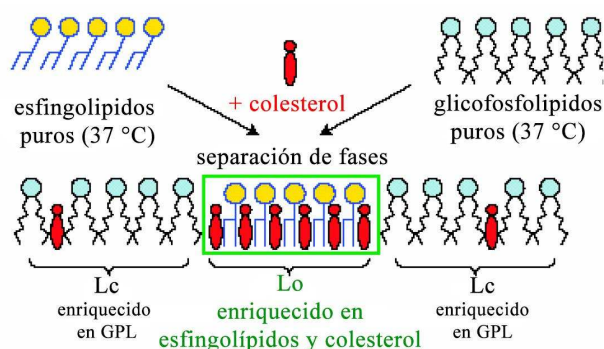


Figura 5. A diferencia de los otros glicerofosfolípidos, los esfingolípidos forman una fase gel a 37°C, con un alto empaquetamiento de las cadenas saturadas. El colesterol interactúa preferentemente (pero no exclusivamente) con los esfingolípidos y favorece la separación de fases entre los esfingolípidos y los glicerofosfolípidos. En la membrana plasmática, los glicerofosfolípidos forman una fase líquido-cristalina relativamente pobre en colesterol, mientras que los esfingolípidos forman una fase líquido-ordenada enriquecida en colesterol (modificada de Fantini y col., 2002) [90].

1.4.3 Organización de las biomembranas

Las funciones de las biomembranas dependen de la organización de sus constituyentes moleculares y sus relaciones con el citoesqueleto y la matriz extracelular. Hay particularidades en las membranas que son relevantes para su integridad y funcionamiento.

Las membranas plasmáticas tienen una “fluidez característica”, responsable del carácter altamente dinámico de las reacciones químicas asociadas y de otros procesos celulares, que depende

de la composición de lípidos, la presencia de proteínas y la temperatura [83]. Esta propiedad de membrana permite que la mayoría de las moléculas difundan libremente, roten y se reorienten adoptando la conformación óptima. Sin embargo, hay restricciones a la movilidad lateral de las moléculas, hay dominios con composiciones moleculares diferentes. Estas restricciones pueden deberse a diferentes mecanismos, como interacciones con moléculas del citoesqueleto o de la matriz extracelular, interacciones entre las propias moléculas de la membrana, cambios locales de fluidez, interacciones entre cargas eléctricas, grado de curvatura de la membrana o espesor de la misma.

La composición de lípidos y proteínas de ambas hemicapas es diferente. Esta “asimetría” es indispensable para la viabilidad de las células, importante para muchos procesos celulares vitales como la síntesis de ATP, el movimiento transmembrana de determinados solutos o la transmisión de señales eléctricas.

Cuando se establece una “interacción no específica entre lípidos y proteínas” puede presentarse una incompatibilidad hidrofóbica. En este caso el espesor de la bicapa hidrofóbica, determinado por las insaturaciones, longitud de las cadenas acílicas y presencia de esteroides, es diferente a la longitud de la zona hidrofóbica del dominio transmembrana de las proteínas integrales. Estas diferencias inducen segregación lateral de lípidos con cadenas hidrocarbonadas más largas y más rectas como los esfingolípidos [91].

Cuando la “interacción entre lípidos y proteínas es más específica” y con mayor afinidad, se favorece la estabilidad de la proteína y su función [92]. También se observan este tipo de uniones en el transporte de lípidos entre los compartimientos subcelulares [93]. Esas interacciones entre lípidos y proteínas crean dominios de membrana.

También hay “interacciones electrostáticas entre lípidos y proteínas”, las proteínas del citoplasma son atraídas por las cargas negativas de las cabezas polares de los lípidos como la fosfatidilserina. Estas relaciones afectan la movilidad de los lípidos cargados y de su localización [94].

Las “interacciones proteína-proteína” son de alta afinidad y forman estructuras relativamente estables en la membrana. Cuando estas estructuras se unen al citoesqueleto, forman redes proteicas que determinan la movilidad de las moléculas de membrana y su organización lateral. Los filamentos de actina curvan la membrana dado que al polimerizarse la empujan hacia afuera creando expansiones celulares. Muchas de las proteínas capaces de curvar la membrana son también activadoras de la polimerización de filamentos de actina [95]. Ambos procesos son regulados externamente y requieren energía [96]. La curvatura induce una nueva distribución lateral de moléculas ya que el empaquetamiento lateral no homogéneo de los lípidos, inducido por la curvatura y/o la heterogeneidad de sus componentes, impulsa a las proteínas a acumularse en las regiones curvadas en

las membranas [97,98]. Los mecanismos que llevan a la curvatura de la membrana tendrían un alto impacto en la comprensión de diversas fisiologías celulares. Estos mecanismos pueden ser espontáneos por la forma de los lípidos segregados en la zona de membrana, por la forma del dominio de transmembrana de alguna proteína, inducidos por interacción entre proteínas receptoras y lípidos circundantes, o por la inserción asimétrica de un dominio hidrofóbico en la membrana [99].

Las membranas “renuevan sus moléculas” rápidamente (en aproximadamente 1 hora) gracias a mecanismos de transporte vesicular (endo/exocitosis) y de transporte mediado por proteínas, pero otros fenómenos como difusión simple de pequeñas moléculas, o infecciones por virus u otros patógenos también pueden modificar la composición y organización de las membranas [83].

Para interpretar cómo se combinan los mecanismos activos y pasivos de interacciones moleculares que determinan la organización de la membrana, se han postulado diferentes modelos.

El modelo de “mosaico-fluido” propuesto por Singer y Nicolson hace 45 años se formuló a partir de la información sobre distribución y dinámica de los constituyentes de las membranas plasmáticas disponibles en ese momento [100]. Se propuso que los componentes de las membranas se encontraban organizados en una estructura lamelar considerada como un fluido bidimensional. Los lípidos facilitaban la “solvatación” de las proteínas de membrana a través de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, puentes de hidrógeno. Este modelo presenta varias limitaciones: minimiza el papel estructural de las proteínas de membrana incluidas en la bicapa y plantea un equilibrio químico que no tiene en cuenta los continuos procesos de endocitosis y exocitosis [83].

Otro modelo se planteó para explicar la segregación y distribución heterogénea de ciertos lípidos y proteínas [101,102]. Éste propone que lípidos, como colesterol y esfingolípidos, se asocian espontáneamente para formar “plataformas” con alto orden molecular en las que particionan proteínas como “Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins” y otras involucradas en procesos de señalización. Estas plataformas se denominaron “rafts lipídicos” [103]. En membranas artificiales, formadas por fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol, se verificó experimentalmente que coexisten las fases líquido-desordenada pobre en colesterol, y líquido-ordenada enriquecida en colesterol y esfingolípidos; y esto llevó a suponer que en la membrana celular se producía la misma segregación. Por lo tanto, las membranas artificiales heterogéneas en su composición, se promovieron como buenos sistemas modelo para describir las propiedades físicas de la superficie celular. Sin embargo, la formación espontánea de dominios lipídicos en las membranas plasmáticas celulares es todavía un tema en discusión [104,105].

Tanto el “modelo convencional de rafts” como el “modelo de mosaico fluido” asumen que la superficie celular es un sistema heterogéneo en equilibrio termodinámico. Sin embargo, numerosos

trabajos muestran que muchos constituyentes de membrana plasmática como lípidos unidos a proteínas y glicolípidos están organizados en nanodominios y no se observa segregación de lípidos a larga escala en la fase líquido ordenada como se esperaría en el modelo convencional de rafts [83,96].

Enfoques bioquímicos y biofísicos respaldan la amplia disparidad en el concepto de rafts. En el 2006, en el Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, se definió lo que hasta ese momento se conocía como rafts lipídicos, pero que se modificó por “rafts de membrana”. La definición adoptada por el grupo fue la siguiente: “Los rafts de membrana son pequeños (10 – 200 nm) dominios heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, que se relacionan a diversos procesos celulares. Pequeños rafts pueden estabilizarse formando plataformas más grandes a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido” [106].

El hecho de que las moléculas lipídicas de la membrana plasmática de las células animales puedan ensamblarse transitoriamente formando los “rafts de membrana”, resultó en un gran debate científico. Sin embargo, amplio es el consenso en el hecho de que la esfingomielina y el colesterol son los principales componentes lipídicos de los rafts, segregándose de los glicerofosfolípidos que contienen cadenas de ácidos grasos insaturados [107,108].

Ensayos de entrecruzamiento químico han sugerido que los rafts están contruidos de sólo 15 moléculas; por otro lado, estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) pulsado también predicen la existencia de pequeños dominios ricos en colesterol y técnicas de “quenching” fluorescente que tan sólo 25 - 50 moléculas de lípidos pueden formar dominios funcionales. Sin embargo, el tamaño de los rafts detectados por microscopía confocal varía desde 250 nm a algunos micrómetros, y la vida media de estos rafts lipídicos gigantes, probablemente compuestos por el agregado de rafts originalmente pequeños, puede ser de hasta varios minutos. El tamaño pequeño de los rafts puede relacionarse con el hecho que la difusión lateral de proteínas y lípidos está limitada por obstáculos físicos, como zonas de incompatibilidad hidrofóbica, estructuras proteicas inmovilizadas por interacciones con el citoesqueleto o por atracción electrostática [97].

Por otro lado, los procesos involucrados en la formación de los raft gigantes generalmente son activos, y se mantienen fuera de equilibrio por el consumo de energía [96]. Se pueden mencionar como ejemplos, los sitios activos de exocitosis y endocitosis y los desplazamientos de los componentes de membrana por la interacción de los filamentos de actina del citoesqueleto con las proteínas de unión en la membrana [109].

Los procesos que se llevan a cabo en las células vivas difieren de los que están involucrados en las membranas artificiales. Dada la complejidad de la organización lateral de la membrana plasmática se postula que no hay un modelo universal para explicar su dinámica [83].

Una membrana celular en estado estacionario mantiene sus constituyentes, como las proteínas ligadas a lípidos y glicolípidos, fuera de equilibrio químico por procesos activos disipadores de energía que surgen de una interacción con la malla de actina que está debajo de la bicapa y otros mecanismos [110,111]. Se ha propuesto un modelo activo de la superficie celular. Los filamentos de actina afectan la movilidad lateral de las proteínas de membrana creando barreras a modo de cercas en la cara citosólica de la membrana plasmática que delimitan áreas e impiden largos desplazamientos laterales por difusión de los componentes de la membrana. Los lípidos estabilizarían a esas proteínas segregándose en dominios difiriendo en el origen del raft convencional [96,109].

1.4.4 Composición de lípidos y esteroides de las membranas de células de insectos

La información publicada sobre la composición lipídica de las líneas de células de insectos lepidópteros es limitada. En aquellos casos en que la composición fue analizada, como el de Sf9, de *Spodoptera frugiperda*, y Tn, de *Trichoplusia ni*, los principales fosfolípidos que se encontraron fueron PC y PE y los ácidos grasos fueron el ácido oleico y palmitoleico (monoinsaturados) y el ácido esteárico (saturado). Se demostró, llamativamente, que la relación colesterol/fosfolípidos resulta menor que en las líneas celulares de mamífero: las membranas plasmáticas de las células Sf9 contienen 10 veces menos colesterol que las membranas plasmáticas aisladas de células de mamíferos. La relación colesterol/fosfolípido resultó 0,03 para las células Sf9 y de 0,04 para las Tn, mucho menor que el 0,28 encontrado en células animales. La infección con un baculovirus recombinante se asoció a un aumento de los niveles de PC en las células de insecto. Las diferencias en la actividad de las proteínas de membrana producidas en estas dos líneas celulares después de la infección viral podrían correlacionarse con el perfil lipídico diferente y con cambios en la fluidez de su membrana [112]. Otros estudios destacaron la capacidad de las células Sf9 para absorber ácido oleico del medio de cultivo e incorporarlo a fosfolípidos de membrana [113].

El colesterol (Figura 6) en los insectos también es de importancia fisiológica, forma parte del desarrollo normal y la reproducción [114], es un componente estructural de las membranas celulares y precursor de las hormonas de muda de insectos [114,115]. Los insectos digieren y absorben los lípidos de manera similar a los vertebrados, pero con algunas diferencias importantes. El intestino medio parece ser el sitio de absorción del esteroide para numerosos insectos, incluso los fitófagos. Los mecanismos de captación de esteroides del alimento en el intestino son poco conocidos. Los insectos no tienen sales biliares y hay modelos que sugieren que los esteroides empaquetados como micelas de fosfolípidos se absorben pasivamente en las membranas del tejido intestinal. El metabolismo de las grasas en los insectos se centra en el sistema de transporte de lípidos. El principal lípido transportado por la hemolinfa es diacilglicerol, y es llevado por una lipoproteína de alta densidad llamada

lipoforina. Esta es una proteína transportadora y reutilizable que recoge el lípido del intestino y lo entrega a los tejidos para el almacenaje (cuerpo graso) o la utilización, sin usar los procesos de endocitosis comunes de las células de vertebrados [116,117].

Aunque el colesterol es el principal esteroide que se encuentra en los insectos, a diferencia de los vertebrados son incapaces de sintetizarlo de novo, y por lo tanto necesitan incorporarlo a través de su dieta [117–121]. Sin embargo, el colesterol en sí no es un componente de la dieta normal para los insectos fitófagos, que consumen gran variedad de esteroides vegetales. Cuando los fitoesteroides (principalmente el sitosterol o el stigmasterol) son ingeridos, el proceso digestivo comienza en la boca y continúa cuando la comida pasa al intestino medio, donde puede ser modificado a través de reacciones enzimáticas o permanecer sin cambio. Tras ser absorbidos en el intestino medio del insecto, los fitoesteroides, son vehiculizados gracias a una proteína transportadora al retículo endoplasmático donde, por desalquilación de la cadena lateral, pueden convertirse en colesterol [115,117,122]. En los lepidópteros, que son fitófagos, la capacidad de desalquilar está presente en todos sus miembros primitivos. El sitosterol produce crecimiento de los insectos, pero en las larvas, la habilidad de usar ergosterol es variable (Figura 6).

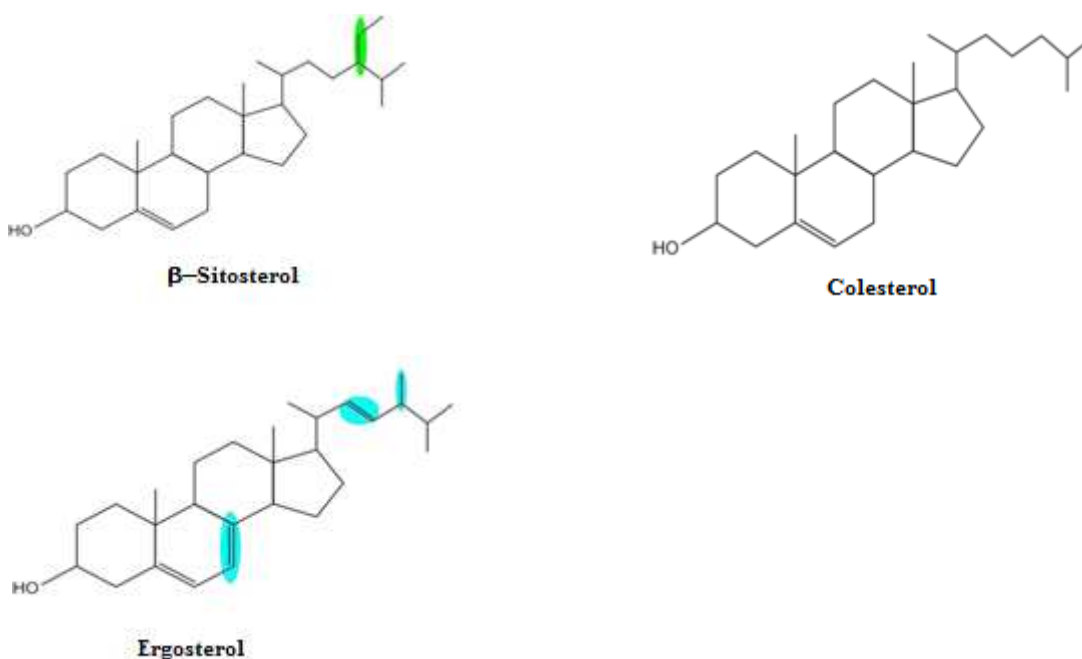


Figura 6. Fórmula molecular del colesterol, β -sitosterol y ergosterol.

En las larvas de *Manduca sexta*, la incorporación de colesterol a nivel de intestino medio y su transporte en la hemolinfa también están asociados a la lipoforina [117,123].

1.4.5 Rol del colesterol de membrana en las infecciones virales

Como se mencionó anteriormente, los rafts lipídicos pueden actuar como pequeñas plataformas de señalización y/o internalización. Este concepto de los rafts como microdominios funcionales de señalización fue corroborado mediante la desintegración de estos por extracción de colesterol con metil β -ciclodextrina (M β CD), alterando la señalización mediante TCR (receptor de células T). Los rafts y los filamentos de F-actina colocalizan y es el citoesqueleto celular el que dirige la agregación de los rafts de membrana. El reclutamiento del TCR en los rafts es dependiente de un citoesqueleto de actina funcional, puesto que puede ser bloqueado con el inhibidor de la polimerización de actina [124]. Numerosos estudios han demostrado que los rafts juegan un papel importante en distintas etapas del ciclo de replicación de los virus, incluyendo la adsorción, penetración por fusión con la membrana plasmática, síntesis de componentes, ensamblaje y brotación [81,125–127]. En particular, existen evidencias experimentales acerca de la participación de los dominios enriquecidos en colesterol, tanto en la membrana celular como en la envoltura viral, en las etapas de adsorción y/o internalización de virus pertenecientes a distintas familias, tales como *Retroviridae* [128], *Herpesviridae* [129], *Coronaviridae* [130–133], *Paramyxoviridae* [134], *Reoviridae* [135] y *Flaviviridae* [136,137], entre otros. Respecto al rol del colesterol en la infección y la replicación de baculovirus, la escasa información es contradictoria. Mientras que algunos trabajos publicados han informado que el colesterol es esencial para la infección o replicación de baculovirus en células de lepidópteros [138,139], y para la transducción productiva de células de mamíferos [58], también se ha descrito la expresión exitosa de proteínas recombinantes en cultivos de células de lepidópteros infectados con baculovirus recombinantes en un medio libre de colesterol [140]. Por otro lado, se ha descrito la existencia de dominios de unión a colesterol (CRAC) en la molécula de GP64, que podrían mediar en la interacción entre viriones brotados y la superficie de células de mamíferos, conduciendo a una transducción productiva [141]. La importancia de esta interacción en el proceso de infección de células de lepidópteros, cuyas membranas plasmáticas contienen una cantidad significativamente menor de colesterol que las células de mamíferos, es aún desconocida.

1.5 Fluidéz de membrana

1.5.1 ¿A qué llamamos fluidéz de membrana?

Las moléculas lipídicas dentro de una bicapa están sujetas a distintos procesos dinámicos. Estas distintas formas de movimiento ocurren en un amplio rango de tiempo, desde picosegundos a horas, y dependen del tipo de lípidos contenidos en la bicapa y de la temperatura.

En fases líquidas, los *cambios de conformación molecular* ocurren en el orden de los picosegundos para las rotaciones alrededor de los enlaces carbono-carbono y en decenas de nanosegundos para la rotación de la molécula alrededor de su eje vertical. Las moléculas realizan, en decenas de nanosegundos, traslaciones por *difusión lateral* en el plano de la membrana una distancia correspondiente a su tamaño. Las moléculas de lípidos pueden exponer o esconder sus cabezas polares a través del plano de la membrana (*protrusión* fuera de la bicapa) en el orden de los picosegundos, o pueden trasladarse de una monocapa a la otra (*flip-flop*) en un proceso sumamente lento que puede llevar horas (Figura 7). Se producen además modos de movimientos colectivos que involucran a muchas moléculas de lípidos, como fluctuaciones en el espesor u ondulaciones de la bicapa en un amplio rango de escalas temporales [82].

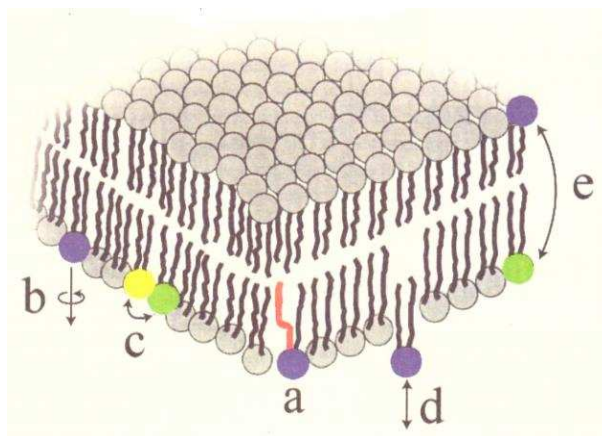


Figura 7. Los diferentes modos de movimiento de lípidos en una bicapa. (a) Cambios conformacionales. (b) Rotación alrededor de su eje vertical. (c) Difusión lateral. (d) Protrusión fuera de la bicapa. (e) Flip-flop. (modificada de Bagatoli y Mouritsen, 2014) [82].

Los procesos dinámicos en las proteínas son más moderados que en el caso de los lípidos. Los cambios conformacionales son más lentos y restringidos, y la difusión lateral de las proteínas que no están unidas al citoesqueleto es cien veces más lenta. Si se disminuye la temperatura hasta que la membrana pase a una fase sólida estos procesos se enlentecen llamativamente, por ejemplo la difusión lateral disminuye 100 veces con respecto a las fases líquidas [82].

En el caso de membranas biológicas u otros materiales altamente heterogéneos, se usa frecuentemente el término "fluidez" para describir propiedades tales como compresibilidad lateral de membrana y orden de cadenas acílicas, que influyen en la movilidad de los componentes de membrana [83].

Sin embargo, aunque el concepto de fluidez no tiene una definición clara, puede llegar a dar una idea de aspectos dinámicos presentes en estas fases líquidas de la membrana. Una bicapa lipídica tiene al menos dos grados de libertad: traslacional y conformacional. En este sentido, la fluidez se puede describir como la difusión rápida de las moléculas en el plano lateral de la bicapa lipídica,

representándose como un desorden dinámico traslacional. Por otro lado, se puede entender la fluidez como un desorden conformacional por movimientos aleatorios internos de las cadenas hidrocarbonadas. De esta forma la bicapa lipídica en la fase líquido-desordenada es fluida en ambos grados de libertad, traslacional y conformacional. En cambio, la fase líquido-ordenada es fluida sólo en el grado de libertad traslacional por la presencia de colesterol que restringe el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas [82].

Es importante tener en cuenta que el grado de fluidez no sólo depende de la composición lipídica de la bicapa, de la estructura de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, y de la presencia de colesterol, sino también de la temperatura. Sabemos que la fluidez se reduce con la disminución de la temperatura. Las células de insecto proliferan y se cultivan a 27°C, temperatura significativamente menor a la temperatura óptima de las células de mamífero (37°C), sin embargo el grado de fluidez en ambas células es similar. Esto se podría explicar asumiendo que el efecto de la menor temperatura (27°C) sobre la fluidez de membrana y la mayor saturación de los ácidos grasos presentes en las cadenas de sus fosfolípidos compensan la menor presencia de colesterol [112]. Organismos cuyas temperaturas fluctúan con las del entorno, controlan la fluidez de la membrana sintetizando más o menos ácidos grasos con más dobles enlaces cis.

1.5.2 Evaluación de la fluidez de membrana por Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Marcadores de espín.

En esta sección se describe la técnica de EPR, principalmente en cuanto a sus aplicaciones al estudio de bicapas lipídicas, ya que esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el presente trabajo.

1.5.2.1 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopia de EPR es una técnica que detecta electrones desapareados de una muestra en presencia un campo magnético por absorción de energía de fotones de microonda. El momento magnético asociado al espín electrónico interactúa con el campo magnético definiendo dos estados de energía diferentes de acuerdo con las dos orientaciones posibles. La transición entre estos dos estados se produce por absorción de la energía de un fotón que coincide con la diferencia de energía entre niveles. La señal detectada aparece como la derivada del espectro de absorción [142].

Esta técnica se ha utilizado ampliamente durante las últimas décadas para estudiar sistemas biológicos no paramagnéticos utilizando marcadores de espín. Los marcadores de espín son radicales libres estables que se utilizan como sondas y permiten determinar comportamientos dinámicos a escala molecular. El radical más utilizado es el nitróxido, que unido a diferentes moléculas con grupos funcionales específicos, ha permitido que EPR sea aplicada a un amplio rango de sistemas. En el

espectro de EPR del radical nitróxido se observa estructura hiperfina que surge de la interacción entre el electrón desapareado localizado en el orbital $2p\pi$ del enlace N-O y el núcleo del ^{14}N (de espín nuclear $I=1$). El espín nuclear produce un campo magnético local sobre el electrón con tres $(2I+1)$ orientaciones con respecto al campo magnético externo, que causa subdivisiones en los niveles de energía electrónicos y da lugar a un espectro de tres líneas (Figura 8), cuya separación es el parámetro Hiperfino.

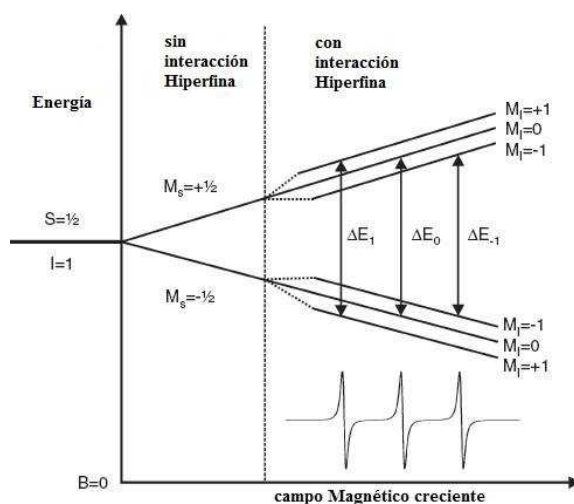


Figura 8. Esquema de niveles de energía y transiciones permitidas por la interacción de un electrón desapareado, $S = 1/2$, con el momento magnético nuclear del N, $I = 1$, en un campo magnético B externo. La resonancia ocurre cuando la diferencia de energía entre los niveles coincide con la energía de los fotones del campo electromagnético. (modificada de Klare, 2013 [143]).

El parámetro Hiperfino depende de la dirección relativa del campo magnético respecto a los ejes moleculares. Se caracteriza por tres valores principales: A_{xx} , A_{yy} y A_{zz} . Las tres líneas muestran una significativa anisotropía debido a que el espín electrónico se encuentra en un orbital tipo p. Esta anisotropía puede ser promediada total o parcialmente debido a movimientos moleculares. Cuando los movimientos son rápidos e isotrópicos (marcador pequeño en medio de baja viscosidad), las tres líneas son finas y de alturas similares, pero en un estado de movimiento muy restringido o no-movimiento, el espectro se ensancha (Figura 9). Situaciones intermedias entre estos dos extremos permiten que los espectros de EPR muestren cambios y sean sensibles a la anisotropía y dinámica del movimiento, como ocurre en los lípidos constituyentes de membranas.

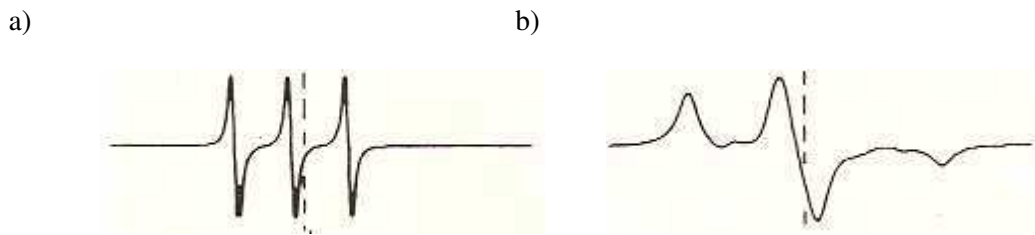


Figura 9. Espectro del radical nitróxido: a) en solución de muy baja viscosidad, b) inmovilizado en material amorfo (solución congelada o polvo cristalino).

Las tres líneas del espectro del radical nitróxido se modifican por la interacción por intercambio [144]. El intercambio de espín es el cambio de estado de espín de los electrones desapareados de dos radicales vecinos, y ocurre cuando hay overlap de sus orbitales electrónicos. Esta interacción disminuye rápidamente con la distancia. La frecuencia con que intercambian los espines es proporcional a la concentración de los radicales. El espectro observado depende de la relación entre la frecuencia de intercambio y la diferencia de frecuencia de resonancia de las líneas del espectro. Si la frecuencia de intercambio es menor (intercambio lento) se observará solo un ensanchamiento de las tres líneas. Si es mayor (intercambio rápido) las líneas se unen en una sola en el centro del espectro (Figura 10).

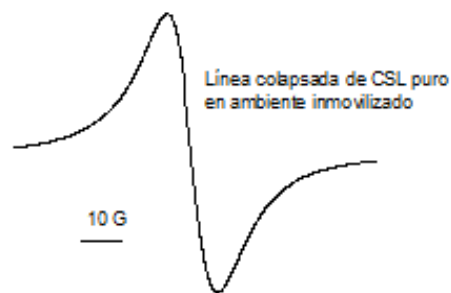


Figura 10. Espectro colapsado de EPR (marcador CSL inmovilizado).

1.5.2.2 Determinación del orden dinámico de membranas por Espectroscopia de EPR

En particular, para estudiar el orden conformacional de membranas o sistemas modelo se utilizan marcadores de espín liposolubles. Los espectros de EPR obtenidos son sensibles tanto a la dinámica como a la anisotropía del marcador de espín en el medio en el que se encuentra. El orden dinámico del marcador incorporado a la muestra se puede evaluar a partir de los parámetros A_{MAX} y A_{MIN} (Figura 11).

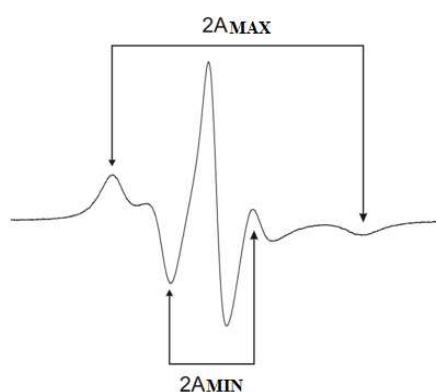


Figura 11. Espectro típico de EPR del marcador 5-SASL en membrana biológica. En la Figura se indica cómo se obtiene la información para calcular los Parámetros A_{MAX} y A_{MIN} .

Los valores posibles de A_{MAX} varían entre alrededor de 16 G, para un marcador en un medio isotrópico, completamente desordenado, y 32 G, correspondiente al marcador de espín inmobilizado. A_{MIN} puede variar entre 6 G aproximadamente, para el caso de un marcador inmobilizado, y el límite isotrópico rápido de 16 G [145].

En este trabajo de tesis, se utilizaron los marcadores de espín liposolubles: n-doxil ácido esteárico (n-SASL) y 3 β -doxil-5 α -colestano (CSL).

En el marcador n-doxil ácido esteárico (n-SASL) el anillo conteniendo al radical nitróxido reemplaza al carbono n de una molécula de ácido esteárico (Figura 12). El marcador se incorpora a la bicapa de fosfolípidos en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, con su extremo carboxilo próximo a las cabezas polares, y su distribución lateral en la membrana es homogénea y al azar.

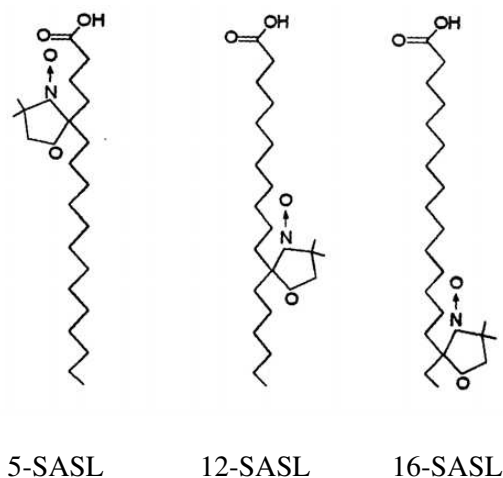


Figura 12. Marcadores de espín liposolubles 5-, 12- y 16-SASL.

Cuando el anillo conteniendo al radical nitróxido reemplaza al carbono 5 de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico ($n=5$), censa la región próxima a las cabezas polares. Por el contrario, si se ubica en las posiciones 12 o 16 se encuentra más sumergido en la bicapa y por lo tanto censa la región hidrofóbica de la membrana. A_{MAX} disminuye a medida que el marcador se localiza más profundo, por la mayor amplitud de movimiento y flexibilidad que tienen las cadenas hidrocarbonadas hacia el centro de la membrana; mientras que A_{MIN} registra un comportamiento opuesto (Figura 13).

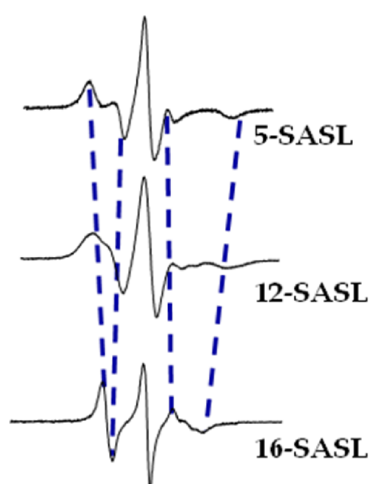


Figura 13. Espectros típicos de EPR (marcadores 5-, 12- y 16-SASL en membrana biológica).

El marcador de espín 16-SASL censa la región más interna de las bicapas lipídicas, donde los movimientos de las cadenas están menos restringidos, por lo que tiene un espectro de líneas más finas que el de 12- o 5-SASL que están en regiones más inmovilizadas.

En el marcador 3β -doxil- 5α -colestano (CSL), el anillo conteniendo al radical nitróxido se une al carbono 3 del colesterol (Figura 14) y se ubica en la región de los grupos polares de la membrana. El esqueleto esterano del marcador se orienta hacia la zona hidrofóbica de la bicapa.

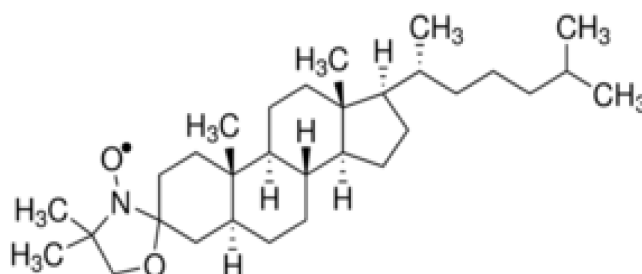


Figura 14. Marcador de espín liposoluble 3β -doxil- 5α -colestano (CSL).

Los espectros obtenidos del radical nitróxido en la membrana celular resultan diferentes según el tipo de molécula a la que está unido, moléculas con cadenas hidrocarbonadas como los fosfolípidos o con anillos esteranos como los esteroides. El fragmento paramagnético N-O• se asocia generalmente con un sistema de coordenadas en el que el eje x está orientado a lo largo del enlace N-O y z es el eje del orbital $2p\pi$ donde se ubica el electrón no apareado (Figura 15).

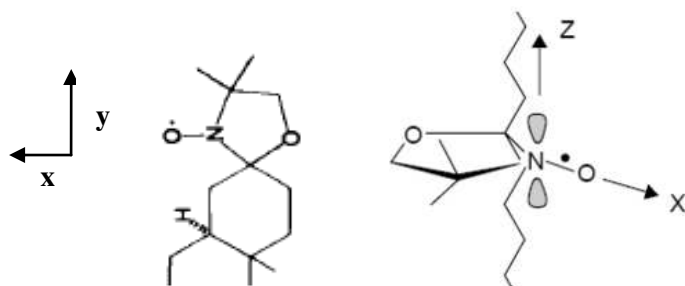


Figura 15. Sistema de coordenadas asociado al radical nitróxido unido a un anillo esterano y a una cadena hidrocarbonada, orientado con el eje x en dirección del enlace N-O y el eje z en dirección del orbital $2p\pi$.

El eje molecular largo del CSL es paralelo al eje y (Figura 16). A_{xx} y A_{yy} son cinco a seis veces menores que A_{zz} . En un movimiento rápido de CSL alrededor del eje molecular largo en el estado fluido de la bicapa, hay un promedio de los componentes A_{xx} y A_{zz} ; y este valor promedio se manifiesta en el espectro del CSL como A_{MAX} [146].

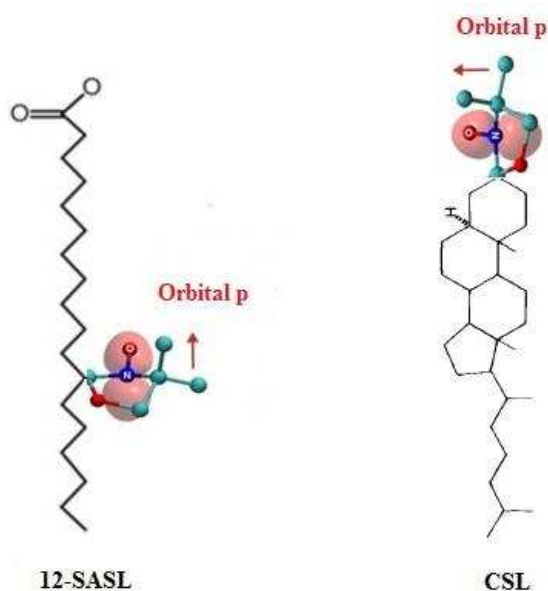


Figura 16. Posición relativa del orbital p ocupado por el electrón desapareado en los marcadores de espín liposolubles 12-SASL y 3β -doxil- 5α -colestano (CSL).

En el caso de los marcadores del tipo n-SASL, un rápido movimiento de rotación alrededor del eje de la cadena acíclica paralelo al orbital $2p\pi$ (eje z) promedia las componentes A_{xx} y A_{yy} (simetría axial) (Figura 16). Mientras que un movimiento simultáneo de bamboleo en torno a la dirección perpendicular a la bicapa, hace que las posibles orientaciones del orbital $2p\pi$ estén confinadas dentro de una región en forma de cono (Figura 17). Una membrana más ordenada (es decir, más rígida) disminuye la amplitud del balanceo dando como resultado un aumento en el parámetro A_{MAX} (y una disminución de A_{MIN}) [147].

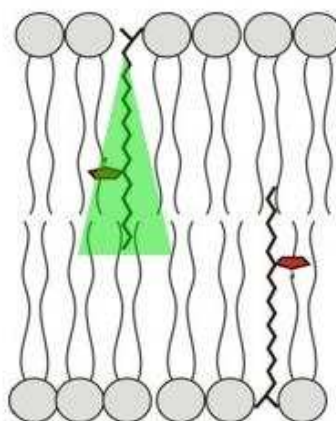


Figura 17. Movimiento anisotrópico del marcador de espín liposoluble 12-SASL en una bicapa lipídica.

En resumen, el valor obtenido del parámetro A_{MAX} en los espectros del marcador CSL es menor que el registrado en los espectros de n-SASL por lo que se considera a este último marcador más sensible a los cambios de movilidad en el entorno del radical nitróxido.

1.6 Justificación

El aumento en las restricciones a la disponibilidad y el uso de componentes de origen animal en la composición de los medios de cultivo están conduciendo hacia el desarrollo de una nueva generación de medios de cultivo de células de insecto libres de materia prima de origen animal, de composición simple y bajo costo. Es importante evaluar en estos nuevos medios de cultivo la aptitud para sostener la proliferación celular y la replicación viral con producción de altos títulos de progenies virales. Entre los componentes que deberían ser reemplazados en la formulación de un medio de cultivo absolutamente libre de compuestos de origen animal se encuentra, además del suero bovino y los hidrolizados y peptonas de proteínas de origen animal, al colesterol. El colesterol es el esteroide presente en las membranas de las células animales, participa en la regulación de un sinnúmero de actividades celulares, incluidas aquellas que relacionan a la célula con la infección y la replicación

viral. En la naturaleza existe una amplia variedad de esteroides, algunos de los cuales tienen una cercana similitud estructural con el colesterol y se encuentran en gran abundancia, como es el caso del sitosterol, un esteroide que puede ser obtenido a muy bajo costo a partir de aceites vegetales. El sitosterol resulta, entonces, un candidato para el reemplazo del colesterol en la formulación de medios libres de componentes de origen animal para el cultivo de células animales, en general, y de células de insecto en particular. Sin embargo, para ello primero debe demostrarse que tal reemplazo es compatible con la conservación de las propiedades y funciones celulares esenciales para sostener sus aplicaciones biotecnológicas, entre ellas su capacidad para ser infectadas por baculovirus y replicarlos. Entre las propiedades que podrían ser afectadas por cambios cualitativos o cuantitativos en el perfil lipídico celular, derivado de modificaciones cuantitativas o cualitativas en el contenido de esteroides del medio de cultivo, se destacan las modificaciones en la estructura y fluidez de las membranas que, a su vez, podrían interferir con la susceptibilidad a la infección viral y la permisividad a la replicación. El estudio de las relaciones entre los cambios en la estructura y fluidez de las membranas, y la capacidad celular para ser infectada y replicar baculovirus no sólo será útil para determinar la factibilidad del recambio de esteroides en los nuevos medios de cultivo para células de insecto, sino que también puede ser utilizado como modelo para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la relación virus – membranas celulares.

1.7 Hipótesis

Las variaciones en el contenido cualitativo y cuantitativo de esteroides de los medios de cultivo para células de insecto provocan cambios en la estructura y dinámica de las membranas celulares, y afectan la capacidad de las células para ser infectadas con baculovirus y replicarlos.

Las alteraciones observadas en la infección y/o replicación viral en las células animales privadas de colesterol están asociadas a variaciones de fluidez de la membrana plasmática que afectan su funcionalidad.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Avanzar en el conocimiento de los factores estructurales y dinámicos de la membrana plasmática que condicionan la infección y la replicación viral en células de insecto con diferente contenido de esteroides.

2.2 Objetivos específicos

- Diseñar un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular UFL-AG-286.
- Analizar el efecto de hidrolizados de proteínas de origen vegetal y aceites vegetales sobre la proliferación celular y la replicación de AgMNPV en células UFL-AG-286.
- Adaptar las células UFL-AG-286 al cultivo en un medio libre de componentes de origen animal, determinar sus parámetros de crecimiento y evaluar la replicación de AgMNPV.
- Adaptar las células UFL-AG-286 al cultivo en medios con diferente contenido de esteroides y evaluar la replicación de AgMNPV.
- Estudiar la influencia de los esteroides en la unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286.
- Analizar la cinética de inactivación de viriones brotados de AgMNPV en medios con diferente contenido de esteroides.
- Analizar la influencia de los esteroides sobre el ordenamiento lipídico, por la técnica de EPR con diferentes marcadores de espín, en sistemas modelo de membranas artificiales con diferente contenido de esteroides.
- Analizar el ordenamiento lipídico de la membrana plasmática de células UFL-AG-286 con diferente contenido de esteroides mediante EPR con diferentes marcadores de espín.
- Correlacionar el orden dinámico de la membrana plasmática de la línea celular UFL-AG-286 con la incorporación de diferentes esteroides y su respuesta a la infección viral.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Línea celular UFL-AG-286

Línea celular establecida por Sieburth y Maruniak en el año 1986 [5] a partir de embriones del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatalis*. La línea celular fue cedida por el Dr. Victor Romanowski del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

3.1.1 Cultivos con células adheridas

La línea celular UFL-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 medio, se incubó a 27°C en una estufa de cultivo.

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 pipeteo sucesivos y se tomó una alícuota de 0,5 mL. La misma se transfirió a otra botella conteniendo 4,5 mL de medio de cultivo fresco.

3.1.2 Recuento de células totales, no viables y viables

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL de volumen se colocó 10 µL de una solución de Azul de Trypan 0,4%, 45 µL de una solución de PBS 1% y 45 µL de la suspensión celular a cuantificar. Se homogeneizó suavemente y se cargaron ambas hemisferias de una cámara de recuento de Neubauer, para luego efectuar el recuento de células totales y viables en un microscopio invertido Olympus modelo CK2 con un aumento 10X de objetivo y 10X de ocular. Las densidades celulares se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad células totales (células totales.mL}^{-1}\text{)} = \text{recuento promedio} \times \text{dilución}^{-1} \times 10^4$$

$$\text{Densidad células no viables (células muertas.mL}^{-1}\text{)} = \text{recuento promedio} \times \text{dilución}^{-1} \times 10^4$$

$$\text{Densidad células (viables células viables.mL}^{-1}\text{)} = \text{células totales.mL}^{-1} - \text{células no viables.mL}^{-1}$$

3.1.3 Evaluación de la proliferación celular por el ensayo de reducción de MTS

En algunos ensayos se utilizó la reacción de reducción de la sal tetrazólica MTS en presencia del dador de electrones PMS (Promega) para evaluar la proliferación celular en cultivos efectuados en placas de múltiples pocillos. Cultivos de células UFL-AG-286 en placas de 96 orificios (2×10^4 células por pozo en 0,1 mL de cultivo), fueron incubados durante 120 horas a 27°C en un ambiente humidificado. Al cabo del período de incubación se agregó a cada pocillo 0,02 mL de la mezcla MTS-PMS por pocillo. Luego de incubar durante 3 horas a 27°C, el formazán soluble fue valorado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm. La densidad óptica, contrastada con una curva de calibrado, permitió determinar la concentración de células viables.

3.2 Medios de cultivo libres de suero fetal bovino

3.2.1 Medio de cultivo básico

Se utilizaron un conjunto de medios de cultivo cuya composición básica fue similar y se detalla a continuación:

Nutrientes	Concentración (g/L)
L-alanina	0,1139
L-arginina	0,0611
Acido L-aspártico	0,0389
L-asparagina	0,2722
Acido L-glutámico	0,0667
L-glutamina	2,7333
L-glicina	0,0722
Clorhidrato de L-histidina	0,3756
L-isoleucina	0,0055
L-leucina	0,0194
Clorhidrato de L-lisina	0,0694
L-metionina	0,1666

L-prolina	0,0389
L-fenilalanina	0,0167
L-serina	0,1999
L-treonina	0,0194
L-valina	0,0111
L-cisteína	0,0024
L-tirosina	0,0055
L-triptofano	0,0111
Clorhidrato de tiamina	0,0004
Pantotenato de calcio	0,0023
Clorhidrato de piridoxina	0,0004
Acido p-aminobenzoico	0,0004
Acido fólico	0,0004
Acido nicotínico	0,0004
i-inositol	0,0004
Cianocobalamina	0,0004
Riboflavina	0,0004
Biotina	0,0002
Acido fumárico	0,0024
Acido α ceto-glutárico	0,0167
Acido L (-) málico	0,0300
Cloruro de potasio	3,2200
Cloruro de calcio di-hidratado	1,4400
Cloruro de magnesio hexa-hidratado	2,5556
Sulfato de magnesio	1,5200
Fosfato di-ácido de sodio	0,9600
Carbonato ácido de sodio	0,3889

L-tirosina	0,0122
Cloruro de colina	0,0222
Glucosa	7,7778

Micronutrientes

111 µL de sulfato ferroso.7 H₂O (27,5 mg/L)

111 µL de ácido molíbdico amoniacal.4H₂O (2 mg/L)

222 µL de cloruro de cobalto.6H₂O (2,5 mg/L)

67 µL de cloruro cúprico (anhidro) (7,9 mg/L)

56 µL de cloruro de manganeso.4H₂O (1 mg/L)

167 µL de cloruro de zinc (2 mg/L)

Los componentes de este medio de cultivo fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co.

El pH se ajustó a 6,23 con una solución de ácido clorhídrico 1 N ó de hidróxido de potasio 10 N.

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

Al momento de su utilización se suplementó con 15 mL de una microemulsión lipídica.

3.2.2 Suplementos de composición química no definida que se agregan al medio de cultivo base

Los suplementos que se pusieron a prueba son los siguientes:

3.2.2.1 Hidrolizados proteicos

- Hidrolizado enzimático de caseína N-Z-Case Plus (Sigma)	3,0 g/L
- Caldo triptosa fosfato (Sigma®)	1,0 g/L
- Peptona de soja tipo III (Sigma®)	3,0 g/L
- Digesto papaínico de soja (DMV®)	3,0 g/L

3.2.2.2 Extractos microbianos

- Extracto de levadura (Difco®)	3,0 g/L
---------------------------------	---------

3.2.2.3 Emulsiones lipídicas

Para preparar las distintas emulsiones de lípidos y esteroides utilizadas para suplementar el medio básico se siguió el siguiente procedimiento general:

1) Pesarse:

0,1 g de aceite

0,25 g de Tween 80

0,045 g de esteroide

0,02 g de alfa-tocoferol

2) Disolver en 10 mL de etanol absoluto

3) Preparar una solución de Pluronic F68 10% en agua

4) Colocar 1 mL de solución etanólica en un tubo de 50 mL, y agregar 10 mL de solución de Pluronic gota a gota con agitación permanente en vórtex.

5) Disolver la emulsión en el medio de cultivo a una concentración de 1%.

El medio de cultivo se suplementa a razón de 1 mL de concentrado lipídico por cada 100 mL de medio, de tal manera que las concentraciones de cada uno de los componentes en el medio de cultivo completo resultan:

aceite	0,001%
Tween 80	0,0025%
esteroide	0,00045%
α -tocoferol	0,002%
Pluronic F68	0,1%
etanol	0,1%

Los siguientes aceites fueron ensayados:

- Aceite de soja (Sojola)
- Aceite de maíz (Mazola)
- Aceite de oliva extra virgen (Lira)

Además, se evaluaron los siguientes esteroides:

Colesterol (Sigma)

β -Sitosterol (Fluka)

Por otro lado, se utilizó también, alternativamente, la siguiente emulsión de origen comercial: concentrado lipídico de origen comercial provisto por Invitrogen-GIBCO \rightarrow (Cat. 11905-031).

3.3 Evaluación de la proliferación celular

3.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de multiplicación celular

Para caracterizar la proliferación de los cultivos de células UFL-AG-286 bajo diferentes condiciones se determinaron los siguientes parámetros: velocidad específica de proliferación en fase exponencial y densidad celular máxima.

Velocidad específica de proliferación 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.

Tiempo de duplicación:

Este parámetro mide el tiempo necesario para que la masa celular se duplique cuando la velocidad específica de proliferación es μ . Por lo tanto, haciendo

$$C_i = 2 \times C_{i_0}$$

y reemplazando en (3):

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

Densidad celular máxima:

La densidad celular fue determinada en todos los experimentos por recuento al microscopio, en cámara de Neubauer cada 24 horas por 7 días. Se representaron los datos experimentales en una gráfica, y se determinó la densidad celular máxima al iniciar la fase estacionaria del crecimiento celular.

3.3.2 Determinación del diámetro celular

Para determinar el diámetro de las células se recurrió al uso de un ocular micrométrico previamente calibrado con objetivo de 10X (aumento angular en infinito), que fue comparado a una platina micrométrica graduada de longitud y retículo conocidos. Al enfocar la muestra en un microscopio a dicho aumento, se comparó el tamaño de los diámetros celulares con el número de unidades del ocular micrométrico incluidas en esa longitud. Con el dato del número de divisiones del ocular correspondientes a cada diámetro celular y su calibración, se determinaron 100 diámetros celulares para promediar estadísticamente. La calibración del Ocular Micrométrico a 10X resultó: 0,010416 mm/unidad del ocular. El procedimiento se realizó por duplicado.

3.3.3 Análisis de nutrientes y productos metabólicos

Se determinaron las concentraciones de glucosa, glutamina, amonio y lactato en los sobrenadantes de cultivo. Todas las determinaciones analíticas se realizaron por duplicado, y al menos sobre dos muestras independientes. Para obtener los sobrenadantes, una alícuota de cultivo se centrifugó en una microcentrífuga → a 13.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se separó del pellet celular y se conservó a -20°C hasta el momento de realizar las respectivas determinaciones.

3.3.3.1 Dosaje de la concentración de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó empleando un equipo enzimático provisto por Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). El método se fundamenta en la oxidación enzimática (glucosa oxidasa) de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último, en presencia de una 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 18). Si la concentración de la glucosa superaba este valor, la muestra se diluía al medio con agua bidestilada.

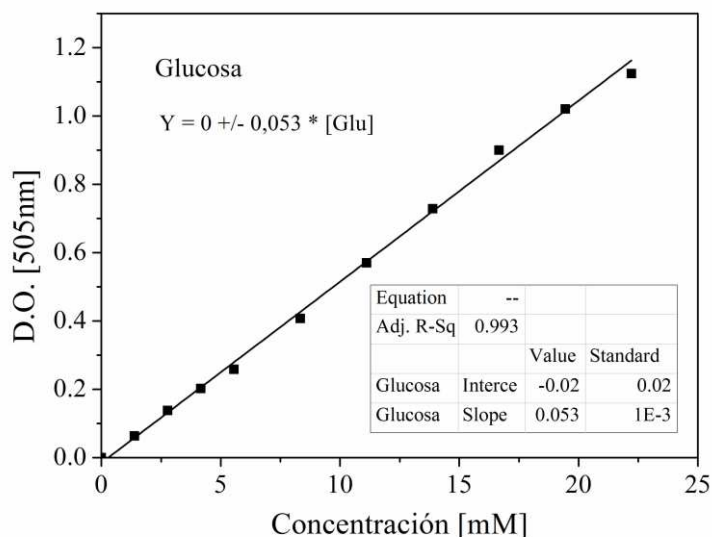


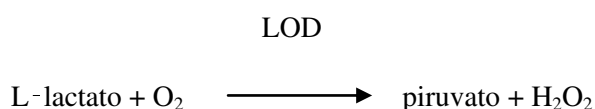
Figura 18. Curva experimental de calibrado para la cuantificación de Glucosa.

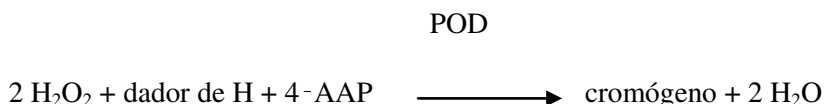
3.3.3.2 Dosaje de la concentración de glutamina

Para la cuantificación de glutamina se utilizó Glutaminasa de E. coli (G 8880), provisto por Sigma, disuelta 1/10 en buffer acetato 0,5 M. La glutaminasa cataliza la hidrólisis de la L-Glutamina a ácido glutámico y amonio. Ese amonio producido es el que se determina en cada muestra según protocolo basado en la reacción de Berthelot (ver dosaje de la concentración de amonio).

3.3.3.3 Dosaje de la concentración de lactato

Las concentraciones lactato se determinaron con un analizador Roche/Hitachi Cobas c311. El método colorimétrico emplea una reacción enzimática para transformar el lactato en piruvato. El L-lactato es oxidado a piruvato por la enzima específica lactato oxidasa (LOD). La peroxidasa (POD) se emplea para generar un colorante utilizando el peróxido de hidrógeno producido en la primera reacción.





La intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de L-lactato, la cual se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 540 nm.

El intervalo de medición es de (0,2-15,5) mM o (1,8-140) mg/dL.

3.3.3.4 Dosaje de la concentración de amonio

Para la cuantificación del amonio se utilizó un equipo comercial provisto por Laboratorio Wiener 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 (Figura 19). La curva resultó lineal hasta la máxima concentración de amonio ensayada (50 mM).

Testigo: 0,6 g/L = 0,0333 M = 33,3 mM

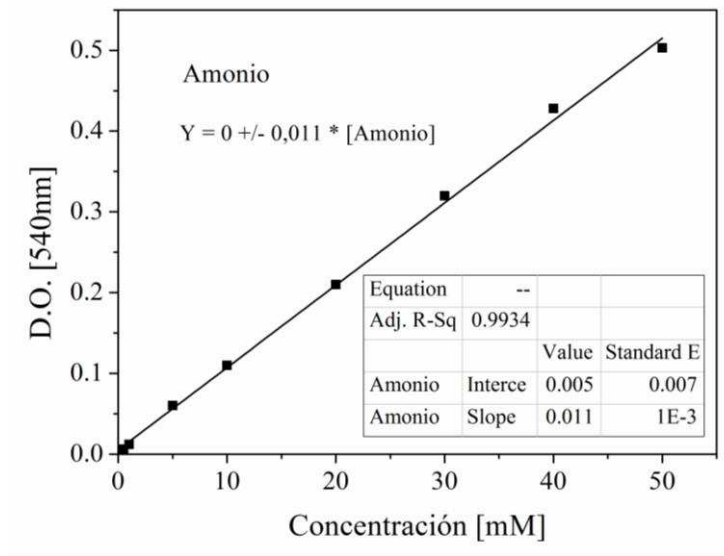


Figura 19. Curva experimental de calibrado para la cuantificación de amonio.

3.4 Virus

Se empleó una cepa del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, AgMNPV, aislada en la Estación Experimental Oliveros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, gentilmente cedido por la Prof. Sara Lorenzatti [32].

3.4.1 Preparación de *stock* de AgMNPV

Cultivos de células, de densidad 2×10^5 células viables. mL^{-1} , se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,05 TCID_{50} .célula $^{-1}$. Durante la primera hora de incubación a 27°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 .

3.4.2 Titulación de virus brotado de AgMNPV (Titulación por dilución límite)

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 suplementado con 10% de 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 + 10% SFB. Las placas se incubaron a 27°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 27°C.

Para calcular el título viral por el método desarrollado por Reed y Muench se confeccionó una tabla de respuestas (+) y (-) para cada una de las diluciones [148]. 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% (TCID₅₀). Los títulos virales se expresaron en TCID₅₀.mL⁻¹.

3.4.3 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) = $\Sigma \times 5 \times 10^4$

- Producción específica de poliedros (poliedro.célula⁻¹) = $\Sigma \times 5 \times 10^4 \times (\text{células viables.mL}^{-1})^{-1}$

3.4.3 Cálculo de los porcentajes de unión de AgMNPV

El porcentaje de unión para cada tiempo se calculó según:

$$\% \text{ Unión} = (V_{t_0} - V_{t_i}) \cdot V_{t_0}^{-1} \cdot 100$$

donde V_{t_0} es el título viral en el sobrenadante a $t=0$ y V_{t_i} el título a $t=i$ luego de la infección, determinados por el procedimiento de Reed y Muench.

3.5 Membranas modelo

Como membranas modelo se preparan liposomas de PC de huevo con diferente contenido de esteroides con el objeto de analizar la sensibilidad de la técnica de EPR para registrar cambios en el orden dinámico de las membranas, originados por las diferencias estructurales de los esteroides

ensayados. Las bicapas de PC de huevo en liposomas unilamelares o multilamelares están en estado fluido desordenado o cristalino a temperaturas superiores a 0°C [146].

Los lípidos constituyentes se disuelven en las proporciones adecuadas en un solvente orgánico, que luego se remueve por evaporación y/o vacío. El depósito seco de lípidos se somete a vacío para evaporación completa del solvente orgánico y posteriormente se resuspende en un medio acuoso adecuado, como es el caso del buffer fosfato (PBS), a una concentración final de lípidos de 18,5 mM. La suspensión resultante consiste, en la gran mayoría de los casos, en liposomas multilamelares (MLVs) de variados tamaños que luego pueden ser procesados para obtener liposomas unilamelares grandes (LUVs) mediante técnicas de extrusión con un extrusor Avanti Mini-Extruder.

3.6 Reducción del contenido de colesterol celular

La M β CD (Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.) es un oligosacárido cíclico derivado de la degradación del almidón, que presenta un exterior hidrofílico y una cavidad hidrofóbica capaz de unirse reversiblemente a pequeñas moléculas orgánicas hidrofóbicas como los esteroides [149–153]. Se ha demostrado que la M β CD no se incorpora en las membranas tratadas [150]. Este procedimiento no afecta la viabilidad celular, lo que se verificó por Trypan blue.

Las células UFL-AG-286, lavadas tres veces con PBS, se trataron con M β CD 10 mM, 5% V/V, durante una hora a 27°C en un agitador a 100 rpm.

Para eliminar el exceso de M β CD las células se lavaron con medio de cultivo base a 1.000 rpm durante 3 a 5 minutos. La cantidad de colesterol remanente en las células se determinó por cromatografía de gases CROM069-S02842-09 (CONICET, Santa Fe) en una mezcla de cloroformo:metanol (1:2), previa extracción lipídica con alcohol isopropílico y cloroformo.

Se evaluó previamente la concentración óptima de M β CD necesaria para lograr reducir el contenido de colesterol celular sin afectar la viabilidad celular. Las muestras de células se incubaron a 27°C con agitación continua en shaker, a 100 rpm durante 1 hora, con diferentes concentraciones de M β CD en PBS. La evaluación de la cantidad de colesterol remanente se verificó por cromatografía gaseosa y la viabilidad celular por Trypan blue.

3.7 Reincorporación de esteroides a las células tratadas con M β CD

Los esteroides se incorporan a las células por transporte activo, para lo cual se incubaron durante 16 horas en medio de cultivo suplementado con emulsiones con esteroides (colesterol o sitosterol) o libre de esteroides agregados. La incorporación de esteroides se confirmó usando cromatografía gaseosa y la viabilidad celular se verificó por tinción con Trypan blue.

3.8 Determinación de fluidez de membrana por EPR

La técnica de EPR permite estimar el orden dinámico de membranas utilizando marcadores de espín tanto en LUVs como en células.

3.8.1 Preparación de muestras

3.8.1.1 Cantidad de marcador a incorporar

Para conseguir buena señal de EPR se recomienda que la concentración final de marcador en lípidos de membrana sea de 1% molar para evitar la presencia de marcador libre. El volumen de marcador a incorporar depende de la concentración de la solución stock, que fue provista por Avanti Polar Lipids, (Alabaster, EE.UU.).

Para LUVs:

Se incorporan 3,5 μ L de una solución stock de n-SASL 8,66 mM en etanol sobre 11,1 μ moles de lípidos totales.

Para el caso de CSL, se incorporan 2,1 μ L de una solución stock de 7,05 mM en cloroformo cuando la cantidad total de lípidos a marcar era de 11,1 μ moles.

Para células UFL-AG-286:

Se estima la cantidad de moléculas de lípidos en una muestra de células y se calcula el volumen de marcador de espín a agregar para que la relación molar marcador/lípido sea de aproximadamente el 1%.

Se determina que el número total de moléculas de lípidos en una muestra de 1×10^7 células es del orden de 1×10^{17} . Para ello se considera que el área promedio una molécula de lípido es $60 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ y que la superficie total de membrana es de $0,03 \text{ m}^2$. Como la relación molar marcador/lípidos debe ser

de aproximadamente el 1%, se calcula el volumen de marcador a agregar en función de la concentración de la solución stock disponible. En este caso fue de 0,2 μL para n-SASL y 0,18 μL para CSL.

3.8.1.2 Vesículas unilamelares (LUVs)

Se prepararon LUVs de colesterol/PC de huevo, sitosterol/PC de huevo y ergosterol/PC de huevo con diferente contenido de esteroles: 0, 4, 10, 20 y 40 mol% del esteroles/lípidos totales. A cada tipo de LUVs se incorporaron alternativamente 5, 12, 16-SASL o CSL como sonda paramagnética. La mezcla de lípidos en cloroformo se secó bajo nitrógeno y se resuspendió en PBS (pH = 7,4). Los lípidos hidratados se sometieron a agitación por vórtex, y los liposomas multilamelares resultantes se convirtieron en LUVs por extrusión a través de filtros de 100 nm de poro (20 ciclos) a 40°C. Los lípidos puros fueron provistos por Sigma y Avanti Polar lipids (Alabaster, EE.UU.) y conservados a -20 °C.

3.8.1.3 Células UFL-AG-286

Incorporación de marcadores n-SASL

Para incorporar el marcador de espín en las muestras de células se depositó en un tubo Eppendorf el volumen de marcador calculado según la cantidad de células a marcar, y sobre el tubo se depositaron las células conservadas en el medio de cultivo básico. Se homogeneizó la mezcla y sin incubación se centrifugó y se separó el sobrenadante. Para eliminar el marcador no incorporado, las muestras se lavaron con medio de cultivo base, sin agregado de esteroides, centrifugando a 1.000 rpm durante 3 minutos.

La disminución del tiempo de centrifugación de la muestra de células marcadas de 5 minutos (tiempo original) a 3 minutos, resultó crítica para reducir el tiempo entre la incorporación del marcador y el comienzo del registro del espectro. Es importante que no se superen los 12 o 15 minutos de iniciada la marcación ya que se producen cambios en intensidad de la señal y éstos son dependientes del tiempo. El efecto de moléculas antioxidantes presentes en la membrana celular sería el responsable de la disminución de la señal del marcador en el tiempo.

Incorporación del marcador CSL

La incorporación de este marcador de espín es más difícil porque es sólo soluble en cloroformo, tóxico para las células. El volumen de marcador calculado según la cantidad de células a marcar se depositó en el fondo de un tubo de vidrio y se evaporó el solvente con N_2 gaseoso. Con el objeto de resuspender el marcador, se agregaron sucesivamente 1 μL de la solución alcohólica de lípidos utilizada para preparar la emulsión (libre de alfa-tocoferol), y 10 μL de Pluronic F68 al 10%.

La incorporación se facilitó mecánicamente por agitación con un vórtex y sobre esa mezcla se depositaron las células conservadas en 1 mL de medio de cultivo base. Se incubaron 10 minutos a 27°C, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 3 minutos para separar el sobrenadante. El sobrenadante se reservó para determinar la cantidad de marcador no incorporado a la muestra celular. El pellet celular se lavó con medio de cultivo base para eliminar el exceso de marcador, y se reservó también este último líquido de lavado.

Se determinó por EPR la cantidad de marcador en el sobrenadante, en el líquido de lavado y en el fondo del tubo de muestra donde se efectuó la marcación de las células. Para ello se realizó una extracción con cloroformo, agregando 100 μL a cada una de las muestras mencionadas. De la capa orgánica se cargaron 15 μL en un capilar para obtener los espectros de EPR, que se midieron en las mismas condiciones que las muestras. Se tomaron además espectros de un capilar vacío y de un patrón compuesto por 2 μL de la solución stock de CSL y 100 μL de cloroformo.

Este procedimiento se realizó en cada experimento para corroborar efectivamente la cantidad de marcador CSL que entró a las células.

3.8.1.4 Muestras policristalinas

Se prepararon soluciones secas de marcadores n-SASL y CSL diluidos en colesterol y sitosterol. Se disolvieron en cloroformo las cantidades adecuadas para preparar diluciones marcador/esterol 1/100, 1/500 y 1/1.000. Se colocaron las soluciones sobre vidrio de reloj para favorecer la evaporación del solvente y se obtuvieron muestras policristalinas de los marcadores diluidos. También se preparó un depósito seco de los marcadores concentrados 12-SASL y CSL.

3.8.2 Mediciones de EPR

Las muestras se cargaron en capilares de vidrio marca Tecnon (Berisso, Buenos Aires), se sellaron en un extremo y se montaron para la medición en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro exterior.

Los espectros de EPR se registraron a 9,7 GHz (banda X) en un espectrómetro Bruker EMX Plus equipado con una cavidad rectangular, que opera en un rango de temperaturas de 4 a 350 K. La frecuencia de modulación del campo es de 100 kHz y la amplitud del campo de modulación debe mantenerse debajo del 30% de los anchos de línea, para evitar distorsiones de los espectros por sobremodulación. Se sintonizó el campo central en 3.340 G con un barrido de 100 G en 200 segundos. Los espectros se registraron a temperaturas controladas con un criostato de flujo continuo de N_2 marca Bruker.

Resultados

4. Resultados

4.1 Desarrollo de un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular UFL-AG-286

4.1.1 Efecto de hidrolizados de proteínas de origen vegetal sobre la proliferación de células UFL-AG-286

Cultivos de células UFL-AG-286 en medio básico UNL + 1% de suero fetal bovino fueron suplementados individualmente con 3 mg.mL⁻¹ de peptona de soja III (PS III) o digesto papaínico de soja (DPS), y se evaluó la proliferación celular a las 120 hs., mediante el ensayo de MTS. Cada hidrolizado se ensayó en seis réplicas independientes. En la Tabla 1, donde se presentan los rendimientos celulares relativos respecto al control suplementado con 3 mg.mL⁻¹ de hidrolizado enzimático de caseína y 1 mg.mL⁻¹ de caldo triptosa (Absorbancia promedio de la incógnita/Absorbancia promedio del control), se puede observar que la PS III ejerció un ligero efecto estimulante sobre la proliferación celular, aunque no se diferenció significativamente respecto al control suplementado con hidrolizados de proteínas animales, mientras que el efecto del DPS, por el contrario, resultó insuficiente para promover niveles de proliferación idénticos a los del control. En función de este resultado se decidió seguir trabajando con la PS III como suplemento de origen vegetal para los medios UNL, en ausencia de otros hidrolizados de origen animal.

Tabla 1. Rendimientos celulares relativos en medios suplementados con hidrolizados de proteínas de soja.

Hidrolizado	Proliferación celular relativa
PS III	1,100 ± 0,004
DPS	0,770 ± 0,007

4.1.2 Proliferación de la línea celular UFL-AG-286 en medios de cultivo suplementados con microemulsiones preparadas a partir de aceites vegetales

Células UFL-AG-286 se cultivaron durante repetidos pasajes en distintos medios de cultivo, formulados sobre la base de medio UNL con la adición de 3 mg.mL^{-1} de hidrolizado enzimático de caseína y 1 mg.mL^{-1} de caldo triptosa, y suplementados con microemulsiones conteniendo distintos aceites vegetales: soja, maíz u oliva. Al cabo del décimo pasaje en cada medio, se cosecharon las células y se realizaron recuentos de células totales y viables. Cada una de las suspensiones celulares obtenidas se diluyó a una densidad inicial de 2×10^5 células viables. mL^{-1} en el medio respectivo, y se incluyó además un control suplementado con una microemulsion de lípidos de origen comercial. Con cada una de estas suspensiones celulares se sembraron pocillos de una placa de 24 orificios, dispensando $500 \text{ }\mu\text{L}$ de suspensión por pocillo. Las placas se incubaron a 27°C en ambiente humidificado, y al cabo de 10 días los cultivos se cosecharon de manera mecánica, mediante pipeteo suave, y se efectuaron los respectivos recuentos de células viables en cámara de Neubauer. En todos los medios de cultivo se verificó la existencia de proliferación celular, aunque en diferente magnitud. En la Tabla 2 se presentan los valores de densidad celular máxima obtenidos para cada uno de los medios. El medio suplementado con la microemulsión preparada a partir de aceite de soja y el medio suplementado con la microemulsión de aceite de maíz permitieron alcanzar el máximo rendimiento celular, sin diferencias significativas entre ambos. Por otro lado, el rendimiento alcanzado en el medio suplementado con la microemulsión preparada a partir de aceite de oliva fue aproximadamente similar al obtenido con la microemulsión comercial, y ambos significativamente menores a los dos primeros.

Tabla 2. Densidad celular máxima en medios de cultivo suplementados con distintas microemulsiones.

Microemulsión	Densidad celular máxima [Células. mL^{-1}]
Aceite de soja	$2,3 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
Aceite de maíz	$2,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
Aceite de oliva	$1,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
Comercial	$1,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$

4.1.3 Efecto de aceites vegetales sobre la replicación de AgMNPV en cultivos de células UFL-AG-286

Suspensiones de células UFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en los medios suplementados con microemulsiones de aceites de soja, maíz, oliva o lípidos de origen comercial, obtenidas a partir de la cosecha de cultivos en frascos de 25 cm², se infectaron con un stock de AgMNPV a una multiplicidad de infección de 2 TCID₅₀.célula⁻¹. Luego de 1 hora de incubación en agitación a baja velocidad, se tomaron alícuotas de 0,5 mL de cada suspensión celular infectada y se sembraron en pocillos de una placa de cultivo de 24 orificios, a una densidad inicial de 2x10⁵ células viables/pocillo. Las placas con los cultivos infectados se incubaron a 27°C durante siete días, al cabo de los cuales fueron cosechados mecánicamente. Los sobrenadantes de los cultivos se separaron mediante centrifugación a baja velocidad, y se conservaron a 4°C hasta efectuar la titulación de BVs. Cada uno de los pellets de centrifugación, conteniendo las células y los poliedros virales, se extrajeron inmediatamente con 0,5 mL de una solución de SDS 1% en agua, y los extractos fueron también conservados a 4°C hasta efectuar el recuento de poliedros en cámara de Neubauer.

Tabla 3. Producción viral en cultivos suplementados con diferentes microemulsiones.

Microemulsión	Poliedros [Poliedros.mL ⁻¹]	BVs [BVs.mL ⁻¹]
Soja	9,9x10 ⁷ ± 0,9x10 ⁷	3x10 ⁸ ± 1x10 ⁸
Maíz	6x10 ⁷ ± 1x10 ⁷	3x10 ⁷ ± 1x10 ⁷
Oliva	6,8x10 ⁷ ± 0,8x10 ⁷	3x10 ⁷ ± 1x10 ⁷
Comercial	8,8x10 ⁷ ± 0,4x10 ⁷	1,5x10 ⁸ ± 0,5x10 ⁸

Como se puede observar en la Tabla 3, los cultivos suplementados con la microemulsión preparada a partir de aceite de soja fueron los que permitieron obtener los rendimientos más elevados de ambas progenies virales, los cuales no resultaron significativamente diferentes a los alcanzados en los cultivos suplementados con la microemulsión comercial. Por otro lado, los cultivos suplementados con las microemulsiones preparadas a partir de los aceites de maíz y oliva rindieron títulos significativamente inferiores, tanto de poliedros como de virus brotados. En función de los resultados obtenidos, el aceite de soja fue seleccionado para ser utilizado como base para la formulación de una microemulsión que reemplace a la de origen comercial.

4.1.4. Evaluación de un medio suplementado con hidrolizado de proteína de soja y microemulsión de aceite de soja

Células UFL-AG-286 provenientes de un cultivo adaptado al crecimiento en medio UNL suplementado con 3 mg.mL^{-1} de hidrolizado enzimático de caseína, 1 mg.mL^{-1} de caldo triptosa y 1% de microemulsión de lípidos y esteroides de origen comercial fue adaptada, mediante repiques sucesivos, al crecimiento en el medio conteniendo 3 mg.mL^{-1} de hidrolizado de proteína de soja en reemplazo de los hidrolizados de proteínas animales, y suplementado con 1% de microemulsión basada en aceite de soja. Durante el período de adaptación, las células fueron sub-cultivadas en frascos de 25 cm^2 , y cada sub-cultivo se efectuó cuando la superficie libre sobre la pared de las botellas se reducía por lo menos al 10% de la superficie total. Luego de 20 pasajes sucesivos, lapso durante el cual el tiempo entre repiques se fue reduciendo paulatinamente y finalmente se estabilizó entre 4 y 5 días, se realizó una evaluación de la cinética de proliferación. Para ello, se tomaron células de un cultivo en una botella de 25 cm^2 , cosechado cuando la superficie cubierta por células alcanzó el 90%, se realizó el recuento de células viables y se efectuó una dilución en medio fresco para obtener una densidad celular inicial de $2 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$. Alícuotas de 0,5 mL de esta suspensión se sembraron en pocillos de placas de cultivo de 24 orificios (sin utilizar los pocillos ubicados sobre los bordes), la cual se depositó en una incubadora regulada a 27°C , en atmósfera humidificada. Cada 24 hs, a partir del momento de la siembra, se cosecharon dos pocillos seleccionados al azar, en los cuales las células fueron removidas mediante pipeteo suave. Sobre las suspensiones celulares obtenidas se efectuaron los recuentos de células totales y viables, y las curvas respectivas están representadas en la Figura 20.

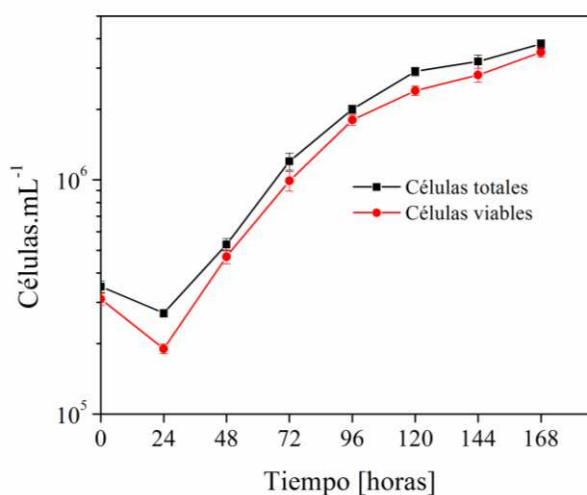


Figura 20. Recuento de células Totales y Viables de cultivos de células UFL-AG-286 adaptados al medio UNL-9 suplementado con microemulsión formulada sobre la base de aceite de soja.

Como se puede apreciar, luego de una fase lag inicial durante las primeras 24 horas de cultivo, se produjo una activa proliferación celular que se extendió hasta los 4 días, para posteriormente reducir la velocidad y estabilizarse la densidad celular en su valor máximo, que alcanzó un valor promedio de $3,5 \times 10^6$ células viables.mL⁻¹ entre los días 6 y 7.

La velocidad específica de proliferación celular entre los días 1 y 4 alcanzó un valor de $0,028 \text{ h}^{-1}$, lo cual determinó un tiempo de duplicación de 24,77 horas.

Por otro lado, en forma paralela, se evaluó la capacidad de los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados al medio suplementado con microemulsión formulada sobre la base de aceite de soja para infectarse y replicar a AgMNPV. Con este objetivo se cosecharon cultivos adaptados a este medio, se efectuaron los recuentos celulares correspondientes y se diluyeron en medio fresco para alcanzar una densidad celular inicial de 2×10^5 células.mL⁻¹. La suspensión obtenida se infectó con stock de AgMNPV a una MOI de 2 TCID₅₀.cel⁻¹, y luego de una hora de incubación con agitación suave, se tomaron alícuotas de 0,5 mL, las cuales fueron sembradas en pocillos de una placa de cultivo de 24 orificios. Cada 24 horas se cosecharon, mediante pipeteo suave, un par de pocillos tomados al azar, hasta el 7° día post-infección. Se apartó una alícuota de cada suspensión celular cosechada para efectuar recuento de células totales y viables, mientras que otra alícuota se centrifugó para separar el sobrenadante, que fue descartado, mientras que el pellet fue extraído para efectuar posteriormente el recuento de poliedros virales. Como se puede observar en la Figura 21, la proliferación celular luego de la infección resultó casi nula, no registrándose variaciones en la densidad celular total durante la duración del experimento. Por otro lado, la viabilidad se redujo a partir del tercer día post-infección, con un descenso abrupto entre los días 3 y 4, y una caída más gradual hasta el final. La disminución marcada de la viabilidad coincidió con un marcado incremento de la concentración de células infectadas (reconocibles por la presencia de masas de poliedros), que empezaron a hacerse visibles al tercer día luego de la infección.

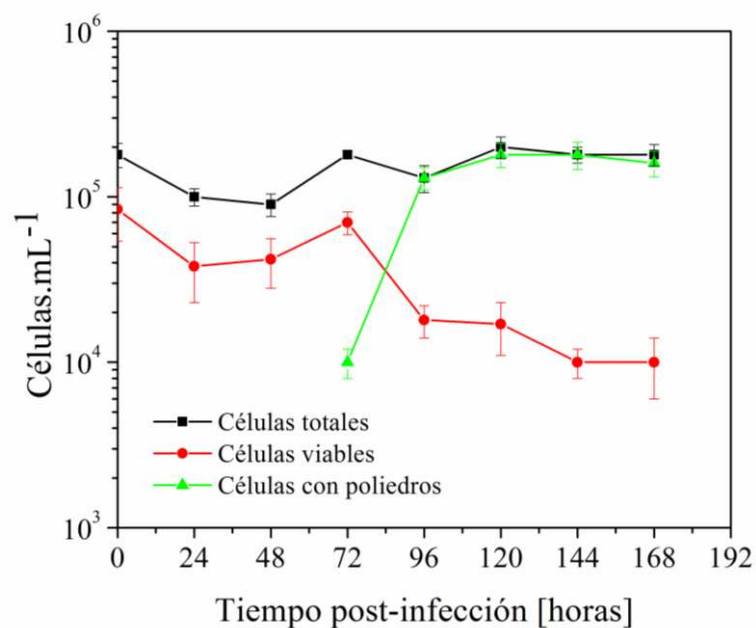


Figura 21. Recuento de células Totales, Viables y células productoras de poliedros en cultivos de la línea UFL-AG-286 adaptados al medio UNL-9 suplementado con microemulsión formulada sobre la base de aceite de soja, infectados con AgMNPV a una $MOI = 2 TCID_{50}.cel^{-1}$.

En cuanto a la evolución de los recuentos de poliedros virales en función del tiempo post-infección (Figura 22), se puede observar que se produjo un rápido incremento de su concentración entre los días 2 y 4 luego de la infección, y luego más lentamente hasta alcanzar un valor máximo de $7,75 \times 10^7$ poliedros.mL⁻¹ a los 5 días post-infección.

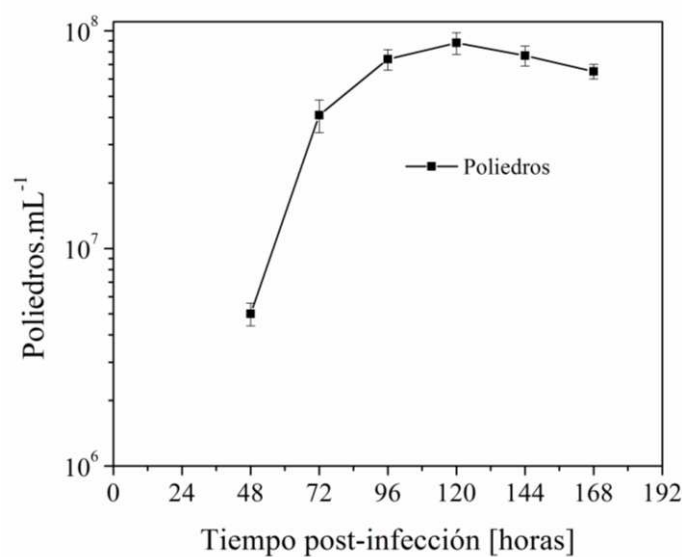


Figura 22. Recuento de poliedros en cultivos de la línea UFL-AG-286 adaptados al medio UNL-9 suplementado con microemulsión formulada sobre la base de aceite de soja, infectados con AgMNPV a una $MOI = 2 TCID_{50}.cel^{-1}$.

La evaluación del medio suplementado con una microemulsión de aceite de soja demostró que este medio, libre de componentes de origen animal (con la excepción del colesterol) tiene la capacidad de sostener la proliferación de las células UFL-AG-286 con parámetros de cultivo aproximadamente similares a los registrados en los medios suplementados con hidrolizados de proteínas animales. Por otro lado, esta evaluación reveló que las células cultivadas e infectadas en el mismo medio pueden replicar activamente al baculovirus AgMNPV, alcanzando rendimientos finales de poliedros virales que se encuentran sólo ligeramente por debajo de los alcanzados en los medios conteniendo hidrolizados de origen animal. Por lo tanto, el medio suplementado con diferentes microemulsiones basadas en aceite de soja, fue utilizado para llevar a cabo todos los experimentos que se describen a continuación en este trabajo de tesis.

4.2 Adaptación de la línea celular UFL-AG-286 a medios de cultivo libres de componentes de origen animal con diferente composición de esteroides

Partiendo de células UFL-AG-286 en cultivo estático en el medio básico libre de componentes de origen animal, pero suplementado con 1% de una emulsión lipídica a base de aceite de soja que contiene colesterol, se generaron dos sub-líneas adaptadas a crecer en sendos medios de idéntica composición básica, pero que difieren en el contenido de esteroides: uno suplementado con sitosterol, a la misma concentración que la empleada para el colesterol, y el otro sin esteroides agregados. La adaptación de cada sub-línea a su respectivo medio de cultivo se llevó a cabo mediante pasajes sucesivos en cultivos estáticos en frascos de 25 cm², reduciendo en cada pasaje el volumen de medio conteniendo colesterol a la mitad respecto al pasaje precedente, e incrementando en la misma proporción el volumen del medio conteniendo sitosterol o sin esteroides agregados. La adaptación al medio libre de esteroides agregados resultó dificultosa, con niveles de proliferación en descenso a medida que se reducía la concentración de colesterol, de tal manera que a lo largo del proceso, en algunas etapas, fue necesario estacionar la concentración de colesterol del medio en adaptación durante algunos pasajes antes de continuar con su reducción. Por el contrario, la adaptación al medio conteniendo el esteroide vegetal fue más rápida y sin deterioro notable de la capacidad de proliferación de las células en adaptación a medida que el colesterol era reemplazado por el sitosterol. Finalmente, al cabo de 200 pasajes sucesivos, cuando se obtuvieron cultivos de células capaces de proliferar activamente en el medio libre de esteroides agregados, se procedió a evaluar cuantitativamente los parámetros de crecimiento de los cultivos de cada una de las sub-líneas obtenidas. Se caracterizaron

asimismo los consumos de nutrientes y las producciones de metabolitos de cada una de las sub-líneas, como así también la respuesta frente a la infección con AgMNPV.

4.2.1 Evaluación de la proliferación de las células UFL-AG-286 en medios con distintos contenidos de esteroides

Para caracterizar los parámetros cinéticos de los cultivos de las sub-líneas de células UFL-AG-286 adaptadas a los medios con diferente contenido de esteroides, se iniciaron en paralelo inóculos de cada una de ellas a una densidad celular inicial de 2×10^5 células viables. mL^{-1} en frascos de 25 cm^2 . Los cultivos se incubaron a 27°C en atmósfera húmeda. Cada 24 horas se cosecharon dos cultivos de cada una de las sub-líneas, se procedió a efectuar los recuentos de células totales y viables, y se reservaron a -20°C alícuotas de los sobrenadantes obtenidos luego de la centrifugación para determinar las concentraciones de nutrientes y metabolitos.

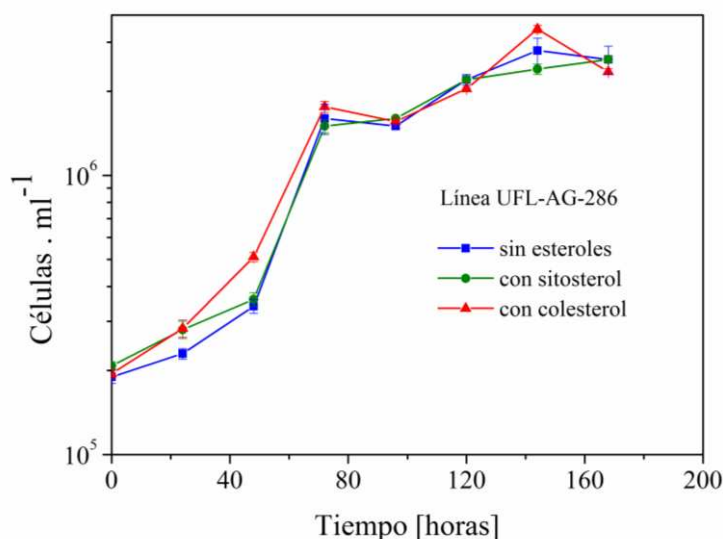


Figura 23. Curvas de crecimiento de cultivos estáticos de las sub-líneas de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con diferente contenido de esteroides.

Se observó fase “lag” al comienzo del cultivo en todos los cultivos, aunque de diferente duración: en el caso de los cultivos en los medios sin colesterol y con sitosterol se extendió durante 48 horas, mientras en los cultivos que contenían colesterol duró sólo 24 horas (Figura 23). Luego de la fase lag se verificó una fase de crecimiento exponencial en todos los cultivos, con una duración de 72 horas. La velocidad específica de multiplicación celular durante la fase exponencial fue de $0,026 \text{ h}^{-1}$ para los cultivos sin esteroides y con sitosterol (tiempo de duplicación de 26,7 horas) y de $0,025 \text{ h}^{-1}$ para los cultivos con colesterol (tiempo de duplicación de 27,7 horas). La densidad celular máxima alcanzada en los cultivos de células adaptadas al medio con colesterol, fue de $3,1 \times 10^6$ células viables. mL^{-1} , para los cultivos adaptados al medio sin esteroides fue de $2,8 \times 10^6$ células viables. mL^{-1} , ambos valores

alcanzados a las 144 horas de cultivo, y para los cultivos adaptados al medio con sitosterol fue de $2,59 \times 10^6$ células viables.mL⁻¹, a las 168 horas de cultivo. La viabilidad de los cultivos se mantuvo en porcentajes superiores al 91%.

Tabla 4. Densidad celular máxima, Velocidad específica de crecimiento y Tiempo de duplicación celular de las sub-líneas de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con diferente contenido de esteroides.

Sub-línea	Densidad celular máxima [células viables.mL ⁻¹]	Velocidad de crecimiento [h ⁻¹]	Tiempo de duplicación [h]
con colesterol	$3,1 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$	0,025	26,7
con sitosterol	$2,59 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$	0,026	27,7
sin esteroides	$2,8 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	0,026	27,7

4.2.2 Caracterización del consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con distinto contenido de esteroides

Para caracterizar el perfil nutricional y metabólico de los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados a medios con distinta fuente de esteroides, se determinaron las concentraciones de glucosa, glutamina, lactato y amonio en los sobrenadantes de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de cultivo, como se explicó en la sección precedente.

4.2.2.1 Consumo de nutrientes

Las concentraciones de glucosa disminuyeron constantemente, y en forma paralela, en los cultivos de las tres sub-líneas, los cuales conservaron niveles remanentes del carbohidrato por encima de 30 mM en el momento de la cosecha final (Figura 24.a). Por otro lado, las concentraciones de glutamina también decrecieron en forma paralela, pero a diferencia de lo ocurrido con la glucosa este aminoácido resultó consumido en su totalidad en los tres cultivos (Figura 24.b).

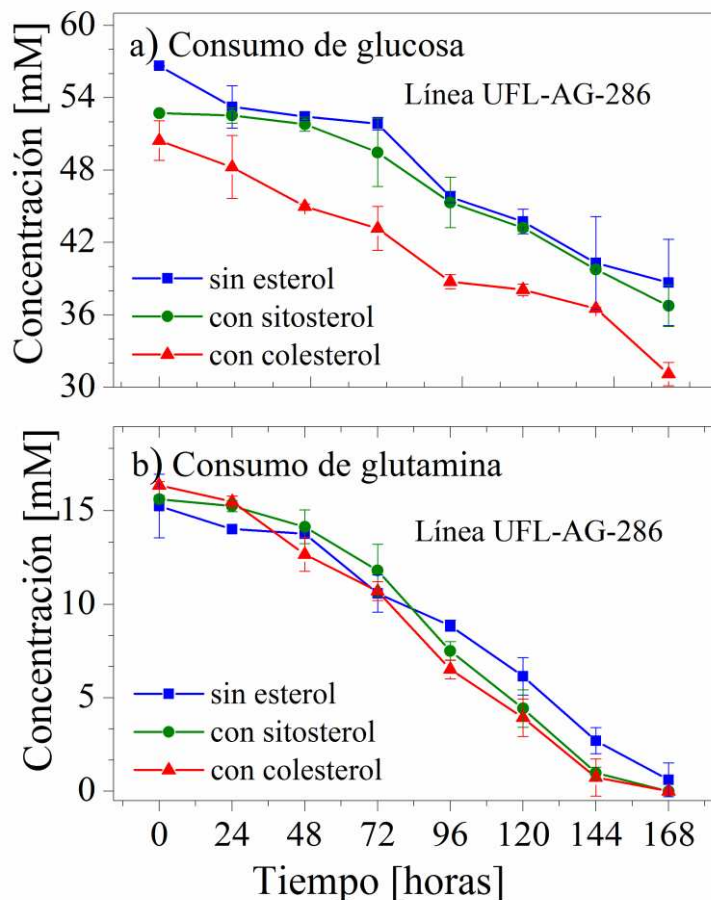


Figura 24. Evolución en el tiempo de las concentraciones de glucosa (a) y glutamina (b) en los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados a medios con diferente contenido de esteroides.

4.2.2.2 Producción de metabolitos

Las concentraciones de lactato aumentaron paulatinamente, y en forma paralela, durante toda la evolución de los cultivos, indistintamente de la composición de esteroides del medio de cultivo (Figura 25.a). De todos modos, los niveles de acumulación máxima de este producto metabólico no resultaron superiores a 5 mM en los cultivos conteniendo colesterol, y un poco menos aún en los otros dos. Por otro lado, la concentración de amonio también aumentó progresivamente a partir del inicio de los cultivos, en forma paralela, y hasta alcanzar un valor máximo de $(12,4 \pm 0,1)$ mM a las 168 horas en ambos cultivos conteniendo esteroides, mientras que la concentración máxima resultó ligeramente menor en el cultivo que no contenía esteroides (Figura 25.b).

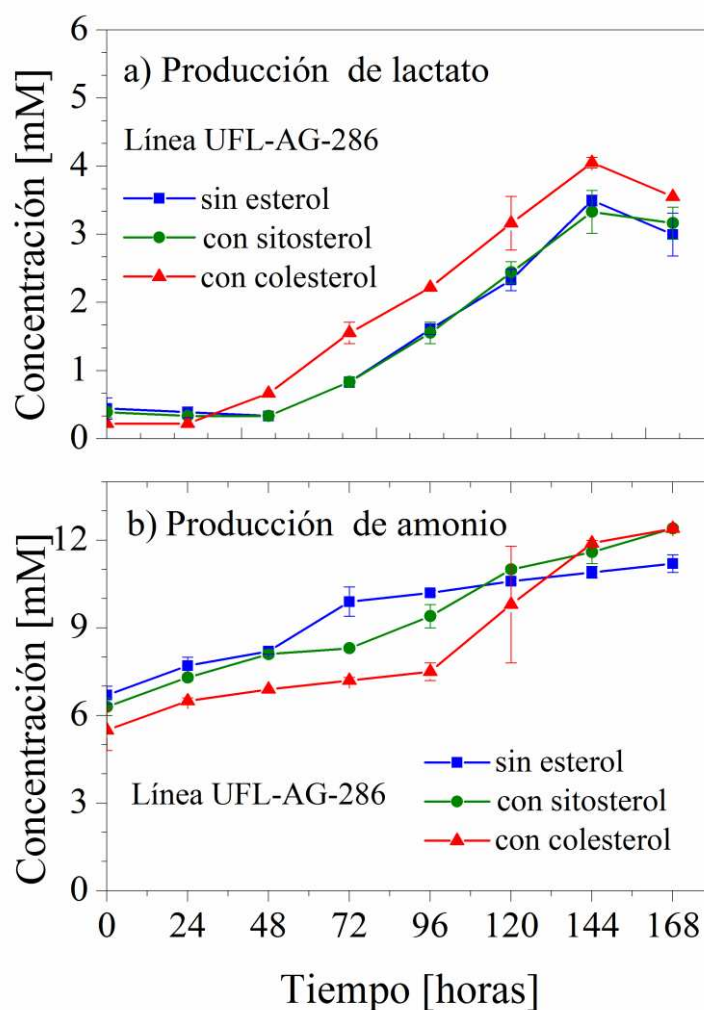


Figura 25. Evolución en el tiempo de las concentraciones de lactato (a) y amonio (b) en los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados a medios con diferente contenido de esteroides.

4.2.3 Determinación del diámetro de las células adaptadas a los medios con contenido diferente de esteroides

Cultivos estáticos de células adaptadas a crecer en medio con colesterol, con sitosterol y sin esteroles, fueron iniciados a una densidad celular inicial de 2×10^5 células viables. mL^{-1} .

Se incubaron en estufa a 27°C y a los 5 días de cultivo, todavía en fase de crecimiento exponencial, se cosecharon las células para recuento y determinación de diámetro celular, que se llevó a cabo en cámara de Neubauer y con ocular micrométrico calibrado. Se determinaron los diámetros de 100 células y se calcularon los promedios y las desviaciones respectivas.

Como se puede observar en la Tabla 5, las células adaptadas a los medios que carecen de colesterol, ya sea que contengan sitosterol o estén libres de esteroides, presentan diámetros casi similares, y

significativamente inferiores (aproximadamente 30%) a los diámetros de las células adaptadas al medio conteniendo colesterol. Si se conviene en considerar a las células como objetos esféricos, tales diferencias en los diámetros se traducen en diferencias en el volumen celular que alcanzan hasta casi 4 veces a favor de las células adaptadas y cultivadas en el medio con colesterol.

Tabla 5. Diámetro promedio de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con distinto contenido de esteroides.

	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
Diámetro celular [um]	19 ± 5	20 ± 4	30 ± 10
Volumen celular [um ³]	3.590	4.190	14.137

4.3 Replicación de AgMNPV en cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas a medios con diferente contenido de esteroides

Cultivos de células UFL-AG-286 en medio basal suplementado con 1% de emulsión lipídica sin esteroides, o suplementado con emulsión con colesterol o sitosterol, se infectaron con stock de AgMNPV a una multiplicidad de infección de 3 TCID₅₀.célula⁻¹. La densidad celular inicial en cada caso fue de 2,0x10⁵ células viables.mL⁻¹. Los cultivos infectados se incubaron en agitación continua a 100 rpm a 27°C. Se tomaron muestras de los cultivos infectados a los 7 días post infección para realizar recuento de células totales y viables (Tabla 6).

Tabla 6. Recuentos de células totales y viables, al momento de la cosecha, en los cultivos en suspensión de células UFL-AG-286 en medios con distinto contenido de esteroides, infectados con AgMNPV a una MOI de 3 TCID₅₀.cel⁻¹.

Sub-cultivos	células totales.mL ⁻¹	células viables.mL ⁻¹
sin esteroides	2,01x10 ⁶ ± 0,09x10 ⁶	1,9x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶
con sitosterol	2,1x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶	1,92x10 ⁶ ± 0,09x10 ⁶
con colesterol	1,11x10 ⁶ ± 0,07x10 ⁶	0,85x10 ⁶ ± 0,07x10 ⁶

Las células cultivadas en el medio suplementado con colesterol e infectadas con AgMNPV proliferaron escasamente. Por el contrario, el nivel de proliferación resultó significativamente más elevado en los cultivos de células adaptadas a los medios libres de colesterol, cuyas densidades celulares finales igualaron a los de los controles sin infectar.

4.3.1 Producción de progenies virales de AgMNPV en los cultivos infectados

Se evaluó la replicación de AgMNPV en los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados a medios con diferente contenido de esteroides mediante la titulación de viriones brotados y recuento de poliedros en las muestras tomadas a los 7 días post-infección en los cultivos infectados descritos en el apartado precedente.

Tabla 7. Producción de BVs y Poliedros de AgMNPV en los cultivos en suspensión de células UFL-AG-286 en medios con diferente contenido de esteroides e infectados con AgMNPV (MOI: 3 TCID₅₀.célula⁻¹).

Sub-cultivos	BVs.mL ⁻¹	Poliedros.mL ⁻¹
sin esteroides	6x10 ² ± 3x10 ²	1,0x10 ⁵ ± 0,2x10 ⁵
con sitosterol	7x10 ² ± 2x10 ²	6,0x10 ⁵ ± 0,5x10 ⁵
con colesterol	3,5x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷	4,4x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷

Como se puede observar en la Tabla 7, los rendimientos de ambas progenies alcanzados en los cultivos sin esteroides o suplementados con sitosterol resultaron significativamente inferiores a los obtenidos en los cultivos que contienen colesterol. No se registraron diferencias en los rendimientos alcanzados en los cultivos suplementados con sitosterol o no suplementados con esteroides.

4.3.2 Efecto de la concentración de microemulsión sobre la proliferación celular en medios con diferente contenido de esteroides

Se evaluó la respuesta a la variación en la concentración de emulsión lipídica en los cultivos adaptados a los medios con diferente contenido de esteroides.

Para cada uno de los tres medios de cultivo (sin esteroides, con colesterol y con sitosterol), se prepararon cinco variantes con concentraciones crecientes de emulsión: 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 %. Luego, con cada una de estas variantes se prepararon inóculos celulares, a una densidad inicial de 2x10⁵

células.mL⁻¹, los cuales fueron sembrados en placas de 24 pocillos e incubados durante 7 días a 27°C en atmósfera humidificada. Al cabo del período de incubación se cosecharon las células para recuento (Tabla 8). Cada concentración de emulsión fue ensayada por duplicado.

Tabla 8. Proliferación en los cultivos de células UFL-AG-286 adaptados a medios con diferentes fuentes esteroides, y suplementados con diferentes concentraciones de emulsiones lipídicas.

emulsión %	Densidad celular máxima [células viables.mL ⁻¹]		
	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
0	1,40x10 ⁶ ± 0,3 x10 ⁶	1,80x10 ⁶ ± 0,04x10 ⁶	1,80x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶
0,5	2,10x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶	2,00x10 ⁶ ± 0,04x10 ⁶	1,83x10 ⁶ ± 0,02x10 ⁶
1	2,20x10 ⁶ ± 0,5x10 ⁶	2,00x10 ⁶ ± 0,05x10 ⁶	2,00x10 ⁶ ± 0,02x10 ⁶
1,5	2,20x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶	2,10x10 ⁶ ± 0,04x10 ⁶	2,20x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶
2	-----	2,10x10 ⁶ ± 0,02x10 ⁶	2,21x10 ⁶ ± 0,01x10 ⁶

El comportamiento de los tres tipos de cultivos (sin esteroides, con sitosterol y con colesterol) fue similar en respuesta al incremento en la concentración de emulsión, obteniéndose un ligero aumento de la densidad celular final hasta una concentración de 1,5 %, para luego mantenerse constante cuando la concentración se incrementó al 2%. Las diferencias entre las densidades celulares máximas alcanzadas en los tres tipos de medios no resultaron significativas.

4.3.3 Efecto de la concentración de microemulsión sobre cultivos infectados

4.3.3.1 Proliferación post infección

El efecto de la adición de diferentes concentraciones de emulsión se evaluó también en cultivos infectados con AgMNPV a una MOI de 2 TCID₅₀.célula⁻¹. Cada concentración de emulsión, para cada uno de los tipos de cultivo, se ensayó por duplicado, en cultivos estáticos en placas de 24 pocillos, a una densidad celular inicial de 2x10⁵ células.mL⁻¹. Los cultivos infectados se cosecharon a los 7 días post-infección, y se separaron muestras para recuento de células totales y viables, titulación de viriones brotados y recuento de poliedros.

Tabla 9. Recuentos finales de células totales en cultivos adaptados a medios con diferente contenido de esteroides e infectados con AgMNPV, en presencia de diferentes concentraciones de emulsión lipídica.

% emulsión	Densidad celular máxima [células viables.mL ⁻¹]		
	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
0	$1,9 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
0,5	$1,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
1	$2,0 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,07 \times 10^6 \pm 0,09 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$
1,5	$2,3 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
2		$1,6 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$

Como se puede observar en la Tabla 9, a medida que se incrementó la concentración de emulsión conteniendo colesterol, a partir de 0,5%, se produjo una reducción del recuento final de células, mientras que en los cultivos adaptados a medios sin esteroides o suplementados con sitosterol, los incrementos en la concentración de emulsión no se asociaron a cambios significativos en la densidad celular final.

4.3.3.2. Replicación viral

En la Tabla 10 se muestran los títulos de producción de viriones brotados. Como se puede observar, en los cultivos conteniendo colesterol el título de viriones brotados aumentó conforme se incrementó la proporción de emulsión, hasta una concentración de 1,5%, para reducirse ligeramente cuando la concentración de emulsión se incrementó a 2%. Por el contrario, en los cultivos incubados en medio con emulsiones sin esteroles y con sitosterol, no se registró producción de viriones brotados a ninguna de las concentraciones de emulsión que fueron ensayadas.

En cuanto a la producción de cuerpos de oclusión, en la Tabla 11 se puede observar que en los cultivos conteniendo colesterol los rendimientos de poliedros se incrementaron con los aumentos de la concentración de emulsión hasta un límite de 1,5%, y luego decayó ligeramente cuando la proporción de emulsión subió hasta 2%, repitiendo el comportamiento observado en la producción de viriones brotados. Por otro lado, los recuentos de poliedros resultaron significativamente menores en los cultivos adaptados al medio sin esteroides, mientras que en los cultivos con sitosterol los rendimientos resultaron también inferiores a los registrados con colesterol pero ligeramente superiores a los alcanzados en el medio sin esteroides.

Tabla 10. Título de viriones brotados, BVs, en cultivos adaptados a medios con diferente contenido de esteroides e infectados con AgMNPV, en presencia de diferentes concentraciones de emulsión lipídica.

AgMNPV BVs [TCID ₅₀ .mL ⁻¹]			
% emulsión	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
0	500 ± 400	1.000 ± 400	1,35x10 ⁵ ± 0,05x10 ⁵
0,5	800 ± 400	3.000 ± 1.000	8x10 ⁶ ± 2x10 ⁶
1	600 ± 400	700 ± 100	3x10 ⁷ ± 1x10 ⁷
1,5	400 ± 400	1.000 ± 500	4x10 ⁸ ± 1x10 ⁸
2		600 ± 100	8x10 ⁷ ± 4x10 ⁷

Tabla 11. Producción de cuerpos de oclusión en cultivos adaptados a medios con diferente contenido de esteroides e infectados con AgMNPV, en presencia de diferentes concentraciones de emulsión lipídica.

% Emulsión	en células sin esteroles [Poliedros.mL ⁻¹]	en células con sitosterol [Poliedros.mL ⁻¹]	en células con colesterol [Poliedros.mL ⁻¹]
0	5x10 ⁴ ± 4x10 ⁴	3x10 ⁵ ± 1x10 ⁵	5,0x10 ⁶ ± 0,5x10 ⁶
0,5	5,0x10 ⁴ ± 0,8x10 ⁴	6,0x10 ⁵ ± 0,610 ⁵	4,0x10 ⁷ ± 0,6x10 ⁷
1	1,0x10 ⁵ ± 0,5x10 ⁵	6,0x10 ⁵ ± 0,4x10 ⁵	4,0x10 ⁷ ± 0,8x10 ⁷
1,5	2,0x10 ⁵ ± 0,7x10 ⁵	1,0x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶	1,00x10 ⁸ ± 0,07x10 ⁸
2		8x10 ⁵ ± 4x10 ⁵	6,6x10 ⁷ ± 0,5x10 ⁷

La Tabla 12 muestra que los rendimientos específicos de poliedros resultaron significativamente más elevados en los cultivos suplementados con emulsión con colesterol, alcanzando un rendimiento máximo superior a 80 cuerpos de oclusión por célula cuando la concentración de emulsión fue de 1,5%. En los cultivos adaptados a crecer en medio de cultivo sin esteroles o con sitosterol los rendimientos específicos de poliedros resultaron para todas las proporciones de suplementos ensayados menores a 0,5 cuerpos de oclusión por célula, si bien se pueden advertir diferencias entre los rendimientos de los cultivos que contenían sitosterol y los de los cultivos libres de esteroides.

Similar comportamiento siguieron los rendimientos específicos de viriones brotados (Tabla 12): los cultivos suplementados con emulsión con colesterol alcanzaron un rendimiento específico superior a 280 viriones brotados por célula cuando la concentración de emulsión fue de 1,5%, mientras que los cultivos adaptados a crecer en medio sin esteroles o con sitosterol produjeron rendimientos específicos

de viriones brotados menores a 0,001 Bvs/célula, para todas las concentraciones de emulsiones que fueron ensayadas.

Tabla 12. Rendimiento específico de poliedros y de viriones brotados, obtenidos en cultivos adaptados a medios suplementados con distinta proporción de emulsión y contenido de esteroides.

% emulsión	Rendimiento específico de poliedros [poliedros.célula ⁻¹]			Rendimiento específico de viriones brotados [viriones brotados.célula ⁻¹]		
	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
0	0,02	0,12	3,33	2x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴	0,09
0,5	0,02	0,27	28,31	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻³	5,16
1	0,05	0,28	28,44	2x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴	22,57
1,5	0,08	0,47	80,52	2x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴	284,48
2		0,37	42,73		5x10 ⁻⁴	40,68

4.4 Unión del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* sobre células UFL-AG-286 con diferente contenido de esteroides

4.4.1 Unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 tratadas con metil-β-ciclodextrina (MβCD)

Se decidió modificar el contenido de esteroides de las células de la línea UFL-AG-286 mediante el uso de MβCD. Para ello, células UFL-AG-286 en cultivo estático en el medio básico libre de componentes de origen animal, suplementado con 1% de una emulsión lipídica a base de aceite soja que contiene colesterol, se trataron con MβCD 10 mM durante una hora a 27°C en agitación continua. Este procedimiento permitió reducir un 80% el contenido de colesterol celular. Posteriormente, distintas alícuotas de esa suspensión celular se incubaron durante 16 horas a 27°C en agitación continua en medio suplementado con emulsión sin esteroles agregado, con sitosterol o con colesterol. De esta manera, partiendo de cultivos suplementados con colesterol se obtuvieron células libres de esteroides, células conteniendo sitosterol y células conteniendo colesterol, luego de haber sido privadas temporariamente de esteroides. Muestras de estos tres tipos de células, suspendidas en los respectivos medios de cultivo, se colocaron en sendos tubos Eppendorf envueltos en papel de

aluminio, al abrigo de la luz, a una densidad inicial de 1×10^6 células. mL^{-1} . A cada tubo se agregó $8 \mu\text{L}$ de stock de AgMNPV (título viral: $6,32 \times 10^8$ $\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$), determinando una multiplicidad de infección de 5 $\text{TCID}_{50} \cdot \text{célula}^{-1}$. En paralelo se inoculó a la misma MOI un tubo con idéntica cantidad de células provenientes de un cultivo que no fue tratado con M β CD, que se tomó como control. Los tubos inoculados se mantuvieron en agitación continua a 100 rpm. Se tomaron muestras ($70 \mu\text{L}$) de las respectivas suspensiones a los 240 minutos posteriores a la inoculación viral, se centrifugaron a 13.000 rpm y los sobrenadantes se conservaron a -80°C para la posterior titulación viral. La viabilidad de las suspensiones celulares tratadas con M β CD, luego de la infección, resultó mayor al 70% en todos los casos.

Tabla 13. Porcentajes de unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 modificados en su contenido de esterol por tratamiento con M β CD y realimentados con colesterol o sitosterol a los 240 minutos post-infección.

	sin esterol agregado	con sitosterol	con colesterol
Porcentajes de unión	(87 \pm 5) %	(91 \pm 5) %	(98 \pm 5) %

Como se puede observar en la Tabla 13, en todos los cultivos se verificó una significativa reducción de los títulos virales entre la inoculación viral y los 240 minutos post-infección, con porcentajes que alcanzaron a 87% (cultivos no realimentados con esteroides), 91% (cultivos realimentados con sitosterol) y 98% (cultivos realimentados con colesterol). La reducción de los títulos virales en los sobrenadantes de cultivo se interpreta como producto de la unión de los viriones sobre las células. Si bien no puede descartarse que la inactivación sea un componente del descenso de los títulos virales, la velocidad de inactivación de los viriones en estas condiciones es significativamente menor, como se expone más adelante.

4.4.2 Cinética de unión de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 adaptados a distintas fuentes de esteroides

Una vez lograda la adaptación de la línea UFL-AG-286 al cultivo en medios suplementados con diferente fuente de esteroides, las sub-líneas obtenidas se utilizaron para evaluar el impacto del contenido de esteroides sobre la cinética de unión viral. Cultivos en monocapa en frascos T de 25 cm^2 de cada una de las sub-líneas, con una densidad celular de $1 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} , fueron infectados con stock viral a una MOI de 10 $\text{TCID}_{50} \cdot \text{célula}^{-1}$. Los cultivos inoculados con el virus se incubaron a 27°C . Se tomaron muestras ($70 \mu\text{L}$) de los respectivos sobrenadantes a los 30, 60, 90, 120, 180 y 240

minutos post-infección. Las muestras se centrifugaron 1 minuto a 13.000 rpm, y los sobrenadantes se guardaron a 4°C hasta la titulación viral. Luego de tomar la última muestra de los respectivos sobrenadantes, los cultivos infectados se mantuvieron en incubación a 27°C para observar su evolución hasta los 7 días post-infección. El experimento se repitió en dos ensayos realizados de manera independiente.

Los promedios y desviaciones estándar de los títulos virales determinados en los sobrenadantes de los respectivos cultivos infectados a los diferentes tiempos post-infección se muestran en la Figura 26. En la misma están representadas, asimismo, las rectas de regresión lineal, a partir de cuyas pendientes se determinaron las respectivas constantes de unión (k_u). Como se puede observar, los títulos virales se redujeron en todos los cultivos, pero con distintas velocidades: mientras que en los cultivos de células con colesterol la reducción del título viral transcurrió con una k_u de $(-0,29 \pm 0,03) \text{ h}^{-1}$, en los cultivos con sitosterol la k_u fue de $(-0,24 \pm 0,01) \text{ h}^{-1}$ y en aquellos que no contenían esteroides resultó aún menor, $k_u = (-0,16 \pm 0,03) \text{ h}^{-1}$.

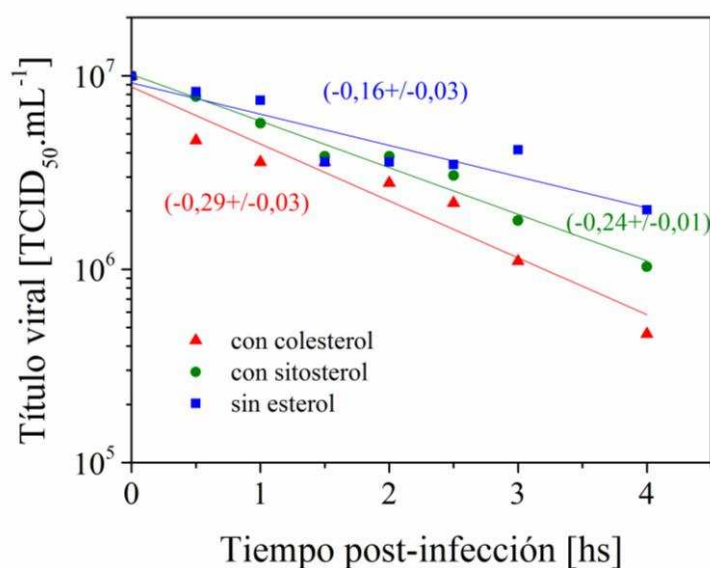


Figura 26. Títulos virales de AgMNPV en función del tiempo post-inoculación en células UFL-AG-286 adaptados a medios suplementados con emulsiones sin esteroles agregado, con sitosterol o con colesterol.

Como se puede observar en la Figura 26, los títulos virales se redujeron en los sobrenadantes de todos los cultivos de las células adaptadas a los medios con diferente contenido de esteroides, si bien la reducción transcurrió más rápidamente en los cultivos adaptados al medio conteniendo colesterol.

En la Tabla 14 se muestran los porcentajes de reducción de los títulos virales iniciales alcanzados a los 240 minutos post-infección en los cultivos adaptados a los medios con diferente contenido de esteroides que resultaron significativamente mayores en los cultivos de las células que contenían

colesterol (95 ± 1 %), respecto a los de aquellos cuyas células contenían sitosterol (89 ± 1 %) o que no contenían esteroides (80 ± 3 %).

Tabla 14. Porcentajes de Unión de BVs de AgMNPV sobre células UFL-AG-286 adaptados a medios suplementados con emulsiones sin esteroles agregados, con sitosterol o con colesterol a los 240 minutos post-infección.

	sin esteroles agregados	con sitosterol	con colesterol
Porcentajes de unión	(80 ± 3) %	(89 ± 1) %	(95 ± 1) %

Respecto a la evolución posterior de estos cultivos, a los 7 días post infección no se observó proliferación celular significativa, la mayor parte de las células contenían poliedros, y había restos celulares y poliedros libres en el medio de cultivo de las células adaptadas al medio con colesterol. Por el contrario, la observación de los cultivos de células adaptadas a sitosterol permitió apreciar proliferación celular y escasa cantidad de células con evidencias de efecto citopático. En los cultivos de células adaptadas sin esteroides también se verificó proliferación celular significativa y muy escasa cantidad de células con efecto citopático típico de la infección con AgMNPV.

4.4.3 Cinética de inactivación de viriones brotados de AgMNPV en medios con diferente contenido de esteroides

Para verificar la estabilidad los viriones brotados del virus AgMNPV en medios con diferente contenido de esteroides, se diseñó un experimento en el que se incubaron idénticas cantidades de stock viral en medio de cultivo libre de suero, con o sin contenido de colesterol.

El stock viral utilizado tenía un título de $2,94 \times 10^8$ TCID₅₀ y la dilución viral en los medios de cultivo fue 1/100. El experimento se realizó por triplicado. Se colocó 3,96 mL de cada medio a ensayar en sendos tubos y se agregó a cada uno 40 µL del stock viral, de manera de lograr una dilución 1/100. Una vez homogeneizado por pipeteo suave, se dividió cada muestra en tres tubos plásticos. De esa manera se organizó el experimento por triplicado, resultando en seis muestras a analizar, tres correspondientes al medio sin esteroles agregados y las otras tres restantes al medio de cultivo con colesterol como fuente de esteroles. Los seis tubos se incubaron a 27° C durante 72 hs. De cada uno de ellos se tomaron 100 µL a diferentes tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 horas), y se determinó el título de virus brotado. Se organizó el experimento de manera de efectuar las titulaciones de las muestras de manera inmediata, sin almacenaje previo.

En la Figura 27 se representa la evolución en el tiempo del título viral luego de ponerse en contacto con el medio de cultivo base suplementado en uno de los casos con una microemulsión sin esterol y en el otro con una microemulsión con colesterol agregado.

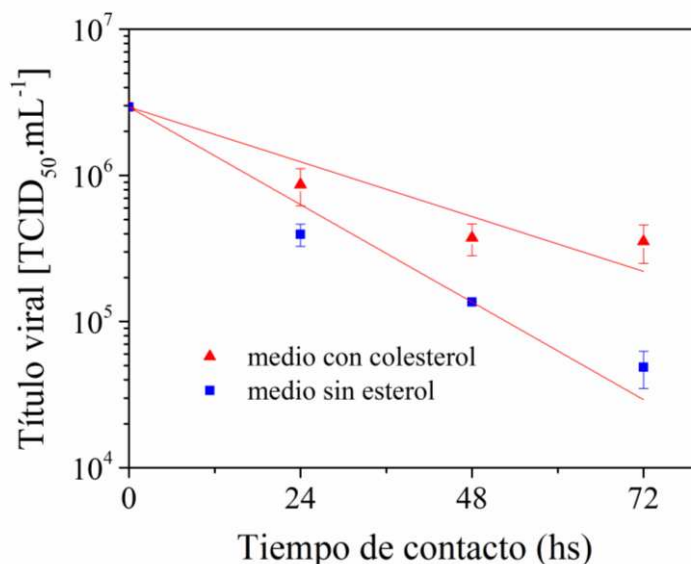


Figura 27. Inactivación de viriones brotados de AgMNPV en el medio de cultivo suplementado con microemulsión sin esteroides o microemulsión con colesterol.

Como se puede observar en la Figura 27, los títulos virales disminuyeron con el tiempo en contacto con ambos medios de cultivo, pero a velocidades diferentes. Mediante regresión lineal se calcularon las respectivas constantes de inactivación: $(-0,016 \pm 0,002) \text{ h}^{-1}$ en el medio suplementado con emulsión con colesterol, y $(-0,028 \pm 0,001) \text{ h}^{-1}$ en el medio sin esteroides. Estas constantes determinan tiempos medios de inactivación de 10,8 hs en el medio sin esteroides y 18,8 hs en el medio suplementado con colesterol.

4.5 Aplicación de la técnica de EPR al estudio del orden dinámico y la funcionalidad de membranas

Considerando que la mayor parte de los esteroides celulares se concentran en la membrana plasmática, las diferencias observadas en el comportamiento frente a la infección de las células adaptadas y cultivadas en medios con diferente composición de esteroides podrían resultar una expresión de cambios en el ordenamiento estructural y la funcionalidad de la membrana plasmática, que serían vitales para el progreso del proceso de infección viral. Para verificar si los cambios en el contenido de esteroides producen modificaciones en las propiedades de la membrana plasmática de las

células se recurrió a la técnica de de EPR con los marcadores de espín n-SASL y CSL, que contienen un radical nitróxido estable. Esta técnica permite obtener información sobre el ordenamiento dinámico y la fluidez de las membranas analizadas, propiedades que podrían estar relacionadas con la funcionalidad de la membrana plasmática durante el proceso de infección viral. Los experimentos se llevaron a cabo primero sobre sistemas modelo de membranas, y luego directamente sobre células UFL-AG-286, en ambos casos sujetas a variaciones en el contenido de esteroides.

4.5.1 Determinación de la fluidez en membranas modelo por EPR

Se utilizaron como membranas modelo liposomas unilamelares (LUVs) preparados con colesterol/PC de huevo o sitosterol/PC de huevo, con diferentes proporciones molares de esterol (0%, 4%, 10%, 20% y 40%) y el agregado de un marcador de espín liposoluble a concentración de 1% molar relativa a los lípidos totales.

4.5.1.1 Marcadores de espín n-SASL

En una primera etapa se utilizaron los marcadores de espín derivados del ácido esteárico 5-SASL, 12-SASL y 16-SASL. La Figura 28 muestra los espectros obtenidos para LUVs con una concentración de esteroides del 20% y los registrados para LUVs sin esteroides. La temperatura de medición fue de (27 ± 1) °C. En los espectros marcadas con n-SASL se determinó el parámetro Hiperfino A_{MIN} , directamente proporcional a la fluidez de membrana.

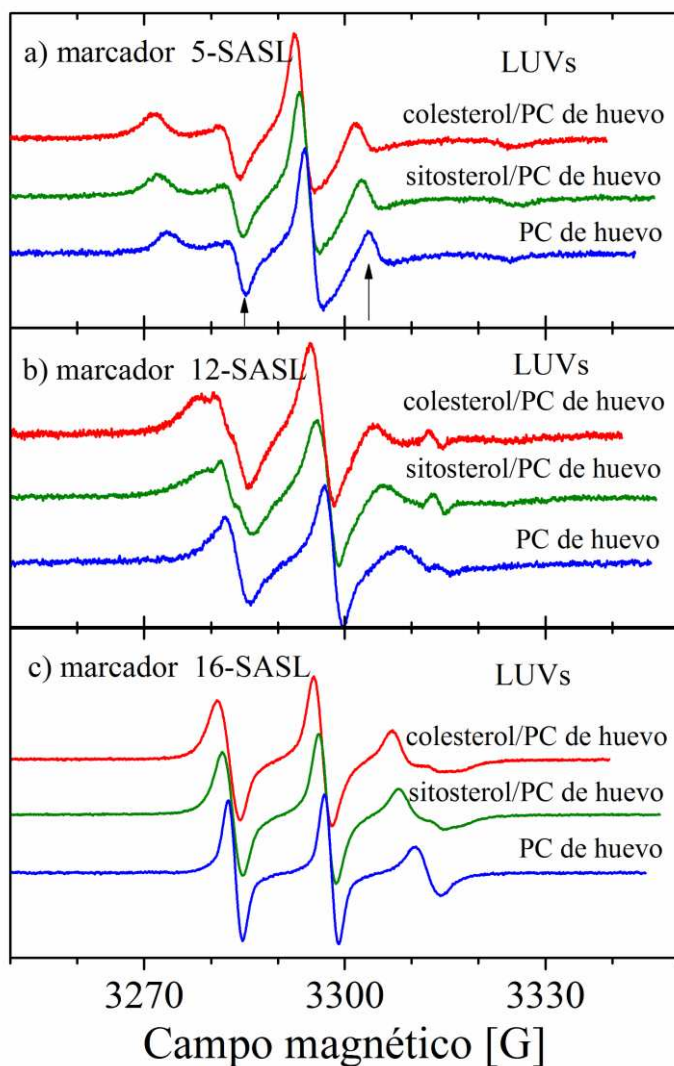


Figura 28. Espectros de EPR del marcador de espín 5-SASL (a), 12-SASL (b) y 16-SASL (c) en LUVs de colesterol/PC de huevo, sitosterol/PC de huevo con una proporción de esteroles/lípidos totales de 20%, y PC de huevo puro. Con una flecha se identifica la posición de los picos involucrados en la determinación del parámetro A_{MIN} para diferentes concentraciones del esteroles (a). Temperatura: (27 ± 1) °C.

Las medidas de EPR con marcadores 5, 12 y 16 SASL, con distinta posición del radical nitróxido en la cadena hidrocarbonada (n), permitieron medir la movilidad a distinta profundidad en la membrana.

En todos los casos se verificó un aumento de A_{MIN} como función de n, que indica un incremento en la movilidad de las cadenas lipídicas al acercarse al centro de la bicapa (Figura 29).

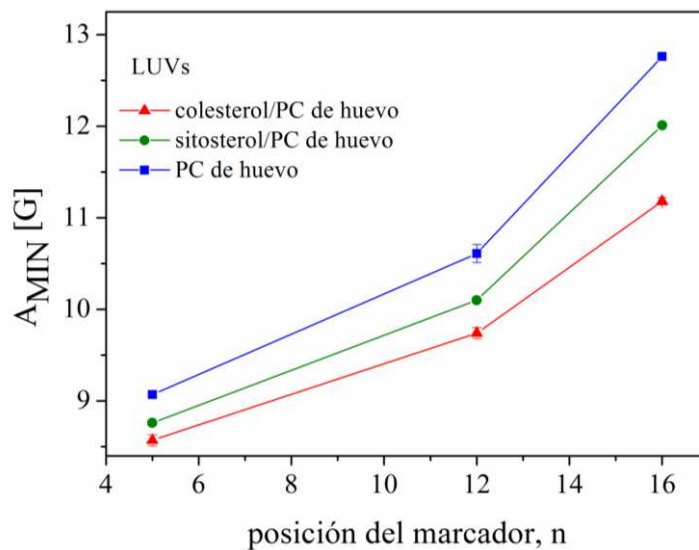


Figura 29. Parámetro Hiperfino A_{MIN} como función de la posición del radical nitróxido a lo largo de la cadena acílica. Parámetro calculado de los espectros de EPR como los mostrados en la Figura 4.10, para LUVs con una proporción de esterol/lípidos totales de 20%. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Se graficó el parámetro hiperfino A_{MIN} en función de las diferentes concentraciones de esteroides en LUVs y los resultados pueden analizarse en la Figura 30. Se notó una disminución significativa en la fluidez de membrana cuando se incrementaba el contenido de colesterol o sitosterol. Para proporciones de esterol menores que el 10 mol% no se observó ninguna diferencia entre ellos, aunque para concentraciones de esterol mayores el colesterol resultó más efectivo que el sitosterol en la disminución de la fluidez de membrana.

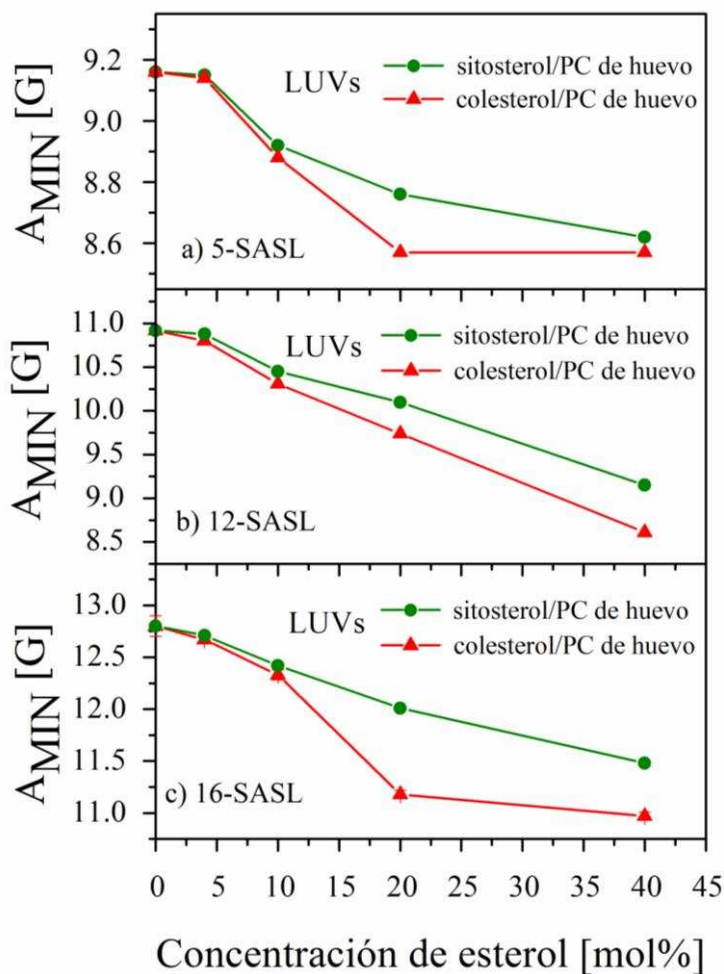


Figura 30. Parámetro Hiperfino A_{MIN} para marcadores de espín 5-SASL (a); 12-SASL (b) y 16-SASL (c), correspondientes a LUVs de PC de huevo y colesterol o sitosterol, como función de las diferentes concentraciones de esterol. Temperatura: (27 ± 1) °C.

El marcador de espín 12-SASL registró cambios con la concentración de colesterol hasta el 40% de esterol respecto de lípidos totales, resultando ser el marcador más sensible a las variaciones de fluidez en LUVs probablemente porque se localiza en la zona de posicionamiento de las moléculas de esterol en las membranas (Figura 30.b).

Se prepararon LUVs de ergosterol/PC de huevo. El ergosterol es el esterol presente en la levadura de cerveza. Por ello, posiblemente forme parte de los medios de cultivo, incluso en el caracterizado como “sin esteroides”. Se analizaron los espectros correspondientes a los marcadores 12-SASL (Figura 31), 5-SASL y 16-SASL (espectros no mostrados).

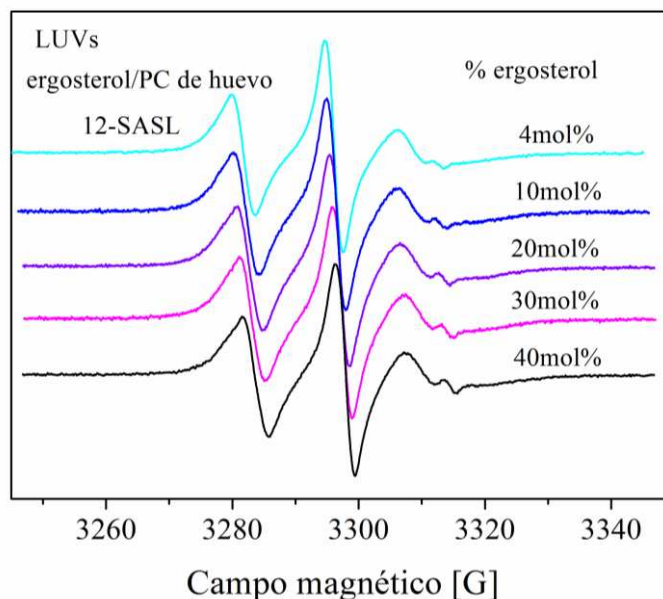


Figura 31. Espectros de EPR correspondientes a LUVs de ergosterol/PC de huevo a diferentes concentraciones de esteroles. Temperatura: (27 ± 1) °C.

En la Figura 32 se comparó la variación del parámetro Hiperfino A_{MIN} con la concentración de esteroles presente en la membrana en vesículas de PC de huevo con ergosterol, sitosterol y colesterol, marcadas con 12-SASL.

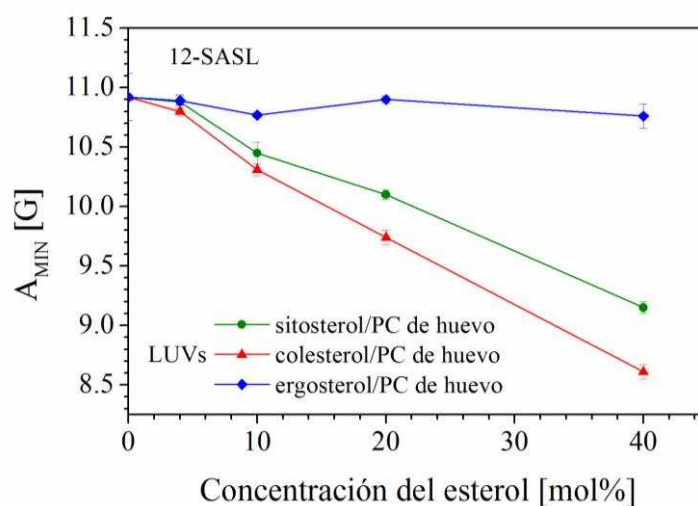


Figura 32. Parámetro Hiperfino A_{MIN} para el marcador de espín 12-SASL, correspondiente a LUVs de PC de huevo y ergosterol, sitosterol o colesterol, como función de las diferentes proporciones de esteroles en las membranas. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Entre 0 y 4 mol% de esteroles, no se evidencian diferencias apreciables en el parámetro A_{MIN} para los distintos esteroles. Se puede informar una disminución del parámetro al aumentar la proporción de

esterol para el colesterol y el sitosterol. La fluidez de membrana se mantiene prácticamente constante para el caso del ergosterol en el rango de concentraciones analizadas. Dicho comportamiento difiere del resto de los esteroides ensayados.

Se analizó la respuesta del parámetro A_{MIN} para los marcadores de espín n-SASL en LUVs de PC de huevo con ergosterol, colesterol o sitosterol en distintas concentraciones, a dos diferentes temperaturas. Una de las temperaturas fue 20°C, temperatura a la cual la PC de huevo permanece en estado líquido cristalino y la otra 27°C, temperatura de crecimiento de las células UFL-AG-286.

Como fue de esperar, un aumento en la temperatura produce un incremento en la fluidez de membrana que se registra en el parámetro Hiperfino A_{MIN} . Para todos los esteroides en PC de huevo ensayados, y a todas las concentraciones de esteroles, los parámetros A_{MIN} a 27°C son mayores que a 20°C (Figura 33). El marcador 12-SASL resultó ser el más sensible a las variaciones de fluidez.

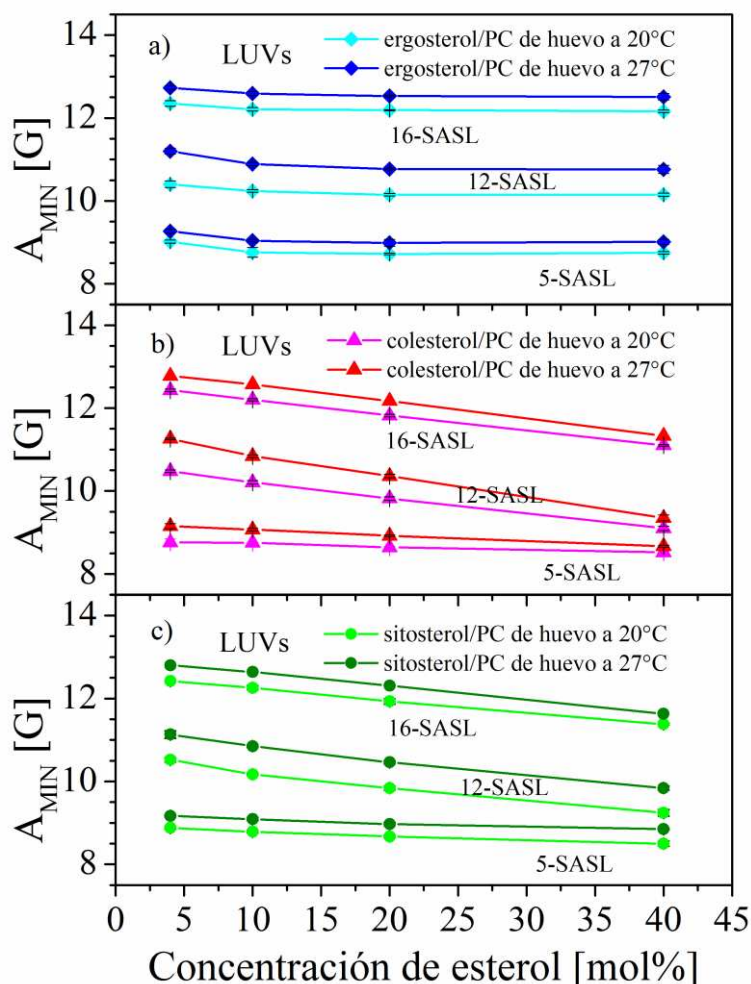


Figura 33. Parámetro Hiperfino A_{MIN} en LUVs de ergosterol/PC de huevo (a), colesterol/PC de huevo (b) y sitosterol/PC de huevo (c), como función de la concentración del esteroles a dos temperaturas, 20°C y 27°C. Marcadores de espín: 5, 12 y 16-SASL.

4.5.1.2 Marcador de espín Colestano (CSL)

Se prepararon LUVs de PC de huevo, colesterol/PC de huevo y sitosterol/PC de huevo, con diferentes proporciones de esteroles (0%, 4%, 10%, 20% y 40%), incorporando el marcador 3- β -doxyl-5- α -colestano (CSL) con estructura química similar al colesterol. La temperatura de medición fue de (27 ± 1) °C. Los espectros registrados con este marcador se muestran a continuación en la Figura 34. En este caso se determinó el parámetro Hiperfino A_{MAX} inversamente proporcional a la fluidez de membrana. Cuando se analizaron vesículas de PC de huevo, resultó evidente que los picos (señalados con flechas) que permiten el cálculo del parámetro Hiperfino están más próximos. Ese menor A_{MAX} se corresponde con una membrana más fluida.

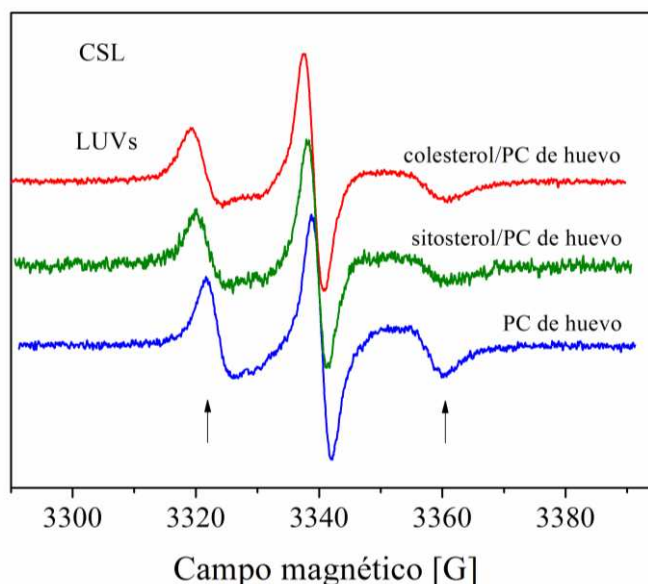


Figura 34. Espectros de EPR para el marcador CSL, correspondientes a LUVs de PC de huevo y PC de huevo y colesterol o sitosterol, con una proporción de esteroles/lípidos totales de 20%. Con una flecha se identifica la posición de los picos involucrados en la determinación del parámetro Hiperfino A_{MAX} para los diferentes esteroides. Temperatura: (27 ± 1) °C.

En la Figura 35 se observó el incremento del parámetro Hiperfino A_{MAX} con la concentración de esteroles, pero no se registraron diferencias significativas entre ambos esteroides.

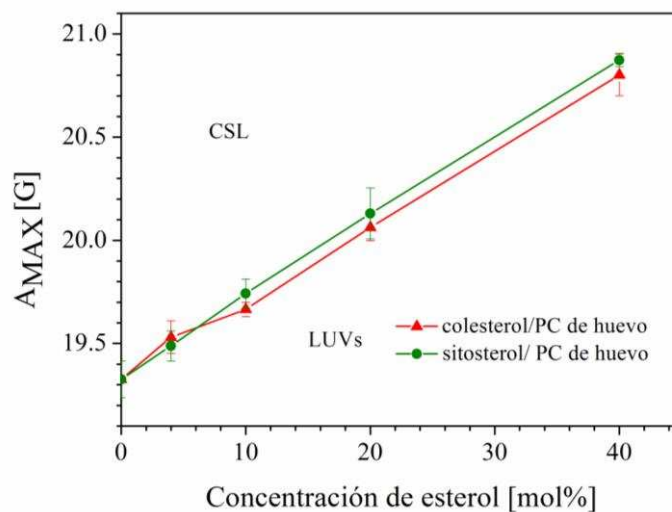


Figura 35. Parámetro Hiperfino A_{MAX} para el marcador de espín CSL, correspondiente a LUVs de PC de huevo y sitosterol o colesterol, como función de las diferentes proporciones de esterol en las membranas. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Efecto de la temperatura sobre las determinaciones de EPR

Se prepararon vesículas multilamelares (MLVs) de PC de soja y 4% de colesterol con el marcador de espín CSL para analizar su variación con la temperatura.

Se registraron los espectros de EPR de esta muestra a diferentes temperaturas en un rango de $(-36^{\circ}\text{C}$ a 27°C), datos que se muestran en la Figura 36.

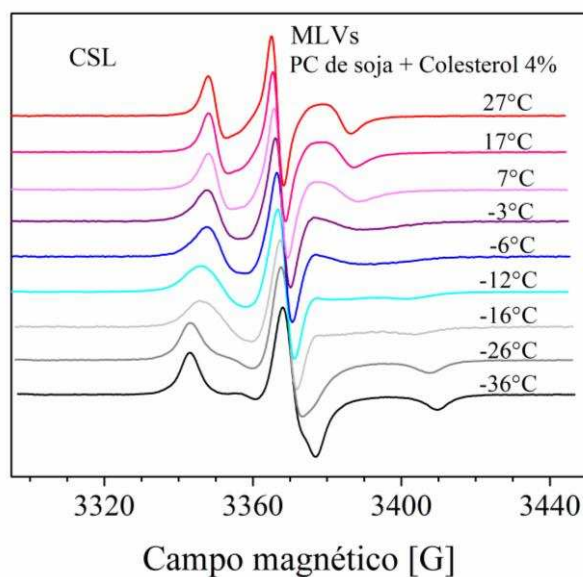


Figura 36. Variación con la temperatura de espectros de MLVs de PC de soja con 4% de colesterol y CSL como marcador de espín.

De los espectros registrados para cada temperatura se calcularon los parámetros A_{MAX} , parámetro que aumenta al incrementarse el orden en el entorno del marcador. Dicho parámetro y su cambio con la temperatura puede analizarse en la Figura 37.

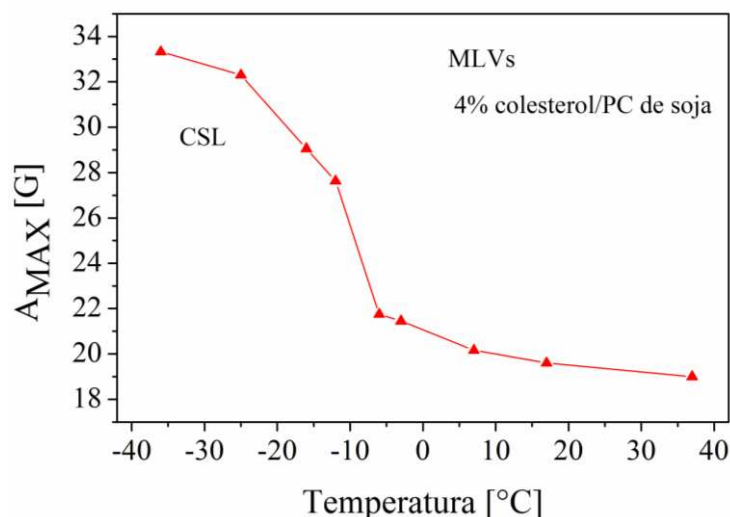


Figura 37. Variación con la temperatura del parámetro A_{MAX} correspondiente a los espectros de EPR de MLVs de PC de soja con 4% de colesterol y CSL como marcador de espín.

Se observó el cambio de fase (de gel a líquido cristalina) a una temperatura menor que 0°.

Con este marcador de espín se verificó también un aumento en la fluidez de membrana en MLVs de PC de soja al aumentar la temperatura.

Como la temperatura es un factor importante en la determinación del parámetro Hiperfino, las mediciones de EPR se realizaron a temperatura controlada, (27 ± 1) °C, temperatura de crecimiento de las células de insecto.

4.5.2 Determinación de la fluidez de membrana en células de la línea UFL-AG-286 por EPR

4.5.2.1 Preparación de las muestras

4.5.2.1.1 Células tratadas con M β CD

Se utilizó a la M β CD como agente para reducir el contenido de esterol en las células de la línea UFL-AG-286 en suspensión. Se partió de la línea celular UFL-AG-286 cultivada en el medio UNL-10 sin SFB, pero con hidrolizados proteicos de origen animal. Todavía no se disponía de la línea celular adaptada a medio UNL-9, libre de contenido de origen animal.

Para optimizar la extracción del esteroles de las células, sin afectar en forma determinante la viabilidad celular, se programó un experimento variando la concentración de M β CD en buffer fosfato y evaluando la viabilidad celular. Las concentraciones de M β CD ensayadas fueron: 3 mM, 5 mM, 10 mM y 15 mM. Las células UFL-AG-286, lavadas tres veces con buffer fosfato (PBS), se trataron con las diferentes soluciones de M β CD en una proporción de 5% V/V, durante una hora a 27°C en un agitador a 100 rpm. Como era de esperar, a mayor concentración de M β CD en contacto con las células, menor resultó la viabilidad celular. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Viabilidad celular post extracción del colesterol celular con M β CD.

[M β CD]	Viabilidad celular
3 mM	90%
5 mM	87%
10 mM	79%
15 mM	70%

De este análisis se seleccionó la solución de M β CD 10 mM, que coincidía con la elegida por otros autores [152]. Se utilizó esta concentración para determinar la proporción de colesterol en las muestras tratadas, por cromatografía gaseosa. Los resultados obtenidos mostraron que en la muestra tratada el contenido de esteroles celular se redujo un 80% con respecto al contenido en las células control.

4.5.2.1.2 Incorporación de colesterol o sitosterol en las células tratadas con M β CD

Las células tratadas con M β CD 10 mM, se dividieron en 3 alícuotas y se lavaron con medio de cultivo base (1.000 rpm durante 3 a 5 minutos). Dos de las muestras se incubaron en frascos color caramelo con 5 mL de medio de cultivo base y 55 μ L de emulsión con colesterol o sitosterol. La tercera alícuota tratada con M β CD y una muestra control sin tratamiento, se incubó en forma paralela con 5 mL de medio de cultivo base. Se mantuvieron en agitación a 100 rpm durante 16 horas a 27°C. Terminada la incubación de las muestras se hizo el recuento celular y se verificó la viabilidad. El recuento celular en todos los casos de células tratadas con M β CD fue inferior al realizado al inicio del ensayo y la viabilidad nunca fue menor al 70%.

Se realizaron otros experimentos con menor tiempo de incubación (1 hora y 2 horas), y no se registró por cromatografía gaseosa la incorporación de los esteroides en las muestras. Cuando la incubación de 16 horas a 27°C se realizó en buffer fosfato en lugar del medio de cultivo base, tampoco fue efectiva la incorporación de los esteroides.

Estos experimentos permitieron tener una primera evidencia sobre la diferencia de orden en las membranas celulares según el esteroide incorporado, pero la excesiva manipulación de las células en estos procedimientos no era conveniente. Los experimentos posteriores se realizaron con las células *adaptadas* a proliferar en el medio UNL-9 (medios de cultivo sin componentes de origen animal), suplementado con emulsiones: con sitosterol, colesterol, o sin esteroides agregados.

En síntesis: con las células crecidas en medio UNL-10 se prepararon cuatro muestras: células control, reducidas en colesterol y reducidas en colesterol y realimentadas con colesterol o sitosterol. Las células crecidas en el medio UNL-9 se adaptaron a crecer con tres tipos de emulsiones: sin esteroide agregado, con sitosterol o colesterol. Todas estas muestras se midieron por EPR.

4.5.2.1.3 Incorporación del marcador de espín CSL a las células de la línea UFL-AG-286

Como fue mencionado, la incorporación de este marcador de espín es más difícil porque es sólo soluble en cloroformo y éste resulta tóxico para las células. Esto hizo que fuera necesario, luego de la evaporación de ese solvente, lograr resuspender el marcador del fondo del tubo para facilitar la incorporación a las membranas celulares.

Se probaron sucesivamente distintos solventes orgánicos para solubilizar el CSL, siempre teniendo en cuenta no alterar las membranas celulares, y se analizaron los espectros de EPR en cada caso para poder evaluar cada desempeño. Se ensayó la emulsión lipídica utilizada para incorporar los esteroides a los cultivos adaptados, pero el marcador disminuía su señal al poco tiempo de contacto con las células. Esto llevó a probar cada componente de esa microemulsión por separado. Se evaluó al etanol como solvente, al aceite de soja, al Pluronic F68 10% en agua y todos solubilizan el marcador en mayor o menor medida. Como era necesario que este proceso no alterara las condiciones del medio, para no afectar la viabilidad celular, se preparó la emulsión lipídica libre de esteroides agregados, con los componentes en proporción adecuada pero sin α -tocoferol, antioxidante que reduce el marcador de espín. Se analizó la evolución de los espectros del marcador en el tiempo, para la emulsión de 2 μ L de CSL, 1 μ L de solución alcohólica y 10 μ L de Pluronic F68 al 10% en agua y se observó que permanecía constante en el tiempo. Ese mismo comportamiento se verificó cuando se le agregó 1 mL de medio de cultivo base sin las células. En los espectros se observó el desdoblamiento hiperfino.

Para marcar células, el método empleado fue el mismo. En definitiva, el volumen de solución stock del marcador calculado ($2 \mu\text{L}$) según la cantidad de células a marcar (1×10^7) se depositó en el fondo de un tubo de vidrio, se evaporó el solvente con N_2 gaseoso, y se resuspendió con la incorporación sucesiva de los componentes de la emulsión utilizada para suplementar el medio de cultivo celular sin el antioxidante tocoferol. Para ello, se agregó $1 \mu\text{L}$ de la solución alcohólica (etanol, aceite y tween 80) y luego $10 \mu\text{L}$ de Pluronic F68 al 10% en agua. La incorporación se facilitó mecánicamente con un vortex (15 minutos) y baño de calor (80°C) que favoreció la recuperación del marcador del tubo. Sobre esa mezcla, ya a 27°C , se depositaron las células conservadas en 1 mL de medio de cultivo base. Se incubaron 10 minutos a 27°C agitando de vez en cuando, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 3 minutos para separar el sobrenadante.

El sobrenadante se reservó para determinar también la cantidad de marcador no incorporado a la muestra celular. El pellet celular se lavó con medio de cultivo base para eliminar el exceso de marcador y se reservó también ese líquido de lavado.

Una vez cargadas las muestras de células marcadas en el capilar (preferentemente $15 \mu\text{L}$ de pellet) y sellado éste por un extremo, se evaluó la necesidad de verificar si queda marcador adherido al fondo del tubo de vidrio sin incorporarse a las membranas. Se lavó el tubo con buffer fosfato con el objeto de arrastrar los restos de la muestra y se le agregó $100 \mu\text{L}$ de cloroformo sobre el tubo aparentemente limpio. Se cargaron $15 \mu\text{L}$ de esa mezcla en un capilar que se selló en ambos extremos. Este solvente facilitó la disolución del CSL que quedó adherido al fondo del tubo y no penetró en las células. Se preparó un patrón con $2 \mu\text{L}$ de CSL y $100 \mu\text{L}$ de cloroformo para poder comparar con aquel material resuspendido del tubo en el que se marcaron las células. Se verificó la presencia de marcador en el fondo del tubo de muestra, por lo que no todo el marcador agregado se resuspende con la emulsión lipídica y se reincorpora a las células. En la Figura 38 se representan los espectros obtenidos de las muestras de fondo del tubo de vidrio, de sobrenadante post centrifugación de la muestra una vez marcada, de patrón de CSL y de una muestra de células marcadas previo tratamiento con $\text{M}\beta\text{CD}$.

En ninguno de los casos la cantidad de marcador que efectivamente se incorporó a las células superó el 10% del marcador suministrado inicialmente.

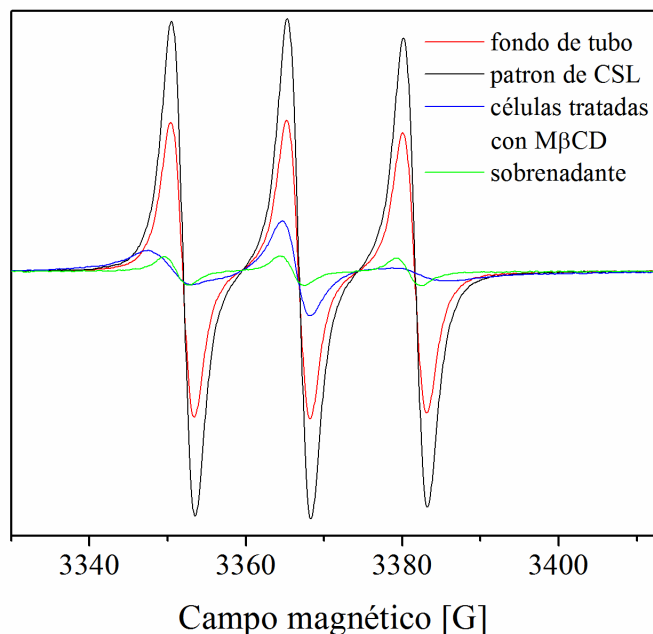


Figura 38. Espectros de EPR del marcador de espín CSL en células reducidas en colesterol con M β CD, en el sobrenadante de las células marcadas, en el fondo del tubo donde se marcaron las células y del patrón de CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C.

4.5.2.2 Mediciones de EPR

4.5.2.2.1 Marcadores de espín n-SASL

Se depositó en un tubo Eppendorf 0,2 μ L de n-SASL (5-SASL, 12-SASL o 16-SASL) y una vez evaporado el solvente (etanol), se agregó la muestra de células (1×10^7 células) conservadas en 1 mL de medio de cultivo base. Se eliminó el marcador no incorporado por lavados con medio de cultivo base. Posteriormente se cargaron los pellets en capilares que, dentro de tubos de cuarzo, fueron medidos por EPR.

En la Figura 39 se muestran los espectros obtenidos para las muestras de células marcadas con la sonda 12-SASL. En el caso de las células reconstituidas con colesterol y sitosterol, se observa la aparición de un hombro a la izquierda del primer pico. Este hallazgo es característico de un espectro compuesto, suma de dos componentes que corresponden a la ubicación del marcador de espín en regiones de la membrana que difieren sustancialmente en su orden dinámico. Se pueden distinguir, una componente más fluida y una menos móvil [154].

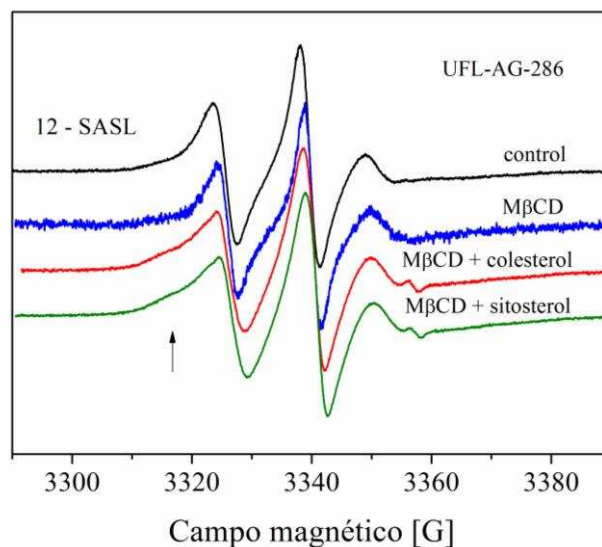


Figura 39. Espectros de EPR del marcador de espín 12-SASL en células UFL-AG-286 (control), en células reducidas en colesterol con M β CD, y también en células reducidas en colesterol con M β CD y realimentadas con colesterol o sitosterol. Espectros normalizados. Con una flecha se identifica la posición del hombro que aparece a la izquierda del primer pico. Temperatura: (27 ± 1) °C.

En la Figura 40 se muestra la variación del parámetro Hiperfino A_{MIN} , determinado en cada espectro, con la posición n del radical nitróxido. Se verificó el aumento de movilidad de las cadenas acílicas hacia el centro de la bicapa. Se observó que las células reducidas en esteroides son más fluidas que el resto de las muestras. Para el caso de las células tratadas que incorporaron sitosterol o colesterol, se obtuvieron parámetros similares entre sí, comparables a los de las células control. Dichas células reconstituidas recuperaron la fluidez de las células originales.

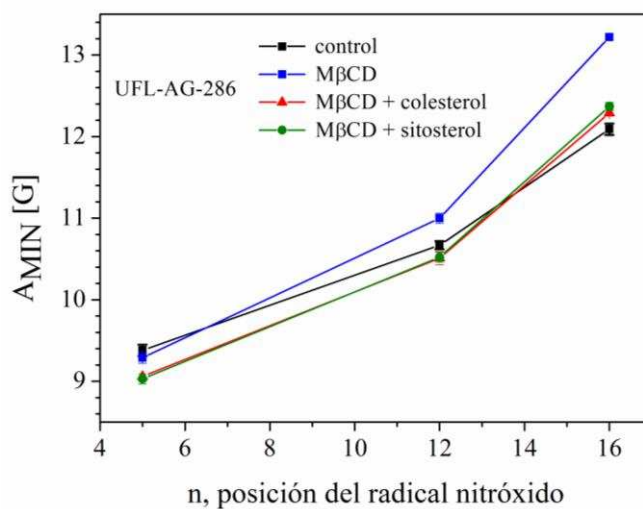


Figura 40. Parámetro Hiperfino A_{MIN} como función de la posición n del radical nitróxido obtenido a partir de los espectros de EPR para las células control, las células tratadas con M β CD y para las células tratadas con M β CD pero restituidas con colesterol o sitosterol. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Los espectros obtenidos para el marcador 12-SASL se muestran en la Figura 41. En el caso de estas muestras adaptadas también se hizo evidente el hombro a campo magnético bajo, previo al primer pico de la señal, que indica que el marcador sensa entornos con distinto orden dinámico.

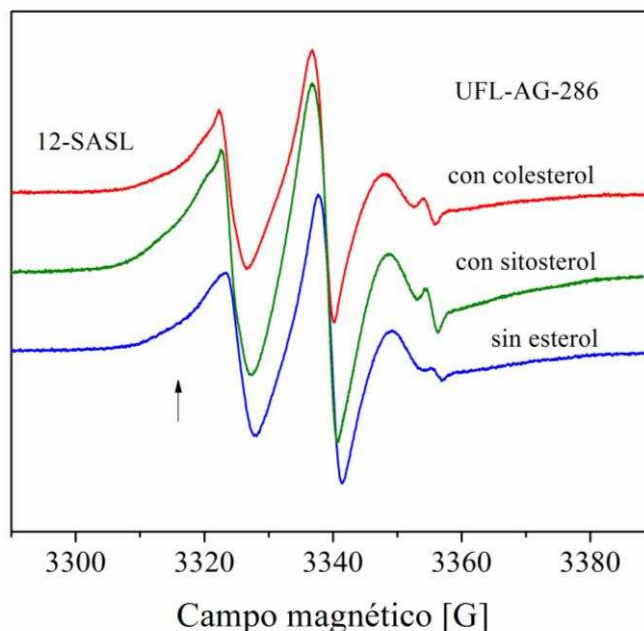


Figura 41. Espectros de células UFL-AG-286 adaptadas a crecer en medios de cultivo con distinta fuente de esteroides. Marcador de espín 12-SASL. Con una flecha se identifica la posición del hombro que aparece a la izquierda del primer pico. Temperatura: (27 ± 1) °C.

La Figura 42 muestra los parámetros Hiperfinos A_{MIN} calculados a partir de los espectros de las células adaptadas y suplementadas con las distintas emulsiones. Se observa que las células adaptadas a crecer en medio de cultivo sin esteroles agregado muestran una fluidez similar a las suplementadas con esteroides.

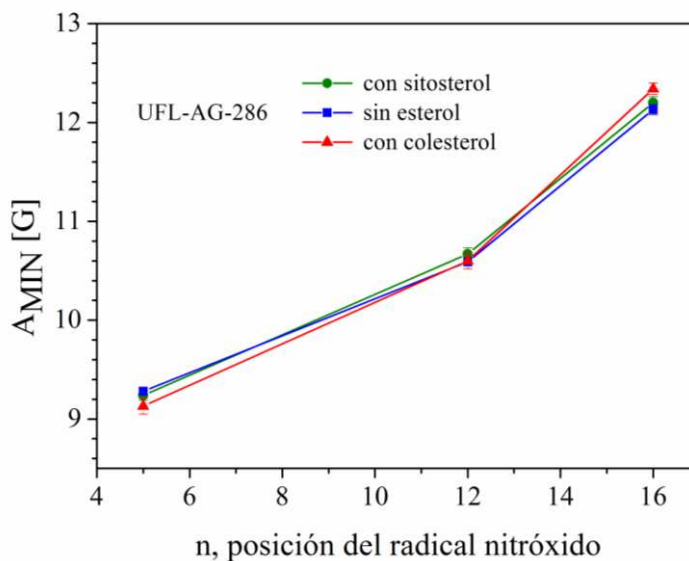


Figura 42. Parámetro Hiperfino A_{MIN} como función de la posición n del radical nitróxido obtenido a partir de los espectros de EPR para las células UFL-AG-286 adaptadas a proliferar en medios de cultivo con diferente fuente de esteroides. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Se compararon los parámetros Hiperfinos A_{MIN} correspondientes a todas las muestras celulares analizadas para el marcador 12-SASL. En la Tabla 16 se observa que los valores de A_{MIN} coinciden dentro del error experimental en seis muestras. En la reducida en colesterol y sin realimentar este parámetro es significativamente superior.

Tabla 16. Parámetro Hiperfino A_{MIN} (en gauss) obtenido de los espectros de EPR correspondientes al marcador 12-SASL incorporado a todas las muestras celulares analizadas.

Control	UFL-AG-286 tratadas con MBCD			UFL-AG-286 adaptadas		
	sin esteroles agregado	con sitosterol	con colesterol	sin esteroles	con sitosterol	con colesterol
10,67±0,05	11,00±0,06	10,52±0,06	10,51±0,08	10,59±0,04	10,67±0,06	10,6±0,08

Los valores de los parámetros A_{MIN} obtenidos para las muestras celulares se compararon con los calculados para LUVs. En la Figura 43, donde están registrados los parámetros A_{MIN} de los LUVs en función de la concentración de esteroles, el punto azul vacío indica el valor de A_{MIN} obtenido en las seis muestras celulares. Este valor correspondería a para una concentración de esteroides en LUVs de 6% aproximadamente sin diferencias entre sitosterol y colesterol. Para el caso de la muestra de células reducidas en colesterol sin realimentar el valor de A_{MIN} corresponde a LUVs de PC de huevo sin esteroides.

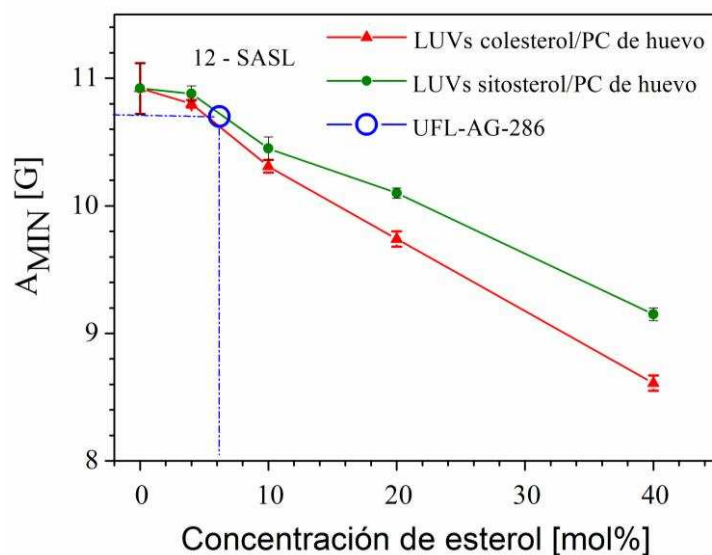


Figura 43. Parámetro Hiperfino A_{MIN} en LUVs de PC de huevo con diferente contenido de colesterol. Punto azul: rango de valores de A_{MIN} ($10,7 \pm 0,1$ G) medidos en los tres grupos celulares.

4.5.2.2.2 Marcadores de espín CSL

4.5.2.2.2.1 Células adaptadas a crecer en medio suplementado con emulsión de colesterol

El marcador de espín CSL es muy poco hidrosoluble y en todos los experimentos realizados se detectó su presencia en el sobrenadante post centrifugación de las células, en el fondo del tubo de vidrio donde se realizó la marcación y en el medio de lavado de las células. A partir de los espectros obtenidos se calculó la proporción de marcador libre en cada uno de los casos y se concluyó, por comparación con el patrón de CSL en cloroformo, que a lo sumo un 10% del marcador suministrado se incorpora a las membranas. Es por eso que el volumen de CSL utilizado en la marcación de 1×10^7 células adaptadas fue $2 \mu\text{L}$ (datos analizados en 4.5.2.1.3). Después de 10 minutos de incubación a 27°C , las muestras suplementadas con la emulsión con colesterol se centrifugaron, lavaron con medio de cultivo base y se cargaron los pellets en capilares que, dentro de tubos de cuarzo, se midieron por EPR a 27°C con control de temperatura. El espectro típico obtenido de las muestras se muestra en la Figura 44.

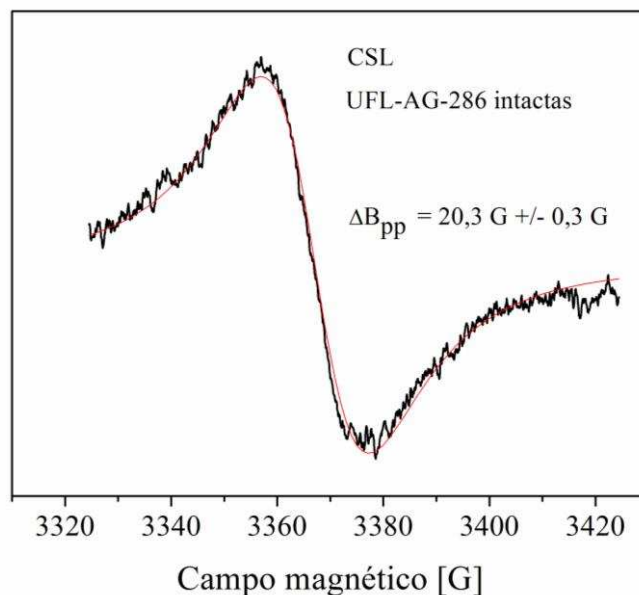


Figura 44. Espectro de células UFL-AG-286 adaptadas a crecer en medio de cultivo con colesterol. Marcador de espín CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C. La línea roja es el ajuste a una lorentziana.

El espectro del marcador CSL en las células muestra una única línea, compatible con el colapso por intercambio de la interacción hiperfina. Esta señal fue sorprendentemente diferente a las obtenidas en los espectros del marcador en las membranas modelo de PC de huevo con colesterol o sitosterol y en las mismas células adaptadas con los marcadores n-SASL. Su interpretación demandó estudios detallados.

Se repitieron las mediciones en las mismas condiciones y se verificó que esta señal se mantiene constante en el tiempo. Las señales colapsadas obtenidas en distintos experimentos se ajustaron con la derivada de una lorentziana y los anchos de línea obtenidos se encuentran comprendidos en un intervalo de (22 ± 2) G.

4.5.2.2.2 Resultados de mediciones de EPR para interpretar el espectro colapsado

Con el objeto de evaluar el comportamiento de este marcador en las células UFL-AG-286, fue necesario analizar en una primera etapa los espectros del CLS en diferentes entornos: en cloroformo, en la emulsión lipídica con la que se agrega el esteroles al medio de cultivo; en los modelos de membrana y en las propias células de la línea UFL-AG-286 (Figura 45).

El marcador CSL en cloroformo mostró un espectro típico de un medio de baja viscosidad, con movimientos isotrópicos rápidos. En la emulsión, el espectro reflejó un entorno isotrópico más viscoso. En los modelos de membrana con distintos esteroides y en todo el rango de concentraciones

(0% a 40%) el espectro fue típico del marcador en un entorno con movimientos anisotrópicos. En todos estos espectros aparece una estructura básica de tres líneas debido a la interacción hiperfina. En cambio, en las células UFL-AG-286 se observó un espectro ancho, con la estructura hiperfina colapsada.

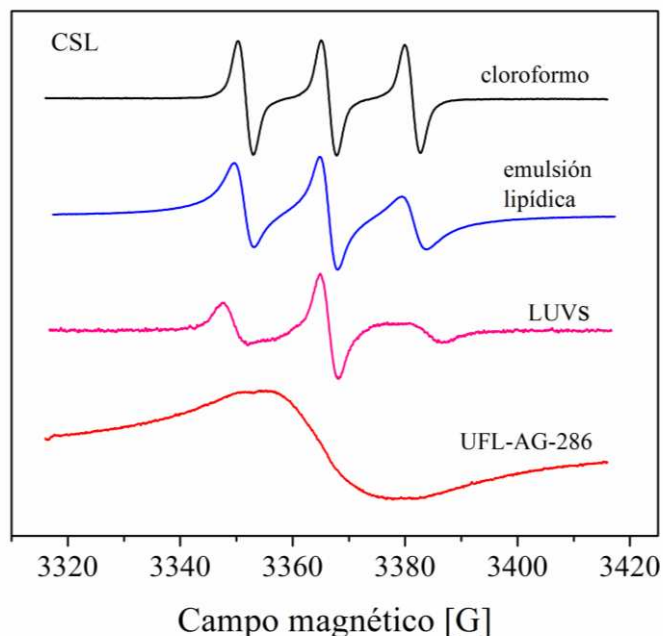


Figura 45. Espectros del marcador CSL en diferentes entornos, en cloroformo (solvente de elección), en la emulsión lipídica sin esteroides agregados utilizada como suplemento de los medios de cultivo, en LUVs de colesterol/PC de huevo y en células de la línea UFL-AG-286.

Dado que un espectro con estructura hiperfina colapsada es típico de una interacción de intercambio importante entre moléculas de marcador, se prepararon muestras que permitieran analizar en qué condiciones se produce el colapso. La interacción de intercambio aparece cuando las moléculas de CSL vecinas están lo suficientemente cerca como para permitir el solapamiento de sus funciones de onda. A medida que se establece el intercambio se van produciendo cambios graduales en el espectro, que comienzan con un ensanchamiento de los picos, su posterior desplazamiento hacia el centro y finalmente el colapso en una única línea ancha, que se afina gradualmente al aumentar la interacción [145].

Muestras policristalinas de marcadores de espín puro y diluido

Se prepararon muestras policristalinas de los marcadores 5-SASL y CSL puros y diluidos 1/100, 1/500 y 1/1000 molar en colesterol o sitosterol partiendo de soluciones en cloroformo y evaporando el solvente.

La Figura 46 muestra los espectros del marcador 5-SASL puro y diluido en sitosterol en a) y diluido en colesterol b).

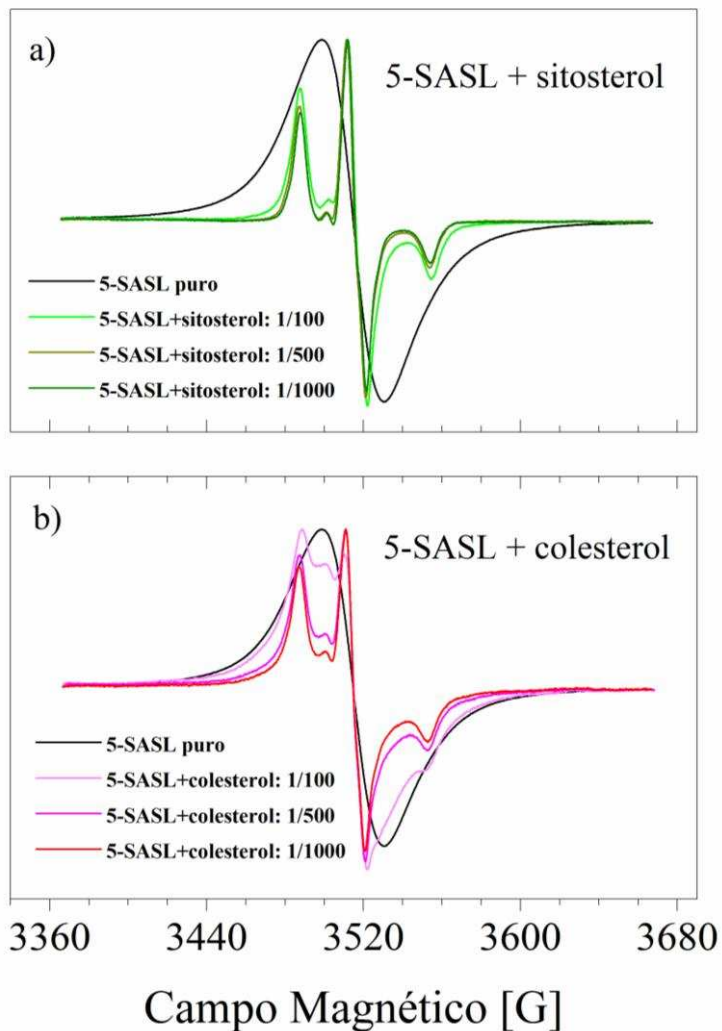


Figura 46. Espectros de muestras policristalinas del marcador de espín 5-SASL puro y diluido con diferentes proporciones de Sitosterol (a) y Colesterol (b). Temperatura: (27 ± 1) °C.

Se observa una sola señal en el espectro del marcador 5-SASL puro, compatible con el colapso por intercambio de la interacción hiperfina. Los espectros de las muestras policristalinas de 5-SASL diluido en sitosterol (1/100, 1/500, 1/1000) muestran 3 señales que indican que la interacción hiperfina está resuelta. En los espectros del marcador diluido con colesterol solo está resuelta la interacción hiperfina para 1/500 y 1/1000. La Figura 47 muestra los espectros de muestras policristalinas del marcador CSL puro y diluido en sitosterol en a) y diluido en colesterol b).

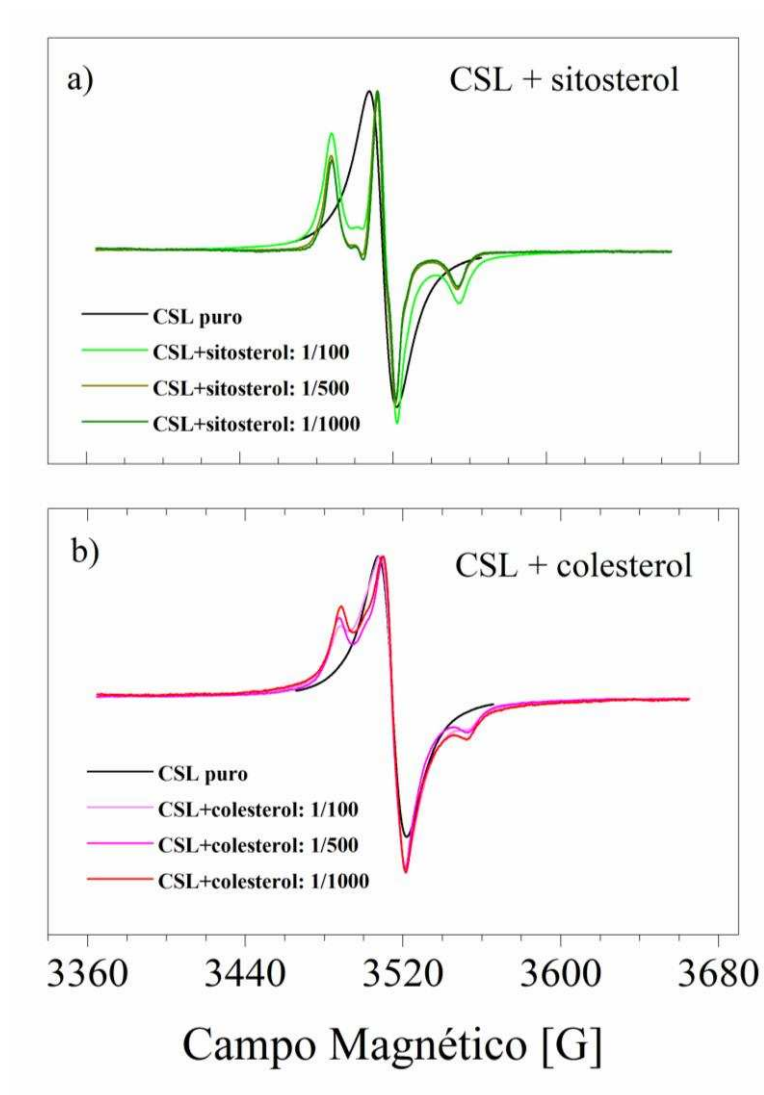


Figura 47. Espectros de muestras policristalinas del marcador de espín CSL puro y diluido con diferentes proporciones de Sitosterol (a) y Colesterol (b). Temperatura: (27 ± 1) °C.

La muestra policristalina del marcador CSL puro muestra una única señal en el espectro. Para el caso de las muestras policristalinas de CSL diluido, los resultados difirieron si la dilución fue en colesterol o sitosterol. Todas las diluciones en sitosterol mostraron espectros con 3 señales mientras que en colesterol se observó una señal solo parcialmente desdoblada para todas las concentraciones.

En la Figura 48, se comparan espectros de muestras policristalinas de CSL puro y diluido 1/1000 en colesterol y sitosterol y diluido 1/100 en colesterol.

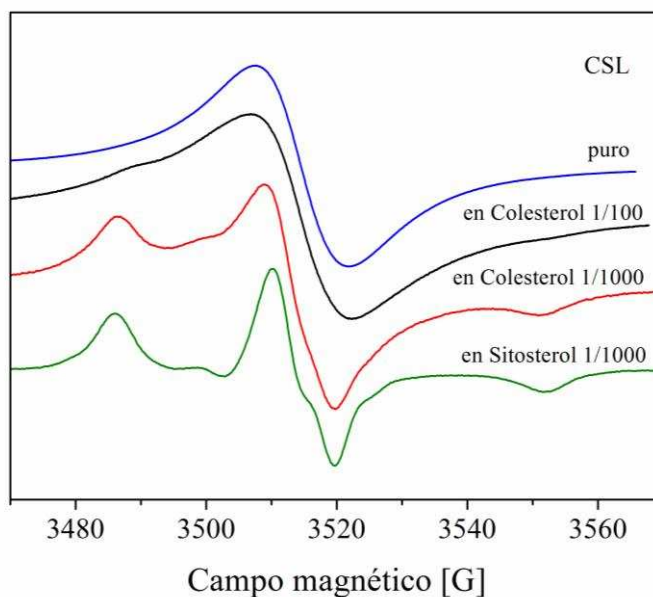


Figura 48. Intercambio: Espectros de muestras policristalinas de CSL con diferente contenido de esterol. Efecto de la concentración de CSL. Muestras secas a temperatura ambiente. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Puede observarse que a igual concentración de esterol, la estructura hiperfina se ve mejor resuelta en la dilución con sitosterol. Este resultado indicaría que las moléculas de sitosterol separan a las moléculas de CSL con mayor eficiencia que el colesterol.

Se midieron por EPR muestras policristalinas de los marcadores puros 5-SASL y CSL. En ambos casos las señales se ajustaron con funciones lorentzianas y el ancho de línea obtenido de cada ajuste resultó 30,5 G y 15,6 G respectivamente. Esta diferencia de ancho muestra que el fenómeno de angostamiento por intercambio es más eficiente en el CSL que en el 5-SASL (Figura 49).

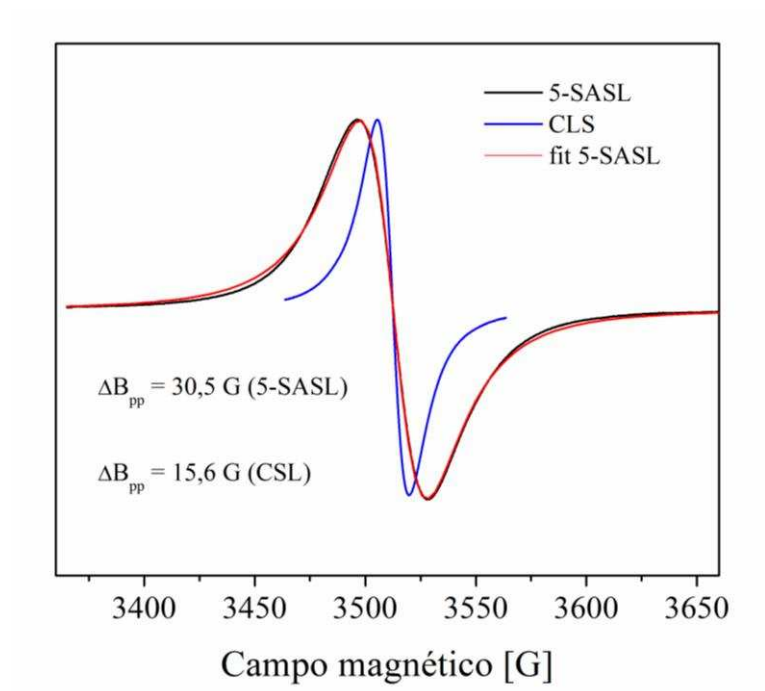


Figura 49. Espectros normalizados de muestras policristalinas de marcadores puros de CLS y 5-SASL. Muestras secas a temperatura ambiente. Temperatura: $(27 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

Células adaptadas a proliferar en medio con emulsión con colesterol y tratadas con M β CD

Se midieron los espectros de muestras de células adaptadas reducidas en colesterol por tratamiento previo con soluciones de 15 mM y 30 mM de M β CD. La viabilidad promedio en cada caso fue 70% y 39% respectivamente. Las muestras se marcaron con CSL siguiendo el mismo procedimiento que para las células sin reducción de colesterol.

La Figura 50 muestra los espectros de las células adaptadas tratadas con M β CD, obtenidos a los 18 minutos de poner en contacto las muestras con el marcador. En estos casos se observan las 3 líneas correspondientes a la estructura hiperfina del radical nitróxido del CSL.

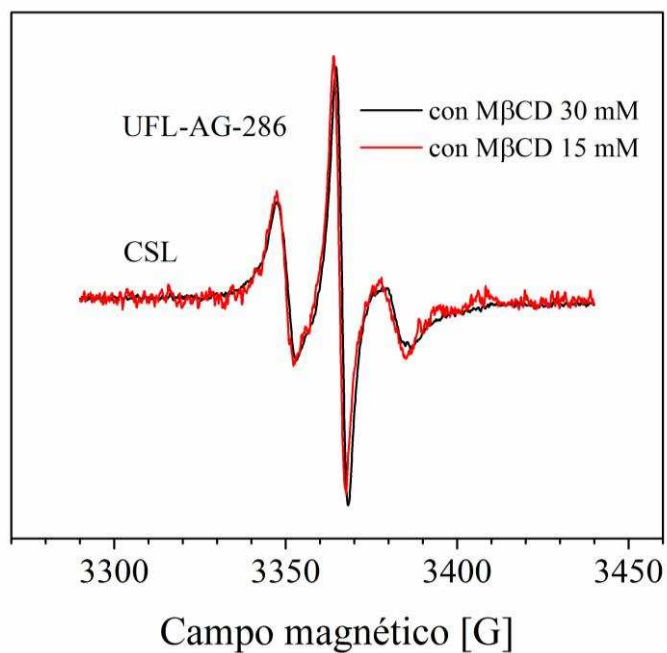


Figura 50. Espectros correspondientes a células tratadas con M β CD 15 y 30 mM. Normalizados. Marcador de espín CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Estos espectros no permanecieron constantes en el tiempo. Se registraron espectros a distintos tiempos para analizar su evolución. Los resultados se muestran en la Figura 51. Se ve la desaparición gradual de la señal de tres líneas. En el último espectro, registrado a los 52 minutos de iniciada la marcación de la muestra, hay una única línea compatible con colapso por intercambio del marcador remanente. Se midieron las alturas pico a pico de la señal central en varias muestras marcadas en las mismas condiciones y se observaron tiempos de decaimiento diferentes.

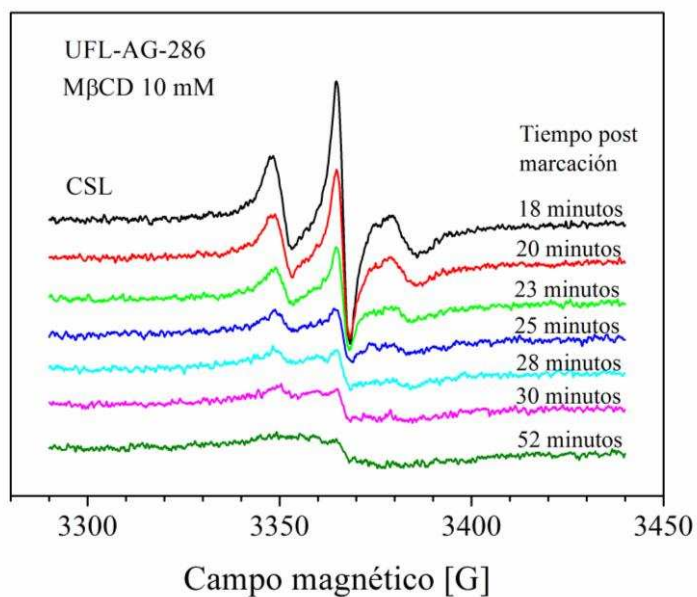


Figura 51. Evolución en el tiempo del espectro correspondiente a células tratadas con M β CD 30 mM. Marcador de espín CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C. El valor de $t=0$ corresponde al instante en que las muestras se ponen en contacto con el marcador de espín.

En la Figura 52 se comparan los espectros obtenidos para las células tratadas con M β CD 30 mM (18 y 52 minutos después del contacto con el marcador) y las adaptadas a proliferar en el medio de cultivo UNL-9 suplementado con la emulsión con colesterol (íntactas). De la gráfica se observa que el último espectro de las células reducidas en colesterol parece coincidir con el espectro de las células íntactas. Se realizó el ajuste de cada señal con la derivada de una lorentziana obteniéndose parámetros que coincidieron dentro del error experimental.

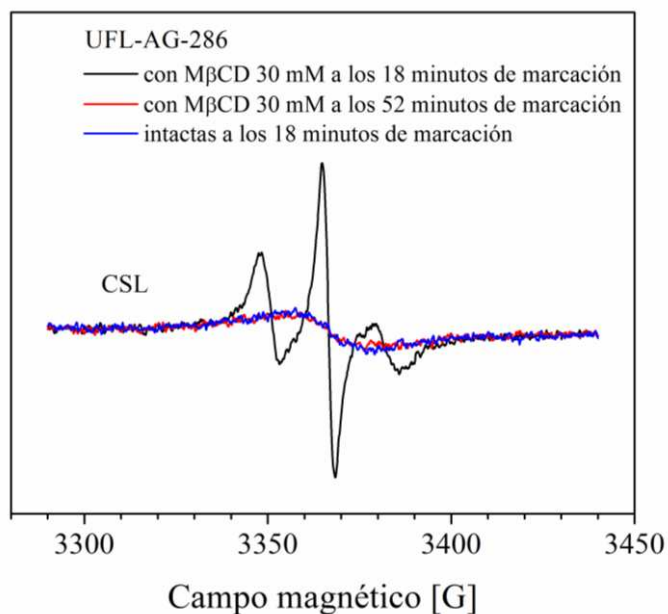


Figura 52. Espectros de EPR obtenidos a 18 y 52 minutos (inicial y final) post marcación en células tratadas con M β CD 30 mM y espectro obtenido en células intactas. Marcador de espín: CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C.

En el primer espectro registrado para células reducidas se observa una señal que resulta la suma de una de tres líneas y otra de una sola línea. Se verificó que la señal de una sola línea coincide con la señal del último espectro registrado. Una vez realizada la resta del primer y último espectro de las células reducidas en colesterol, se observa la señal correspondiente a una estructura hiperfina claramente resuelta (Figura 53).

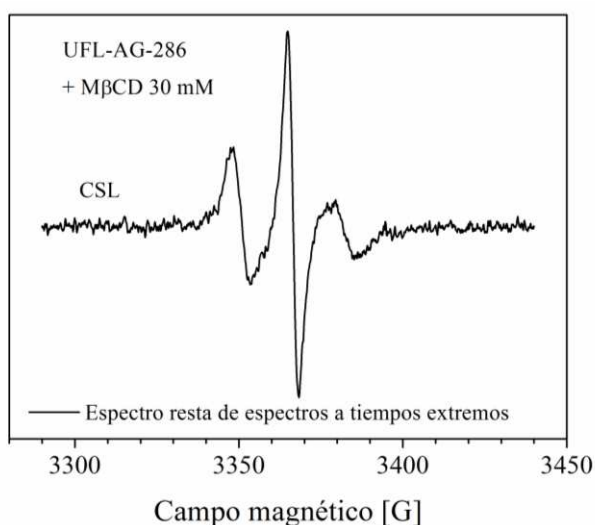


Figura 53. Espectro resultado de la resta del primer y último espectro de las células reducidas en colesterol por tratamiento con M β CD 30 mM. Marcador de espín CSL. Temperatura: (27 ± 1) °C.

Discusión general

5. Discusión general

5.1 Sobre el desarrollo de un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular UFL-AG-286

La línea UFL-AG-286, de origen embrionario, es susceptible y muy permisiva al baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* [5], y es la línea celular de elección para la replicación *in vitro* de AgMNPV, uno de los agentes de control biológico de plagas agrícolas más utilizados en el mundo [67]. UFL-AG-286 se estableció como una línea celular adherente, pero teniendo en cuenta el objetivo de desarrollar un proceso industrial para producir el insecticida viral en biorreactores, se seleccionó una subpoblación celular capaz de crecer en suspensión como células aisladas, a la cual se denominó saUFL-AG-286 [9]. El costo del medio de cultivo es uno de los componentes principales del costo total de producción de baculovirus en cultivos de células de insectos. Por lo tanto, el desarrollo de un medio de bajo costo es imprescindible para alcanzar la viabilidad económica en un proceso para la producción *in vitro* de un bioinsecticida viral [155]. El medio UNL-10 se desarrolló después de un profundo estudio de las demandas nutricionales de la línea celular saUFL-AG-286, tanto no infectadas como infectadas con AgMNPV [9,79]. En comparación con otros medios utilizados para el cultivo de líneas celulares de insectos lepidópteros, UNL-10 permite obtener altos rendimientos de cuerpos de oclusión de AgMNPV en cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en distintos modelos de reactores [80]. UNL-10 es un medio libre de suero, pero aún incluye componentes de origen animal. Las restricciones crecientes para el uso de materias primas de origen animal en biotecnología están impulsando el desarrollo de una nueva generación de medios para el cultivo *in vitro* de células animales, en general, y de células de lepidópteros, en particular [156]. La obtención de un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular saUFL-AG-286, uno de los objetivos propuestos para esta tesis, permitirá avanzar hacia el desarrollo de un proceso factible para la producción del bioinsecticida AgMNPV. Para alcanzar este objetivo, el trabajo se enfocó en los componentes del medio UNL-10 que se obtienen a partir de materias primas de origen animal: los hidrolizados enzimáticos de proteínas (hidrolizado de caseína y caldo triptosa) y el colesterol presente en la emulsión lipídica. Ambos componentes son agregados al medio basal para sustituir diferentes funciones que cumple el suero en los medios que lo contienen: los hidrolizados proteicos actúan como fuente de factores de crecimiento, y el colesterol es la fuente de esteroides para la síntesis de membranas celulares, principalmente [24]. Por otro lado, si bien en la emulsión que suplementa al medio UNL-10 la fuente de ácidos grasos es aceite de soja [79], la aptitud de otros aceites vegetales, que podrían ser menos costosos o más asequibles, todavía no ha sido evaluada.

Para reemplazar los hidrolizados de proteínas animales, se evaluaron dos hidrolizados de proteínas de soja. Los hidrolizados de proteínas vegetales, particularmente los obtenidos a partir de

proteínas de soja, han sido utilizados para desarrollar medios libres de componentes de origen animal para células de mamíferos aplicadas a la producción de anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes [157–161]. En unos pocos casos también se ha demostrado la utilidad de los hidrolizados de proteínas de plantas como suplementos en el cultivo de células de insectos lepidópteros utilizados en la producción de proteínas recombinantes expresadas en baculovirus [162,163].

De los dos hidrolizados evaluados en este trabajo, la peptona de soja III (PS III) demostró efecto ligeramente estimulante sobre la proliferación celular, mientras que el digesto papaínico de soja (DPS) mostró un efecto francamente inhibitorio. Esta diferencia en la actividad de los dos hidrolizados puede deberse a diferencias en la identidad de los péptidos contenidos en cada uno de ellos [161], o en el balance del contenido de componentes de distinta naturaleza química, como péptidos, hidratos de carbono o isoflavonas [160]. Si bien en los ensayos iniciales el efecto de la adición de PS III sobre la proliferación celular resultó modesto, las células UFL-AG-286 pudieron adaptarse fácilmente a un nuevo medio en el que los hidrolizados de origen animal (caldo triptosa e hidrolizado de caseína) fueron reemplazados por PS III, sin detrimento notable de los parámetros de proliferación de los cultivos, incluso cuando se los compara con el comportamiento de la misma línea celular en medios suplementados con suero [9]. El reemplazo del caldo triptosa y el hidrolizado de caseína por un único hidrolizado vegetal, además de cumplir con el objetivo de avanzar en el desarrollo de un medio libre de componentes de origen animal, implica también la reducción de la cantidad de componentes indefinidos, de la concentración total de hidrolizados, y del costo del medio de cultivo.

El aporte de los nutrientes de naturaleza hidrofóbica a los medios libres de suero para células de insectos se efectúa a través de la suplementación con emulsiones de soluciones alcohólicas de lípidos y esteroides en una base acuosa, tal como ocurre en el medio descrito por Maiorella y col. [17]. En el medio desarrollado por estos investigadores, la fuente de ácidos grasos era un aceite de pescado, mientras que la de esteroides es colesterol, para el cual no existe una fuente natural que no sea de origen animal [164]. Si bien se puede obtener colesterol mediante síntesis química, su costo resulta significativamente mayor.

Por lo tanto, en el marco de una estrategia de desarrollo de un medio libre de componentes de origen animal, la composición de la emulsión lipídica también debería ser modificada.

Excepto para el medio UNL-10, no existen antecedentes publicados acerca de la evaluación y uso de aceites de origen vegetal como fuentes de nutrientes hidrofóbicos en cultivos de células de insectos. En este trabajo se demostró que las células UFL-AG-286 pueden proliferar, ser infectadas y replicar baculovirus cuando son cultivadas en un medio de cultivo libre de suero, suplementado alternativamente con emulsiones preparadas sobre la base de tres aceites vegetales diferentes, todos

ellos de calidad comercial estándar para cocina, obtenidos a partir de soja, oliva y maíz, respectivamente. Los rendimientos celulares alcanzados en cultivos no infectados, suplementados con cualquiera de las tres emulsiones, fueron al menos similares a los obtenidos con una emulsión de origen comercial, y en el caso de aquellas preparadas con aceites de soja o maíz, significativamente superiores. En cuanto a los cultivos infectados, sólo la emulsión preparada a partir de aceite de soja permitió alcanzar rendimientos de poliedros y de BVs tan elevados como los obtenidos con la emulsión comercial utilizada como control, mientras que los rendimientos alcanzados con las emulsiones preparadas con los aceites de maíz u oliva fueron significativamente menores a los del control. Por lo tanto, si bien los aceites de maíz u oliva se comportan tan bien como el aceite de soja para sostener la proliferación de los cultivos celulares no infectados, los dos primeros no pueden sustituir al último cuando se trata de promover la replicación viral. En función de estos resultados, la emulsión preparada a partir de aceite de soja fue la seleccionada para continuar con el desarrollo del nuevo medio libre de componentes de origen animal. La utilización de una materia prima de costo tan reducido como un aceite de cocina significa un considerable avance, también, hacia la obtención de un medio de bajo costo que podría ser utilizado para la producción económicamente sustentable de baculovirus utilizables como agentes de control de plagas en agricultura. Además, la utilización de aceite de soja en la preparación de un medio de cultivo para la línea celular UFL-AG-286, la línea de elección para la replicación de AgMNPV, un baculovirus extensamente usado para controlar una plaga principal de la soja, sumado a la utilización de un hidrolizado de proteínas de la misma planta como reemplazo de los hidrolizados de origen animal, introduce un elemento de interés en el desarrollo de un insecticida viral específico para controlar dicha plaga, ya que el cultivo que es objeto de protección es, al mismo tiempo, la fuente de materias primas para la preparación del agente de control. Esta relación entre el origen de la materia prima y el destino del producto establece un lazo virtuoso que puede acarrear beneficios económicos y ambientales que contribuyan a promover el desarrollo de un proceso factible de producción de este insecticida viral *in vitro* en cultivos de células de insectos.

Como se mencionó anteriormente, la eliminación del colesterol de la formulación de las emulsiones, o su sustitución por otro esteroles de origen no animal, es una exigencia a satisfacer para el desarrollo de un medio de cultivo de bajo costo y libre de componentes animales. Los insectos, como el resto de los organismos vivos, requieren esteroides con propósitos estructurales, ya que son componentes de las membranas celulares, donde actúan como moduladores de la fluidez; además, los esteroides actúan como intermediarios en procesos de señalización celular, y son precursores para la síntesis de otros compuestos, como los ecdisteroides, esenciales para la regulación del desarrollo de estos organismos [165]. Los insectos son incapaces de sintetizar el anillo esteroide característico de los esteroides, y por lo tanto los deben incorporar pre-formados con la dieta, considerándose los auxótrofos en relación a estos compuestos [166,167]. El aporte dietario de anillos esteroides para las

larvas de los insectos lepidópteros está basado en la ingesta de fitosteroles. Sin embargo, es el colesterol el esteroles predominante en las membranas de las células de lepidópteros. Se conoce que, muchos animales son colonizados por simbiontes microbianos que tienen impacto importante en la biología del huésped. Los microbios pueden regular el desarrollo del animal, su inmunidad y metabolismo. En los lepidópteros (mariposas, polillas, y sus larvas de oruga), el papel de los microbios sigue siendo ambiguo. La gran mayoría de las orugas son herbívoros, y algunos insectos herbívoros dependen de los microbios para complementar los nutrientes que faltan, neutralizar las toxinas o digerir las paredes celulares de las plantas. Sin embargo, teniendo en cuenta la simple morfología intestinal de las orugas, los microbios podrían ser incapaces de persistir en el intestino de la oruga y no contribuirían a la digestión. De hecho, estudios basados en microscopía reportan mínimo crecimiento microbiano dentro del intestino de la oruga. Las orugas carecen de un microbioma intestinal residente y funcional. En *Manduca sexta*, la supresión antibiótica de la actividad bacteriana intestinal no afectó significativamente la ganancia de peso de la oruga, su desarrollo o supervivencia, no son dependientes de la actividad bacteriana intestinal. El alto pH, la estructura simple del intestino, y el rápido tránsito intestinal que tipifican la fisiología digestiva de la oruga, pueden prevenir la colonización. Las orugas muestran los beneficios evolutivos de la independencia de los simbiontes [168] y dicha independencia reafirma la hipótesis de que a nivel de intestino medio del insecto, los fitoesteroles son absorbidos y vehiculizados al retículo endoplasmático donde, por desalquilación de la cadena lateral, pueden convertirse en colesterol [115,117,122]. En principio, esta auxotrofia característica de los insectos se debería manifestar también en los cultivos de células aisladas, que no deberían ser capaces de sobrevivir y proliferar en medios libres de esteroides. Sin embargo, en este trabajo se ha demostrado que las células de la línea saUFL-AG-286 pueden adaptarse y proliferar de manera indefinida en un medio sin agregado exógeno de esteroides. Esta capacidad ha sido demostrada también, previamente, para otras líneas de células de insectos, como Sf9 [138] y High Five [140]. Esta aparente contradicción entre la auxotrofia de los insectos y la capacidad de supervivencia y reproducción de las células en cultivo en medios libres de esteroides debe ser tomada con precaución, ya que algunos componentes habituales de los medios de cultivo para células de insectos podrían contener trazas de esteroides. El extracto de levaduras, por ejemplo, puede contener ergosterol, principalmente, pero también otros esteroides, mientras que el Tween 80, utilizado habitualmente como agente emulsionante en medios de cultivo libres de suero para cultivos de células de insectos lepidópteros, contiene una mezcla de fitosteroides [169], y el propio aceite de soja también contiene una proporción de sitosterol. Por lo tanto, es posible que el medio cuya emulsión fue preparada sin agregado de colesterol pueda contener aún trazas de otros esteroides. En este sentido, se debe tener en cuenta que el contenido de esteroides determinado en dos líneas de células de lepidópteros, Sf9 y Tn, resultó significativamente inferior al de las células de mamíferos [112]. Si las células UFL-AG-286 comparten esta característica, los

requerimientos mínimos necesarios para su supervivencia y reproducción podrían ser solventados con las trazas de esteroides aportadas por el extracto de levaduras y el aceite de soja presentes en los medios UNL [79].

Si bien las células adaptadas al medio carente de esteroides se multiplicaron a idéntica velocidad que las células cultivadas en el medio suplementado con colesterol, y no se apreciaron diferencias en los perfiles de consumo de glucosa y glutamina, como tampoco de producción de lactato y amonio, sí se pudo verificar que las células adaptadas al medio sin esteroides son significativamente más pequeñas que las células que se reproducen en el medio conteniendo colesterol. Si se calcula la velocidad de crecimiento específica en función de la biomasa estimada de acuerdo al volumen celular, en lugar de hacerlo, como es corriente, de acuerdo a la concentración celular, entonces se puede concluir que la velocidad de multiplicación de la biomasa resultó significativamente menor en los cultivos que no contienen esteroides, respecto a aquellos suplementados con colesterol. Además, la eficiencia metabólica también resultó inferior en las células adaptadas al medio sin esteroides: los rendimientos de biomasa por mol de glucosa o glutamina consumida resultaron casi 4 veces inferiores en relación a los cultivos en presencia de colesterol.

La influencia del contenido de colesterol sobre el volumen celular ha sido estudiada previamente en células endoteliales de aorta bovina [170,171]. Se ha observado en estas células que una disminución en el contenido de colesterol en su membrana, conduce a una activación en la corriente de aniones regulada por el volumen (VRAC). Esta corriente es responsable del eflujo de Cl^- y otros osmolitos orgánicos en respuesta a las modificaciones del volumen celular [172]. Se ha postulado que la presencia de colesterol en la membrana afecta el equilibrio entre los estados de apertura y cierre de los canales a través de los cuales se produce el flujo de aniones, y que los cambios en la concentración de colesterol en la membrana modulan la actividad de VRAC afectando la energía de deformación de la membrana asociada con la apertura de los canales [170]. Este fenómeno no ha sido descrito previamente en células de insectos, pero el efecto observado en las células UFL-AG-286 sugiere que un mecanismo similar de regulación del volumen celular dependiente del contenido de colesterol de la membrana plasmática podría también ser operativo en este tipo de células.

El sitosterol es el más abundante entre los esteroides vegetales [173]. El rol del sitosterol en las células vegetales es el mismo que el del colesterol en las células animales. La diferencia en la estructura química del sitosterol respecto del colesterol radica sólo en la presencia de un grupo etilo en el carbono 24. La adición de este esteroide a la emulsión lipídica, en reemplazo del colesterol, además de sustituir un componente de origen animal por otro de origen vegetal, supondría también una significativa reducción del costo de la emulsión y del medio. Sin embargo, el comportamiento de los cultivos de células adaptadas al medio suplementado con el esteroide vegetal no difirió del comportamiento de las células cultivadas en ausencia de esteroides: los parámetros de crecimiento y

metabólicos fueron similares, y el volumen celular fue sólo ligeramente superior al de las células sin esteroides, pero significativamente inferior al de las células cultivadas en el medio con colesterol. Este resultado indica que la regulación del volumen de las células UFL-AG-286 es estrictamente dependiente de la estructura del esteroide, y que a pesar de su similitud estructural el sitosterol no puede suplir la función del colesterol en la regulación del volumen celular. En este aspecto, la respuesta de esta línea celular difiere de la descrita previamente en las células endoteliales bovinas [171], donde la sustitución del colesterol por sitosterol no alteró la funcionalidad de los mecanismos involucrados en la regulación del volumen celular. Por otro lado, no se puede descartar que los cambios en los niveles de esteroides, y en la identidad del esteroide, afecten también la funcionalidad de otros canales iónicos dependientes de esteroides que también intervienen en la homeostasis celular [174].

El contenido de esteroides también afectó la capacidad de las células UFL-AG-286 para replicar AgMNPV. Las células adaptadas al cultivo en un medio carente de esteroides, una vez infectadas, no mostraron evidencias de efecto citopático y continuaron proliferando como los controles no infectados. Esta pérdida de la capacidad de replicación de los virus de poliedrosis nuclear en las células de insectos lepidópteros en ausencia de colesterol también fue descrita en las líneas Sf9 [138] y BmN [139]. Sin embargo, Cleverley y colaboradores fueron capaces de infectar cultivos libres de colesterol de la línea celular High Five con dos virus recombinantes diferentes derivados de AcMNPV [140]. Esta discordancia en el comportamiento de distintas líneas celulares podría ser la consecuencia de diferencias intrínsecas entre ellas, como ha sido sugerido por Huang [139], o bien deberse a diferencias en los procedimientos seguidos para obtener los cultivos libres de colesterol: Belloncik y col. (1997) realizaron los experimentos con células Sf9 previamente adaptadas al cultivo en un medio libre de suero y de colesterol [138], Huang y col. (2014) utilizaron células BmN cultivadas en un medio suplementado con suero, reducidas en colesterol por tratamiento con M β CD [139], y Cleverley y col. (1997) emplearon células High Five crecidas en medio suplementado con suero y delipidado mediante tratamiento con éter [140]. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con los cultivos de células UFL-AG-286 mantenidos durante más de 200 pasajes en un medio libre de suero y carente de colesterol, apoyan la hipótesis que el colesterol resulta esencial para que los virus de poliedrosis nuclear infecten y/o se repliquen en células de lepidópteros. Esta conclusión se reafirma por la pérdida de la capacidad de las células UFL-AG-286 para ser infectadas y/o replicar AgMNPV, luego de la reducción en el contenido de colesterol por tratamiento con M β CD. La ausencia de replicación viral en estas condiciones, entonces, torna inviable la posibilidad de desarrollar un proceso de producción de baculovirus, o productos basados en baculovirus, en un medio de cultivo libre de colesterol.

El reemplazo de colesterol por sitosterol como fuente de esteroides en los cultivos de células UFL-AG-286 también estuvo acompañado por la pérdida de la capacidad celular para infectarse y/o

replicar AgMNPV. Este resultado es una evidencia más acerca de la similitud entre las células alimentadas con el esteroles vegetal y las células mantenidas en un medio sin esteroides. Las razones por las cuales estas células, cuando son cultivadas en un medio con sitosterol, se comportan, estructural y funcionalmente, como aquellas que fueron privadas de esteroides, por el momento sólo pueden ser materia de especulación. En este sentido, una posibilidad es que, efectivamente, las células cultivadas con sitosterol posean un menor contenido total de esteroides en sus membranas que las células cultivadas con colesterol, de manera análoga a lo observado en células endoteliales de aorta bovina privadas inicialmente de colesterol mediante tratamiento con M β CD, y re-alimentadas luego con sitosterol [171]. Por otro lado, no puede descartarse que la mínima diferencia existente entre las moléculas de colesterol y sitosterol resulte suficiente para determinar cambios estructurales y funcionales en las membranas que conduzcan al deterioro de la capacidad celular para infectarse y/o replicar el virus, además de interferir con la homeostasis del volumen. En cualquier caso, en relación a la formulación del medio de cultivo, el reemplazo de colesterol por sitosterol tampoco resulta una opción factible para obtener un medio libre de esteroides animales destinado a producir baculovirus en cultivos de células de insectos lepidópteros.

Los cultivos de células UFL-AG-286 infectados con AgMNPV en los medios carentes de colesterol, ya sea con adición de sitosterol o libre de esteroides agregados, no mostraron ninguna evidencia de efecto citopático, ni tampoco alteración de los respectivos parámetros de cultivo en relación a los controles sin infectar, cualesquiera fuera la concentración de emulsión lipídica adicionada como suplemento. En una infección permisiva, los cultivos infectados con AgMNPV muestran evidencias de efecto citopático, como redondeamiento y aumento de volumen, como así también retraso en la proliferación, dentro de las primeras horas luego de la infección. La ausencia de cualquier evidencia de infección, entonces, parece indicar que la interrupción del ciclo de replicación en las células que carecen de colesterol se produce de manera muy temprana, afectando algunas de las etapas iniciales del ciclo. La importancia del colesterol en las etapas tempranas de la infección viral fue reconocida por numerosos autores para diferentes familias virales [130–132,135,136,175]. Considerando la importancia que tiene el colesterol en la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática, y el rol de ésta en la adsorción, la etapa inicial del ciclo de replicación, se decidió estudiar como el cambio de contenido de esteroides afectaba la capacidad celular para unir viriones brotados de AgMNPV, midiendo su velocidad de desaparición de los sobrenadantes de los cultivos infectados. Los resultados obtenidos muestran que las células que carecen de colesterol, ya sea porque fueron adaptadas para su cultivo en un medio que carece del mismo, o porque fueron deprivadas mediante tratamiento con M β CD, conservan la capacidad de unir los BVs de AgMNPV, si bien parecen hacerlo de manera más lenta y menos eficiente que aquellas células que contienen colesterol, de acuerdo a las diferencias verificadas entre las constantes cinéticas de unión determinadas en los experimentos realizados en células adaptadas, y en los porcentajes finales de reducción de los títulos virales de los

sobrenadantes, tanto en células adaptadas como en células tratadas con M β CD. No obstante, para el análisis comparativo de los comportamientos de las células que contienen colesterol, por un lado, y las que son libres de esteroides, por otro, debe tomarse en cuenta que las respectivas superficies disponibles para unir a los BVs no son iguales, debido a la diferencia de tamaños: si se considera que ambos tipos de células son esféricas, a partir de los diámetros celulares se estima que el área superficial promedio de cada célula cultivada en el medio con colesterol alcanza a $2,80 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, mientras que en las células libres de esteroides alcanza a $1,13 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. Si las constantes cinéticas de unión se corrigen por las respectivas áreas superficiales, se verifica que son similares para ambos tipos de células ($1,15 \times 10^{-4} \text{h}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$), lo cual indicaría que la capacidad específica de las células UFL-AG-286 para ligar viriones brotados de AgMNPV sería independiente de la disponibilidad de colesterol. Por lo tanto, la interrupción del ciclo de replicación que acaece en ausencia de colesterol no parece ser atribuible a un bloqueo en la etapa de adsorción. Experimentos de transducción sobre células de mamíferos han demostrado que, en esas células, la extracción de colesterol con M β CD no inhibe la unión de BVs sobre la membrana plasmática [58,141], si bien el patrón de dispersión espacial de los viriones parece modificarse cuando los esteroides son removidos de la membrana [141]. Los resultados de este trabajo muestran por primera vez que la disponibilidad de colesterol tampoco sería esencial para la adsorción de BVs de un NPV del grupo I sobre una línea de células de insectos lepidópteros, y que tal comportamiento se verifica tanto en células cuyo colesterol fue extraído como en aquellas que han sido adaptadas y se cultivan en un medio libre de esteroides agregados.

Se han publicado numerosas evidencias acerca de la existencia de vías alternativas para la unión y penetración de los BVs, tanto en células de insectos lepidópteros como en células de mamíferos [59,141,176–178]. La mayoría de las evidencias obtenidas hasta el presente indican que la vía productiva de ingreso de BVs, tanto en células de lepidópteros como en células de mamíferos, es la endocitosis adsortiva [52,56,58,141,176,179,180]. No se han podido identificar aún receptores proteicos que reconozcan e interaccionen específicamente con GP64, la glicoproteína de la envoltura que media en la endocitosis adsortiva productiva de los BVs de los nucleopoliedrovirus del grupo I [55,179], pero se ha verificado que GP64 presenta dominios que le permiten interaccionar con moléculas distribuidas de forma ubicua y abundante sobre la superficie de las células animales, como el colesterol [141]. Se ha descrito que la interacción entre las moléculas de colesterol localizadas en la membrana celular y el dominio Ch2 CRAC de GP64 es requerida para la infectividad de los BVs del virus AcMNPV en la línea celular Sf9 [141]. Adicionalmente, se ha observado que la interacción con el colesterol facilita la unión de BVs sobre la membrana de células de mamífero, y la posterior endocitosis por un mecanismo dependiente de clatrina y dinamina, que conduce a una transducción productiva [58,141]. Estos antecedentes sugieren, por lo tanto, que la interacción GP64 - colesterol es una condición necesaria para que la unión entre BVs y células conduzca a una endocitosis adsortiva productiva, que además no requeriría de la unión a un receptor específico adicional [181]. Ahora bien,

¿cómo se adsorben los BVs sobre las células cuyas membranas carecen o han sido privadas de colesterol? A este respecto, se ha verificado que la GP64 de AcMNPV posee también un dominio rico en aminoácidos básicos que le permite unirse, por medio de interacciones electrostáticas, con los proteoglicanos de la superficie celular [180] y/o sus residuos de heparán sulfato [178,182]. Estas interacciones podrían ser suficientes para unir inicialmente los BVs sobre la superficie celular, y eventualmente promover su penetración por vías alternativas, como la macropinocitosis [58,141,176] o la fagocitosis [183], que conservan su operatividad en ausencia de colesterol, pero no conducen a una infección o una transducción productiva. Se ha observado en células de mamífero privadas de colesterol que los BVs ingresan a las células, pero quedan retenidos en el interior de grandes vesículas, y por lo tanto el genoma no puede alcanzar el núcleo y expresarse [141]. La adsorción de los BVs de AgMNPV sobre las células UFL-AG-286 carentes o privadas de colesterol podría explicarse, entonces, a través del establecimiento de interacciones electrostáticas inespecíficas entre la GP64 viral y los proteoglicanos celulares, que resultarían suficientes para unir los viriones, y eventualmente también promover su internalización por una vía no endocítica, pero que no pueden conducir a una infección productiva. El gen *gp64* de la cepa de AgMNPV utilizada en estos experimentos ha sido secuenciado [184], y la secuencia predicha de aminoácidos posee un alto nivel de homología con la correspondiente al virus AcMNPV. En particular, en la región en la que ha sido mapeado el sitio de unión a heparán sulfato en la GP64 de AcMNPV, se puede apreciar en AgMNPV la presencia nueve aminoácidos básicos (cuatro residuos de arginina, tres de lisina y dos de histidina), de los cuales seis conservan identidad de especie y posición. Estas características permiten fundamentar como hipótesis que la función de interacción electrostática con proteoglicanos de la superficie celular está conservada en la GP64 de AgMNPV, y que esa interacción podría explicar la captura de viriones por parte de células que carecen de colesterol en su membrana plasmática.

Además de resultar esencial para sostener la replicación de AgMNPV en las células UFL-AG-286, la presencia de colesterol en el medio contribuyó a mejorar la estabilidad de la infectividad de los BVs de AgMNPV a 27°C. Desplanques y col. (2010) demostraron que la extracción de colesterol de la envoltura, por tratamiento con M β CD, de viriones del virus pseudorabia (familia *Herpesviridae*) reducía su infectividad, y también la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente o a -80°C [185]. Más recientemente, Bajimaya y col. (2017) demostraron que los viriones de los virus influenza A y respiratorio sincicial producidos en células privadas de colesterol son más inestables y su densidad más heterogénea que la de los viriones producidas en células control; adicionalmente, demostraron que el agregado de colesterol exógeno restituye la estabilidad de los viriones producidos en células carentes de colesterol [186]. Por otro lado, Carro y Damonte y col. (2013), trabajando con virus dengue, hallaron que su infectividad disminuía cuando el contenido de colesterol de los viriones se reducía por tratamiento con M β CD o nystatin, pero en este caso la adición de colesterol exógeno no sólo no permitió recobrar la infectividad, sino que se tradujo

en un efecto virucida [136]. Otros estudios han mostrado que los viriones del virus Mayaro, del género *Alphavirus*, que fueron producidos en células de mamífero o células de insecto poseen diferentes concentraciones de colesterol en sus envolturas, pero éstas presentan niveles similares de organización lateral; en el mismo trabajo se observó que la reducción del contenido de colesterol de los viriones producidos en células de mamífero afectó la organización lateral de la envoltura, su estabilidad y su infectividad, mientras que las mismas características de los viriones producidos en células de insecto no resultaron afectadas por el mismo tratamiento [187]. Los antecedentes citados ponen en evidencia que la presencia de colesterol en la envoltura es importante para la preservación de la infectividad de los viriones de virus envueltos clasificados en diferentes familias, mientras que los resultados de esta tesis demuestran, por primera vez, que también lo es para la infectividad de los viriones de un virus de la familia *Baculoviridae*, AgMNPV, producidos en una línea de células de insecto. Las razones de la caída más rápida de la infectividad de los viriones de AgMNPV cuando son incubados en un medio sin colesterol deben ser aún dilucidadas. Una posible explicación para este fenómeno es que, en el medio suplementado con la emulsión carente de colesterol, por establecimiento de un gradiente de concentraciones entre la envoltura y el medio, el colesterol migre de aquella a éste a mayor velocidad, conduciendo a una reducción de la concentración en la envoltura y a la consecuente pérdida de capacidad para ingresar a la célula por una vía productiva, reflejada en la pérdida de infectividad. Esta hipótesis está avalada por una antigua investigación que demostró que el contenido de colesterol de la envoltura de los viriones del virus envuelto VSV, de la familia *Rhabdoviridae*, se reducía hasta el 90% cuando los viriones eran incubados en presencia de vesículas unilamelares de fosfatidil colina, y que esa reducción se acompañaba por el aumento de la fluidez de la envoltura viral y la reducción de la infectividad [188]. La exposición de los viriones de AgMNPV a las vesículas fosfolipídicas que constituyen la emulsión utilizada para suplementar el medio UNL podría desencadenar un efecto semejante, cuya intensidad podría depender de la presencia de colesterol en la formulación de la emulsión. Será necesario realizar experimentos adicionales para corroborar esta hipótesis, o eventualmente formular otras alternativas.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir, que el colesterol no es esencial para la supervivencia y la proliferación celular, pero resulta indispensable para la infección productiva con baculovirus. Frente a estos resultados surge la pregunta, ¿cuál es la función de los esteroides y cómo se relacionan sus diferencias estructurales con las propiedades dinámicas de la membrana plasmática que impiden la infección y/o replicación viral en ausencia de colesterol?

5.2 Relación entre las diferencias estructurales de los esteroides y los cambios en las propiedades de membranas

La membrana plasmática además de separar selectivamente los entornos intra y extracelular, actúa como la primera barrera contra patógenos. El orden dinámico de los lípidos de la membrana

plasmática juega un rol importante en las etapas tempranas de la infección viral [81]. Los esteroides contribuyen regulando el orden dinámico de modo determinante y el estudio de las interacciones entre fosfolípidos y esteroides en sistemas sencillos como los liposomas permiten sacar conclusiones acerca de cómo cambia la fluidez de membrana con las diferencias estructurales de los esteroides ensayados.

En este trabajo de tesis se estudió la influencia de los esteroides sobre el ordenamiento lipídico por la técnica de EPR. Se utilizaron los marcadores de espín n-SASL y CSL, sondas con estructura similar a los lípidos de membrana, que contienen un radical nitróxido estable. Al ser incorporadas a membranas artificiales o membranas celulares, estas sondas paramagnéticas, aseguran muy poca perturbación del sistema lipídico en estudio y detectan cambios en su microentorno reflejando restricciones estéricas locales en la movilidad y alteraciones en la dinámica [145]. Se analizó cuál de ellas resultó más sensible para detectar esos cambios. Las bicapas lipídicas estudiadas corresponden a liposomas de PC de huevo con distinto contenido de esteroides y a membranas plasmáticas de células de la línea UFL-AG-286 cultivadas en diferentes condiciones.

Con el objeto de estimar posibles diferencias en el comportamiento de lípidos análogos en la fluidez de membrana, se estudiaron por EPR membranas artificiales, liposomas unilamelares (LUVs) de colesterol/PC de huevo, sitosterol/PC de huevo y ergosterol/PC de huevo, con diferente proporción de esteroles (0%, 4%, 10%, 20% y 40%). Las medidas se realizaron a 27°C, temperatura a la cual la PC de huevo se encuentra en fase líquido desordenada, y el colesterol y el sitosterol resultan totalmente miscibles en el rango de concentraciones ensayadas [146]. El ergosterol, por su parte, deja de ser miscible en fosfolípidos insaturados a concentraciones mayores al 25% [189].

En los LUVs con marcadores n-SASL se utilizó el parámetro hiperfino A_{MIN} para cuantificar la movilidad del marcador (Figura 11). Este parámetro es directamente proporcional a la fluidez de membrana. Todos los marcadores n-SASL registraron una disminución significativa en la movilidad con el aumento de la concentración de colesterol o sitosterol. Al comparar los resultados para cada esteroles se comprobó que para concentraciones mayores a 10 mol%, el colesterol resultó más efectivo que el sitosterol en disminuir la fluidez, pero a concentraciones menores no se observó diferencia en el orden promovido por ambos esteroides. Estos resultados coinciden con los publicados por Gallová y col. (2011) con respecto al aumento en el orden de las cadenas acílicas con la concentración de ambos esteroides; sin embargo dichos autores no observaron diferencias apreciables entre los efectos de colesterol y sitosterol utilizando como marcador el 16-SASL [146]. En esta tesis, los espectros obtenidos de LUVs marcados con 12-SASL mostraron cambios en la fluidez en vesículas de hasta 40 mol% de esteroides y además diferencias en el comportamiento entre colesterol y sitosterol. Esta discrepancia podría deberse al marcador utilizado en cada experimento. Podemos considerar que el 12-SASL resulta una sonda más sensible que el 16-SASL para estudiar los efectos de los esteroides sobre la movilidad de las cadenas acílicas porque se ubica cercano al C9 o C10, zona de

posicionamiento del colesterol en las bicapas de membrana [190–192]. La diferencia en el orden promovido por ambos esteroides a concentraciones mayores a 10 mol% podría atribuirse a la presencia de un grupo etilo adicional en C24 en la molécula de sitosterol, que mantendría más separadas a las cadenas acílicas de los lípidos de membrana, confiriéndole así mayor fluidez. Esta es la única diferencia estructural con la molécula de colesterol ya que comparten la estructura de anillo rígido casi plano que impone restricciones de movimiento y/o posición de los lípidos vecinos.

Se estudiaron por EPR además LUVs de ergosterol/PC de huevo. Recordemos que este esteroide está presente en la levadura de cerveza, constituyente del medio de cultivo celular base. Para proporciones menores que 4 mol%, el ergosterol mostró el mismo comportamiento que el sitosterol y el colesterol. Sin embargo, a concentraciones mayores, no se registraron cambios significativos en la movilidad con el aumento en la concentración de ergosterol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos utilizando RMN por Hsueh y col. (2007) y Urbina y col. (1995), en membranas de ergosterol/POPC. El doble enlace *cis* de la cadena insaturada de los fosfolípidos dificulta el empaquetamiento con los esteroides por lo que éstos tienden a ser excluidos, segregándose hacia dominios con fosfolípidos de cadenas saturadas [191]. Probablemente este efecto sea más notorio en el ergosterol que en el colesterol por la presencia de dos dobles enlaces adicionales, en las posiciones C7 y C22, y un grupo metilo en C24 de la cadena lateral [189,193].

En los LUVs marcados con CSL, de estructura similar al colesterol, se utilizó el parámetro hiperfino A_{MAX} para cuantificar la movilidad del marcador (Figura 11). En este caso, este parámetro es inversamente proporcional a la fluidez de membrana. Se observó un incremento del orden de las cadenas acílicas con el aumento de la concentración de esteroide, en acuerdo con los resultados obtenidos con 12-SASL, y con los reportados por Gallova y col. [146]. Sin embargo, los espectros no mostraron diferencias de fluidez significativas entre esteroides como las registradas por el 12-SASL para concentraciones mayores a 10 mol%. Esto probablemente se deba a que los marcadores *n*-SASL son más sensibles que el CSL para reconocer cambios en la movilidad del entorno del radical nitróxido, como se explicó en la sección 1.5.2.1.

Es importante destacar que en todos los espectros obtenidos de los liposomas se registraron tres picos característicos de la interacción hiperfina resuelta.

Para avanzar en el conocimiento y cumplir progresivamente con los objetivos específicos de esta tesis se analizó el ordenamiento lipídico, con diferentes marcadores de espín por la técnica de EPR, de membranas plasmáticas de células de la línea UFL-AG-286 cultivadas en diferentes condiciones. Todos los espectros obtenidos de las células con *n*-SASL se midieron antes de los 12 minutos de iniciada la marcación. La intensidad de la señal de EPR de este marcador disminuyó con el tiempo, probablemente por reducción frente a los antioxidantes liposolubles presentes en la

membrana, por ejemplo el tocoferol. Este antioxidante reduce directamente los radicales libres que podrían reaccionar con las insaturaciones de los fosfolípidos.

Como se detalló, el medio de cultivo UNL está constituido por un medio básico, enriquecido con una mezcla de hidrolizados proteicos, extractos naturales, y una emulsión de lípidos y esterol. Las células de insecto no tienen la capacidad de sintetizar colesterol, por lo que incorporan en su membrana los esterol disponibles en el medio de cultivo; y es por esto precisamente que esta línea resulta un buen modelo para estudiar el rol de los esterol en la membrana plasmática de células y su relación con la infección viral.

Para analizar el efecto de los esterol sobre la fluidez de la membrana de las células UFL-AG-286 se prepararon distintas muestras con variantes en el medio de cultivo. En un principio, antes de tener las sub-líneas adaptadas a diferente fuente de esterol, y partiendo de células UFL-AG-286 en cultivo estático en el medio básico libre de componentes de origen animal, pero suplementado con 1% de una emulsión lipídica a base de aceite soja que contiene colesterol, se generaron muestras reducidas en colesterol por incubación con M β CD y muestras reducidas en colesterol y realimentadas con colesterol o sitosterol. En simultáneo y como fue detalladamente explicado, por sucesivos pasajes celulares en medios de idéntica composición básica pero que difieren solamente en la fuente de esterol aportada, se adaptaron sub-líneas en medios suplementados con emulsión libre de esterol agregados, con emulsión con sitosterol o con colesterol.

Los espectros obtenidos de las mediciones por EPR de las muestras de células con marcadores n-SASL registraron los tres picos correspondientes a la interacción hiperfina resuelta del electrón desapareado con el núcleo del nitrógeno, de manera similar a lo obtenido en las membranas modelo.

Los valores de los parámetros A_{MIN} determinados a partir de los espectros de EPR del marcador 12-SASL coincidieron dentro del error experimental en las tres muestras de células adaptadas a diferente fuente de esterol, y en las reducidas en colesterol y realimentadas posteriormente con colesterol o sitosterol (Tabla 16). Este valor corresponde al A_{MIN} encontrado en LUVs con 6 mol% de esterol aproximadamente, sin diferencias entre sitosterol y colesterol (Figura 43). Solo el valor de A_{MIN} obtenido en los espectros de las células reducidas en colesterol por tratamiento con M β CD, sin realimentar, resultó *notoriamente mayor* que el registrado en el resto de las muestras e indicó una movilidad similar a la que se registró en LUVs de PC de huevo *sin* incorporación de esterol (Figura 40).

El hecho de que el valor de A_{MIN} para la muestra crecida en medio UNL con el agregado de la emulsión *sin esterol* coincida con el A_{MIN} de las muestras *con colesterol o sitosterol* sugirió que, en ausencia de esterol agregado, las células incorporan algún tipo de esterol presente en el medio de cultivo, como podría ser el caso del ergosterol agregado con la levadura de cerveza presente en el

medio base, o como también ya fue mencionado trazas de sitosterol provenientes del aceite de soja presente en el medio base.

En todos los espectros obtenidos en las muestras de células, con excepción de las reducidas en colesterol con M β CD, se advierte un hombro que aparece a la izquierda del primer pico (Figuras 39 y 41). Esta observación sugiere la presencia de un segundo entorno donde el marcador de espín tiene movimiento más restringido. Este comportamiento fue reportado por Swamy para cuatro diferentes líneas celulares marcadas con n-PC [154].

Las células adaptadas a crecer con el agregado de la emulsión con colesterol se lograron marcar con CSL. Se optimizó un protocolo en el que las células en medio de cultivo UNL base se incubaron con la emulsión en la que se resuspendió el marcador (ver Sección 3.8.1.3). En los espectros de EPR se observó una *única línea*. Estos espectros fueron sorprendentemente diferentes a los obtenidos en las células marcadas con n-SASL y en los LUVs marcados con CSL y con n-SASL, donde se registraron *los tres picos* correspondientes a la interacción hiperfina resuelta. La señal observada en las células marcadas con CSL se mantuvo constante en el tiempo y se ajustó adecuadamente con la derivada de una función lorentziana (Figura 44). Esto es consistente con que las moléculas de CSL se encuentran lo suficientemente próximas entre sí para que se produzca un solapamiento de las funciones de onda de los electrones desapareados y la interacción de intercambio “promedie” las señales de los grupos nitróxidos vecinos [145]. A partir del ajuste de la señal se obtuvieron los anchos de líneas para varios experimentos y se encontraron comprendidos en el rango de (22 ± 2) G. La ausencia de la señal colapsada en los LUVs marcados con CSL indica que la disposición de las moléculas de este marcador en *membranas modelo* es diferente a su distribución en *membranas celulares*. El CSL, por su afinidad química, es un marcador que registra el entorno en el que se encuentran las moléculas de colesterol. En las *membranas celulares*, las moléculas de colesterol se encuentran en dominios a una concentración mucho mayor a la que surge de la relación colesterol/lípidos totales promedio en membrana. Las moléculas de CSL se intercalan con las de colesterol y están lo suficientemente cercanas para que se establezca la interacción de intercambio. En cambio en los *LUVs* las moléculas de CSL junto con las de colesterol se distribuyen en la bicapa de tal forma que los radicales nitróxidos se encuentran a distancias mayores que las requeridas para establecer dicha interacción. La presencia de la interacción de intercambio del CSL en células y no en LUVs fue reportada por Grammenos y col. para células cultivadas de carcinoma de colon humano (HCT-116) [194].

Para analizar la interacción de intercambio entre los electrones desapareados de las moléculas de CSL, se midieron por EPR muestras policristalinas de CSL puro. La señal registrada se ajustó con la derivada de una función lorentziana con un ancho de línea de 15,6 G (Figura 49). El mayor ancho de la señal de CSL en las células indica que la interacción de intercambio es más débil y que las

moléculas del marcador están más separadas que en una muestra pura, y sugiere que el colesterol hace las veces de diluyente en la células, intercalándose entre las moléculas de CSL y reduciendo así la interacción de intercambio. Por lo tanto, se descartó la presencia de agrupaciones de moléculas de CSL puro dentro de la membrana celular.

Con el propósito de comprender y poder interpretar los resultados obtenidos con este marcador en las células, se redujo la concentración de colesterol, con soluciones de M β CD 15 y 30 mM de la muestra adaptada a proliferar en el medio UNL con el agregado de la emulsión con colesterol. A pesar de la elevada concentración de ciclodextrina, la viabilidad celular promedio se mantuvo en 70% y 39% respectivamente. En los espectros de EPR, obtenidos a los 18 minutos de poner en contacto las muestras con el marcador CSL, se observaron sorprendentemente las *tres líneas* correspondientes a la estructura hiperfina resuelta del radical nitróxido, superpuestas a una señal colapsada (Figura 50). Esto sugiere que en membranas celulares reducidas en colesterol, una parte de las moléculas de CSL *no logran* migrar hasta ubicarse en los dominios junto a las moléculas de colesterol, permaneciendo diluidas entre los fosfolípidos originando la señal de un espectro resuelto. Se observó que la intensidad de ese espectro resuelto disminuía en el tiempo y se evaluó ese decaimiento midiendo las alturas pico a pico de máximo central de varios experimentos en las mismas condiciones. El proceso de decaimiento resultó complejo y no se ajusta con una función monoexponencial (datos no mostrados). En los espectros tomados después de los 52 minutos del contacto de las células con el marcador, no se observó la señal resuelta y solo aparece una única línea compatible con colapso por intercambio del marcador remanente (Figura 51). La amplitud de la señal colapsada permanece constante durante el decaimiento de la señal de tres líneas, hecho que confirma que las moléculas de CSL que se encuentran en el entorno de fosfolípidos no migran hacia los dominios más inmovilizados. Los parámetros del ajuste realizado sobre la señal colapsada coincidieron, dentro del error experimental, con los obtenidos del ajuste de la señal en las células sin tratamiento con M β CD, indicando la presencia de dominios de similares características en ambas muestras. Los espectros obtenidos de las células con CSL se midieron después de los 18 minutos de iniciada la marcación porque, a diferencia de los marcadores n-SASL, el CSL necesita un período de incubación para incorporarse a la membrana. La intensidad de la señal colapsada adquirida en las células sin tratamiento con M β CD se mantuvo constante en el tiempo. Evidentemente el espectro observado en las células reducidas en colesterol muestra dos entornos sentidos por el CSL que afectan en forma diferente la estabilidad del radical nitróxido. En el entorno más fluido, el CSL se reduciría por acción del tocoferol, que como ya se mencionó, protege de la oxidación a los fosfolípidos insaturados actuando directamente sobre los radicales libres [195]. En el entorno más inmovilizado, formado fundamentalmente por colesterol, esfingomielina y fosfolípidos saturados, el radical nitróxido del CSL no se reduce, originando la señal constante en el tiempo. En este dominio la

esfingomielina actuaría como antioxidante natural, ejercería un efecto protector sobre el colesterol inhibiendo su contacto con los radicales libres dada su capacidad para formar enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares [196].

¿Pueden estas observaciones espectroscópicas contribuir a comprender por qué el colesterol es esencial para que los baculovirus infecten de manera productiva las células de lepidópteros?

Los nanodominios enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, y las proteínas estabilizadas en dichos dominios, pueden desempeñar un rol crítico en el proceso de infección viral, ya que, en muchos casos, constituyen los sitios para la adsorción e internalización [81]. Evidencias publicadas sugieren que la entrada de un virus con envoltura puede requerir colesterol en la membrana celular o en ambas membranas involucradas como es el caso del virus HIV tipo I [128] y de la infección con el herpes virus bovino I [129]. En el caso de los coronavirus, la infectividad se redujo con el tratamiento con M β CD, tanto de la membrana celular como de la membrana viral, pero no se inhibió totalmente [131].

En este trabajo se ha demostrado que el colesterol, presente en la membrana de las células de la línea UFL-AG-286, adaptada a proliferar en un medio libre de componentes de origen animal, resultó ser indispensable e irremplazable para la producción de ambas progenies virales del AgMNPV, aunque la proliferación celular no se vio afectada por la reducción del esteroles ni por su cambio a sitosterol. Los estudios por EPR en células UFL-AG-286 mostraron que la estructura del colesterol le permite agruparse en nanodominios logrando un alto empaquetamiento que determina las propiedades dinámicas de estos entornos. En liposomas con alta concentración de esteroides se determinó que el sitosterol no logra el mismo orden debido a la presencia del grupo etilo en el C24. La eliminación del colesterol desorganizaría los dominios de membrana útiles para que los viriones brotados penetren por una vía productiva que conduzca a su desnudamiento y transporte del ácido nucleico al núcleo. El sitosterol, por su estructura química, no podría organizar los dominios de manera eficiente, lo cual impediría una internalización productiva de los viriones.

Se requerirá de nuevos estudios para clarificar la relación entre los cambios en el ordenamiento de la membrana y la adsorción e infección viral [197,198].

Conclusiones

6. Conclusiones

- ✓ Se desarrolló un medio de cultivo libre de componentes de origen animal para la línea celular saUFL-AG-286.
 - La peptona de soja III resultó el hidrolizado vegetal de elección para reemplazar el caldo triptosa y el hidrolizado de caseína (ambos de origen animal), por su efecto estimulante sobre la proliferación celular en la línea UFL-AG-286, lo que implica tanto la reducción del costo del medio de cultivo como de la cantidad de componentes indefinidos.
 - La emulsión preparada a partir de aceite de soja fue la seleccionada para continuar con el desarrollo del nuevo medio libre de componentes de origen animal. Las células UFL-AG-286 pueden proliferar, ser infectadas y replicar el baculovirus permitiendo alcanzar rendimientos de poliedros y de BVs tan elevados como los obtenidos con la emulsión comercial control.
- ✓ Las células UFL-AG-286 se adaptaron a un medio de cultivo libre de hidrolizados de proteínas de origen animal por sucesivos pasajes hasta que dichos hidrolizados fueron reemplazados totalmente por los de origen vegetal. Esta sustitución no perjudicó la capacidad de proliferación de estos cultivos ni la replicación de AgMNPV.
- ✓ Las células de la línea UFL-AG-286 se adaptaron, por pasajes sucesivos, a crecer en medios de cultivo suplementados por una microemulsión sin esteroles agregado o conteniendo sitosterol en lugar de colesterol o con colesterol. El colesterol no es esencial para sostener la supervivencia celular y la proliferación.
- ✓ El contenido de esteroides afectó la capacidad de las células UFL-AG-286 para replicar AgMNPV. El agregado de colesterol es necesario para que la replicación viral se lleve a cabo y no puede ser reemplazado por un esteroles vegetal como el sitosterol.
- ✓ La capacidad de unir los viriones brotados de AgMNPV en los cultivos infectados, etapa inicial del ciclo de replicación, se vio conservada tanto en las células que contienen colesterol o sitosterol como en las que carecen de esteroides.
- ✓ La presencia de colesterol en el medio de cultivo ejercería un efecto protector sobre la actividad infectiva de los viriones brotados de AgMNPV.
- ✓ La aplicación de la técnica de EPR, mediante la utilización de los marcadores de espín n-SASL y CSL, permitió investigar la influencia del colesterol sobre el orden dinámico de membranas modelo, como así también en la membrana plasmática de células de la línea UFL-AG-286.

- Cuando 12-SASL se incorporó a la membrana plasmática de las células UFL-AG-286, su señal registró información correspondiente a dos entornos diferentes, uno más fluido, identificado con la región fosfolipídica, y otro de menor movilidad, correspondiente a dominios ricos en colesterol y esfingomielina. En LUVs, por el contrario, la señal de 12-SASL sólo se asoció a las regiones de mayor fluidez.
 - El parámetro indicador de fluidez obtenido a partir de los espectros del marcador 12-SASL resultó similar en todas las muestras celulares, incluyendo las que fueron adaptadas a proliferar en medio con colesterol, con sitosterol o sin esteroides. A su vez, el valor medido de este parámetro coincidió con aquel correspondiente a membranas modelo con un contenido de esterol de 6 mol% aproximadamente. Sólo en las células cuyo contenido de colesterol fue reducido mediante tratamiento con MBCD el grado de orden resultó notoriamente menor que el obtenido en el resto de las muestras e indicó una movilidad similar a la que se registró en LUV_s de PC de huevo sin incorporación de esteroides.
 - El marcador de espín CSL evidenció más contundentemente diferencias en la distribución de las moléculas de colesterol en las membranas de células UFL-AG-286 respecto a las membranas modelo. Su señal colapsada registró un alto empaquetamiento de las moléculas de colesterol en los dominios más inmovilizados de membrana. La ausencia de esta señal en los LUVs con alto contenido de colesterol (40 mol%) indica claramente que los nanodominios inmovilizados sólo se observan en las membranas plasmáticas.
- ✓ La existencia de los nanodominios enriquecidos en colesterol en la membrana plasmática de las células de lepidópteros, revelada por EPR, sería una condición necesaria para la internalización de viriones brotados de baculovirus por una vía que conduce a una infección productiva, mediada por la interacción entre GP64 y colesterol. En células carentes de este esterol, donde la adsorción se produciría a través de la interacción entre GP64 y proteoglicanos celulares, la internalización no se produciría o conduciría a una infección abortiva.

Bibliografía

7. Bibliografía

- [1] G Benz (1986) Introduction: historical perspectives. En: *The biology of baculoviruses*. Vol I. (Ed: R Granados, B Federici) CRC press, Boca Ratón, Florida, p.1-36.
- [2] GE Wilkie, H Stockdale, SV Pirt (1980) Chemically-defined media for production of insect cells and viruses in vitro. *Dev Biol Standardization* 46: 29-37.
- [3] D Lynn, S Ferkovich (2004) New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *J Insect Sci* 4: 9.
- [4] D Lynn (1996) Development and characterization of insect cell line. *Cytotechnol* 20: 3-11.
- [5] P Sieburth, J Maruniak (1988) Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 195-198.
- [6] P Sieburth, J Maruniak (1988) Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J Invertebr Pathol* 52: 453-458.
- [7] WF Hink, RL Hall (1989) Recently established invertebrate cell lines. En: *Invertebrate Cell System Applications*. Vol. II. (Ed: J Mitsuashi) CRC Press, Boca Raton, Florida, p.269-293.
- [8] D Lynn (2003) Comparative susceptibilities of twelve insect cell lines to infection by three baculoviruses. *J Invertebr Pathol* 82:129-131.
- [9] VV Gioria, V Jäger, JD Claus (2007) Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. *Cytotechnol* 52:113-124.
- [10] G Wyatt (1961) The biochemistry of insect hemolymph. *Annu Rev Entomology* 6:75-102.
- [11] T Grace (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature* 195:788-789.
- [12] J Mitsuhashi, K Maramorosch (1964) Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects. *Boyce Thomson Institute*. 22:435-460.
- [13] G Gardiner, H Stockdale (1975) Two tissue culture media for production of Lepidopteran polyhedrosis viruses. *J Invertebr Pathol* 25:363-370.
- [14] S Weiss, G Smith, S Kalter, J Vaughn (1981) Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. *In Vitro* 17:495-502.
- [15] E Schlaeger (1996) Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20:57-70.

- [16] A Röder (1982) Development of a serum-free medium for cultivation of insect cells. *Naturwissenschaften* 69:92-93.
- [17] D Inlow, A Shauger, B Maiorella (1989) Insect cell culture and baculovirus propagation in protein-free medium. *Methods Cell Sci* 12:13-16.
- [18] J Claus, A Sciocco de Cap (2001) Producción masiva de baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. M.V. Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra, p.257-312.
- [19] R Mendonça, L Palomares, O Ramírez (1999) An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J Biotechnol* 72:61-75.
- [20] J Mitsuhashi (1989) Nutritional requeriments of insect cells in vitro. En: *Invertebrate cell system applications*. Vol I. (Ed: J Mitsuhashi) CRC Press, Boca Raton, Florida, p.3-20.
- [21] L Öhman, M Alarcón, J Ljunggren, A Ramqvist, L Häggström (1996) Glutamine is not essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnol Lett.* 18:765-770.
- [22] C Bédard, R Tom, A Kamen (1993) Growth, nutrient consumption, and endproduct accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol Progress* 9:615-624.
- [23] RI Freshney, A Liss (1983) *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New York. 293 pp.
- [24] D Barnes, G Sato (1980) Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22:649-655.
- [25] J van der Valk, D Mellor, R Brands, R Fischer, F Gruber, G Gstraunthaler, L Hellebrekers, J Hyllner, F Jonker, P Prieto, M Thalen, V Baumans (2003) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free and tissue culture. *Toxicol Vitro* 18:1-12.
- [26] H Hild, A Emery, M Al-Rubeai (1992) The effect of pH, temperature, serum concentration and media composition on the growth of insect cell. En: *Baculovirus and recombinant protein production processes*. (Ed: J Vlak, E Schlager, A Bernard) Roche, Basel, Suiza, p.316-321.
- [27] P Cruz, J Moreira, M Carrondo (1997) Insect cell growth evaluation during serum free adaptation in stirred suspension cultures. *Biotechnol Tech* 11:117-120.
- [28] J Wu, G King, A Daugulis, P Faulkner, D Bone, M Goosen (1988) Engineering aspects of insect cell suspension culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:249-255.
- [29] M Donaldson, M Shuler (1998) Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol Progress* 14:573-579.
- [30] F Franek, O Hohenwarter, H Katinger (2000) Plant protein hydrolysates: preparation of

- defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells culture. *Biotechnol Progress* 16:688-692.
- [31] B Maiorella, D Inlow, A Shauger, D Harano (1988) Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *J Biotechnol* 6:1406-1410.
- [32] JD Claus, G Remondetto, S Guerrero, A Demonte, M Murguía, A Marcipar (1994) Anticarsia gemmatalis Nuclear Polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures. *J Biotechnol* 31:1-15.
- [33] B Federici (1986) Ultrastructure of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. (Ed: R Granados, B Federici) CRC Press, Boca Ratón, Florida, p.62-88.
- [34] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dB (2006) *The Universal Virus Database, version 3*. Büchen - Osmond, C. Columbia University, New York, USA.
- [35] GF Rohrmann (2013) *Baculovirus Molecular Biology*. [Internet] 3rd ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. 211 pp.
- [36] JA Jehle, GW Blissard, BC Bonning, JS Cory, EA Herniou, GF Rohrmann, DA Theilmann, SM Thiem, JM Vlak (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Virology* 151:1257-1266.
- [37] M Fraser (1986) Ultra structural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J Ultrastruc Mol Struc Res* 95:189-195.
- [38] G Blissard, G Rohrmann (1989) Location, sequence, transcriptional mapping and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 170:537-555.
- [39] C Funk, S Braunagel, G Rohrmann (1997) Baculovirus structure. En: *The baculoviruses*. (Ed: L Miller) Plenum Press, New York, USA., p. 7-27.
- [40] A Gombart, M Pearson, G Rohrmann, G Beaudreau (1989) A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* 169:182-193.
- [41] R Müller, M Pearson, R Russell, G Rohrmann (1990) A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization. *J Virol* 176:133-144.
- [42] M Ayres, S Howard, J Kuzio, M Lopez-Ferber, R Possee (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202:586-605.

- [43] GW Blissard (1996) Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechn.* 20 (1-3):73-93.
- [44] J Slack, BM Arif (2007) The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus* 69:99-165.
- [45] SA Monsma, AG Oomens, GW Blissard (1996) The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70 (7):4607-4616.
- [46] M Westenberg, F Veenman, E Roode, W Rob, JM Vlak, D Zuidema, RW Goldbach (2004) Functional Analysis of the Putative Fusion Domain of the Baculovirus Envelope Fusion Protein F. *J Virol* 78:6946-6954.
- [47] D Jarvis, A García (1994) Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp 64 protein. *Virol* 205:300-313.
- [48] M Pearson, R Russell, G Rohrmann (2001) Characterization of a baculovirus encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virol.* 291: 22-31.
- [49] P Faulkner, J Kuzio, G Williams, J Wilson (1997) Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *J Gen Virol* 78:3091-3100.
- [50] M Whitford, P Faulkner (1992) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 66:4763-4768.
- [51] X Xiang (2011) *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus odv-e66 is an essential gene required for oral infectivity. *J Gen Virol* 92:1051-1060.
- [52] T Ohkawa, J Washburn, R Sitapara, E Sid, L Volkman (2005) Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *J Virol* 79:15258-15264.
- [53] A Sciocco de Cap (2001) Biología y patogénesis de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. (Ed: P Caballero, T Williams, M López-Ferber) M.V. Phytoma-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra, p.47-72.
- [54] JR Fuxa (2004) Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agric Ecosyst Env* 103 (1):27-43.
- [55] G Blissard, J Wenz (1992) Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 66:6829-6835.

- [56] G Long (2006) Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80:8830–8833.
- [57] J Mercer, M Schelhaas, A Helenius (2010) Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* 79:803-833.
- [58] C Kataoka, Y Kaname, S Taguwa, T Abe, T Fukuhara, H Tani, K Moriishi, Y Matsuura (2012) Baculovirus GP64-Mediated Entry into Mammalian Cells. *J Virol* 86:2610-2620.
- [59] NMJ O'Flynn, A Patel, J Kadlec, IM Jones (2013) Improving promiscuous mammalian cell entry by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Biosci Rep* 33:23-36.
- [60] C Charlton, L Volkman (1993) Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *J Virol* 197:245-254.
- [61] R Granados, K Williams (1986) In vivo infection and replication of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. I (Ed: E Granados, B Federici) CRC press, Boca Ratón, Florida, p.89-108.
- [62] V Romanowski, D Ghiringhelli (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*. M.V. Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra, p.119-142.
- [63] H Beniya, C Funk, G Rohrmann, R Weaver (1996) Purification of a virusinduced RNA polymerase from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cells that accurately initials late and very late transcription *in vitro*. *J Virol* 216:12-19.
- [64] M Grula, P Buller, R Weaver (1981) α -amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus infected *Heliothis* larval and *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol* 38:916-921.
- [65] J Ibarra, M Del Rincón Castro (2001) Capacidad insecticida de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. M.V. Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra, p.203-224.
- [66] F Moscardi, B Santos (2005) Produção commercial de nucleopoliedrosis de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidóptero: Noctuidae) em laboratorio. Proceeding of the IX Simposio de Controle Biologico. Recife, Brazil. 42.
- [67] F Moscardi (1989) Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear

- polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*. 84:51-56.
- [68] JP Condreay, TA Kost (2007) Baculovirus Expression Vectors for Insect and Mammalian Cells. *Curr Drug Targets*. 8:1126-1131.
- [69] M Rychlowska, B Gromadzka, B Bieńkowska-Szewczyk, K. Szewczyk (2011) Application of Baculovirus-Insect Cell Expression System for Human Therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 12:1840-1849.
- [70] A Zeltins (2013) Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol*. 53 (1):92-107.
- [71] TA Kost, JP Condreay, D Jarvis (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23:567-575.
- [72] TA Kost, JP Condreay, RS Ames (2010) Baculovirus Gene Delivery: A Flexible Assay Development Tool. *Curr Gene Ther*. 10 (3):168-173.
- [73] JV Oliveira, JL Wolff, A Garcia-Maruniak, BM Ribeiro, ME de Castro, ML de Souza, F Moscardi, JE Maruniak, PM Zanotto (2006) Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*. 87:233-3250.
- [74] EA Herniou, JA Olszewski, JS Cory, DR O'Reilly (2003) The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol*. 48:211-234.
- [75] AL Bocca, MC Barros, GK Martins, AC de Araújo, MJ Souza, AM Ribeiro, F Figueiredo, BM Ribeiro (2013) Immunological effects of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) by stimulation of mice in vivo and in vitro. *Virus Res*. 176:119-127.
- [76] A Cherry, T Williams (2001) Control de insectos plagas mediante los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra, España, p.389-450.
- [77] M Castro, M Souza, S Araujo, S Bilimoria (1997) Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *J Invertebr Pathol* 69:40-45.
- [78] V Pombo, L Velloso, B Ribeiro, S Bão (1998) Structural and ultrastructural changes during the infection of UFLAg-286 cell with the baculovirus AgMNPV. *J Invertebr Pathol* 72:239-245.
- [79] GA Micheloud, VV Gioria, G Pérez, JD Claus (2009) Production of occlusion bodies of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the

- saUFL-AG-286 cell line: Influence of infection conditions and statistical optimization. *J Virol Methods* 162:258-266.
- [80] GA Micheloud, VV Gioria, I Eberhardt, G Visnovsky, JD Claus (2011) Production of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor. *J Virol Methods* 178:106-116.
- [81] M Mazzon, J Mercer (2014) Lipid interactions during virus entry and infection. *Cell Microbiol* 16:1493-1502.
- [82] L Bagatolli, O Mouritsen (2015) *Life as a matter of fat: lipids in a membrane biophysics perspective*. Springer International Publishing AG, Dinamarca, 2nd ed., XVII, 298 pp.
- [83] J Bernardino de la Serna, GJ Schütz, C Eggeling, M Cebecauer (2016) There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front cell Dev Biol* 4:106-123.
- [84] AD Dupuy, DM Engelman (2008) Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 105:2848-2852.
- [85] H Lodish, A Berk, CA Kaiser, M Krieger, MP Scott, A Bretscher, H Ploegh, A Amon (2013) *Molecular Cell Biology*. Sixth edition. (Ed: W.H.Freeman & Co Ltd) New York, EE.UU.
- [86] T Róg, I Pasenkiewicz-Gierula, M Vattulainen, M Karttunen (2009) Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 1788:97-121.
- [87] JH Ipsen, G Karlstrom, OG Mouritsen, H Wennerstrom, MJ Zuckermann (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* 905:162-172.
- [88] T Fujimoto, I Parmryd (2017) Interleaflet Coupling, Pinning, and Leaflet Asymmetry-Major Players in Plasma Membrane Nanodomain Formation. *Front Cell Dev Biol* 4:1-12.
- [89] M Nielsen, L Miao, JH Ipsen, MJ Zuckermann, OG Mouritsen (1999) Off-lattice model for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers. *Phys Rev E Stat Nonlinear, Soft Matter Phys* 59:5790-5803.
- [90] J Fantini, N Garmy, R Malifoud, N Yahi (2002) Lipids rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med* 4:1-22.
- [91] HJ Kaiser, A Orłowski, T Rog, TKM Nyholm, W Chai, T Feizi, D Lingwood, I Vattulainen, K Simons (2011) Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc Natl Acad Sci* 108:16628-16633.
- [92] FX Contreras, A Ernst, P Haberkant, P Björkholm, E Lindahl, B Gönen, C Tischer, A Elofsson, G Heijne, C Thiele, R Pepperkok, F Wieland (2012) Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature* 481:525-529.

- [93] HJ Kwon, L Abi-mosleh, ML Wang, J Deisenhofer, L Goldstein, MS Brown, RE Infante (2009) Structure of N-terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol. *Cell* 137:1213-1224.
- [94] T Yeung, GE Gilbert, J Shi, J Silvius, A Kapus, S Grinstein (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319:210-213.
- [95] R Šachl, I Mikhalyov, N Gretskaya, A Olżyński, M Hof, L Johansson (2011) Distribution of BODIPY-labelled Phosphatidylethanolamines in Lipid Bilayers Exhibiting Different Curvatures. *Phys Chem Chem Phys* 13:11694-11701.
- [96] M Rao, S Mayor (2014) Active organization of membrane constituents in living cells. *Curr Opin Cell Biol* 29:126-132.
- [97] WS Trimble, S Grinstein (2015) Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J Cell Biol* 208:259-271.
- [98] Q Wu, Q Liang (2014) Interplay between Curvature and Lateral Organization of Lipids and Peptides/Proteins in Model Membranes. *Langmuir*. 30:1116–1122.
- [99] IK Jarsch, F Daste, JL Gallop (2016) Membrane curvature in cell biology: An integration of molecular mechanisms. *J Cell Biol* 214:375-387.
- [100] SJ Singer, GL Nicolson (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175:720-731.
- [101] MJ Karnovsky, AM Kleinfeld, RL Hoover, EA Dawidowicz, DE McIntyre, EA Salzman, RD Klausner (1982) Lipid domains in membranes. *Endothelium* 401:61-74.
- [102] K Simons, G Van Meer (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochem* 27:6197-6202.
- [103] K Simons, E Ikonen (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- [104] A Honigmann, V Mueller, H Ta, A Schoenle, E Sezgin, SW Hell, C Eggeling (2014) Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat Commun* 5:5412-5424.
- [105] E Sevcsik, M Brameshuber, M Fölser, J Weghuber, A Honigmann, GJ Schütz (2015) GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. *Nat Commun* 6:6969-6979.
- [106] LJ Pike (2006) Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* 47:1597-1598.
- [107] J Duggan, G Jamal, M Tilley, B Davis, G Mckenzie, K Vere, MG Somekh, P O'Shea, H Harris (2008) Functional imaging of microdomains in cell membranes. *Eur Biophys J*

- 37:1279-1289.
- [108] U Salzer, U Hunger, R Prohaska (2007) Chapter three: Insights in the organization and dynamics of erythrocyte lipid rafts. *Adv Planar Lipid Bilayers Liposomes* 6:49-80.
- [109] K Gowrishankar, S Ghosh, S Saha, C Rumamol, S Mayor, M Rao (2012) Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell* 149:1353-1367.
- [110] GJ Doherty, HT McMahon (2008) Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys* 37:65-95.
- [111] MP Sheetz, JE Sable, H Döbereiner (2006) Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:417-434.
- [112] K Marheineke, S Grünewald, W Christie, H Reilander (1998) Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett* 441:49-52.
- [113] LP Yeh, RK Bajpai, GY Sun (1997) Membrane Lipid Metabolism and Phospholipase Activity in Insect *Spodoptera frugiperda* 9 Ovarian Cells. *Lipids* 32:481-487.
- [114] JA Svoboda (1999) Variability of metabolism and function of sterols in insects. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 34:49-57.
- [115] M Grieneisen (1994) Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem Mol Biol* 24:115-132.
- [116] L Canavoso, ZE Jouni, KJ Karnas, JE Pennington, MA Wells (2001) Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr* 21:23-46.
- [117] ST Behmer, DW Nes (2003) Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Adv In Insect Phys* 31:1-72.
- [118] LF Ciuffo, PA Murray, A Thompson, DJ Rigden, HH Rees (2011) Characterisation of a desmosterol reductase involved in phytosterol dealkylation in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* 6:1-10.
- [119] A De Loof, E Marchal, C Rivera-Perez, FG Noriega, L Schoofs (2015) Farnesol-like endogenous sesquiterpenoids in vertebrates: the probable but overlooked functional “inbrome” anti-aging counterpart of juvenile hormone of insects? *Front Endocrinol* 5:1-10.
- [120] M Cerkowniak, P Stepnowski, M Golebiowski, M Bogus, E Włoka, E Przybysz (2013) Developmental Changes in the Sterol Composition and the Glycerol Content of Cuticular and

- Internal Lipids of Three Species of Flies. *Chem Biodivers* 10:1521-1530.
- [121] N Awata, M Morisaki, N Ikekawa (1975) Carbon-Carbon bond cleavage of Fucosterol-24,28-oxide by cell-free extracts of silkworm *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* 64:157-161.
- [122] MT Arts, MT Brett, M Kainz (2012) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. (Ed: MT Arts, MT Brett, M Kainz) Springer New York, p.1-380.
- [123] HK Yun, ZE Jouni, M Wells (2002) Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1151-1158.
- [124] M Belmonte (2001) Estructura y función de las balsas lipídicas (raft), dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. *Rev Immunol Org* 20:216-224.
- [125] S Barman, DP Nayak (2007) Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J Virol* 81:12169-12178.
- [126] D Nayak, S Barman (2002) Role of lipid rafts in virus assembly and budding. *Adv Virus Res* 58:1-28.
- [127] A Ono, E Freed (2005) Role of lipid rafts in virus replication. *Adv Virus Res* 64:311-358.
- [128] Z Liao, LM Cimasky, R Hampton, DH Nguyen, JE Hildreth (2001) Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1009-1019.
- [129] L Zhu, X Ding, J Tao, J Wang, X Zhao, G Zhu (2010) Critical role of cholesterol in bovine herpesvirus type 1 infection of MDBK cells. *Vet Microbiol* 144:51-57.
- [130] KS Choi, H Aizaki, MMC Lai (2005) Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J Virol* 79:9862-9871.
- [131] A Pratelli, V Colao (2015) Role of the lipid rafts in the life cycle of canine coronavirus. *J Gen Virol* 96:331-337.
- [132] X Ren, J Glende, J Yin, C Schwegmann-Wessels, G Herrler (2008) Importance of cholesterol for infection of cells by transmissible gastroenteritis virus. *Virus Res* 137:220-224.
- [133] J Yin, J Glende, L Schwegmann-Wessels, C. Enjuanes, G Herrler, X Ren (2010) Cholesterol is important for a post-adsorption step in the entry process of transmissible gastroenteritis virus. *Antiviral Res* 88:311-316.
- [134] H Imhoff, V Messling, G Herrler, L Haas, TS van Zanten (2007) Canine Distemper Virus Infection Requires Cholesterol in the Viral Envelope. *J Virol* 81:4158-4165.

- [135] J Cui, X Fu, J Xie, M Gao, M Hong, Y Chen, S Su, S Li (2014) Critical role of cellular cholesterol in bovine rotavirus infection. *J Virol* 11:98-105.
- [136] AC Carro, EB Damonte (2013) Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus Res* 174:78-87.
- [137] SB Kapadia, H Barth, T Baumert, J McKeating, FV Chisari (2007) Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 81:374-483.
- [138] S Belloncik, WE Akoury, M Cheroutre (1997) Importance of cholesterol for nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication in cell cultures adapted to serum-free *medium*. En: *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications*. (Ed: K Maramorosch, J Mitsuhashi) Science Publishers, New Hampshire, p.141–147.
- [139] J Huang, B Hao, C Cheng, F Liang, X Shen, X Cheng (2014) Entry of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus into BmN cells by cholesterol-dependent macropinocytic endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 453:166-171.
- [140] DZ Cleverley, HM Geller, J Lenard (1997) Characterization of cholesterol-free insect cells infectible by baculoviruses: effects of cholesterol on VSV fusion and infectivity and on cytotoxicity induced by influenza M2 protein. *Exp Cell Res* 233:288-296.
- [141] A Luz-Madrigal, A Asanov, AR Camacho-Zarco, A Sampieri, L Vaca (2013) A Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Domain in GP64 Fusion Protein Facilitates Anchoring of Baculovirus to Mammalian Cells. *J Virol* 87:11894-11907.
- [142] ID Campbell, RA Dwek (1984) *Biological Spectroscopy*. (Ed: Benjamin-Cummings Publishing Co., Subs. of Addison Wesley Longman) Menlo Park, California. 422 pp.
- [143] JP Klare (2013) Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research. *Biol Chem* 394:1281–1300.
- [144] YN Molin, KM Salikhov, KI Zamaraev (1980) *Spin Exchange. Principles and Applications in Chemistry and Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XII, 244pp.
- [145] OH Griffith, P Jost (1976) Lipid spin labels in biological membranes. En: *Spin Labeling: Theory and Applications*. (Ed: LJ Berliner) New York, EE.UU. p.454-523.
- [146] J Gallova, D Uhri, N Kuc, SS Funari, TN Murugova (2011) Influence of Cholesterol and α -Sitosterol on the Structure of EYPC Bilayers. *J Membr Biol* 243:1-13.
- [147] WK Subczynski, J Widomska, JB Feix (2009) Physical properties of lipid bilayers from EPR spin labeling and their influence on chemical reactions in a membrane environment. *Free*

- Radic Biol Med* 46:707-718.
- [148] LJ Reed, H Muench (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27:493-497.
- [149] PC Kilsdonk, PG Yancey, GW Stoudt, FW Bangerter, WJ Johnson, MC Phillips, GH Rothblat (1995) Cellular Cholesterol Efflux Mediated by Cyclodextrins. *Biol Chem* 270:17250-17256.
- [150] PG Yancey, WV Rodriguez, EPC Kilsdonk, GW Stoudt, WJ Johnson, MC Phillips, GH Rothblat (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem* 271:16026-16034.
- [151] ZE Jouni, B McGill, M Wells (2002) β -cyclodextrin facilitates cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body and midgut in vitro. *Comp Biochem Physiol Part B* 132:699-709.
- [152] M Hao, S Mukherjee, FR Maxfield (2001) Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13072-13077.
- [153] MJ Vazquez, MG Rivas, AM Gennaro (2002) Modificación del contenido de colesterol en membranas de glóbulos rojos humanos mediante metil- β -ciclodextrina: Evolución temporal y cambios en la forma celular. *Rev FABICIB*. p.121-127.
- [154] MJ Swamy, L Ciani, M Ge, AK Smith, D Holowka, B Baird, JH Freed (2006) Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy. *Biophys J* 90:4452-4465.
- [155] JD Claus, V Gioria, G Micheloud, G Visnovsky (2012) Production of insecticidal baculovirus in insect cell cultures: potential and limitations. En: *Insecticides, Book 2*. Soloneski, Intech Open Access Publisher, p.127-152.
- [156] CL Chan, S Reid (2016) Development of Serum-Free Media for Lepidopteran Insect Cell Lines. *Methods Mol Biol* 1350:161-196.
- [157] CC Burteau, FR Verhoeve, JF Mols, JS Ballez, SN Agathos, YJ Schneider (2003) Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-gamma-producing CHO cell line. *Vitr Cell Dev Biol Anim* 39:291-296.
- [158] G Chabanon, L Alves da Costa, B Farges, C Harscoat, S Chenu, JL Goergen, A Marc, I Marc, I Chevalot (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technol* 99 (15):7143-7151.
- [159] AJ Gupta, H Gruppen, D Maes, JW Boots, PA Wierenga (2013) Factors causing compositional changes in soy protein hydrolysates and effects on cell culture functionality. *J*

- Agric Food Chem* 61:10613-10625.
- [160] AJ Gupta, H Gruppen, D Maes, JW Boots, PA Wierenga (2015) Influence of protein and carbohydrate contents of soy protein hydrolysates on cell density and IgG production in animal cell cultures. *Biotechnol Prog* 31:1396-1405.
- [161] M Spearman, C Lodewyks, M Richmond, M Butler (2014) The bioactivity and fractionation of peptide hydrolysates in cultures of CHO cells. *Biotechnol Prog* 30:584-593.
- [162] V Deparis, C Durrieu, M Schweizer, I Marc, JL Goergen, I Chevalot, A Marc (2003) Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnol* 42:75-85.
- [163] MS Kwon, T Dojima, EY Park (2005) Use of plant-derived protein hydrolysates for enhancing growth of *Bombyx mori* (silkworm) insect cells in suspension culture. *Biotechnol Appl Biochem* 42:1-7.
- [164] D Talley, B Cutak, E Rathbone, TA Kolla, D Allison, J Blasberg, K Kao, M Caple (2005) Synthechol™ synthetic cholesterol for cholesterol dependent cell culture-development of non-animal derived chemically defined NS0 medium. Sigma Technical Bulletin.
- [165] G Vinci, X Xia, R Veitia (2008) Preservation of genes involved in sterol metabolism in cholesterol auxotrophs: facts and hypotheses. *PLoS One* 3 (8): e2883.
- [166] RB Clayton (1964) The utilization of sterols by insects. *J Lipid Res* 5:3-19.
- [167] R Niwa, YS Niwa (2011) The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis. *Cholesterol*. 2011:1-6.
- [168] TJ Hammer, DH Janzen, W Hallwachs, SP Jaffe, N Fierer (2017) Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 114:9641-9646.
- [169] WD Nes (1987) Metabolism and function of sterols in *Phytophthora cactorum*. *J Am Oil Chem Soc* 64:634-634.
- [170] I Levitan, AE Christian, TN Tulenko, GH Rothblat (2000) Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *J Gen Physiol* 115:405-416.
- [171] VG Romanenko, GH Rothblat, I Levitan (2004) Sensitivity of volume-regulated anion current to cholesterol structural analogues. *J Gen Physiol* 123:77-87.
- [172] B Nilius, J Eggermont, T Voets, G Droogmans (1996) Volume-activated Cl-channels. *Gen Pharmacol* 27:1131-1140.
- [173] A Thomas (2012) Fats and Fatty Oilsp. En: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*

- p.547-572.
- [174] I Levitan, Y Fang, A Rosenhouse-Dantsker, V Romanenko (2010) Cholesterol and Ion Channels. *Subcell Biochem* 51:509-549.
- [175] JP Laliberte, LW McGinnes, ME Peeples, TG Morrison (2006) Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol* 80:10652-10662.
- [176] H Matilainen, J Rinne, L Gilbert, V Marjomäki, H Reunanen, C Oker-Blom (2005) Baculovirus entry into human hepatoma cells. *J Virol* 79:15452-15459.
- [177] LE Volkman, PA Goldsmith, RT Hess (1986) Alternate pathway of entry of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: fusion at the plasma membrane. *Virol* 148:288-297.
- [178] C Wu, S Wang (2012) A pH-Sensitive Heparin-Binding Sequence from Baculovirus gp64 Protein Is Important for Binding to Mammalian Cells but Not to Sf9 Insect Cells. *J Virol* 86:484-491.
- [179] KL Hefferon, AGP Oomens, SA Monsma, CM Finnerty, GW Blissard (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virol* 258 (2):455-468.
- [180] KE Makkonen, P Turkki, JP Laakkonen, S Ylä-Herttuala, V Marjomaki, KJ Airene (2013) 6-O- and N-Sulfated Syndecan-1 Promotes Baculovirus Binding and Entry into Mammalian Cells. *J Virol* 87:11148-11159.
- [181] J Kadlec, S Loureiro, NGA Abrescia, DI Stuart, IM Jones (2008) The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol* 15:1024-1030.
- [182] M Nasimuzzaman (2014) Heparan Sulfate in Baculovirus Binding and Entry of Mammalian Cells. *J Virol* 88:4607-4608.
- [183] JP Laakkonen, AR Mäkelä, E Kakkonen, P Turkki, S Ylä-Herttuala, KJ Airene, C Oker-Blom, M Vihinen-Ranta, V Marjomäki (2009) Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of E. coli in non-phagocytic human cells. *PLoS One*. 4:1-11.
- [184] MG Pilloff, MF Bilén, MN Belaich, ME Lozano, PD Ghiringhelli (2003) Molecular cloning and sequence analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus GP64 glycoprotein. *Virus Genes* 26:57-69.
- [185] AS Desplanques, M Pontes, N De Corte, N Verheyen, HJ Nauwynck, D Vercauteren, HW Favoreel (2010) Cholesterol depletion affects infectivity and stability of pseudorabies virus.

- Virus Res* 152:180-183.
- [186] S Bajimaya, T Hayashi, T Frankl, P Bryk, B Ward, T Takimoto (2017) Cholesterol reducing agents inhibit assembly of type I parainfluenza viruses. *Virology* 503:127-135.
- [187] A Hafer, R Whittlesey, DT Brown, R Hernandez (2009) Differential Incorporation of Cholesterol by Sindbis Virus Grown in Mammalian or Insect Cells. *J Virol* 83:9113-9121.
- [188] NF Moore, EJ Patzer, JM Shaw, TE Thompson, R. Wagner (1978) Interaction of vesicular stomatitis virus with lipid vesicles: depletion of cholesterol and effect on virion Membrane Fluidity and Infectivity. *J Virol* 27:320-329.
- [189] Y Hsueh, M Chen, P Patty, C Code, J Cheng, B Frisken, M Zuckermann, J Thewalt (2007) Ergosterol in POPC Membranes: Physical Properties and Comparison with Structurally Similar Sterols. *Biophys J* 92:1606–1615.
- [190] L Mainali, M Raguz, WJ O'Brien, WK Subczynski (2014) Properties of membranes derived from the total lipids extracted from clear and cataractous lenses of 61-70-year-old human donors. *Eur Biophys J* 44:91-102.
- [191] WK Subczynski, A Kusumi (2003) Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys Acta Biomembr* 1610:231-243.
- [192] WK Subczynski, J Widomska, JB Feix (2010) Physical properties of lipid bilayers from EPR spin labeling and their influence on chemical reactions in a membrane environment. *Free Radic Biol Med* 46:707-718.
- [193] J Urbina, S Pekerar, H Le, J Patterson, B Montez, E Oldfield (1995) Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ²H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1238:163-176.
- [194] A Grammenos, A Mouithys-Mickalad, PH Guelluy, M Lismont, G Piel, M Hoebeke (2010) ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 398:350-354.
- [195] M Miki, H Tamai, M Mino, Y Yamamoto, E Niki (1987) Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Arch Biochem Biophys* 258:373-380.
- [196] PV Subbaiah, D Sircar, RS Lankalapalli, R Bittman (2009) Effect of double bond geometry in sphingosine base on the antioxidant function of sphingomyelin. *Arch Biochem Biophys* 481:72-79.

- [197] A Kawaguchi, M Hirohama, Y Harada, S Osari, K Nagata (2015) Influenza Virus Induces Cholesterol-Enriched Endocytic Recycling Compartments for Budozone Formation via Cell Cycle-Independent Centrosome Maturation. *PLoS Pathog* 11:1-19.
- [198] S Harada, K Yusa, K Monde, T Akaike, Y Maeda (2005) Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem Biophys Res Commun* 329:480-486.