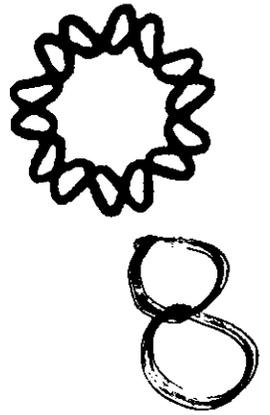


0055/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



**"EFECTO DE VARIABLES DE CULTIVO SOBRE LA
PRODUCCION DE LAS PROTEINAS
RECOMBINANTES VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS
EN EL SISTEMA CELULAS DE
INSECTO-BACULOVIRUS"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

ING. MIRANDA GONZALEZ AGUIRRE

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fué realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 124423.

A mis padres,

María Elba y Rafael,

Gracias por brindarme su apoyo y amor en todo momento y por guiarme para llegar hasta donde estoy.

A mis tíos,

Rosa Luz y Rodolfo

Gracias por orientarme en este campo, en verdad aprecio mucho sus consejos y todos los momentos que dedicaron para orientarme, corregir mi trabajo e insentivar mi camino.

A Carlos,

Te agradezco la enorme paciencia, amor y las aportaciones tan valiosas que me brindaste durante este trabajo, en especial te doy gracias por no haberme dejado caer en todo este tiempo.

A mis abuelas,

María Jesús y Teodora,

Gracias por estar al pendiente de mí.

A todos los González Aguirre,

A mis amigos,

Bety, Lety, Gabriel, Gerardo, Eduardo, José Juan, Joel, Jacobo, Salvador, José Luis, Francisco y todos los demás.

Agradecimientos

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich ya que gracias a su dirección, gran paciencia y apoyo hicieron posible que este trabajo fuera concluído.

A la Dra. Laura A. Palomares Aguilera por sus valiosas aportaciones, por haber compartido conmigo su conocimiento y por haberme enseñado a trabajar en este laboratorio.

A la Dra. Vera L. Petricevich por todo el apoyo y la comprensión brindados durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Sandino Estrada quien me brindó gran apoyo en la preparación de mi exámen de grado.

Al Dr. Agustín López-Munguía y a la Dra. Susana López por sus valiosas aportaciones durante los tutoriales.

Al Dr. Ernesto Mendez por su paciencia y por su guía tan valiosa para desarrollar parte de este trabajo.

A mis compañeros del grupo OTR/EG: Laura, Vera, Angélica, Antonio de León, Francisco, Edith, Toño S., Alexandra, Angélica O., Edgar, Rolando, Alfonso, Sandino, José Luis, Karin, Celia, Marisol, Mainul, Karina, José Antonio, Patyla, Rocío, Nancy, Gabriel, Mauricio, Carlos, María Elena, Tere, Savidra, Laura I., César, Blanca, Sanje.

A Nancy Osorio, gracias por estar siempre al pendiente de que mi trabajo fuera más ágil.

A la unidad de cómputo, en especial a Juan Manuel, Alma y Abel, gracias por solucionarme todos mis problemas computacionales.

A los miembros del jurado,

Dr. Celso Ramos, Dr. Leobardo Serrano, Dr. Ernesto Méndez, Dra. Brenda Valderrama, Dr. O. Tonatiuh Ramírez R. Les agradezco las valiosas aportaciones realizadas durante las correcciones de la tesis.

Indice	I
Indice de Figuras	IV
Indice de Tablas	VII
Nomenclatura	VIII
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 El sistema células de insecto-baculovirus	5
2.2 Los baculovirus	7
2.2.1 Ciclo de infección del baculovirus	8
2.3 Parámetros que afectan la producción de proteínas recombinantes en distintos sistemas de expresión	11
2.3.1 Multiplicidad de infección	11
2.3.1.1 Partículas defectivas	12
2.3.2 pH	12
2.3.3 Temperatura	14
2.3.4 Amonio	16
2.3.5 Osmolaridad	18
2.3.6 Otros parámetros importantes en la expresión de proteínas recombinantes	20
2.4 El Rotavirus	22
2.4.1 Proteína estructural de rotavirus VP7	23
2.4.2 Proteína estructural de rotavirus VP4	24
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. Materiales y Métodos	26
4.1 Material Biológico	26
4.1.1 Línea celular	26
4.1.2 Baculovirus recombinante	27
4.2 Métodos analíticos	27

4.2.1 Determinación del título viral	27
4.2.2 Determinación de la concentración celular, viabilidad y tamaño celular	29
4.2.3 Generación de un estándar para usarlo como control en geles	29
4.2.3.1 Cultivo de células MA104	29
4.2.3.2 Infección de las células MA104 con rotavirus SA11	30
4.2.3.3 Purificación del rotavirus	30
4.2.3.4 Estandarización del método de cuantificación	31
4.3 Estrategia experimental	32
4.3.1 Procedimiento para la producción de VP7	32
4.3.1.1 Infección de células Sf9	32
4.3.1.2 Preparación de geles para la identificación de proteínas recombinantes	33
4.3.1.3 Western Blot	33
4.3.1.4 Efecto de la MDI sobre la producción de VP7 recombinante	35
4.3.2 Efecto de variables de cultivo sobre la producción de VP4 recombinante	36
4.3.2.1 Efecto del pH	36
4.3.2.2 Efecto de la temperatura	37
4.3.2.3 Efecto del amonio	38
4.3.2.4 Efecto de la osmolaridad	38
4.4 Medio de cultivo	38
4.5 Tipo de cultivo	39
4.6 Determinación de parámetros cinéticos	40
5. Resultados	42
5.1 Generación del estándar de rotavirus nativo para usarlo como control en geles	42
5.2 Efecto de la MDI sobre la producción de VP7	43
5.2.1 Multiplicidad de infección	43
5.2.1.1 Multiplicidad de infección de 0.1	43
5.2.1.2 Multiplicidad de infección de 1	46
5.2.1.3 Multiplicidad de infección de 5	49
5.2.1.4 Multiplicidad de infección de 10	52

5.3 Efecto del pH inicial sobre el crecimiento y el tamaño de las células Sf9	58
5.3.1 Cultivos estáticos	58
5.3.2 Cultivos agitados	62
5.4 Efecto del pH inicial en el título viral y en la producción de VP4	67
5.5 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento, la producción de VP4 y sobre el título viral	72
5.6 Efecto del amonio sobre el crecimiento celular	78
5.7 Efecto del amonio sobre la producción de VP4 y sobre el título viral	82
5.8 Efecto de la osmolaridad sobre el crecimiento celular	88
5.9 Efecto de la osmolaridad sobre la producción de VP4 y sobre el título viral	92
6. Discusión	97
6.1 MDI	97
6.2 pH	98
6.3 Temperatura	99
6.4 Amonio	100
6.5 Osmolaridad	101
7. Conclusiones	103
7.1 Conclusiones Particulares	103
7.2 Conclusión General	104
7.3 Direcciones futuras	104
Bibliografía	106
Apéndice	121
A1. Tabla de resumen de los resultados de este trabajo	121

Indice de Figuras	IV
Figura 2.1 Micrografía de baculovirus recombinantes	7
Figura 2.2 Ciclo de infección de baculovirus silvestre	10
Figura 2.3 Representación de rotavirus mostrando las proteínas estructurales	23
Figura 4.1 Larva y mariposa de <i>Spodoptera frugiperda</i>	26
Figura 4.2 Determinación de título viral en placas de 24 pozos	28
Figura 4.3 Esquema del gradiente obtenido en la purificación del rotavirus	31
Figura 4.4 Cultivos estáticos en frascos de 25 cm ²	39
Figura 4.5 Cultivos en frascos ("spinners") y en matraces agitados ("shakers")	40
Figura 5.1 Inmunodetección del rotavirus purificado	42
Figura 5.2 Cultivo infectado a MDI = 0.1 UFP/cel	45
Figura 5.3 Cultivo infectado a MDI = 1 UFP/cel	48
Figura 5.4 Cultivo infectado a MDI = 5 UFP/cel	51
Figura 5.5 Cultivo infectado a MDI = 10 UFP/cel	53
Figura 5.6 Efecto de variaciones en la MDI sobre la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)), la máxima concentración celular viable (X_v máx/ X_{vo}), la concentración de VP7 máxima y el título viral máximo en cultivos infectados	55
Figura 5.7 Velocidad específica máxima de producción de VP7 durante la fase de crecimiento, velocidad específica máxima de producción de VP7 durante la fase de muerte y rendimiento específico máximo para VP7 en cultivos infectados a distintas MDI's	57
Figura 5.8 Efecto del pH en cultivos sin infectar en frascos de 75 cm ²	59
Figura 5.9 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en frascos de cultivo de 75 cm ²	61
Figura 5.10 Efecto del pH en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml	63
Figura 5.11 Efecto del pH en cultivos sin infectar sobre el incremento máximo de la concentración celular (matraces de 125 ml y 250 ml)	65
Figura 5.12 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces agitados de 125 ml	66

Figura 5.13 Efecto del pH en cultivos infectados en frascos agitados de 250 ml	68
Figura 5.14 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces agitados de 250 ml	70
Figura 5.15 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento y rendimiento específico máximo para VP4 en cultivos infectados a distintos pH's	71
Figura 5.16 Efecto de la temperatura en cultivos sin infectar	73
Figura 5.17 Efecto de la temperatura en cultivos infectados	75
Figura 5.18 Efecto de la temperatura sobre la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar e infectados en spinners de 50 ml	77
Figura 5.19 Efecto de la adición de NH_4Cl en cultivos sin infectar	79
Figura 5.20 Efecto de la adición de NH_4Cl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml	81
Figura 5.21 Efecto de la adición de NH_4Cl en cultivos infectados en matraces de 250 ml	83
Figura 5.22 Efecto de la adición de NH_4Cl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces de 250 ml	85
Figura 5.23 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento, velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte y rendimiento específico máximo para VP4 en cultivos infectados adicionados con NH_4Cl	86
Figura 5.24 Efecto de la adición de NaCl en cultivos sin infectar	90
Figura 5.25 Efecto de la adición de NaCl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml	91
Figura 5.26 Efecto de la adición de NaCl en cultivos infectados en matraces de 250 ml	93

Figura 5.27 Efecto de la adición de NaCl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces de 250 ml	95
Figura 5.28 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento, velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte y rendimiento específico máximo para VP4 en cultivos infectados adicionados con NaCl	96

Índice de Tablas

VII

Tabla 2.1 Ejemplos de producción de proteínas recombinantes por el sistema células de insecto-baculovirus	6
Tabla 4.1 Composición de los geles de poliacrilamida para electroforesis	34
Tabla 4.2 Composición de los buffers para transferencia	35

		UNIDADES
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus	
AG	Aparato de Golgi	
Bac-VP4	Baculovirus que contiene el cDNA que codifica para VP4	
Bac-VP7	Baculovirus que contiene el cDNA que codifica para VP7	
BHK	Células de riñón de Hamsters bebés	
CsCl	Cloruro de Cesio	
CHO	Células de ovario de Hamster Chino	
EPO	Eritropoyetina	
GDH	Glutamato deshidrogenasa catabólica	
hpi	Horas post-infección	(h)
kpb	Kilo pares de bases	
MDI	Multiplicidad de infección	(UFP/cel)
MEM	Minimum essential medium	
mOsm	Mili osmoles	(mOsm)
NaCl	Cloruro de sodio	
NC	Membrana de nitrocelulosa	
NH ₃	Amoniacó	
NH ₄ ⁺	Amonio	
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio	
OD	Oxígeno disuelto	(mg O ₂ /L)
pCO ₂	Presión parcial de CO ₂	(atm)
p/v	Relación peso por volumen	(mg/mL)
P _{máx}	concentración máxima de proteína	(µg/ml)
PF68	Pluronic F-68	
PPVs	Pseudopartículas virales	
q prot	Velocidad de producción de proteína	(µgprot/cel h)
rpm	Revoluciones por minuto	(min ⁻¹)
RE	Retículo endoplásmico	
RER	Retículo endoplásmico rugoso	

RNA _m	RNA mensajero	
RNA pol II	RNA polimerasa II	
SDS-Page	Electroforesis en geles de acrilamida con SDS	
SEAP	Fosfatasa alcalina de humano secretada	
SFB	Suero fetal bovino	
t	Tiempo	(h)
t _i	Tiempo inicial	(h)
t _f	Tiempo final	(h)
TDI	Tiempo de infección	(cel/ml)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)
μ _{ap}	Velocidad aparente de crecimiento	(h ⁻¹)
UFP	Unidades formadoras de placa	
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana	
VL	Virus libres	
VNO	Virus no ocluidos	
VO	Virus ocluidos	
X _t	Concentración celular total	(cel/ml)
X _v	Concentración celular viable	(cel/ml)
X _{vi}	Concentración celular viable inicial	(cel/ml)
X _{vf}	Concentración celular viable final	(cel/ml)
Y _{prot}	Rendimiento específico máximo de proteína	(μg prot / cel)

Resumen

En años recientes el sistema células de insecto-baculovirus ha tenido un gran auge debido a su alta capacidad de producción de proteínas recombinantes. A pesar de esto, ciertas condiciones de cultivo para la producción de proteínas recombinantes no han sido estudiadas a fondo. De este hecho surgió el interés por estudiar parámetros de cultivo en la producción de dos proteínas recombinantes modelo que conforman parte de la estructura de los rotavirus: VP4 y VP7. Los parámetros de cultivo estudiados fueron la multiplicidad de infección (MDI) (para la producción de VP7), el pH, la temperatura y la adición de cloruro de amonio y de sodio al medio de cultivo para la producción de VP4. En este estudio se determinó el efecto de estas variables sobre el crecimiento celular y sobre la producción de proteína y virus recombinantes. En particular se eligieron como modelo proteínas de rotavirus debido a que en un futuro se pretende generar una posible vacuna contra este virus que es uno de los causantes de enfermedades diarreicas de mayor importancia en el mundo.

Se determinó que la mejor MDI para la producción de la proteína recombinante VP7 fue de 5 ya que a esta multiplicidad se eleva la producción en un orden de magnitud; mientras que la producción de baculovirus se incrementa a MDI de 1.

Se mejoró la producción de la proteína VP4 recombinante y la producción de baculovirus recombinante efectuando la infección de las células a un pH por debajo (de 5.8 a 6.2) del pH control de 6.2 (pH del medio de cultivo comercial). Esta variación de pH no presenta efectos significativos sobre el crecimiento celular.

Se observó que la producción de VP4 recombinante cesa completamente al emplear temperaturas por arriba de 27°C. El título viral se mantiene constante a pesar de las variaciones en la temperatura (sólo se modifica el tiempo al cual se obtiene su máximo valor).

Se demostró que la adición de NH_4Cl a los cultivos, en un intervalo de 5-25 mM, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular de cultivos sin infectar; además, la presencia de estas concentraciones de amonio en el cultivo conlleva al decremento significativo de la producción de proteína VP4 y de baculovirus recombinantes.

La adición de NaCl al cultivo de células de insecto, en un intervalo de 5-25 mM, no afectó al crecimiento celular pero si benefició la producción de proteína VP4 (15 mM NaCl) y de baculovirus recombinantes (25 mM NaCl).

Las modificaciones a las condiciones de cultivo realizadas en este trabajo permitieron, bajo ciertas condiciones, mejorar tanto la producción de las proteínas de rotavirus VP7 y VP4, como la producción de baculovirus recombinante. Este estudio es de gran interés si se considera que diferencias en el rendimiento de productos recombinantes producidos por el sistema células de insecto-baculovirus se han atribuido a variables en diferentes niveles, tales como: molecular y genético, de clonación, del cultivo o bien de la infección. De ahí que la información generada en este trabajo sea de utilidad para mejorar el rendimiento de proteínas recombinantes en este sistema de expresión. Por otro lado, una ventaja adicional de la optimización es que podría aplicarse para la obtención de pseudopartículas virales de rotavirus (PPVs), las cuales podrían ser una alternativa para ser empleadas como vacunas contra la infección por este virus.

1. Introducción

En años recientes uno de los sistemas de eucariotes superiores más empleados para la producción de proteínas recombinantes ha sido el sistema células de insecto-baculovirus (Caron et al. , 1990; Schopf et al., 1990). Este sistema presenta una serie de ventajas con respecto a otros sistemas de expresión, entre las que destacan los altos rendimientos del producto recombinante (Zhang et al., 1994), la capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales similares a las de sistemas de expresión de células de mamífero (Davis y Wood, 1995; Davidson et al., 1990; Davidson y Castellino, 1991, Jarvis y Summers, 1989; Ogonah et al., 1996), la facilidad de construcción del virus recombinante y su seguridad ya que es inocuo para el ser humano y para el medio ambiente, entre otras. No obstante, es necesario realizar estudios para optimizar los parámetros para la producción de proteínas recombinantes en este sistema, particularmente aquellos relacionados con la productividad (Gooche y Monica, 1990).

En este trabajo se analizó el efecto de la variación en algunos parámetros, tales como la MDI, el pH, la temperatura y la adición de cloruro de amonio y de sodio al medio de cultivo sobre el crecimiento celular y la producción de proteína y virus recombinantes. Como modelo de expresión se emplearon dos proteínas estructurales de rotavirus, VP7 y VP4. Los cDNAs para estas proteínas (Bac-VP7 y Bac-VP4) habían sido previamente clonados en el baculovirus *Autographa californica multiple polyhedrosis virus* (AcMNPV) (Crawford et al., 1994). Con Bac-VP4 se llevó a cabo la infección de células de insecto Sf9 y se analizó el efecto de cada parámetro sobre el crecimiento celular y la producción de proteína y virus recombinantes, mientras que Bac-VP7 se empleó para evaluar el efecto de variaciones en la cantidad de virus adicionada (MDI) sobre la producción de la proteína y del virus recombinante.

La MDI, o número de partículas virales por célula, es un parámetro muy importante para la expresión de proteínas recombinantes ya que variaciones en la MDI están relacionadas con cambios en la expresión de las proteínas (Caron et al., 1990). En cultivos de células de insecto, se ha visto que variaciones en el pH provocan tiempos de adaptación más largos, velocidades de crecimiento menores, así como concentraciones celulares reducidas (Zhang et al., 1994).

Se ha encontrado que la temperatura afecta directamente el crecimiento celular, la viabilidad, el metabolismo, la síntesis de proteínas (Furakawa y Ohsuye, 1999), el tiempo de expresión y el porcentaje de proteína secretada en algunas líneas celulares tanto de mamíferos como de insectos (Reuveny et al., 1993). El amonio limita la concentración celular y por ende la concentración y productividad de la proteína recombinante de interés (Ramírez, 1996). Al parecer el efecto del amonio en cultivos de células animales es de tipo tóxico y no de tipo osmótico (esta toxicidad se debe a que el NH_4^+ es transportado hacia la célula en lugar del ion K^+ , lo que da lugar a la reducción de los niveles de K^+ en la célula) (Martinelle y Haggstrom, 1993). Se ha demostrado que altas concentraciones de compuestos osmóticamente activos, tales como sales y azúcares, provocan estrés osmótico sobre las células (Lee y Lee, 2000), causando disminución de la viabilidad celular, modificaciones metabólicas (incremento en el consumo de aminoácidos) (Ozturk y Palsson, 1991; Takagi et al., 2000; Zhang et al., 1994) y modificaciones en la velocidad de crecimiento (Takagi et al., 2000).

2. Antecedentes

2.1. El sistema células de insecto-baculovirus

El cultivo de células de insecto fue empleado por primera vez en conjunto con el baculovirus para la producción a gran escala de insecticidas virales (algunos baculovirus, entre ellos *Autographa californica* han sido empelados como pesticidas), los cuales presentaban una alternativa interesante para el tratamiento de plagas, evitando así el uso de agentes químicos (Miller et al., 1983). Posteriormente, con el desarrollo del baculovirus como vector de expresión, el cultivo de células de insecto evolucionó como uno de los sistemas más importantes para la producción de proteínas recombinantes. En la actualidad, una de las aplicaciones más interesantes de este sistema es la generación de posibles vacunas contra algunos virus, entre los que destaca el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), una de las cuales se encuentra actualmente en pruebas clínicas (Gossen y Daugulis, 1993).

Entre las ventajas presentadas por este sistema se encuentran aquellas relacionadas con los baculovirus recombinantes: a) son sencillos de construir, b) permiten la inserción de varios genes - lo cuál hace que el sistema sea altamente versátil -, c) no son patógenos para vertebrados ni para plantas, d) no requieren de células transformadas como en cultivos de células de mamífero (Licari y Bailey, 1991). Las ventajas referentes a las células de insecto o al sistema de expresión en general son: a) permite alcanzar niveles elevados de expresión de proteínas recombinantes funcionales similares a los alcanzados en otros sistemas de expresión (**Tabla 2.1**)(Bathia et al.,1997), b) se llevan a cabo modificaciones postraduccionales - tales como la glicosilación, la formación de puentes disulfuro y la fosforilación-, c) el transporte de proteínas, d) la secreción y localización de proteínas, e) el reconocimiento de intrones, procesamiento alternativo (splicing) y f) el ensamblaje de proteínas multiméricas tal como sucede en otros sistemas de expresión que emplean células de eucariotes (Davis y Wood, 1995; Ogonah et al., 1996). Las modificaciones post-traduccionales son importantes en la producción de la proteína recombinante, ya que de esto dependerán la inmunogenicidad, la

solubilidad, la vida media de circulación, la actividad biológica y la resistencia a proteasas, entre otras actividades *in vivo* del producto final (Palomares y Ramírez, 1997).

Tabla 2.1. Ejemplos de producción de proteínas recombinantes por el sistema células de insecto-baculovirus

Gene	P.M (kD)	Modificaciones	Concentración (mg/L)
Interferón humano	17/21	A,B,C	1-5
Cloranfenicol acetil transferasa	27	_____	100
β -galactosidasa	110	_____	600
Rotavirus de simio	41	_____	50
Interleucina humana	15.5	B,C	10-20

A: Glicosilación, B: Señal de corte de péptido, C: Secretado, (Goosen y Daugulis, 1993)

Algunas desventajas de este sistema son que las proteínas recombinantes se expresan al final del ciclo de infección, en momentos en los que la célula se encuentra cercana al proceso de degradación. Esto puede dar lugar a la expresión de proteasas celulares que provocan la degradación del producto recombinante (Licari y Bailey, 1991). En algunas ocasiones, los productos recombinantes presentan procesamiento incompleto debido a que las células de insecto carecen de algunas enzimas requeridas para dichos procesos (Bishop, 1990; Zu Putlitz et al., 1990). Además, el virus pierde su capacidad infectiva después de un número elevado de pases, lo cual conlleva la formación de partículas virales defectivas (Tramper et al., 1990; Van Lier et al., 1990). Sin embargo, a pesar de que el sistema presenta algunas desventajas, sigue siendo una alternativa prometedora para la expresión de altos niveles de proteínas

recombinantes. Inclusive ya se han realizado esfuerzos hacia el escalamiento del sistema con la finalidad de lograr la expresión de proteínas recombinantes a gran escala (Caron et al., 1990).

2.2. Los baculovirus

Los baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae*. Estos virus poseen un genoma circular de DNA empaquetado en una cápside envuelta por una membrana (Fields et al., 1995). Esta familia de virus comprende dos géneros: los virus granulocíticos y los virus nucleares de polihedra. Ambos géneros de virus se caracterizan por estar protegidos por una matriz; en el caso de los virus granulocíticos la matriz está formada por una proteína llamada granulina mientras que en el caso de los virus nucleares de polihedra la matriz está formada por una proteína llamada polihedrina.

El baculovirus que se emplea con mayor frecuencia como vector de expresión es el virus AcMNPV. Este virus recombinante generalmente se encuentra en un cuerpo de inclusión que es compuesto principalmente por polihedrina (Licari y Bailey, 1992) y consiste de una cadena circular superenrollada de DNA de dos hebras con 128 kbp (**Figura 2.1**). El promotor de este gene (de la polihedrina) es empleado para dirigir la expresión del cDNA de la proteína recombinante deseada.



Figura 2.1. Micrografía de baculovirus recombinantes. Las nucleocápsides miden 30 nm de diámetro y 250 nm de longitud (Fields et al., 1995)

El promotor de la polihedrina es muy tardío, por lo que los máximos de producción de las proteínas recombinantes se obtienen en la etapa muy tardía después de la infección. Al colocar el gen heterólogo en lugar de polh (que codifica para la polihedrina) se replica el virus recombinante de manera normal como virus libres en el cultivo y pueden ser distinguidos visualmente del silvestre por su fenotipo de oclusión negativa (occ-). La gran ventaja de usar el promotor de la polihedrina es que es un promotor fuerte capaz de inducir la hipertranscripción del gen heterólogo, permitiendo la acumulación del producto en cantidades elevadas durante la infección (permite que el virus se replique durante todo el proceso de infección) (Jarvis et al., 1990). Si existe la necesidad de acortar el tiempo de expresión se pueden emplear promotores tempranos, esto también favorece a las modificaciones postraduccionales y a la secreción de las proteínas, aunque la proteína recombinante se obtiene en concentraciones más reducidas que al emplear promotores muy tardíos (O'Reilly et al., 1994). Es por ello que se recomienda el uso de promotores tempranos en casos en los que la proteína sea estable y no se sacrifican los rendimientos finales de proteína recombinante y de esa manera se puede llegar a obtener el producto recombinante con mayor rapidez (Jarvis y Summers, 1989).

2.2.1 Ciclo de infección del baculovirus

La infección de los baculovirus ha sido clasificada en etapas que pueden ser resumidas en: 1) etapa precoz (de adsorción, penetración y liberación del recubrimiento), 2) etapa temprana, 3) etapa tardía y 4) etapa muy tardía (**Figura 2.2**).

Durante la etapa precoz, los virus no ocluidos (VNO) entran a las células mediante endocitosis mediada por receptores (Charlton y Volkman, 1993; Volkman et al., 1985). Esta entrada requiere de la glicoproteína gp64 la cual es responsable de la interacción con los receptores y de la fusión con la membrana del endosoma (Jarvis y García, 1994; Markovic et al., 1998). Las nucleocápsides liberadas en el citoplasma migran al núcleo, pasan por los poros nucleares y entran al nucleoplasma en donde pierden su recubrimiento (Jarvis y García, 1994). El RNA viral puede ser detectado después de 30 minutos de la inoculación del virus, lo cual es indicativo de la llegada del DNA viral al núcleo y del inicio de la transcripción (Fields et al., 1995).

En la fase temprana las células se replican y se da la expresión del DNA viral. Durante las primeras 6 horas de infección, algunos genes del baculovirus AcMNPV son transcritos por la RNA Polimerasa II (RNA Pol II) y como resultado se producen proteínas (helicadas, polimerasas, etc.) requeridas para la replicación del DNA viral y para la regulación transcripcional de algunos genes tempranos. Además, se observan cambios en la estructura del citoesqueleto y de la cromatina de las células infectadas ya que las células se vuelven más redondeadas y los núcleos se modifican (Fields et al., 1995).

Entre las 6 y las 18 horas se pasa a la fase tardía. En esta fase se llevan a cabo la replicación del DNA viral (Lynn et al., 1980), la expresión de genes tardíos y la producción de virus libres (VL) o VNO. Esta etapa requiere de la síntesis de proteínas necesarias para la formación de los virus libres. La transcripción de genes tardíos al parecer está acoplada a la replicación del DNA. Después de la transcripción y replicación del DNA viral, este es empacado en nucleocápsides en asociación con el estroma virogénico (estructura con densidad electrónica distinta localizada en el núcleo). Durante esta fase las nucleocápsides dejan el núcleo y viajan hacia la membrana plasmática donde son liberadas para producir VNO (Jarvis y García, 1994).

La fase muy tardía abarca de las 18 a las 24 horas post-infección aunque llega a extenderse hasta las 76 horas o hasta la lisis celular. A lo largo de esta fase las nucleocápsides son empaquetadas en el núcleo y por tanto se producen los virus ocluidos (VO). Las nucleocápsides salen del núcleo a través de los poros nucleares. Antes de que ocurra la lisis estos VO se acumulan en el núcleo de la célula infectada. La maduración de los VO requiere de una cubierta llamada calyx que está principalmente conformada por carbohidratos y proteínas. Esta fase de oclusión se caracteriza por mostrar alta transcripción del gene polh. Al reemplazar éste por un gene de interés es posible obtener niveles elevados de expresión los cuales se detectan después de la producción de los virus libres (Fields et al., 1995).

El tiempo de lisis depende de la salud de las células, de la edad del medio de cultivo y de los niveles de oxígeno presentes en el cultivo. Si no se efectúa recambio de medio de cultivo o si no se provee oxígeno, la lisis puede presentarse desde las 60 horas post-infección, y para las

72 horas post-infección la mayoría de las células ya no estarán sintetizando proteínas, y generalmente estarán en un proceso de muerte o de lisis celular (O'Reilly et al., 1994).

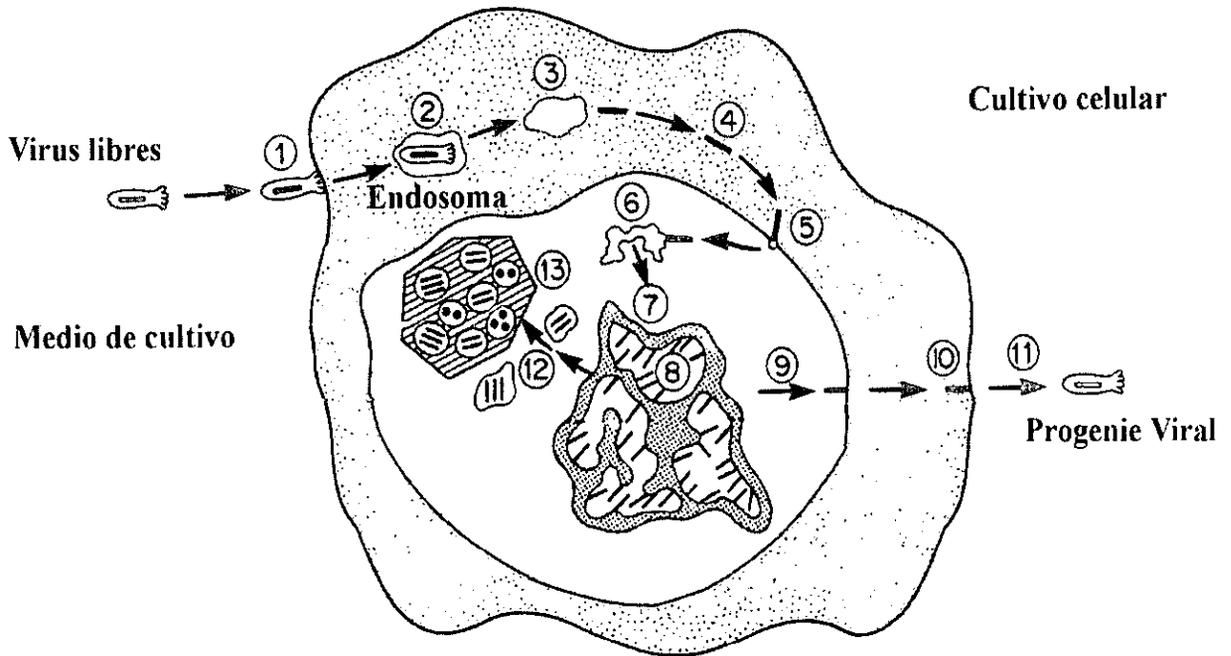


Figura 2.2. Ciclo de infección del baculovirus silvestre. Un virus libre se une a los receptores de la célula (1) y entra por endocitosis mediada por receptores (2). Con la acidificación del endosoma se unen el virus y el recubrimiento del endosoma (3), y las nucleocápsides son liberadas al citoplasma. Las nucleocápsides se dirigen hacia el núcleo (4) donde interaccionan con los poros nucleares (5). Al entrar al núcleo se libera el recubrimiento (6) y el DNA es transcrito (7), replicado y empaquetado en nucleocápsides (8) en asociación con el estroma virogénico. Durante la etapa tardía, las nucleocápsides dejan el núcleo (9) y viajan hacia la membrana plasmática donde posteriormente son liberadas (10) y producen virus libres (11). Durante la fase muy tardía las nucleocápsides son recubiertas en el núcleo (12). Posteriormente los viriones intracelulares son embebidos en la matriz de polihedrina para formar cuerpos ocluidos (13) (Fields et al., 1995).

2.3. Parámetros que afectan la producción de proteínas recombinantes en distintos sistemas de expresión

A pesar de que el sistema células de insecto-baculovirus ha sido empleado recientemente para la producción de proteínas recombinantes, la producción de estas está aún lejos de ser óptima por lo que el efecto de algunas variables como la MDI, la temperatura, el pH, la ósmolaridad del medio de cultivo y desechos tóxicos del metabolismo celular tales como el amonio debe ser analizado sobre el crecimiento celular y la producción de proteína y virus recombinantes.

2.3.1. Multiplicidad de infección

La MDI, o número de partículas virales por célula, es un parámetro muy importante para la expresión de proteínas recombinantes ya que variaciones en la MDI están estrechamente relacionadas con cambios en la expresión de las proteínas. Existe un gran número de respuestas como resultado de variaciones en la MDI, las cuales dependen tanto de la línea celular empleada como de la proteína a expresar (Caron et al., 1990).

Los resultados publicados en la literatura hasta ahora se pueden agrupar en tres clases: aquellos en los que pequeñas variaciones de la MDI causan cambios drásticos en la producción de proteína y virus recombinantes (Smith et al., 1990; Wickham et al., 1991), otros en los que se requiere de grandes cambios en la MDI para observar diferencias en la producción de proteína, o bien en los que no se genera un cambio en la producción independientemente de la MDI empleada (Caron et al., 1990; Wong et al., 1996; Schopf et al., 1990). Al emplear MDI bajas se prolonga el tiempo de expresión del producto recombinante, se incrementa la probabilidad de que la proteína sea degradada por proteasas, se dificultan los procesos de purificación del producto recombinante (sobre todo si este es extracelular), no se generan partículas defectivas (sección 2.3.1.1) en el cultivo y no es necesario generar stocks virales grandes (Radford et al., 1997).

Por otro lado se ha encontrado que el efecto de la MDI sobre la producción de proteínas recombinantes está directamente relacionado con la concentración inicial del cultivo a infectar (Caron et al., 1990; Vallaza y Petri, 1999; Wong et al., 1996), con la fase de crecimiento en la que se encuentran las células al momento de la infección (Kioukia et al., 1995; Licari y Bailey,

1991; 1992), con la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células al ser infectadas (Al-Rubeai et al., 1991; Kioukia et al., 1995) y con la disponibilidad de sustrato (Wong et al., 1996) o de oxígeno (Kioukia et al., 1995).

2.3.1.1. Partículas defectivas

Las partículas defectivas son partículas virales que contienen solamente parte del genoma viral e interfieren específicamente con la replicación de otros virus similares. Estas partículas no son capaces de replicarse por lo que requieren de la presencia de un virus normal (helper). Las partículas defectivas son producidas como consecuencia de un número elevado de pases del virus y por incrementos en la MDI (Wickman et al., 1991). La aparición de estas partículas en un cultivo infectado da como resultado la generación de virus no infectivos por lo cual se reducen los rendimientos tanto de proteína recombinante como de progenie viral durante la infección; de ahí que se busque erradicar la aparición de las mismas. Para evitar la formación de estas partículas se utilizan MDI bajas, ya que a estas multiplicidades la probabilidad de que una partícula defectiva entre a la célula es casi nula.

2.3.2. pH

A pesar de que se han realizado estudios encaminados a determinar el efecto del pH sobre el crecimiento y la producción de proteínas recombinantes en células animales (hibridomas, BHK, CHO, etc.), no se ha podido hacer ninguna generalización de los resultados debido a que, al igual que en el caso de la MDI, el efecto del pH depende tanto de la línea celular utilizada como de la proteína a expresar (Koval y Suppes, 1990). Aunque existen resultados del efecto de modificaciones en el pH sobre líneas celulares de mamíferos, la información referente al efecto del pH sobre cultivos de células de insecto es escasa.

En cultivos de hibridomas se ha observado que el pH afecta la viabilidad, la actividad metabólica (McQueen y Bailey, 1991), y valores de pH superiores a 7.5 provocan agregación de anticuerpo (Rognoni et al., 1999); mientras que pH's inferiores a 6.6 provocan tanto disminución de la velocidad específica de crecimiento (McQueen y Bailey, 1990) como aumento de amonio en el cultivo (Doyle y Buttler, 1990); aunque en otros casos estas modificaciones no tienen ningún efecto en el cultivo de hibridomas (Miller et al., 1988).

Por otra parte, se ha mostrado que disminuciones en el pH en cultivos de hibridomas provocan una acidificación del citoplasma y decrementos en el rendimiento celular con respecto a glucosa (McQueen y Bailey, 1990). Además, los cambios en el pH se han correlacionado con cambios en el pH intracelular (McQueen y Bailey, 1991). Incrementos en el pH provocados por la adición de bases débiles tienen un efecto negativo sobre la producción de oligosacáridos que conforman algunas glicoproteínas y sobre fusiones membranales para el transporte mediado por vesículas (Gooche y Monica, 1990). En algunos casos, cambios de pH (6.8-7.8) provocados por la adición de NH_4Cl , pueden llegar a provocar decrementos hasta del 50% en la velocidad de crecimiento de los cultivos (Doyle y Butler, 1990).

A pesar de que existen datos acerca de los intervalos de pH en los que se favorece el crecimiento de distintos tipos de células de insecto (para lepidópteros 6.0-6.5, para dípteros 6.5-7.2 y para saltamontes 7.0), no se tiene bien claro el efecto de variaciones de este parámetro sobre el crecimiento de las células infectadas, sobre la producción de proteína y sobre la infección viral. Variaciones en el pH (de 6.3 a 6.5) de cultivos de células Sf9 provocan tiempos de adaptación más largos, velocidades de crecimiento menores, así como concentraciones celulares reducidas. A valores de pH por arriba de 6.5 se observa un efecto negativo sobre el crecimiento celular y se tiene una fase de adaptación más prolongada (Zhang et al., 1994).

En el caso de cultivos de células de insecto, incrementos en el pH promueven la fusión directa del virus (coronavirus) con la membrana sin requerir de compartimentos ácidos (Guirakhoo et al., 1993), y pueden favorecer la adherencia de algunas líneas celulares de insecto a pH de 6.7-6.8 (Koval y Suppes, 1990). Por otra parte, pH ácidos (pH entre 5.0 y 5.6) estimulan la fusión del virus con la membrana celular (Guirakhoo et al., 1993), favorecen la fusión célula-célula (formación de sincicio) (Lanzrein et al., 1993) e incrementan la permeabilidad de las células como resultado de la formación de poros (dependiente del virus) por las proteínas que se presentan como proyecciones (spikes) en el virus (Leikina et al., 1992; Kasermann y Kempf, 1996; Randolph y Stollar, 1990; Vanlandschoot et al., 1998), promueven la entrada del virus por endocitosis mediada por receptores (Guirakhoo et al., 1993) y causan cambios conformacionales en la glicoproteína gp64, la cual es requerida para la fusión entre la superficie viral y la membrana celular (Kielian y Helenius, 1985; Marquardt et al., 1993).

2.3.3. Temperatura

Existen pocos trabajos relacionados con el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y rendimiento de producto recombinante en líneas celulares de insecto. Al igual que en el caso de la MDI y el pH, se presentan resultados muy variables que además están en función de la línea celular y de la proteína a expresar (Reuveny et al., 1993; Tsao et al., 1996).

Se ha encontrado que la temperatura afecta directamente el crecimiento celular, la viabilidad, el metabolismo, la síntesis de proteínas (Furakawa y Ohsuye, 1999), el tiempo de expresión y el porcentaje de proteína secretada en algunas líneas celulares tanto de mamíferos como de insectos (Reuveny et al., 1993). Además disminuciones en la temperatura (en el caso de cultivos de células de insecto, reducciones de temperatura de 27°C a 25°C) evitan limitaciones de O₂, sobre todo presentes durante la infección de los cultivos (las limitaciones de oxígeno se pueden detectar por acumulación de ácido láctico en los cultivos. Al reducir la temperatura se puede incrementar el oxígeno disuelto disponible para el metabolismo celular y para la producción de proteína, sin afectar tanto el nivel de producción como el patrón de crecimiento) (Reuveny et al., 1993). Al disminuir la temperatura de cultivos de células de insecto de 30°C a 20°C (BTI TN5B1-4) también se ha observado que se prolonga la estancia de la proteína en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi (AG). En estos casos se ha visto que el tiempo de cosecha es el factor que determina la cantidad de procesamiento de las proteínas y no la temperatura. Estos cambios en la temperatura no afectan el tipo de oligosacáridos de las proteínas producidas pero si afectan el grado de glicosilación de las mismas (Donaldson et al., 1999).

Por otro lado, se ha observado que aumentos en la temperatura de 22°C a 30°C causan incrementos en el metabolismo de glucosa, en la velocidad específica de crecimiento y en la velocidad de consumo de O₂ (Reuveny et al., 1993). Las oscilaciones en la temperatura de cultivo (de 28°C = cultivo control a 20°C, 22°C, 24°C ó 26°C) provocan una disminución en la velocidad de infección, por lo que es posible mantener la viabilidad de cultivos de células de insecto Sf9 por periodos más largos. Temperaturas de 25°C y 32°C (comparadas con 28°C) ocasionan el incremento del número de cuerpos de inclusión de baculovirus por célula y de virus extracelulares. Esto demuestra que la temperatura óptima para el crecimiento celular

(28°C) no necesariamente coincide con la temperatura óptima para la producción de virus (Shao-Hua et al., 1998). Por otra parte, incrementos en la temperatura (de 27°C a 30°C) de cultivos infectados de células Sf-21 han permitido incrementar el nivel de expresión de β -galactosidasa (Hara et al., 1993).

Por otro lado, existen una serie de estudios acerca del efecto de la temperatura sobre cultivos de líneas celulares de mamíferos, sobre todo de hibridomas, células BHK y células CHO. La reducción de temperatura de operación ha sido una estrategia de manipulación de proteínas en cultivos que han mostrado incrementos en la viabilidad celular con efectos variables sobre la productividad (Moore et al., 1997) y en el consumo específico de O₂ (Jorjani y Ozturk 1999). En estudios con células CHO se ha visto que disminuciones en la temperatura (de 37°C a 30°C) conllevan la disminución del porcentaje de células en fase S (disminución en la proliferación celular) del ciclo celular y a la acumulación de las mismas en la fase G1. Además, esta reducción en la temperatura prolonga la viabilidad del cultivo pues se retrasa el mecanismo de muerte celular por apoptosis (Nagarathnamma et al., 1997). En estos experimentos no se modificó la carga energética de las células, sin embargo la velocidad global del metabolismo sí se vió disminuída. Esto significa entonces que la viabilidad puede ser prolongada ya que se reduce la producción de metabolitos tóxicos y la limitación de nutrientes o bien que las células permanecen durante periodos más prolongados en fase G1 (Jenkins y Hovey, 1993; Moore et al., 1997). Otros autores consideran que la reducción de la temperatura *per se* no es la causa del incremento en la productividad, sino que ese incremento se debe a efectos secundarios en el ciclo celular y en la viabilidad (Ramírez y Mutharasan, 1990).

Existen otros efectos de la temperatura en cultivos de células de mamífero, entre los que destacan incrementos en los niveles de proteína obtenidos así como en la duración de la producción de la proteína. Con la reducción de la temperatura de cultivo de 37°C a 33°C se han incrementado de 10 a 20 veces los niveles de expresión de la luciferasa cuando el tiempo de cosecha se prolonga hasta las 50 horas post-infección (Schlaeger y Ludstrom, 1998). Estas reducciones en la temperatura de cultivo muestran velocidades de crecimiento y velocidades de consumo de glucosa menores; sin embargo ni la máxima concentración celular ni la productividad se han visto afectadas. Además se ha encontrado que reducciones en la temperatura promueven la resistencia de las células al estrés (Schlaeger y Ludstrom, 1998). En

estudios similares con células CHO, se ha encontrado que disminuciones en temperatura equivalentes a las anteriores permiten mantener la viabilidad por periodos más prolongados (se suprime la lisis celular, por lo que también se evita la presencia de proteasas celulares en el medio de cultivo), se incrementa la pureza de la proteína secretada al medio de cultivo, se inhibe el crecimiento celular, se mejora la productividad de la proteína recombinante, se suprime el consumo de medio de cultivo y se suprime la liberación de impurezas de las células (Furakawa y Ohsuye, 1998; 1999).

2.3.4. Amonio

La glutamina y el glutamato son aminoácidos de importancia central en el metabolismo de las células animales (Kovacevic y McGiven, 1983). La glutamina es utilizada por células de mamífero tanto como fuente de carbono como fuente de nitrógeno para la síntesis de otros aminoácidos, nucleótidos, purinas y pirimidinas (Jeong y Wang, 1995). El producto mayoritario del catabolismo de estos aminoácidos es el amonio el cual es un producto tóxico que es secretado al medio (Glaken, 1988). El amonio limita la concentración celular y por ende la concentración y productividad de la proteína recombinante de interés (Ramírez, 1996). La toxicidad del amonio en cultivos se debe a que el NH_4^+ es transportado hacia la célula en lugar del ion K^+ , lo que da lugar a la reducción de los niveles de K^+ en la célula (este es un factor importante para varias enzimas y para el gradiente en la membrana citoplasmática) (Martinelle y Haggstrom, 1993).

La degradación de la glutamina es catalizada por la glutaminasa, la cual desamida directamente su substrato para liberar amonio y glutamato. Sin embargo, la velocidad de generación de amonio depende directamente de la concentración de glutamina en el medio, ya que también existe una degradación espontánea no enzimática hacia amonio (Butler y Jenkins, 1989). Por otra parte, la velocidad de consumo de glutamina en un cultivo está determinada por varios factores, tales como: el tipo de cultivo, la concentración de suero, la velocidad específica de crecimiento, la concentración de glucosa y la concentración de glutamina (Jeong y Wang, 1995). El glutamato liberado puede ser desaminado y formar así α -cetoglutarato y amonio mediante la glutamato deshidrogenasa catabólica (GDH) (Doyle y Butler, 1990).

Se ha demostrado que el amoniaco (NH_3) puede llegar a inhibir tanto el crecimiento de varias líneas celulares como la producción de varios virus (se ha reportado que concentraciones de tan solo 2 mM pueden inhibir la velocidad de crecimiento en cultivos de hibridomas) (Martinelle y Haggstrom, 1993). El amonio (NH_4^+), por su parte, disminuye la velocidad específica de crecimiento así como los rendimientos sobre sustrato (cuanto producto se obtuvo por mol ó gramo de sustrato consumido), incrementa la velocidad específica de muerte y cambia las velocidades metabólicas, el procesamiento de proteínas (Dyken y Sambanis, 1993) y la replicación de algunos virus (Newland et al., 1994; Schneider et al., 1996).

Existen diversos modelos que explican el mecanismo de toxicidad del amonio en células animales, entre los cuales destacan: el desequilibrio entre gradientes electroquímicos (Glaken, 1988), la inhibición enzimática de reacciones (Glaken, 1988), cambios en el pH intracelular (Glaken, 1988; McQueen y Bailey 1990 y 1991), formación de gradientes de protones - lo cual conlleva a la inhibición de los procesos de endocitosis y exocitosis - (Docherty y Snider, 1991), y por último un incremento en la demanda de energía de mantenimiento (Martinelle y Haggstrom, 1993).

Los iones NH_4^+ son transportados por proteínas transportadoras de K^+ . En cambio el NH_3 al no tener carga no requiere de estas proteínas transportadoras pues se difunde más rápido que el NH_4^+ . Además, la constante de difusión del NH_3 es más alta que la del NH_4^+ , por lo cual se establece un equilibrio de manera más rápida al transportar amonio. La formación de NH_3 / NH_4^+ , que se da principalmente en la mitocondria, provoca un decremento ligero en el pH mitocondrial y citoplasmático (Martinelle y Haggstrom, 1993). Por otra parte, la adición de NH_4^+ al cultivo causa un incremento en el pH mitocondrial mientras que el NH_4^+ producido por la célula lo disminuye. La descomposición espontánea de glutamina en el medio de cultivo tiene el mismo efecto que la adición del ión amonio. Sin embargo, se ha encontrado que la generación de NH_4^+ en el cultivo es aún más tóxica que su adición (Martinelle y Haggstrom, 1993).

En cultivos de hibridomas se ha observado que la adición de NH_4Cl provoca una disminución en los rendimientos relativos de anticuerpo; además si se tiene un pH elevado, el efecto de la adición de NH_4Cl aún es más tóxico para el cultivo (Doyle y Butler, 1990). En cultivos

infectados de células CHO se ha observado que la adición de NH_4Cl por arriba de 5 mM inhibe el crecimiento celular, sin embargo la productividad específica de la proteína eritropoyetina (EPO) se ve incrementada al emplear concentraciones de NH_4Cl por arriba de 5 mM. Además la adición de NH_4Cl también tiene efecto sobre la heterogeneidad de las glicofomas de la EPO (esto se vió reflejado en aumentos en el peso molecular de la EPO) (Yang y Butler, 2000). En relación con el efecto del amonio sobre la glicosilación, se han realizado pruebas adicionando 40 mM de sulfato de amonio a cultivos infectados de células de insecto Sf-21, con la finalidad de ver que concentración de amonio afectaba el patrón de glicosilación basal de la fosfatasa alcalina de humano secretada (SEAP) (Donaldson et al., 1999).

Una alternativa para contender con la formación de NH_4^+ en el cultivo es usar medios libres de glutamina, aunque esta alternativa conlleva una disminución en la velocidad específica de crecimiento de los cultivos (Ljunggren y Haggstrom, 1990). Estos medios libres de glutamina contienen otros nutrientes indispensables para el crecimiento de las células tales como glucosa y aminoácidos, además de nutrientes que remplazan las funciones anabólicas efectuadas generalmente por la glutamina (tales como la síntesis de nucleótidos) (Ramírez, 1996).

2.3.5. Osmolaridad

Se ha demostrado que altas concentraciones de compuestos osmóticamente activos, tales como sales y azúcares, provocan estrés osmótico sobre las células (Lee y Lee, 2000), causando disminución de la viabilidad celular, modificaciones metabólicas (incremento en el consumo de aminoácidos) (Ozturk y Palsson, 1991; Takagi et al., 2000; Zhang et al., 1994) y modificaciones en la velocidad de crecimiento (Takagi et al., 2000). Las células de insecto toleran un intervalo amplio de osmolaridades entre 250-500 mOsm (Zhang et al., 1994), sin embargo la osmolaridad sufre cambios a lo largo de los cultivos. Al respecto, se han realizado estudios en los que se ha monitoreado la osmolaridad en un cultivo de células de insecto en reactor por lotes. Como resultado se observó una osmolaridad constante de apróx. 350 mOsm durante la fase exponencial de crecimiento, un aumento de 350 mOsm a 400 mOsm durante la fase estacionaria y finalmente un decremento dramático hasta 230 mOsm durante la fase de

muerte. Estos cambios coinciden con el agotamiento de glucosa y con el principio del agotamiento de la fructosa y del lactato (Palomares y Ramírez, 1997).

En cultivos de hibridomas se ha observado que aumentos en la osmolaridad (por la adición de NaCl, PBS o de una solución 0.31 M de sacarosa) dan como resultado incrementos en el consumo de glucosa y glutamina e incrementos en la producción de lactato y amonio, mientras que los rendimientos lactato/glucosa y amonio/glutamina se mantienen constantes. Además, estas condiciones hipertónicas provocan cambios de tamaño en las células durante las primeras 10 horas de cultivo (el incremento en la osmolaridad causa un flujo de agua hacia el exterior de las células por lo cual las mismas tienden a encojarse en un principio) (Lin et al., 1999; Ozturk y Palsson, 1991; Takagi et al., 2000), causan una disminución en la velocidad específica de crecimiento (esta inhibición del crecimiento celular debido a condiciones hiperosmóticas ha sido explicada en términos de la inhibición de la actividad de algunas enzimas por altas concentraciones de potasio). Simultáneamente, un sistema de osmoregulación dependiente de energía funciona acumulando solutos orgánicos que compensan los efectos tóxicos de las macromoléculas en el interior de las células. Esta acumulación puede, a la vez, compensar los solutos en el exterior de las células para reestablecer el volumen celular en una etapa posterior, de esta manera se previene la entrada de otros solutos que pretendan entrar a las células (Lin et al., 1999) y llegan a modificar también la porosidad de las mismas (Ozturk y Palsson, 1991).

En otros casos se han registrado incrementos en la secreción del anticuerpo monoclonal, en el crecimiento celular, en la pureza del anticuerpo (Bibila et al., 1994), y en los niveles de anticuerpo producidos (Oh et al., 1993) como consecuencia de incrementos en la osmolaridad por la adición de NaCl o de butirato de sodio (esta sustancia también tiene efectos tanto sobre la morfología de la célula como sobre la del núcleo, y sobre el ciclo celular).

Por otra parte se ha visto que incrementos graduales en la osmolaridad hacen que las células se adapten a las nuevas condiciones y de esa manera se ha mejorado hasta en un 50% la producción de anticuerpo monoclonal (ya que la viabilidad no se ve tan afectada como en casos en los que se cambia la osmolaridad inicial de los cultivos) (Cherlet y Marc, 1999; Lin et al., 1999). Estos experimentos, sin embargo, provocan decrementos en la velocidad de crecimiento, aceleran el metabolismo de aminoácidos (tales como la glutamina), incrementan el

volumen celular y el pH, y causan la acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular (Cherlet y Marc, 1999).

El incremento en la concentración de otros factores de cultivo da como resultado modificaciones en la osmolaridad. Incrementos en la presión parcial de CO₂ (pCO₂) conllevan un aumento en la osmolaridad disminuyendo la producción de proteínas recombinantes por células infectadas (Garnier et al., 1996). En cultivos de hibridomas (transfectoma KR12H-2) la adición de NaCl ha mostrado un decremento en la velocidad específica de crecimiento y un incremento en la productividad específica de anticuerpo. Una de las razones a las cuales se atribuye este incremento en la producción de anticuerpo es que los niveles de transcripción de los RNA mensajeros de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina se han visto intensificados al incrementar la osmolaridad del cultivo (Lee y Lee, 2000).

2.3.6. Otros parámetros importantes en la expresión de proteínas recombinantes

El estudio de otros parámetros tales como: la línea celular (Hink et al., 1991; Wickham et al., 1992), el tipo de virus (Fraser, 1989), el número de pase del virus (Wickham et al., 1991), la composición del medio (Hink et al. 1991), la concentración de oxígeno disuelto (Scott et al., 1992; Wang et al., 1993), el tiempo de infección (Licari y Bailey, 1991; Bédard et al., 1994), el tipo de proteína (Hink et al., 1991), la densidad celular inicial (Wickham et al., 1992), la fase de crecimiento y metabolismo del cultivo (Caron et al., 1990; Lindsay et al., 1992, Reuveny et al., 1993) y la adición de surfactantes al medio de cultivo (Palomares et al., 2000) es importante ya que podrían determinar un mejor rendimiento de proteínas recombinantes en cultivos de células de insecto infectadas (Bhatia et al., 1997).

Una buena calidad del inóculo celular garantiza una velocidad de crecimiento más alta, y una infección más eficiente (Wu et al., 1990; Lazarte et al., 1992). Además la fase de crecimiento en que se encuentran las células que servirán como inóculo (Al-Rubeai et al., 1991), y la relación medio fresco/medio usado (Rechtoris y McIntosh, 1976) son parámetros muy importantes ya que tienen efectos sobre la actividad metabólica de las células.

Durante la infección, a pesar de que las células dejan de dividirse, otras actividades celulares - tales como la respiración y las maquinarias transcripcional y traduccional- siguen funcionando

pero ahora están enfocadas a la multiplicación viral y a la expresión de los genes virales. Durante el proceso de infección, los cultivos muestran limitación de oxígeno debido al incremento en la tasa de consumo de oxígeno de un 7 hasta un 100% (Maiorella et al., 1988).

La aglutinación de las células, por otro lado, interfiere con la entrada del virus a la célula, ya que el virus tiene una menor área de contacto con los receptores celulares (se daría una especie de impedimento estérico durante el contacto virus-receptor celular). Para solucionar este problema se han estudiado varias sustancias tales como los polianiones, los cuales tienen la capacidad de separar las células permitiendo así que el virus entre a más células y por tanto se incrementa la productividad del sistema (Dee et al., 1997).

Otro parámetro importante es el tiempo de cosecha. Si no se cosechan los productos a tiempos adecuados, en ocasiones pueden sufrir proteólisis (transcurridas alrededor de 72 horas post-infección, se comienza a detectar actividad proteolítica). Estas proteasas pueden ser de dos tipos, las generadas por la célula como sistema de defensa (este es un mecanismo de defensa de las células como respuesta a la síntesis de proteínas extrañas) ó bien las proteasas virales (existen evidencias de que este tipo de proteasas virales pueden ser responsables del movimiento de proteínas virales y que también tienen la capacidad de reconocer proteínas no virales que posteriormente son expuestas a hidrólisis) (Licari y Bailey, 1991; O'Reilly y Luckow, 1994). La productividad se verá afectada dependiendo de la sensibilidad de la proteína al ataque de las proteasas (Palomares y Ramírez, 1997). Otra razón por la cual este tiempo debe ser controlado es el hecho de que, a tiempos prolongados de infección, las células comienzan a lisarse, liberando así la proteína intracelular y por tanto complicando los procesos de purificación de la misma.

En cultivos de células de insecto se ha observado que la multiplicación viral es mejorada cuando la infección se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular, esto da como resultado una aceleración de la tasa de producción de partículas virales así como de proteína recombinante (Kioukia et al., 1995).

Por otro lado, se ha evaluado la adición de Pluronic F-68 (PF68) a cultivos de células de insecto Sf9. La adición de 0.05% PF68 (p/v) a cultivos infectados permite incrementar 10 veces tanto la

concentración máxima de proteína como el rendimiento, con respecto a cultivos sin adición de PF68. Bajo las mismas condiciones, se ha observado un decremento de 20 veces en la producción del virus recombinante y no se ha detectado ninguna diferencia ni en la reología del medio ni en las cinéticas de crecimiento en ambos cultivos. El PF68 protege a las células del estrés hidrodinámico. Por ejemplo, se han sometido células con PF68 durante 15 minutos a 3000 s^{-1} y se ha observado que la viabilidad permanece constante durante este tiempo, mientras que cultivos sin PF68 sufren una caída en la viabilidad del 60.0% bajo esas mismas condiciones. Además, este efecto protector permanece en las células de cultivos en los que se retira este aditivo (Palomares et al., 2000).

2.4 El Rotavirus

El rotavirus es uno de los causantes de enfermedades diarreicas de mayor importancia en el mundo. Se calcula que en países en desarrollo este virus provoca aproximadamente 10 millones de muertes por año. Tan solo en los Estados Unidos se gasta alrededor de 1 billón de dólares para tratamientos de pacientes afectados por este virus (Glass et al., 1996). De ahí el interés por generar una vacuna efectiva que ayude a contrarrestar el número tan elevado de pacientes infectados por este virus. Una alternativa para la producción de vacunas contra rotavirus ha sido la generación de PPVs, partículas similares al rotavirus pero que carecen del genoma y que son capaces de inducir respuesta inmune protectora (Jiang et al., 1998). De hecho ya se tuvo en el mercado (de 1998 a finales de 1999) una vacuna contra rotavirus (vacuna trivalente de virus atenuados); sin embargo la misma tuvo que ser retirada por causar problemas en las personas vacunadas (Vaccine, 2001).

El rotavirus contiene 11 segmentos de RNA de doble cadena y pertenece a la familia *Reoviridae*. Estos segmentos codifican para las 11 proteínas del virus de las cuales 6 son proteínas estructurales, las cuales a la vez conforman tres capas concéntricas (**Figura 2.3.**). La capa interior está formada por la proteína viral 2 (VP2), la cual rodea a las proteínas VP3, VP1 y a los 11 segmentos de RNA (Labbé et al., 1991). Por su parte, VP6, que es la proteína central y es la más abundante de todo el virus (Shaw et al., 1993), está rodeada por las dos proteínas que conforman la capa exterior, VP7 y VP4 (Estes y Cohen, 1989).

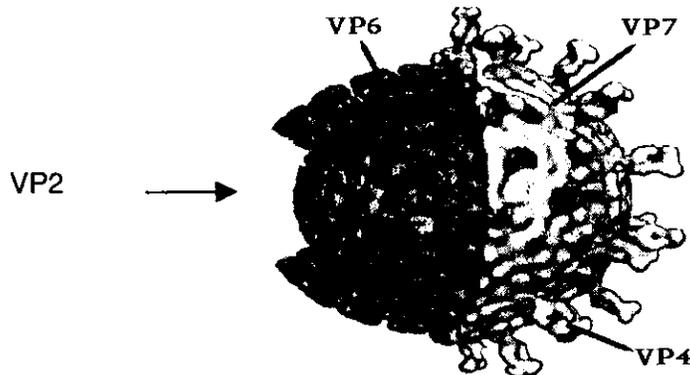


Figura 2.3. Representación de rotavirus mostrando las proteínas estructurales.

2.4.1. Proteína estructural de rotavirus VP7

VP7 es una proteína glicosilada de 38 kDa y llega a comprender 30% de la masa del rotavirus. Esta proteína en conjunto con VP4, conforma la cápside externa del rotavirus. En cultivos de células de mamífero infectadas por rotavirus, esta proteína es sintetizada en los ribosomas asociados al Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) y es translocada al lumen en donde es glicosilada mediante la adición de carbohidratos de tipo alta-manosa.

La estructura de estos carbohidratos simples indica que el procesamiento de VP7 está restringido al lumen del Retículo Endoplásmico (RE), por lo que no se involucra al aparato de Golgi (AG), restringiendo así la maduración de VP7 al RER (Andrew et al., 1987). Con la finalidad de realizar estudios de infectividad, se han creado mutantes que son capaces de ser secretadas, esto sucede una vez que VP7 ha sido completamente madurada en el lumen del Retículo Endoplásmico (una vez eliminada la señal de retención – pueden ser varias señales tales como: la presencia de una lisina concenso a tres aminoácidos del COOH terminal, la presencia de un COOH citoplásmico altamente cargado en proteínas transmembranales asociadas al RE, etc.). De ahí que se tenga una proteína glicosilada que contiene solamente residuos de oligosacáridos de tipo N altos en manosa, principalmente del tipo $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$, aunque también se encuentran algunos oligosacáridos del tipo $\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$ (Maass y Atkinson, 1994).

El estudio de esta glicoproteína, producida por el sistema células de insecto-baculovirus, es importante ya que es una proteína clave tanto en la producción de PPVs funcionales, como en la infectividad del rotavirus. La actividad inmunogénica de VP7 recombinante depende de su correcto procesamiento postraduccional. Además se ha visto que la proteína recombinante es secretada al medio de cultivo durante la fase tardía de infección. Esta secreción no se debe a la lisis celular provocada por la infección viral (Sabara et al., 1991). En este estudio se empleó una proteína de rotavirus de la cepa SA11 que está conformada por 326 aminoácidos (Mass y Atkinson, 1994) y cuenta con un sitio específico de glicosilación ubicado en la asparagina 69 (Both et al., 1983).

2.4.2. Proteína estructural de rotavirus VP4

La proteína de rotavirus VP4 es una proteína estructural que conforma las proyecciones de la cápside externa del rotavirus. Esta proteína presenta actividad de hemaglutinina y contiene epítopes de neutralización (anticuerpos monoclonales dirigidos ya sea hacia VP7 o a VP4 neutralizan la infectividad viral) (Andrew et al., 1987). Esta proteína es cortada por tripsina en dos segmentos: VP8 (de apróx. 60 KDa) y VP5 (de apróx. 28 KDa). Este corte es importante ya que incrementa la infectividad del virión, determina el crecimiento *in vitro* del virus y la formación de placas líticas en cultivo, es responsable de la virulencia en ratón e influencia la patogenicidad / atenuación en humanos (Ramig, 1994). Además esta proteína es la que interactúa con el receptor celular a través de VP8 y de VP5. La proteína de la cepa SA11 está conformada por 776 aminoácidos y constituye tan sólo el 1.5 % del rotavirus. Esta proteína no está glicosilada (Ramig, 1994).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

- Evaluar el papel de algunos parámetros de cultivo sobre el crecimiento celular, rendimiento de baculovirus recombinantes y la producción de las proteínas **VP7** y **VP4** de rotavirus en el sistema células de insecto-baculovirus.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la multiplicidad de infección sobre la producción de la proteína de rotavirus **VP7** en el sistema células de insecto–baculovirus.
2. Analizar el efecto de diversos parámetros de cultivo sobre el crecimiento de las células de insecto y sobre la producción de la proteína **VP4** y baculovirus recombinantes:
 - a) Efecto de cambios en el pH del medio de cultivo
 - b) Efecto de la temperatura de cultivo
 - c) Efecto de la adición de amonio al cultivo
 - d) Efecto de modificaciones en la osmolaridad del medio de cultivo

4. Materiales y métodos

4.1. Material biológico

4.1.1 Línea celular

Para la realización de los experimentos se empleó la línea celular Sf9 (número de catálogo ATCC 1711) proveniente del ovario de la pupa de *Spodoptera frugiperda*, lepidóptero comúnmente conocido como gusano cogollero del maíz o gusano soldado de otoño (**Figura 4.1**). Esta línea fue una clona obtenida en 1983 (Smith et al., 1983) a partir de la línea celular Sf-21 previamente obtenida en 1977 (Vaughn et al., 1979). Las células provinieron de un mismo lote conservado en nitrógeno líquido.



Figura 4.1 Larva y mariposa de *Spodoptera frugiperda*.

Como se desconocía el pase original de las células, al descongelarlas se tomó como pase número uno y las células fueron conservadas no mas allá del pase 50. Las células para los inóculos se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 27°C. Se llevaron a cabo tanto cultivos estáticos en frascos de cultivo (de 25 cm² ó 75 cm²) como cultivos agitados en frascos ("spinners") y/o matraces ("shakers") agitados a 100 rpm.

Todos los experimentos fueron realizados con células cuya viabilidad fue superior al 90% y en fase de crecimiento exponencial. Esta fase se eligió ya que se ha observado mayor actividad proliferativa de las células debido a la presencia, entre otros factores, de grandes cantidades de precursores de DNA en la reserva celular.

4.1.2 Baculovirus recombinante

Se utilizaron dos baculovirus recombinantes que codifican para dos proteínas estructurales de rotavirus de la cepa de simio SA11. El primero de estos baculovirus contiene el cDNA que codifica para la proteína de la capa externa VP4 (Bac-VP4) y el segundo codifica para la otra proteína que conforma la misma capa VP7 (Bac-VP7) (Dra. Estes, Baylor College – obtenido de la Dra. Susana López) (Crawford et al., 1994). Los cDNAs de los segmentos 4 (codifica para VP4) y 9 (codifica para VP7) fueron sintetizados a partir del RNA mensajero (mRNA de rotavirus). El mRNA fue clonado usando un kit para la síntesis de cDNA (cDNA Synthesis System Kit – Amersham International, Amersham –England).

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Determinación del título viral

La determinación del título viral es indispensable para conocer la cantidad de partículas infectivas contenidas en un stock de virus o bien para determinar la progenie viral de un experimento de infección. Para conocer el título es necesario utilizar el ensayo en placa descrito por Wood (Wood, 1995). Este ensayo consiste en infectar células con un número reducido de partículas infecciosas para que sólo células aisladas sean infectadas. Posteriormente se adiciona un medio semisólido que limita la difusión del virus. Cuando la célula infectada originalmente libera virus, sólo células adyacentes son infectadas. Después de varios ciclos de infección un foco de células infectadas forma una placa lítica. Todas las partículas virales de la placa derivan de una partícula infectiva.

En este caso se colocaron 500 µl de una suspensión celular (células Sf9 en medio de cultivo TNMFH + 10% de suero fetal bovino (SFB)) a una densidad de 0.4×10^6 cel/ml por pozo en placas de cultivo de 24 pozos. Se permitió que las mismas se adhirieran y mientras tanto se realizaron diluciones decimales seriadas del virus en PBS. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado de los pozos sin dañar las células adheridas y las diluciones de cada muestra fueron colocadas por duplicado e incubadas a 27°C.

Transcurridas dos horas de adsorción, se retiró el virus y se colocaron 500 μ l por pozo de una suspensión constituida por: 6.5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 3% (GIBCO-BRL, reactivo ultrapuro-Número de catálogo 15517-014), 5.3 ml de medio TNMFH concentrado 2X (Medio Grace's de GIBCO-BRL, Número de catálogo 11300-043) y 1.2 ml SFB (GIBCO-BRL, Número de catálogo 16000-044). La placa fue incubada a 27°C, una vez que el medio solidificó.

Después de 5 días de incubación se agregó a la placa 500 μ l por pozo de otro medio semisólido compuesto por: 12 ml de agarosa de punto de fusión normal al 0.6% (GIBCO-BRL, reactivo ultrapuro -Número de catálogo 15510-019) y 1 ml de rojo neutro (SIGMA, Número de Catálogo N-7005). Pasadas las 24 horas de incubación a 27°C, se realizó el conteo de las placas líticas formadas por el virus. El título viral es calculado a partir del promedio del conteo de las placas formadas en las diferentes diluciones realizadas y se reporta en UFP/mL.



Figura 4.2. Determinación de título viral en placas de 24 pozos. Se observan claramente las placas líticas en las distintas diluciones tituladas. Se usaron células Sf9 en medio de cultivo TNMFH suplementado con 10% SFB. Las diluciones seriadas fueron de -4 a -7 (de arriba para abajo).

4.2.2 Determinación de concentración, viabilidad y tamaño celular

La determinación de la concentración y del tamaño celular fue llevada a cabo mediante el uso de un contador de partículas Coulter (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics). Para poder hacer uso de este dispositivo se realizaron diluciones apropiadas de las células en una solución isotónica, Isotón II (Coulter, No. de catálogo 7546719). Las mediciones fueron realizadas con un tubo de apertura de 100 μm con un volumen de muestra para conteo de 500 μl . El tamaño de la partícula es determinado por el Coulter cuando la partícula pasa por el orificio; en ese momento cambia la impedancia entre los electrodos y produce un pulso eléctrico de corta duración el cual tiene una magnitud proporcional al volumen de la partícula. De esta manera el Coulter da una medida simultánea tanto del tamaño de partícula detectada como del número de partículas. La viabilidad fue determinada por la técnica de exclusión de azul de tripano (se realizaron diluciones de muestra y azul de tripano a una relación de 1:10) mediante el uso de conteos múltiples en hematocitómetro.

4.2.3 Generación de estándar para usarlo como control en geles

Ya que la cantidad de proteínas recombinantes obtenida fue escasa, y debido a la variación intrínseca tanto de la electroforesis como del inmunoblotting se propuso generar un estándar interno con el cual se tuvieran unidades internas confiables. Para esto se generó un estándar de rotavirus nativo contra el cual se pudieron comparar las proteínas recombinantes ya que la cantidad de proteína total contenida en el rotavirus nativo es conocida. Además esta aproximación permitió conocer más de cerca la concentración de cada una de las proteínas recombinantes ya que se conocen los porcentajes de cada una de las proteínas estructurales que conforman al rotavirus.

4.2.3.1 Cultivo de células MA104

Se cultivaron células MA104 (células de riñón de embriones de simio). Estas células son adherentes, por lo que son cultivadas en frascos estáticos. Se partió de un frasco con una monocapa confluyente de células para la mantención. En resumen se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con una solución de 0.2g/L de EDTA en PBS. Se agregó tripsina-

EDTA y transcurridos alrededor de 5 minutos se retiró el exceso de tripsina dejando sólo una película sobre la monocapa de células. Esta película se dejó en el frasco de cultivo a una temperatura de 37°C hasta que las células adheridas se despegaron (1-3 min). Posteriormente se agregó medio MEM (Minimum Essential Medium- Powder, Gibco BRL, Número de catálogo 61100-061) suplementado con 10% de SFB y se dispersaron las células hasta que estuvieran totalmente despegadas. La suspensión celular obtenida fue distribuída en nuevos frascos.

4.2.3.2 Infección de las células MA104 con rotavirus SA11

El rotavirus de simio SA11 (cepa 4S) se activó con tripsina durante 30 minutos (10 µg/ml). Las células fueron cultivadas hasta llegar a una confluencia del 70-80 por ciento. Posteriormente se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS tres veces la monocapa de células y se agregó el inóculo viral conservado en medio MEM sin suero (este inóculo se obtuvo de infecciones previas de células MA104 con virus SA11). Se incubaron las células infectadas a 37°C durante 1 hora, procurando agitar los frascos cada 15 minutos para garantizar una mejor adsorción del virus. Transcurrida la hora, se retiró el inoculo viral (se aspiró mediante vacío) y se agregó medio MEM sin SFB. Se incubaron los frascos hasta ver el efecto citopático total de las células (aprox. De 18 a 24 horas) y después se congelaron a -20°C.

4.2.3.3 Purificación del rotavirus

Los lisados de células infectadas con SA11 obtenidos en el paso anterior fueron centrifugados durante 1 hora a 24,000 rpm en un rotor SW28 (a 4°C). Se aspiró el sobrenadante y se desechó. El pellet se resuspendió en 1 ml de TNC (10mM Tris pH 7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) y después se realizaron tres ciclos de sonicado (en hielo) durante 20 segundos, seguidos de tres extracciones con freón (con agitación vigorosa durante 5 minutos, o hasta que la fase de freón quedó limpia). Para las extracciones con freón se usó una proporción de 1:1. Para purificar el virus se tomó la fase acuosa y se le agregó cloruro de cesio (CsCl) hasta alcanzar una densidad de 1.37 g/ml. Posteriormente se ultracentrifugó la fase acuosa adicionada con el CsCl durante 16 horas a 35,000 rpm en un rotor SW 50.1 (a 4°C). Transcurridas las 16 horas se colectaron las bandas opalescentes y se guardaron a 4°C. La **Figura 4.5** muestra un esquema de la localización de las bandas formadas.

Antes de utilizar el virus fue necesario retirar el CsCl. Para esto se usó la resina Sephadex G-25 (SIGMA, No. de catálogo 6-25-300). Esta resina fue empacada poniendo 0.25 g de resina/ml H₂O Milli Q (H₂O MQ) en puntas de micropipeta de 200 μ l. Para empacar la punta se hizo uso de un ciclo de centrifugación de 15 segundos a la velocidad mínima de una microcentrífuga de eppendorf. Una vez empacada la punta se hizo pasar un volumen de 30 μ l de la solución de rotavirus puro y se sometió a 15 segundos de centrifugación. Se tomaron 20 μ l de este virus desalado y se cargaron en un carril del gel para ser utilizado como control interno. En cada uno de los geles se cargó la misma cantidad de rotavirus previamente purificado y cuantificado.

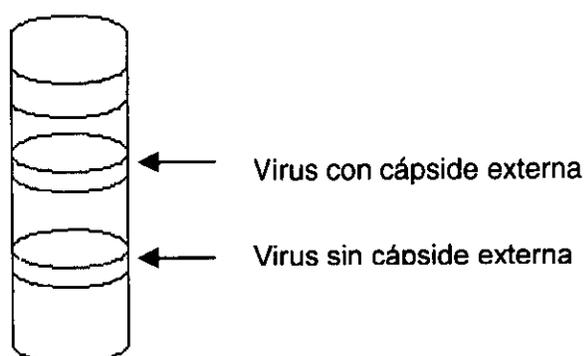


Figura 4.3 Esquema del gradiente obtenido en la purificación del rotavirus.

4.2.3.4 Estandarización del método de cuantificación

Una vez purificadas las partículas de rotavirus, se procedió a cuantificar la cantidad de proteína total contenida en la solución, para lo cual se empleó un ensayo para cuantificar proteínas de Bio-Rad que está basado en el método de Bradford. Para este ensayo se requiere de un colorante ácido (Azul de Coomassie) el cual se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos. Se realizaron varias diluciones de la solución del rotavirus (5 μ l de virus en 995 μ l de agua). Cada una de las diluciones se hizo a un volumen final de 1 ml. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de colorante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250 (Biorad). También se prepararon diluciones de albúmina bovina para tener una curva de calibración estándar (1.2, 2, 4, 6, 8, 10 μ g/ml) y se obtuvieron las mediciones de absorbancia de estas muestras. Después de 5 minutos de haber preparado cada dilución de albúmina y de haber adicionado el colorante, se midió la absorbancia (a 595 nm) de cada dilución, usando

como blanco una muestra de 1 ml de agua y 100 μ l de colorante. Para esto se usaron celdas de poliestireno desechables de 2 ml de volumen. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el resto de las diluciones de la solución del rotavirus. De esa manera se obtiene la cantidad de proteína total al comparar las absorbancias resultantes de las lecturas de las muestras de rotavirus, contra las absorbancias obtenidas para las diluciones de la albúmina bovina, cuya concentración se conoce desde un principio.

Una vez conocida la concentración de proteína total del rotavirus y conociendo el porcentaje teórico de cada una de las proteínas estructurales que conforman al mismo, es posible conocer -por medio de electroforesis en un gel de acrilamida seguido por un Western Blot- la cantidad de proteína contenida en la muestra a analizar. El análisis del Western, digitalizado previamente, se realiza por medio de un software (NIH Image 1.61/Fat) mediante el cual se pueden medir el área e intensidad de las bandas de proteína. En primer lugar, se cuantifica el área e intensidad de alguna de las proteínas estructurales de rotavirus. Como se sabe que porcentaje de la proteína total del virus representa esa proteína en específico, se puede relacionar el producto del área y la intensidad de la banda con una concentración de proteína. Una vez conocido este valor se puede comparar con el producto del área e intensidad registrados para la proteína recombinante. De esta manera se puede cuantificar la cantidad de proteína recombinante en función de la concentración de una de las proteínas estructurales de rotavirus. A pesar de que la cuantificación sigue estando en función de otra proteína, es una mejor técnica comparada con mediciones relativas en términos de áreas obtenidas al realizar la densitometría.

4.3. Estrategia experimental

4.3.1 Procedimiento para la producción de VP7

4.3.1.1 Infección de células Sf9

La línea celular de insecto Sf9 fue cultivada en frascos agitados con 60 ml de medio Sf900II, agitados a 100 rpm a una temperatura de 27°C. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar una concentración de alrededor de 1×10^6 cel/ml. Posteriormente fueron infectadas con el baculovirus recombinante Bac-VP7. Se tomaron muestras (a diferentes tiempos) para los

ensayos de viabilidad, tamaño celular y producción de virus y proteína. Las muestras para el análisis de producción de virus y proteína se guardaron a 4°C y -20°C, respectivamente.

4.3.1.2 Preparación de geles para la identificación de proteínas recombinantes

Para la identificación de la proteína se empleó la técnica de SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes). Se hicieron geles de acrilamida al 12% (para VP7) y al 8% (para VP4) con geles concentradores al 4% (ver composición del gel en la Tabla 4.1.). Estos geles se trabajaron en condiciones desnaturalizantes para asegurar que la proteína no estuviera plegada, agregada o multimerizada. Para esto, las muestras fueron tratadas previamente con un buffer de lisis (200 mM Tris HCl pH = 6.8, 8% SDS, 1% 2- β -mercaptoetanol, 40% glicerol y 0.4% azul de bromofenol). Posterior a la adición de esta solución se hirvieron las muestras durante 7 minutos para garantizar que las mismas estuvieran desnaturalizadas. El gel se corrió a 150 V en el gel concentrador y a 250 V en el gel separador.

4.3.1.3 Western Blot

Una vez realizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (NC). Después de la corrida electroforética, el gel fue sumergido para su hidratación en buffer II durante 15 minutos (ver composición de los buffers para transferencia en la Tabla 4.2.). Al mismo tiempo la membrana de NC (Millipore, Immobilon NC, Transfer membranes, Número de catálogo HAHY304F0, Filter type 0.45 μ m) fue lavada en buffer III y se dejó remojando por 15 minutos. Después de este tiempo se procedió a hacer el sandwich para la transferencia. Se colocaron 6 papeles filtro (Whatman – Chromatography paper 1 Chr, Número de catálogo 3001 917) previamente humedecidos en buffer III. Luego se colocó sobre ellos la membrana de nitrocelulosa, encima de esta se colocó el gel seguido por 6 papeles filtro humedecidos en buffer II y por último se colocaron 4 papeles filtro humedecidos en buffer I. El sandwich se colocó en un blotter (marca OWL). Las condiciones de transferencia fueron a corriente constante a 400 mA durante 1 hora.

Una vez transferidas las proteínas de los geles de acrilamida a la membrana de NC, se procedió primeramente a teñir la membrana con colorante Ponceau (SIGMA, Número de catálogo P3504) (0.01% Ponceau, 5% ácido acético) para observar la eficiencia de la

transferencia. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada al 5% en PBS. Se mantuvo la membrana en agitación durante 30 minutos y posteriormente se enjuagó y se colocó en una solución de leche al 0.1 % a la cual se agregó anticuerpo policlonal de detección, originado de un suero obtenido a partir de la inmunización de conejos con rotavirus purificado de la cepa YM. El anticuerpo policlonal se utilizó a una dilución de 1:2000 y se dejó en incubación a 4°C durante 18 horas. Pasadas las 18 horas, se realizaron tres ciclos de lavado: el primero de 15 minutos y los dos siguientes de 5 minutos. Después se agregó anticuerpo policlonal anticonejo conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:1000 y fue incubado durante 1 hora con agitación orbital (a temperatura ambiente). Transcurrido este tiempo se realizaron tres ciclos de lavado similares a los del primer anticuerpo.

Tabla 4.1. Composición de los geles de poliacrilamida para electroforesis

REACTIVO	Gel al 4%	Gel al 8%	Gel al 12%
Agua MQ	1.21 ml	1.8 ml	1.35 ml
Tris 2M pH 8.8	_____	0.7 ml	0.7 ml
Tris 2M pH 6.8	69 μ l	_____	_____
Acrilamida 29%, BIS 1%	200 μ l	930 μ l	1.4 ml
SDS 10%	10 μ l	35 μ l	35 μ l
Persulfato de amonio (PSA)10%	15.04 μ l	10.5 μ l	15 μ l
Temed	1 μ l	3.5 μ l	3.5 μ l

Tabla 4.2. Composición de los buffers para transferencia

BUFFER	TRIS (g/L)	MetOH (ml/L)	Glicina (g/L)
I	36.3	200	----
II	3	200	----
III	3	200	3

Para revelar las bandas de proteína se usó un kit de reactivos quimiluminiscentes de la marca Amersham (ECL- Western Blotting detection reagents, Número de catálogo 2106OL). La reacción de la peroxidasa con el sustrato del kit resulta en una señal fluorescente que se registra por exposición de la membrana de NC a una película fotográfica.

Las imágenes presentes en las películas se digitalizaron a través de un escáner. Una vez escaneada la imagen, se utilizó el software para Machintosh NIH Image 1.61/FAT, el cual permite analizar las bandas de proteína. Con este software se hace una determinación aproximada del área de las bandas y de la intensidad de las mismas. El área y la intensidad de las bandas se multiplica para obtener unidades relativas densitométricas. Estas unidades son comparadas con las unidades obtenidas para la banda del estándar de rotavirus y posteriormente son transformadas a $\mu\text{g/ml}$ ya que se conoce la cantidad de proteína colocada en el estándar.

4.3.1.4 Efecto de la MDI sobre la producción de VP7 recombinante

Se realizaron experimentos con la finalidad de determinar cuál era el efecto de la MDI sobre la producción de proteína recombinante VP7 en el sistema células de insecto baculovirus. Para realizar estos experimentos se siguió la misma metodología descrita en la sección de infección de células Sf9. Se crecieron las células hasta alcanzar una densidad celular de 1×10^6 cel/ml (en medio de cultivo Sf900 II con pH de 6.2). Posteriormente, se agregó el virus recombinante

(obtenido como fue descrito en la sección 4.2) a diferentes MDI. La cantidad de virus a adicionar se calculó como:

$$\#UFP = (\text{vol. de medio de cultivo}) \times (Xv) \times (\text{MDI}) \dots\dots\dots(4.8.1)$$

$$\text{Vol. de virus requerido} = (\#UFP) / (\text{título viral del baculovirus}) \dots\dots\dots(4.8.2)$$

en donde UFP son las unidades formadoras de placa, MDI es la multiplicidad de infección y Xv es la concentración de células de insecto viables.

Al igual que como se describió en la sección de infección, el cultivo infectado fue cosechado alrededor de 120 horas post-infección (hpi). Se determinó la cantidad de proteína recombinante producida y el título viral.

4.3.2 Efecto de variables de cultivo sobre la producción de VP4 recombinante

Una parte de la optimización de la producción de la proteína recombinante VP4 fue realizada previamente en el laboratorio. En particular, se hizo el análisis de la MDI y del tiempo de infección (TDI, es la concentración celular al momento de la infección, de ahí que se reporte en cel/ml). Los resultados mostraron que las mejores condiciones para incrementar la producción de VP4 eran el uso de una MDI de 5 UFP/cel y de una TDI de 1.5×10^6 cel/mL (resultados de V. Petricevich, datos no publicados). De ahí que para los subsecuentes experimentos, en los que se empleó Bac-VP4, se hayan empleado las condiciones antes mencionadas.

4.3.2.1 Efecto del pH

Se realizaron experimentos enfocados a determinar el efecto de variaciones en el pH del medio de cultivo sobre el crecimiento celular y la producción de proteína y virus recombinantes. Para analizar el efecto del pH sobre el crecimiento celular se realizaron experimentos en matraces agitados de 125 ml con 12.5 ml de volumen de trabajo. Estos matraces fueron inoculados a una concentración celular de $0.5 - 1 \times 10^6$ cel/ml. El pH inicial del medio de cultivo (Sf900II cuyo pH normal es de 6.2) fue ajustado con ácido clorhídrico (HCl) 1M y/o hidróxido de sodio (NaOH) 1

M a valores de pH en un intervalo de 4.8 a 7.0 (4.8, 5.0, 5.35, 5.5, 5.8, 6.0, 6.2, 6.6, 6.8, 7.0). Los matraces fueron agitados a 100 rpm a una temperatura de 27°C. Otros experimentos fueron llevados a cabo en frascos de cultivo de 75 cm² con 30 ml de volumen de trabajo. En estos experimentos sólo se evaluó el intervalo de pH entre 6.0 – 7.0.

Por otra parte, también se analizó el efecto del pH sobre la producción de VP4. Para esto se utilizaron matraces agitados de 250 ml (con 25 ml de volumen de trabajo) bajo las condiciones de agitación, temperatura y pH antes mencionadas. Los matraces se inocularon a una concentración celular de 1.5×10^6 cel/ml y fueron infectados con Bac-VP4 (a una MDI de 5 UFP/cel). El cultivo fue cosechado a las 114 horas post infección (tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima de VP4, previamente determinado en este laboratorio). La proteína fue cuantificada por análisis de inmunodetección en geles al 8% por medio de SDS-PAGE y el virus por ensayo en placa.

Los experimentos fueron muestreados aproximadamente cada 24 horas y se determinaron los siguientes parámetros: concentración celular, tamaño celular promedio y pH. El pH fue determinado mediante el uso de un potenciómetro marca Cole & Parmer (Chemcadet-pHmeter/controler, No. de catálogo 13-620-300) con un electrodo marca Accumet.

4.3.2.2 Efecto de la temperatura

Células Sf9 fueron cultivadas en medio de cultivo Sf900II en frascos agitados a 100 rpm. Los experimentos fueron realizados con dos objetivos: determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento celular y sobre la producción de la proteína VP4 y baculovirus recombinantes. Para cumplir el primer objetivo, se emplearon frascos de 50 ml con un volumen de trabajo de 15 ml inoculados con una concentración celular de 1×10^6 cel/ml. Se realizaron experimentos variando la temperatura de incubación desde 27°C hasta 37°C (27°C, 30°C y 37°C) a pH de 6.2. Se tomaron muestras cada 24 horas (aproximadamente) y se monitorearon la concentración celular, la viabilidad y el tamaño celular promedio. Para el segundo objetivo se inocularon spinners (con un volumen de trabajo de 15 ml) a una concentración de 1.5×10^6 cel/ml y estos fueron infectados con Bac-VP4 a una MDI de 5. Transcurridas las 114 horas post-infección se

cosechó el cultivo y se determinó la concentración de proteína recombinante así como el título viral para cada una de las temperaturas propuestas.

4.3.2.3 Efecto del amonio

Para determinar el efecto del amonio sobre el crecimiento celular y sobre la producción de VP4, se llevaron a cabo cultivos a los que se adicionó NH_4Cl a concentraciones finales de 0, 5, 10, 15, 20, 25 mM. En el caso de los cultivos sin infectar se inocularon matraces de 125 ml (con 12.5 ml de volumen de trabajo) para comenzar con una concentración celular de 0.5×10^6 cel/ml; mientras que en el caso de los experimentos infectados se emplearon matraces de 250 mL (con 25 ml de volumen de trabajo) y estos fueron inoculados para comenzar con una concentración celular de 1.5×10^6 cel/ml. Se colectó muestra a intervalos de 24 horas y se cuantificaron los parámetros ya descritos anteriormente.

4.3.2.4 Efecto de la osmolaridad

Para determinar el efecto de la osmolaridad sobre el crecimiento de las células de insecto Sf9 y sobre la producción de la proteína VP4 y baculovirus recombinantes, se llevaron a cabo cultivos a los que se adicionó NaCl. En el caso de los cultivos sin infectar, se crecieron las células hasta alcanzar una concentración celular de 0.5×10^6 cel/ml en frascos agitados a 100 rpm, se adicionó a los cultivos NaCl a concentraciones finales de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM y se observó el efecto sobre el crecimiento celular. En el caso de los cultivos infectados las células fueron crecidas hasta alcanzar una concentración celular de 1.5×10^6 cel/ml. Se colectaron muestras a intervalos de 24 horas y se determinaron los parámetros ya descritos anteriormente. El pH y la temperatura se mantuvieron a 6.2 y 27°C , respectivamente.

4.4. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para los experimentos fue el medio comercial Sf900II SFM - Optimized Serum-free Medium for Insect Cell Culture, Complete- (GIBCO-BRL, Número de catálogo 10902-088). Este es un medio libre de suero y proteínas cuya composición exacta no está accesible; sin embargo este medio presenta la ventaja de ser más económico y de facilitar

la purificación y cuantificación de las proteínas. Además, con el uso de este medio se buscó incrementar el rendimiento celular y el rendimiento del producto final. Cabe mencionar que este medio ha sido empleado en el cultivo de una gran variedad de líneas celulares de insecto, en estudios de patología de invertebrados, en biocontrol de insectos, en la producción de cuerpos de inclusión de polihedra así como en la producción de productos recombinantes utilizando bioreactores de varios tipos (Godwin y Whitford, 1993; New Brunswick Scientific).

4.5. Tipo de cultivo

Los tipos de cultivo para células animales pueden ser divididos en dos clases: aquellos en los que las células crecen sedimentadas en el fondo del recipiente de cultivo, también conocidos como cultivos estáticos, o aquellos en los que las células crecen en suspensión en el medio de cultivo. El sistema con mayores ventajas es el cultivo en suspensión en bioreactores ya que se pueden alcanzar altas productividades para cultivos de células de insecto y permite un control adecuado del cultivo debido a su inherente homogeneidad.

Los cultivos estáticos fueron utilizados principalmente para generar los inoculos celulares para los experimentos posteriores. Estos cultivos se realizaron en frascos de cultivo de 25 cm² (Costar, No. de catálogo 3374) o 75 cm² (Costar, No. de catálogo 3375) (**Figura 4.3**). Como las células de insecto se adhieren débilmente a las paredes de los frascos de cultivo, estas pueden ser despegadas por medio del pipeteo del medio de cultivo de forma repetida hasta que las células están en suspensión y después se pasan a otro frasco.

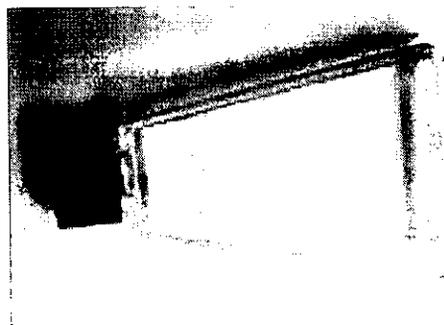


Figura 4.4. Cultivos estáticos en frascos de 25 cm².

Para los cultivos en suspensión se utilizaron dos tipos de frascos: frascos agitados y matraces agitados (**Figura 4.4**). Los frascos agitados ("spinners") tienen un volumen total de 250 ml y fueron utilizados con 60 ml de volumen de trabajo. La agitación se lleva a cabo a 100 rpm mediante una barra magnética que se encuentra suspendida a 3mm del fondo del frasco y los frascos se mantienen en una incubadora a 27°C. Los matraces agitados se mantuvieron a las mismas condiciones de cultivo que los frascos agitados en una incubadora con plataforma adherible. El volumen de los matraces fue de 125 ml y 250 ml y se utilizaron con un volumen de trabajo del 10 % del volumen total de los matraces.



Figura 4.5. Cultivos en frascos ("spinners") y en matraces agitados ("shakers").

4.6. Determinación de parámetros cinéticos

Para calcular la velocidad de crecimiento se calculó el logaritmo natural del cociente de la concentración de células vivas (X_v) y la concentración de células vivas iniciales (X_{vi}). El

logaritmo del cociente anterior (X_v/X_{vi}) fue graficado contra el tiempo post-infección de lo cual se obtuvo una línea recta con pendiente igual a la velocidad específica de crecimiento aparente (μ_{ap}). Lo anterior se basa en lo siguiente:

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_{ap} X_v \quad 4.10.1$$

Integrando la ecuación anterior se obtiene la expresión que describe la velocidad de crecimiento:

$$\ln \frac{X_v}{X_{vi}} = \mu_{ap} (t - t_i) \quad 4.10.2$$

El cálculo de las velocidades específicas de producción de proteína recombinante se realizó tomando en cuenta el crecimiento en la fase exponencial del cultivo. Para dichos cálculos se empleó la siguiente ecuación:

$$q_{prot} = \frac{(p_f - p_i)}{((X_{vf} + X_{vi})/2) * (t_f - t_i)} \quad 4.10.3$$

donde: q_{prot} es la velocidad específica de producción de proteína, p_f y p_i son las concentraciones de proteína final e inicial, X_{vf} y X_{vi} son las concentraciones celulares viables final e inicial y t_f y t_i son los tiempos final e inicial, respectivamente.

Los rendimientos fueron calculados a los tiempos en los que se alcanzó la concentración de proteína máxima, es decir se presentan rendimientos máximos. Estos rendimientos fueron calculados como:

$$Y_{prot} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{X_v} \quad 4.10.4$$

donde: Y_{prot} es el rendimiento específico máximo y $P_{m\acute{a}x}$ es la concentración máxima de proteína.

5. Resultados

5.1. Generación del estándar de rotavirus nativo para usarlo como control de geles

Uno de los problemas iniciales fue la falta de un método de cuantificación adecuado para la proteína recombinante producida. Para subsanar esto, el primer paso fue generar un estándar a partir de la purificación de partículas de rotavirus.

Las células MA104 fueron infectadas con el rotavirus nativo de la cepa SA11. Se purificó el virus y se observaron las 4 proteínas estructurales de rotavirus (VP2, VP6, VP7, VP4). Este resultado concuerda con resultados obtenidos previamente, en los que también se purificaron proteínas nativas de rotavirus por medio de una estrategia de purificación similar (Chen y Ramig, 1992). Con este estándar se comprobó que la proteína recombinante VP7 comigraba con la proteína nativa respectiva de rotavirus (**Figura 5.1**).

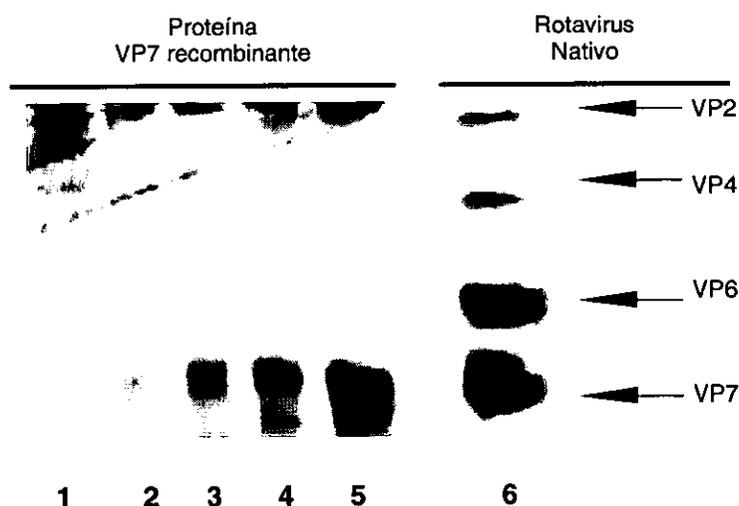


Figura 5.1. Inmunodetección del rotavirus purificado. Se presenta una cinética de producción de VP7 recombinante (24h, 48h, 72h, 96h, 120h – carriles 1 al 5, respectivamente-). Como control interno del gel se usó una muestra de rotavirus nativo puro (carril 6). Se pueden apreciar claramente 4 proteínas estructurales de rotavirus nativo.

Para la cuantificación de proteína total de rotavirus se empleó el método de Bradford. La cantidad de proteína total en el estándar fue 248 ng/μl. Debido a que se conoce el porcentaje teórico de cada una de las proteínas estructurales que conforman al virus, fue posible

determinar la cantidad de cada una de estas contenidas en el estándar considerando la cantidad de proteína total obtenida previamente.

5.2. Efecto de la MDI sobre la producción de VP7

En el sistema células de insecto-baculovirus se han alcanzado altas productividades para la expresión de algunas proteínas recombinantes (Maiorella et al., 1988). Sin embargo, poco se sabe acerca de los parámetros clave a estudiar para mejorar la expresión de proteínas recombinantes de rotavirus. De ahí el interés por el estudio de parámetros tales como la multiplicidad de infección, la cuál ha mostrado ser determinante en la optimización de la productividad de otros sistemas de expresión o de otras proteínas expresadas en el sistema células de insecto-baculovirus.

5.2.1. Multiplicidad de infección

Para evaluar el efecto de variaciones en la multiplicidad de infección se realizaron cultivos en suspensión en donde se agregaron distintas cantidades de virus. Los experimentos fueron realizados por triplicado a MDI de 0.1, 1, 5 y 10.

5.2.1.1. Multiplicidad de infección de 0.1

La cinética promedio de crecimiento del cultivo infectado a MDI = 0.1 se muestra en la **Figura 5.2** (panel A). Las células infectadas presentan una etapa de crecimiento exponencial debido a que a esta MDI no todas las células son infectadas en un principio, por lo que las células sin infectar son capaces de replicarse (Kioukia et al., 1995). Los resultados de esta infección muestran un aumento significativo en la concentración celular a lo largo de la infección, por lo cual se confirma que no todas las células están siendo infectadas desde el principio de este proceso (panel A, **Figura 5.2**). La máxima concentración celular total se alcanzó a las 117 horas, tiempo en el que se suspendió el cultivo. Esta concentración fue 2 veces más alta que la concentración celular total inicial. En cuanto al incremento en la concentración celular viable, el máximo valor también se alcanzó al mismo tiempo post-infección pero este incremento fue de tan sólo 1.7 veces el valor de la concentración celular viable inicial (panel A, **Figura 5.2**).

Incrementos en el tamaño celular se han correlacionado con el progreso de la infección viral. De ahí que en este estudio se haya medido el tamaño celular, con la finalidad de ver si existe tal correlación en este sistema de expresión. El tamaño celular promedio para el cultivo infectado a una MDI = 0.1 aumentó más rápidamente que el cultivo no infectado y alcanzó su máximo a las 95 horas post-infección. Sin embargo a las 117 horas los valores del tamaño celular promedio para ambos cultivos no mostraron diferencias importantes. Resultados similares han sido mencionados en otros trabajos en los que se observa una modificación del tamaño celular promedio en respuesta a la infección (panel B, **Figura 5.2**) (Jain et al., 1991).

La proteína recombinante fue detectada desde las 67 horas post-infección (panel C, **Figura 5.2**) y alcanza un máximo a las 117 horas post-infección (después de este tiempo de infección la concentración de proteína decreció). Este mismo comportamiento ha sido observado previamente, ya que en experimentos en los que se han empleado MDI bajas los cultivos tardan más en producir el producto recombinante de interés. Al aumentar este tiempo de expresión, se incrementa la probabilidad de que las células que se van lisando liberen proteasas celulares las cuales podrían llegar a degradar la proteína recombinante recién sintetizada (a la proteína extracelular). Además de la liberación de proteasas, se liberan proteínas celulares que dificultan la purificación de la proteína recombinante (Radford et al., 1997).

A valores tan bajos de virus, no todas las células son infectadas desde un inicio durante una infección primaria. Las células que no fueron infectadas durante la infección primaria son infectadas como resultado de la generación de la progenie viral de la infección primaria, dando lugar así a una infección secundaria. Al combinar una MDI baja con una concentración celular inicial baja se pueden llegar a obtener niveles de proteína comparables a los obtenidos a MDI más altas. Estos resultados se basan en que es posible calcular, mediante el uso de un modelo matemático propuesto por Power et al., la concentración celular viable al inicio de la infección (TDI) en función de la MDI (Wong et al., 1996).

Los valores para los títulos virales de esta infección fueron menores al compararlos con resultados reportados por otros autores; aunque una posible explicación para este resultado puede estar en función del baculovirus recombinante empleado. El título viral muestra un

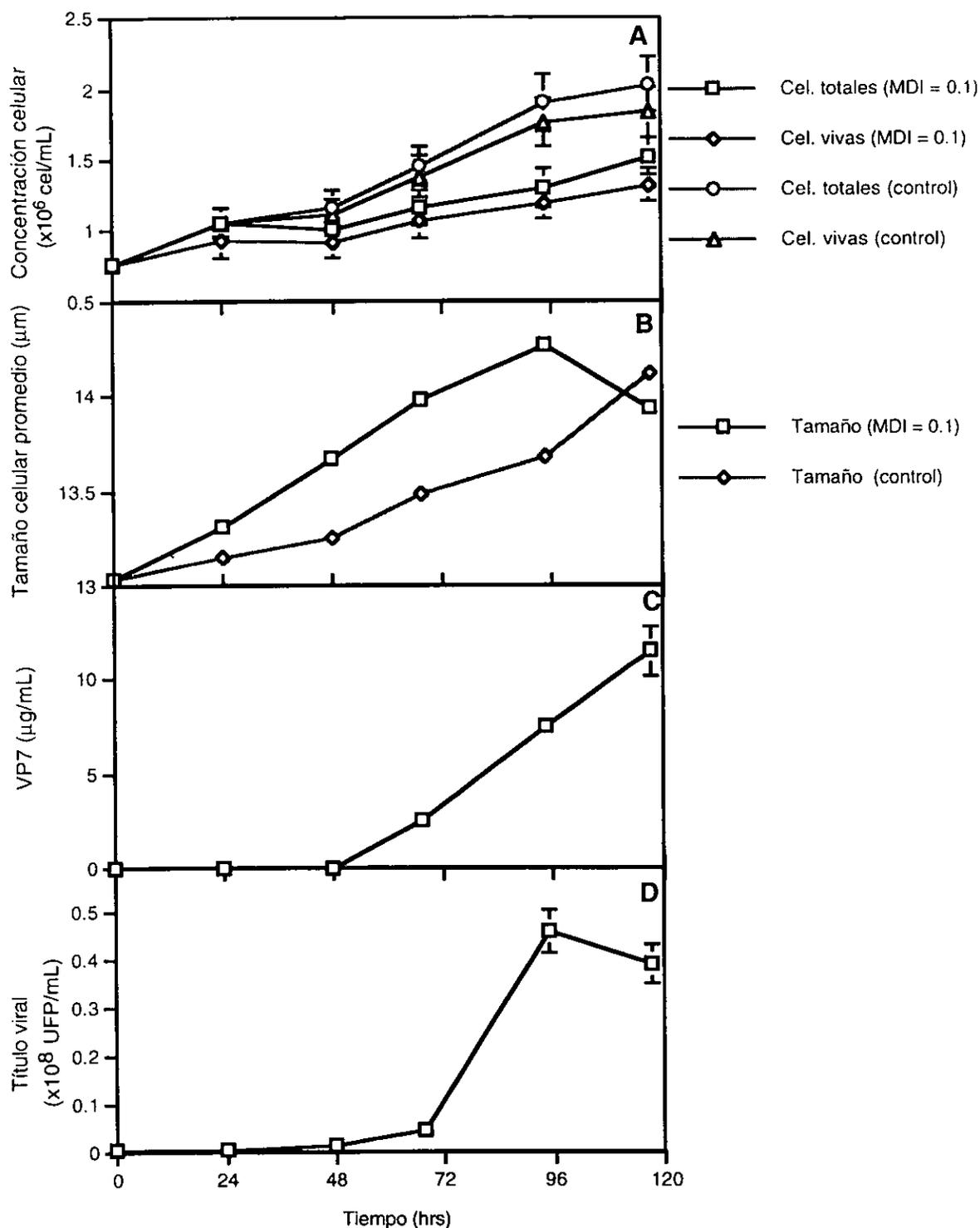


Figura 5.2 Cultivo infectado a MDI = 0.1 UFP/cel. Concentración celular total y viable (A), tamaño celular promedio (B), concentración de VP7 recombinante (C), título viral (D). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

comportamiento exponencial de las 0 a las 95 horas de cultivo y alcanza un máximo de 0.46×10^8 UFP/ml a las 95 horas post-infección. Este máximo título viral muestra un incremento de 373 veces con respecto al valor inicial del título viral. Después de las 95 horas se observa una disminución no significativa en este parámetro - de las 95 a las 117 horas se tiene un decremento de 1.2 veces - (panel D, **Figura 5.2**).

5.2.1.2. Multiplicidad de infección de 1

Al igual que en el caso anterior, se esperaría que al elevar la MDI a 1 se pudiera observar una etapa de crecimiento celular exponencial la cual corroboraría que al trabajar con MDI bajas no se estuvieran infectando todas las células desde el principio de este proceso (Wong et al., 1996).

En la gráfica de la concentración celular fue posible corroborar un comportamiento como el esperado pues se observó un aumento significativo en la concentración celular al comparar la máxima concentración celular con la concentración celular inicial. Aunque a esta MDI también se tiene una infección secundaria, el rendimiento de proteína recombinante, así como la productividad del sistema son más altos que los obtenidos a MDI de 0.1. Estos resultados concuerdan bien con el hecho de que la infección se llevó a cabo con una cantidad de virus más elevada. La **Figura 5.3** muestra las cinéticas de crecimiento celular, de tamaño celular promedio, de producción de proteína y virus recombinantes a una MDI de 1. En el panel A se muestran las cinéticas de crecimiento de las células infectadas (totales y viables) a una MDI de 1 UFP/cel. La máxima concentración celular viable se alcanzó a las 92 horas post-infección y este valor fue de 1.6 veces más alto que el valor celular viable inicial. El crecimiento celular durante el tiempo total del cultivo indica que no todas las células fueron infectadas desde un principio a esta MDI, ya que es bien sabido que la infección de las células inhibe la replicación celular (panel A, **Figura 5.3**).

El máximo tamaño celular promedio para el cultivo infectado a una MDI de 1 se alcanzó a las 71 horas post-infección y este fue de 1.3 veces mayor que el tamaño celular inicial. Por otra parte, el máximo valor para el tamaño celular promedio del cultivo control se alcanzó a las 92 horas, e inclusive a este tiempo, el cultivo infectado mostró un tamaño celular promedio de 1.04 veces mayor que el cultivo control (panel B, **Figura 5.3**). Generalmente las células incrementan de

tamaño durante algunas fases del ciclo celular en las que componentes celulares son duplicados antes de la división celular. En el caso de células infectadas, una de las posibles causas de dicho aumento puede ser que durante la infección se incremente el contenido de DNA viral en el núcleo celular y de otros componentes necesarios para la replicación del virus (Al-Rubeai et al., 1995).

En el panel C se muestra la cinética de producción de VP7 (**Figura 5.3**). La proteína recombinante comenzó a ser detectada desde las 42 horas post-infección y alcanzó un máximo a las 120 horas post-infección. Al respecto hay que considerar que este sistema de expresión emplea un promotor muy tardío lo cual se traduce en que los máximos de concentración de la proteína recombinante se obtienen en tiempos cercanos a la lisis celular. Este tipo de promotores muy tardíos exhibe baja actividad durante la fase tardía (de 6 a 18 horas post-infección), pero se torna muy activo a partir de las 18 horas post-infección. Entre las 27 y las 48 horas post-infección, aproximadamente el 20% del RNA poliadenilado en las células corresponde al RNAm sintetizado a partir del promotor *polh* (O'Reilly et al., 1994).

En cuanto a la producción de virus recombinante (panel D, **Figura 5.3**), el máximo título viral se obtuvo a las 92 horas post-infección y este fue de 85 veces el valor del título viral inicial. Posteriormente se observa una caída drástica en el título viral (de hasta 173 veces con respecto al valor del título viral máximo). El consumo de glucosa incrementa al utilizar multiplicidades de infección más altas (que 0.1 UFP/cel) (datos no mostrados), por lo que es importante verificar que en los cultivos infectados no se registre una limitación por algún sustrato. Al respecto, se han realizado estudios de los requerimientos de cultivos de células de insecto infectados y sin infectar (Vallaza y Petri, 1999). Uno de los resultados es que en algunos cultivos no es suficiente suplementar algunos nutrientes tales como la glucosa (Vallaza y Petri, 1999). Una alternativa es el recambio del medio de cultivo previo a la infección. Con esto se asegura que no haya limitación de nutrientes debido a que durante la infección se ha observado un incremento en el consumo de algunos nutrientes (Vallaza y Petri, 1999). Para el experimento a una MDI de 1 no se encontró limitación por glucosa; aunque cabe mencionar que los requerimientos de glucosa del cultivo infectado a una MDI de 1 son más elevados que los de un cultivo sin infectar.

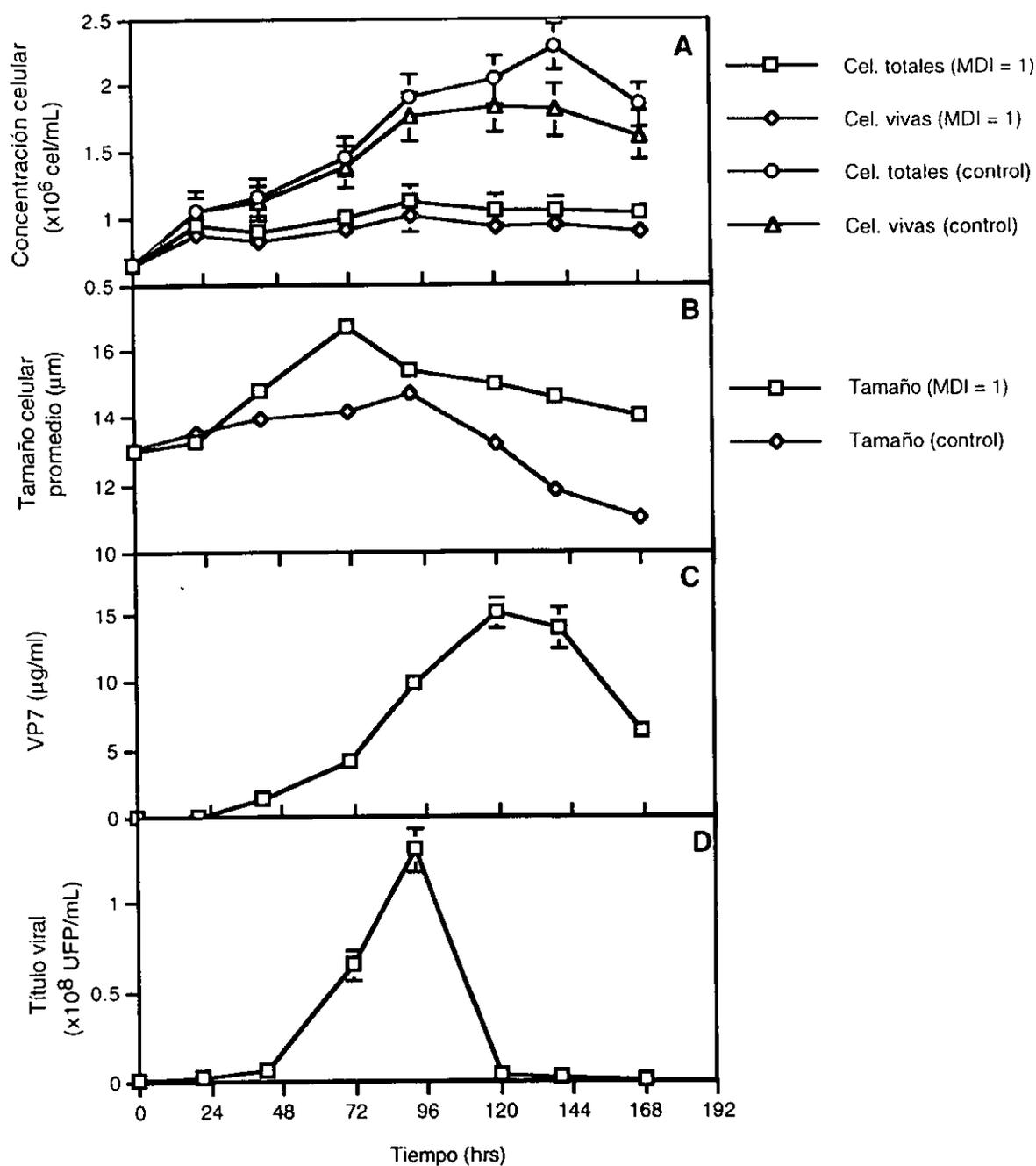


Figura 5.3 Cultivo infectado a MDI = 1 UFP/cel. Concentración celular total y viable (A), tamaño celular promedio (B), concentración de VP7 recombinante (C), título viral (D). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

En el caso del cultivo sin infectar, a las 168 horas post-infección se consumió 1.08 veces menos glucosa que en el cultivo infectado (datos no mostrados).

Si se comparan los resultados para VP7 a una MDI de 1 con los obtenidos previamente en el laboratorio para otra proteína de rotavirus, VP4, se observa que para VP4 se pudo lograr un incremento en la concentración celular de 2.3 veces (comparando la máxima concentración celular viable con la concentración viable inicial), mientras que en el caso de VP7 este incremento fue de tan sólo 1.6 veces (datos no publicados de Petricevich V.). La máxima concentración de VP4 se obtuvo a las 114 hpi mientras que para VP7 se obtuvo a las 120 hpi. Por último el máximo título viral se obtuvo a las 90 hpi y a las 92 hpi para VP4 y VP7, respectivamente. Cabe mencionar que se obtuvieron valores similares para los máximos de títulos virales para ambas proteínas.

5.2.1.3. Multiplicidad de infección de 5

A esta MDI se observó una máxima concentración celular total a las 42 horas y el incremento en la concentración celular total con respecto a la inicial fue de 1.5 veces. La máxima concentración celular viable se obtuvo al mismo tiempo post-infección y esta presentó un incremento de 1.2 veces con respecto al valor inicial (panel A, **Figura 5.4**).

Además con esta MDI fue posible obtener niveles de proteína mucho más altos que a las MDI de 0.1 y 1. Al comparar las máximas concentraciones de proteína recombinante se observó que a la MDI de 5 se obtenían 4.46 veces y 3.38 veces más proteína que a las MDI de 0.1 y 1, respectivamente. Además se encontraron diferencias significativas en el tiempo al cual se alcanzaba la máxima concentración de proteína recombinante al comparar las MDI de 0.1, 1 y 5. A MDI de 0.1 y 1 el máximo no se obtiene sino hasta las 117 - 120 horas, mientras que a una MDI de 5 este se obtiene desde las 66 horas. Esto es de gran importancia al evaluar parámetros tales como la productividad del sistema (panel C, **Figura 5.4**). El máximo de proteína se obtiene a tiempos más tempranos que en las MDI anteriores, probablemente debido a que a esta MDI más células están siendo infectadas en un principio. Esta infección más eficiente provoca una caída más drástica en la viabilidad del cultivo, por lo que el máximo de proteína se detecta a tiempos más tempranos que en el caso de MDI más bajas en los que los cultivos están sujetos a una infección secundaria (Zheng et al., 1999).

El valor máximo para el título viral se obtiene alrededor de las 138 horas post-infección y este fue de 7.6 veces más alto que el título viral inicial. Este resultado no concuerda bien con los resultados obtenidos para la producción de proteína en los cuales claramente se observa un adelanto en la fase de producción de la misma. En el caso del virus, al contrario de cómo se esperaría, la producción se ve retrasada de manera importante al comparar el tiempo en el que se alcanzan los máximos del título viral obtenidos a MDI de 0.1 y 1. El resultado esperado era que al emplear cantidades de virus más elevadas (al usar una MDI de 5) que en los casos anteriores (MDI de 0.1 y 1) se adelantara la fase de producción de virus y que el valor del título viral también se viera incrementado (panel D, **Figura 5.4**). De ahí que se recomiende infectar los cultivos a una MDI de 5 en caso de querer incrementar la producción de proteína recombinante (y en casos en los que la progenie viral no sea de tanta importancia).

La concentración de células viables comenzó a disminuir a partir de las 42 horas post-infección. Esta caída es más rápida que la observada con las MDI de 0.1 y 1 (comienza a bajar a partir de las 67 y de las 120 horas post-infección, respectivamente) (panel A, **Figura 5.4**). Lo anterior se debe a que se emplean cantidades de virus más elevadas por lo que las células son lisadas más rápidamente. Un resultado similar ha sido reportado previamente; al incrementar la MDI de 1 a 50 UFP/cel en cultivos de células de insecto infectados con baculovirus nativo, en donde se ha observado una caída inmediata en la viabilidad del cultivo infectado (Kioukia et al., 1995).

El máximo tamaño celular promedio se alcanzó a las 18 horas post-infección y este fue 1.1 veces más alto que el tamaño celular inicial (panel B, **Figura 5.4**). Es importante mencionar que probablemente a la MDI de 5 se obtiene el máximo del tamaño celular promedio a tiempos más tempranos debido a que según modelos matemáticos propuestos para el proceso de infección (Power et al., 1994) a esta MDI se da una infección del 99.3% desde el comienzo de la infección. Se ha propuesto que al emplear MDI similares a ésta (MDI de 5, o inclusive más elevadas), más virus puedan estar entrando a la célula y de esa manera la maquinaria de replicación viral requiera de un número más elevado de precursores. Este incremento en el número de precursores y en el DNA viral en el núcleo celular puede estar correlacionado con el aumento del tamaño de las células infectadas (Al-Rubeai et al., 1995).

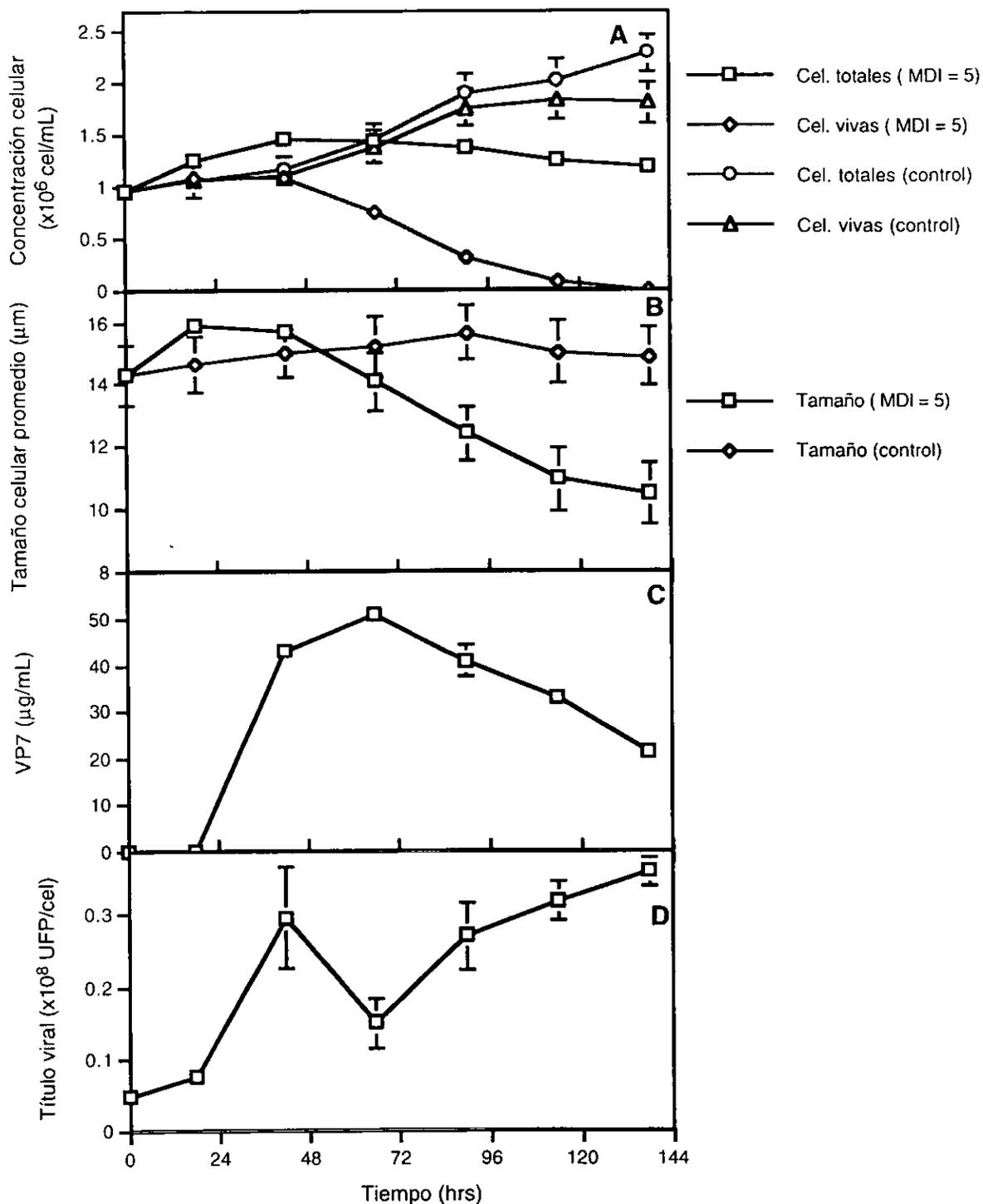


Figura 5.4 Cultivo infectado a MDI = 5 UFP/cel. Concentración celular total y viable (A), tamaño celular promedio (B), concentración de VP7 recombinante (C), título viral (D). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

A una MDI de 5, al igual que a una MDI de 1, se tuvo un mayor incremento en la concentración celular viable para los experimentos de producción de VP4 al comparar con el respectivo incremento registrado en los de VP7. La proteína VP4 alcanzó una máxima concentración a las 114 hpi, mientras que VP7 la alcanzó desde las 66 hpi. Finalmente, el máximo título viral para VP4 se registró a las 90 hpi mientras que para VP7 no fue sino hasta las 138 hpi (datos – no publicados - para VP4 por Petricevich V.).

5.2.1.4. Multiplicidad de infección de 10

A una MDI de 10 UFP/cel se observó una disminución en la concentración de proteína y un incremento en el título viral con respecto a los valores obtenidos a una MDI de 5 (paneles C y D, **Figura 5.5**). La baja en la concentración de proteína recombinante puede deberse a que a esta MDI cada célula es infectada por más de un virus provocando una lisis anticipada (Licari y Bailey, 1991). A esta MDI se espera (según modelos matemáticos que predicen la probabilidad de infección a cada MDI y que siguen una distribución de Poisson (de Gooijer et al., 1989; Licari y Bailey, 1992; Power et al., 1994; Tsao et al., 1996)) que todas las células fueran infectadas desde el inicio de la infección; caso en el que no existiría la posibilidad de que algunas células se duplicaran. Los resultados de este trabajo coinciden con el comportamiento predicho por los modelos matemáticos (panel A, **Figura 5.5**).

En este caso, el máximo tamaño celular promedio se registró a las 72 horas post-infección y este presentó un valor de 1.2 veces mayor que el tamaño celular promedio inicial (panel B, **Figura 5.5**). Aumentos similares en el tamaño celular promedio han sido previamente reportados para otro tipo de cultivos (Al-Rubeai et al., 1995). El tamaño celular del cultivo infectado a una MDI de 10 mostró un incremento durante las primeras 72 horas post-infección, posteriores a las cuales se registró un decremento significativo en este parámetro. Durante las primeras 72 horas el tamaño celular promedio del cultivo infectado presentó valores más altos que los observados en el cultivo control, sin embargo después de este tiempo los valores del tamaño celular promedio del cultivo control fueron más altos que los del cultivo infectado.

La producción de proteína recombinante, por otro lado, alcanza un máximo a las 72 horas post-infección y después comienza a decaer posiblemente debido a que la lisis celular libera proteasas al medio de cultivo (panel C, **Figura 5.5**). La posible presencia de proteasas podría

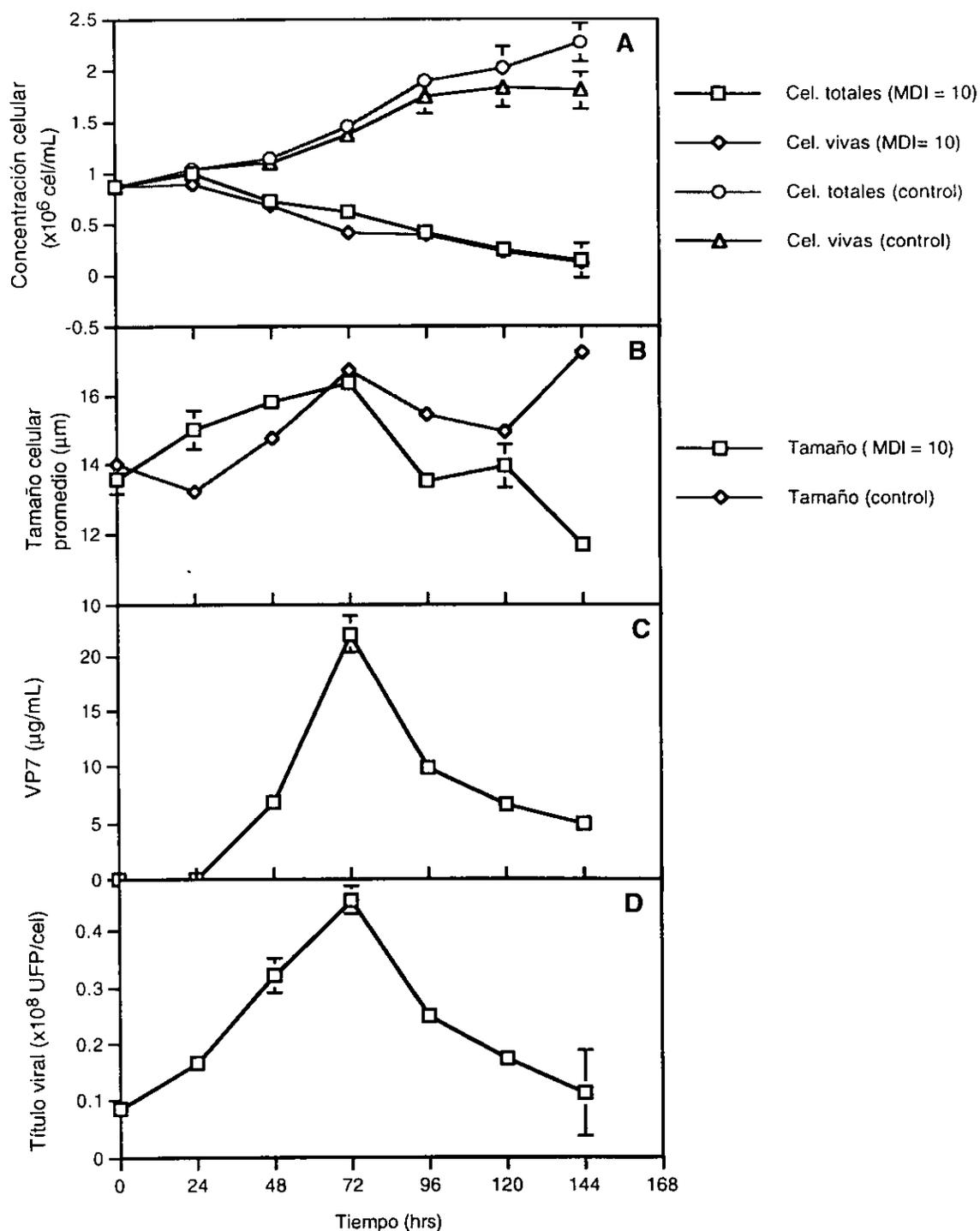


Figura 5.5 Cultivo infectado a MDI = 10 UFP/cel. Concentración celular total y viable (A), tamaño celular promedio (B), concentración de VP7 recombinante (C), título viral (D). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

tener un efecto negativo sobre la proteína producida. Una posibilidad es que a MDI altas sí sea posible alcanzar una concentración de proteína recombinante similar a la obtenida a MDI bajas, sin embargo la posible presencia de proteasas estaría teniendo un efecto sobre la degradación de la proteína (Licari y Bailey, 1991). El valor máximo para el título viral (fue de 5.2 veces más alto que el título viral inicial), al igual que el máximo valor para la proteína recombinante se obtuvo a las 72 horas post-infección y posteriormente comenzó a decaer (panel D, **Figura 5.5**).

A MDI de 10 también se observó un mayor incremento en la concentración celular viable para los experimentos de producción de VP4 al comparar con los resultados para los experimentos de VP7. La máxima concentración de proteína recombinante VP4 se alcanzó entre las 66 y las 90 hpi, mientras que para VP7 este máximo se obtuvo a las 72 hpi. El máximo título viral para VP4 se registró de las 90 a las 114 hpi mientras que para VP7 también se alcanzó a las 72 horas (al igual que el máximo de proteína) (datos – no publicados - para VP4 por Petricevich V.).

Una manera sencilla de comparar los resultados anteriores es analizar el efecto de las diferentes MDI's probadas sobre la máxima velocidad de crecimiento y la máxima concentración celular viable. En la **Figura 5.6** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento aparente (μ_{ap}) (panel A), el incremento en la concentración celular viable (panel B), la máxima concentración de proteína (panel C) y el máximo título viral (panel D) para cultivos infectados a diferentes MDI's. Los resultados muestran diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento a las diferentes MDI's probadas con respecto al cultivo control (MDI = 0), obteniendo el valor más alto a una MDI de 0.1. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar la velocidad de crecimiento a MDI de 0.1 con las encontradas a MDI's de 1 y de 5. El único valor que muestra diferencias significativas con respecto a MDI de 0.1 fue el caso de MDI de 10. La concentración celular viable máxima alcanzada se obtuvo a una MDI de 1. Cabe mencionar que solo se observó una diferencia significativa en el incremento máximo en la concentración celular viable al comparar los resultados de las diferentes MDI's probadas contra el cultivo control (MDI = 0) (**Figura 5.6**). La concentración máxima de proteína se obtiene a una MDI de 5 mientras que el título viral máximo se obtiene a una MDI de 1.

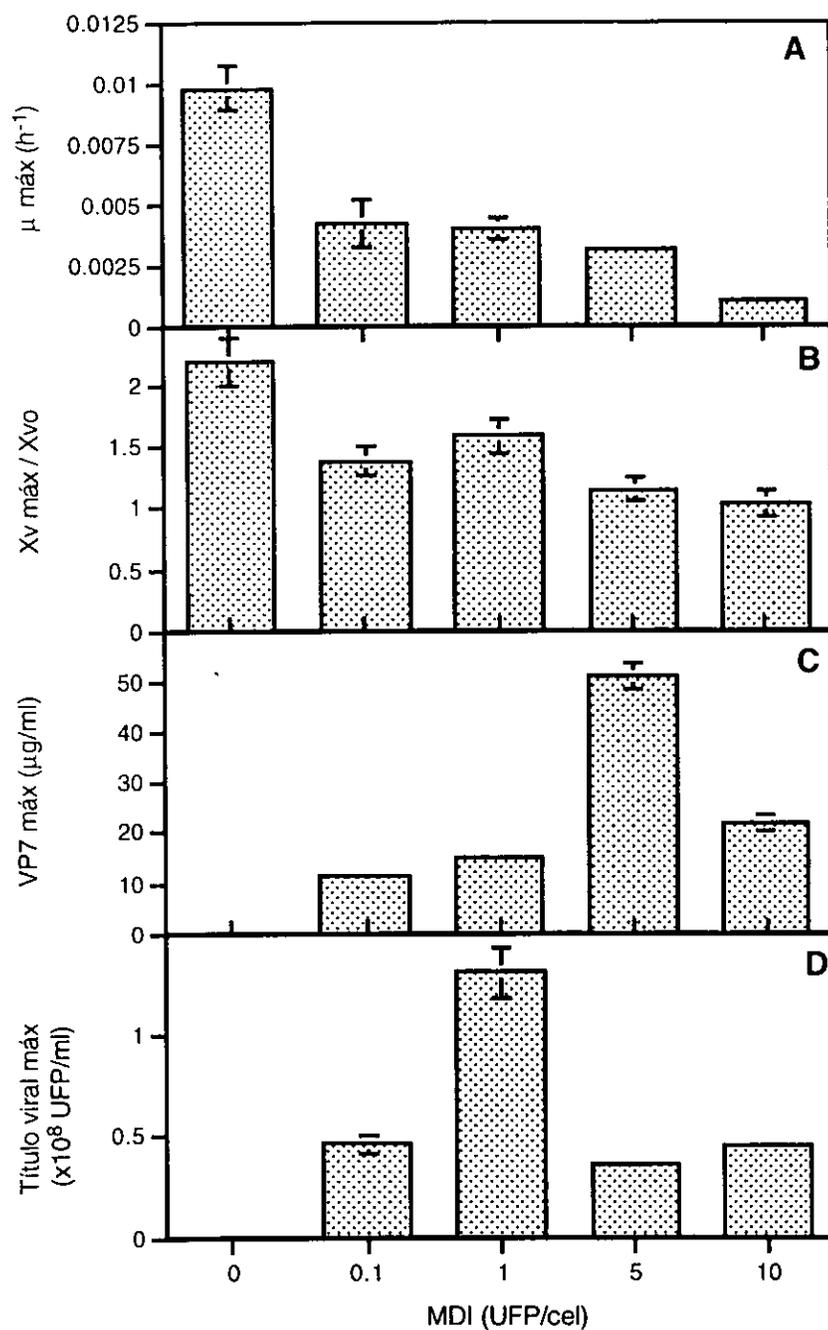


Figura 5.6 Efecto de variaciones en la MDI sobre la máxima velocidad específica de crecimiento (μ máx (h^{-1})) (A), la máxima concentración celular viable (X_v máx/ X_{vo}) (B), la concentración de VP7 máxima (C) y el título viral máximo (D) en cultivos infectados. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es muy pequeño.

En la **Figura 5.7** se muestran la velocidad específica máxima de producción de proteína durante la fase de crecimiento (panel A), la velocidad específica máxima de producción de proteína durante la fase de muerte (panel B) y el rendimiento específico máximo para la producción de VP7 (panel C). Es claro que a una MDI de 5 se puede obtener una mayor concentración de proteína recombinante de manera más rápida que en el resto de las multiplicidades (durante la fase de crecimiento, ya que durante la fase de muerte la velocidad específica máxima de producción se obtiene a una MDI de 10). El rendimiento máximo específico también se observó a una MDI de 5.

En conclusión, para la expresión de VP7 se encontró que la mejor MDI fue de 5 ya que con esta multiplicidad se puede obtener la máxima concentración de proteína recombinante (51 $\mu\text{g/ml}$) a las 66 horas post-infección. En caso de que el objetivo del trabajo hubiera sido incrementar el valor del título viral, entonces se recomendaría emplear una MDI de 1 (el máximo es de 1.3×10^8 UFP/ml y se alcanza a las 92 horas post-infección). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio para otra de las proteínas de rotavirus, VP4. En ese caso la máxima concentración de VP4 (28,000 UE/ml) se alcanza a las 114 horas post-infección empleando una concentración celular viable inicial (al momento de la infección) de 1.5×10^6 cel/ml, mientras que el máximo para el título viral (4.0×10^8 UFP/ml) se alcanza a las 90 horas post-infección (datos – no publicados - para VP4 por Petricevich V.).

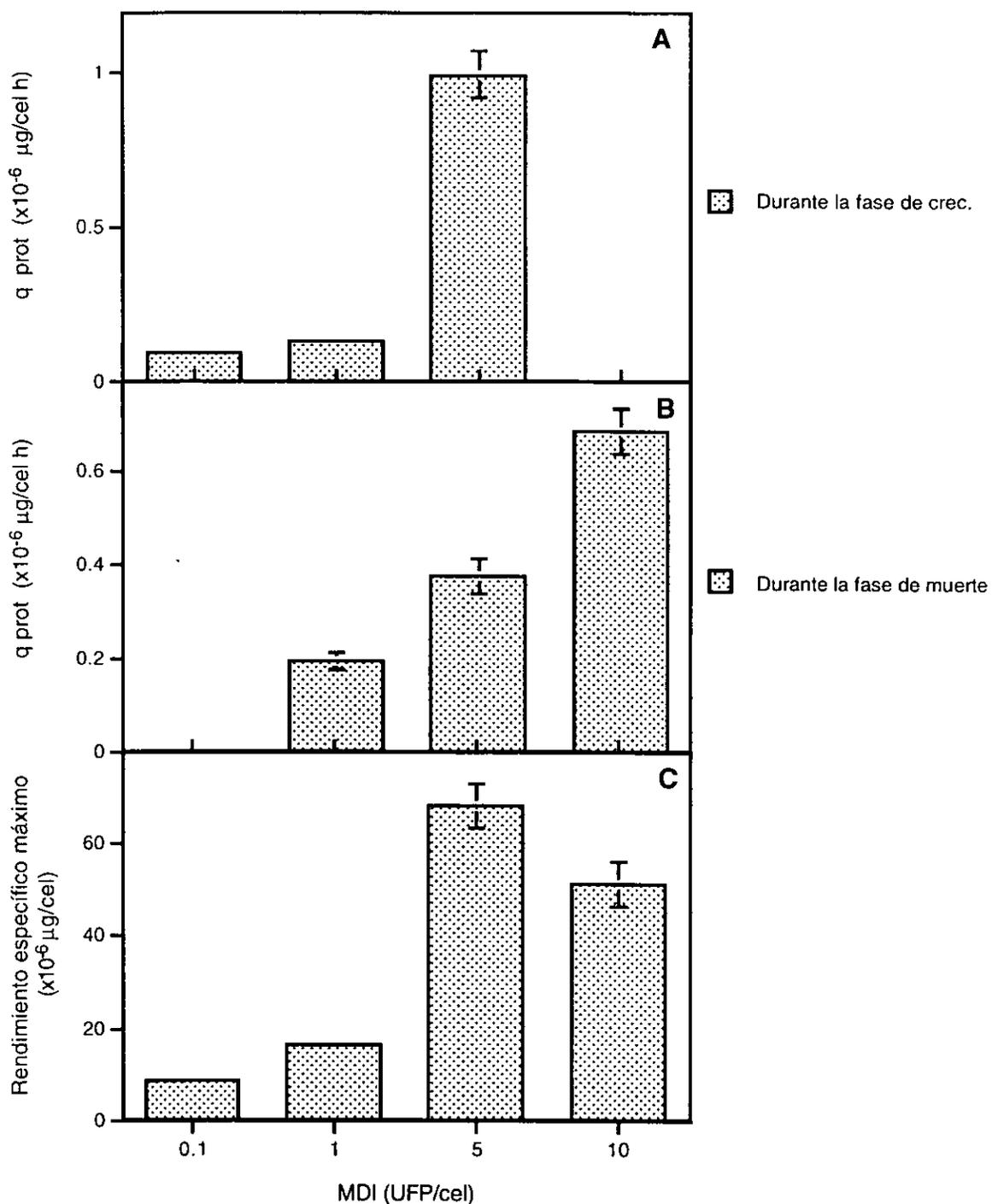


Figura 5.7 Velocidad específica máxima de producción de VP7 durante la fase de crecimiento (A), velocidad específica máxima de producción de VP7 durante la fase de muerte (B) y rendimiento específico máximo para VP7 (C) para cultivos infectados a distintas MDI's. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es muy pequeño.

5.3. Efecto del pH inicial sobre el crecimiento y el tamaño de las células Sf9

Es bien conocido que cambios en el pH inclusive menores tienen efecto sobre el metabolismo de células de eucariotes superiores. Con esta consideración se evaluó el efecto de modificaciones en el pH extracelular en el sistema células de insecto-baculovirus. Para dicha evaluación se realizaron cultivos estáticos y cultivos agitados. Para todos los experimentos se usó como control el pH de 6.2 ya que es el valor que tiene el medio de cultivo comercial Sf900II.

5.3.1. Cultivos estáticos

Para este tipo de cultivos se emplearon frascos de cultivo de 75 cm² y se evaluó el efecto de variaciones en el pH inicial en un intervalo de 6.0 a 7.0. Los resultados muestran el resultado de una cinética típica en la que se observa un aumento en la máxima concentración celular total con respecto a la inicial a pH's de 6.0 y 6.2 de 5.7 y 5.1 veces, respectivamente (panel A, **Figura 5.8**). En contraste, a pH de 6.6 el aumento en la concentración celular fue muy pequeño (1.9 veces), mientras que por arriba de este valor no hubo aumento.

La concentración de células viables presentó un comportamiento similar al observado para las células totales; es decir que pH's por debajo del control, incluyendo este último, presentan incrementos en la máxima concentración celular viable con respecto a la concentración celular viable inicial de 6.03 y 5.29 veces, respectivamente (panel B, **Figura 5.8**).

A pH inicial por arriba del control no se presentó una variación significativa en el pH con respecto al tiempo (panel C, **Figura 5.8**). Sin embargo, se observó acidificación del medio de cultivo después de las 72 horas a pH's de 6.0 y 6.2, lo cual correlaciona con la generación de lactato en el medio (se produjo hasta 0.4 g/l de lactato en cultivos de este tipo, datos no mostrados). Estos resultados coinciden con los resultados encontrados en estudios del efecto del pH en cultivos de células Sf9 y TN-368 (Koval y Suppes, 1990).

Por otra parte, se observó una disminución en el tamaño celular con respecto al inicial en los cultivos a pH's de 6.8 y 7.0 del 32% y del 35% respectivamente, como se muestra en el panel D de la **Figura 5.8**.

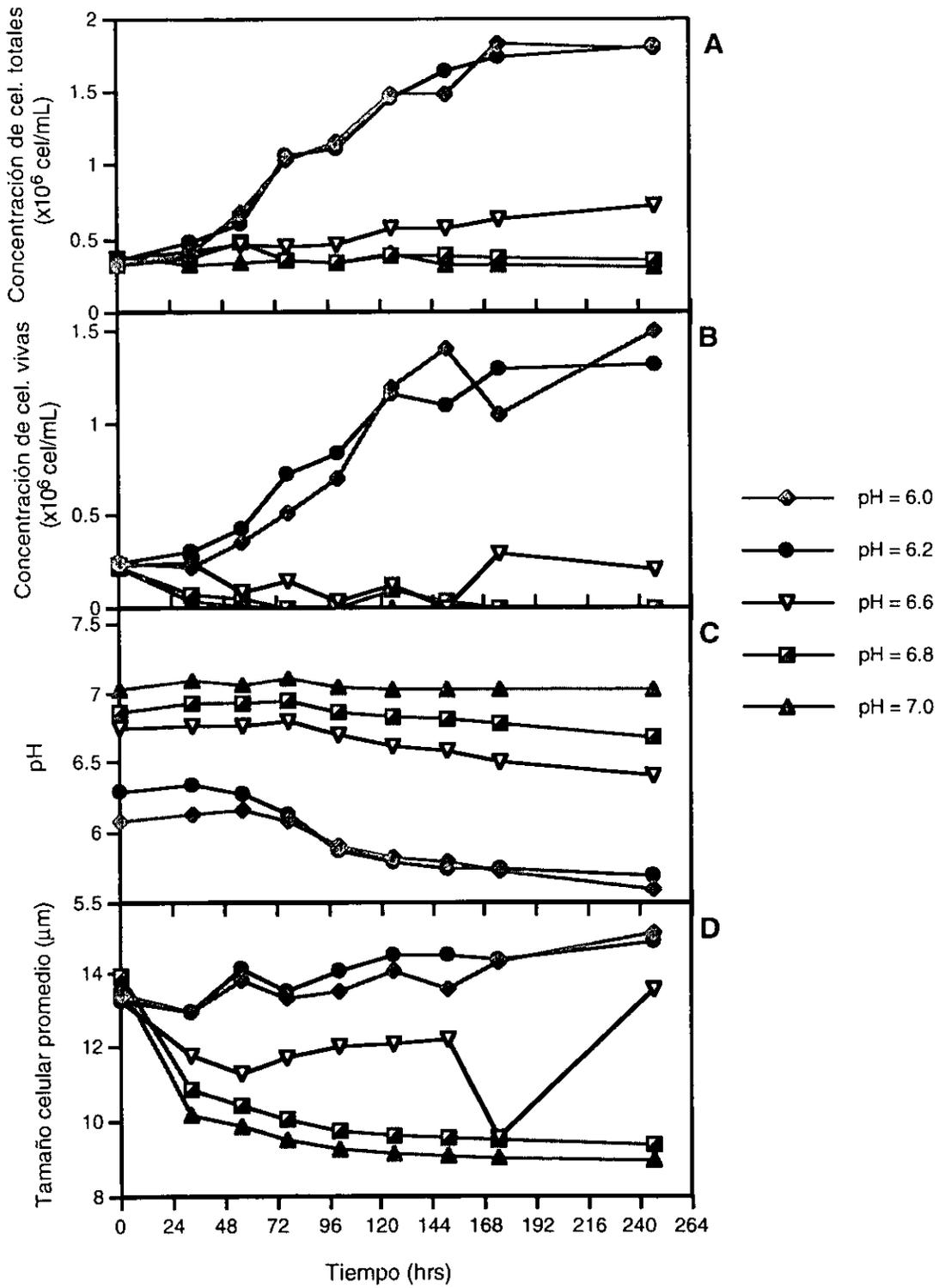


Figura 5.8 Efecto del pH en cultivo sin infectar en frascos de 75 cm². Concentración de células totales (A), concentración de células viables (B), pH (C), tamaño celular promedio (D).

Una posible explicación para este comportamiento sería que el cambio en la concentración de iones en el medio pudiera estar provocando la disminución en el tamaño celular promedio (Doyle y Butler, 1990). Otra explicación es que pH's de 6.6, 6.8 y 7.0 estén causando la muerte de las células y por tanto se observa una disminución en el tamaño celular (ver paneles A y B).

En la **Figura 5.9** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima de los cultivos realizados en frascos de cultivo de 75 cm². A pH de 6.0 se obtiene una velocidad de crecimiento 1.29 veces más alta que la presentada por el cultivo control. Es claro como se tiene un efecto negativo sobre la velocidad de crecimiento al emplear pH's por arriba del pH control ya que estos muestran disminuciones en la máxima velocidad de crecimiento de más del 100 por ciento.

En trabajos previos se ha observado que al emplear pH's de cultivo bajos (por debajo de 6.2), se obtienen velocidades de consumo de glucosa menores, lo cual se ve reflejado en la reducción de la producción de lactato generado en el cultivo. Esta baja en el consumo de glucosa se ha correlacionado con incrementos en la velocidad de consumo de glutamina. Una causa posible de este incremento en el consumo de glutamina puede atribuirse a que se requieran niveles más elevados de energía de mantenimiento para que las células compensen la baja en el consumo de glucosa (Miller et al., 1988).

La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo con pH de 6.0, aunque esta concentración no difiere de la concentración del cultivo control (pH = 6.2) ya que la primera es 1.14 veces mayor que la concentración del control. Las concentraciones celulares viables presentan valores bajos a los pH's por arriba del control, por lo que se corrobora el efecto negativo de estos pH's en los cultivos de células Sf9.

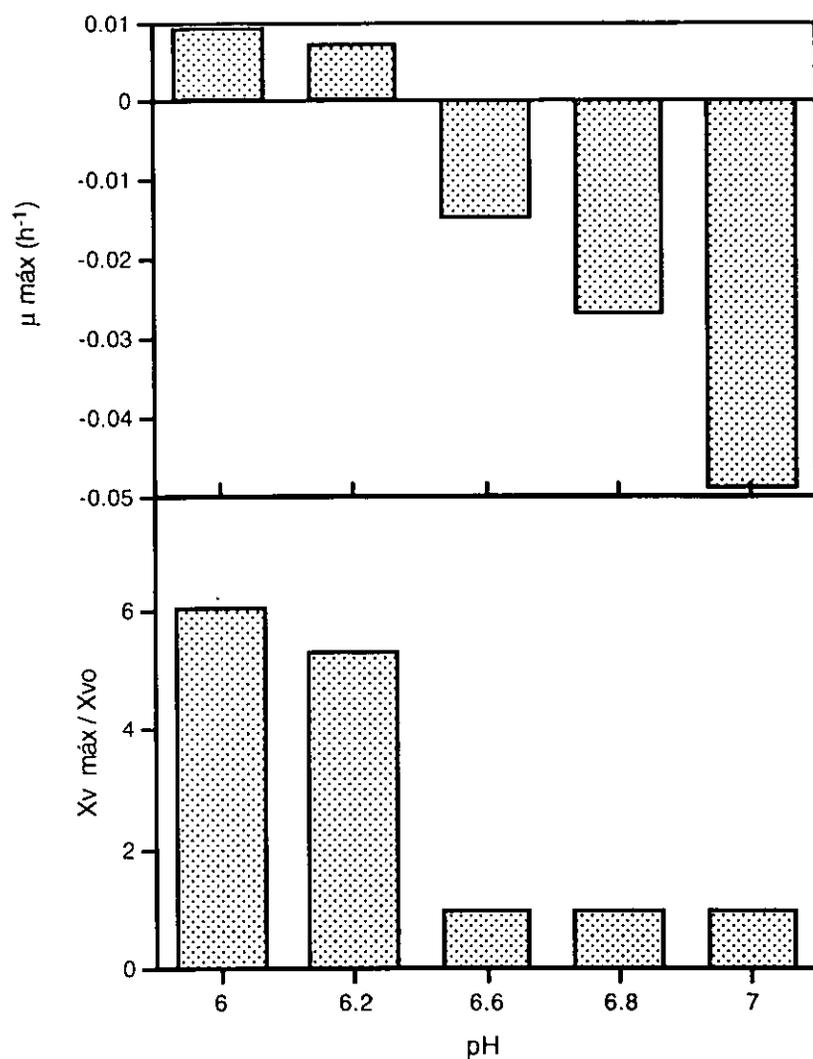


Figura 5.9 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en frascos de cultivo de 75 cm². Los valores negativos de μ indican velocidades específicas de muerte reales mayores a las velocidades reales de crecimiento.

5.3.2. Cultivos agitados

En estos experimentos se emplearon matraces agitados de 125 ml para evaluar el efecto del pH (en un intervalo de 4.8 a 7.0) sobre el crecimiento de células Sf9. En la **Figura 5.10** se muestra la media de experimentos realizados por duplicado. Al analizar la concentración celular total se observó un incremento a pH's entre 4.8 y 6.2; en contraste, la concentración celular descendió en pH's entre 6.6 y 7.0 (panel A, **Figura 5.10**). En los cultivos con pH's por debajo del control así como en el cultivo control, se obtuvieron incrementos de hasta más de 3 veces en la máxima concentración celular total con respecto a la concentración celular inicial, lo cual es indicativo de que estos pH's promueven el crecimiento celular (Zhang et al., 1994).

Una tendencia similar se presenta para el caso de la concentración de células viables (se observa un aumento de entre 2 y 3 veces, panel B, **Figura 5.10**). En relación con el pH del medio, en ninguno de los casos se presentó variación significativa con respecto al pH inicial y al tiempo (panel D, **Figura 5.10**) (Koval y Suppes, 1990). Es importante mencionar que se observó una disminución en el tamaño celular promedio del 27% y del 28% en los cultivos con pH's de 6.8 y 7.0 (panel C, **Figura 5.10**), lo cual es indicativo de la baja viabilidad de los mismos. A pesar de que podría pensarse que a estos pH's la síntesis de DNA podría verse afectada, algunos trabajos previos indican que la síntesis de DNA no sufre cambios significativos en un intervalo de pH similar al usado en este trabajo (Koval y Suppes, 1990).

Al comparar las tendencias de cultivos agitados en matraces de 125 ml y de 250 ml se encontraron algunas diferencias. En los matraces de 125 ml se observó un incremento en la máxima concentración celular viable con respecto a la concentración celular viable inicial de 4 veces (pH's de 5 y 5.5), de más de 3 veces (pH 5.35), de más de 2 veces (pH de 4.8), de más de 1 vez (pH's de 5.8 a 6.2) y de 1 vez (pH's de 6.6 a 7.0) (panel A, **Figura 5.11**). En los matraces de 250 ml, por otra parte, se obtuvieron incrementos en la máxima concentración celular viable con respecto a la concentración celular viable inicial de más de 6 veces (pH's de 6.0 y 6.2), de 4 veces (pH's de 5.8 y 6.6), y de 1 vez (pH's de 6.8 y 7.0) (panel B, **Figura 5.11**).

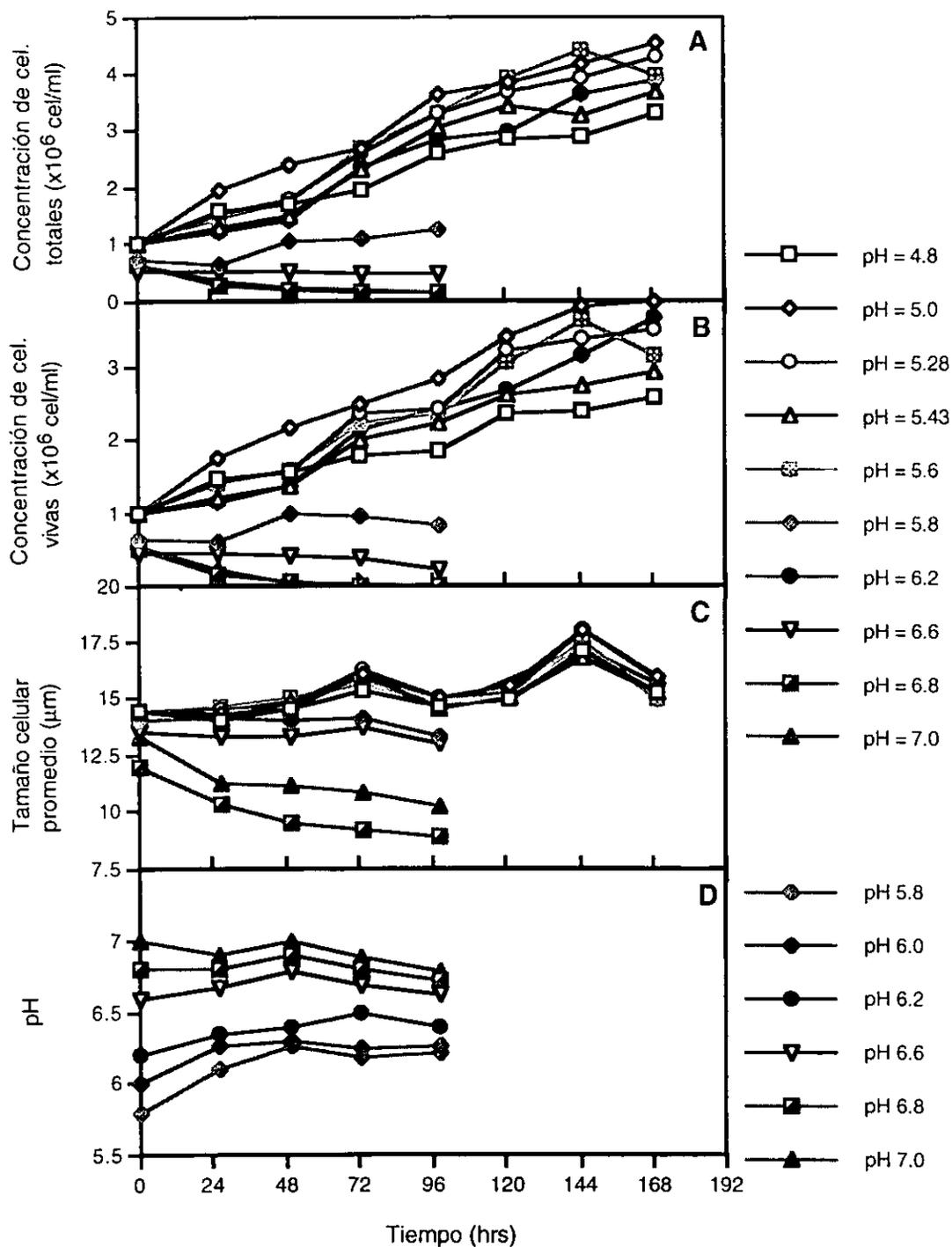


Figura 5.10 Efecto del pH en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml. Concentración de células totales (A), concentración de células vivas (B), tamaño celular promedio (C), pH (D). Se muestra la media de 2 experimentos.

Una de las posibles razones por las cuales se detectan las diferencias antes descritas podría deberse a que las células tienen una mayor área de transferencia de oxígeno y por ende una mayor concentración de oxígeno disuelto en los matraces agitados de 250 ml, por lo que se promueve un mayor crecimiento al comparar con los cultivos de 125 ml. Por otro lado, al comparar los cultivos agitados contra los cultivos estáticos (datos no mostrados) se observa que las concentraciones celulares máximas alcanzadas se obtuvieron en matraces agitados, lo cual puede ser atribuido a una mejor transferencia de oxígeno en estos últimos (por ende se tiene una mayor concentración de oxígeno disuelto) (Massote et al., 1999; Neutra et al., 1992).

Debido a que el ajuste del pH de cultivo se realizó empleando NaOH ó HCl, fue necesario descartar que el efecto observado sobre el tamaño celular promedio se debiera a la presencia de moléculas osmóticamente activas como lo son los iones Na^+ y el Cl^- . Se ha demostrado previamente que cambios mayores a 30 mOsm pueden ser atribuidos al efecto de moléculas osmóticamente activas. Los resultados obtenidos en todos los experimentos arrojaron valores menores a 10 mOsm, por lo cual este comportamiento puede ser atribuido principalmente al efecto del pH y no al efecto ejercido por el Na^+ y el Cl^- (Yang et al., 1996).

En la **Figura 5.12** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima para cultivos agitados en matraces de 125 ml. Los resultados muestran diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento a los diferentes pH's probados. El valor más alto se obtiene en cultivos con pH de 5.5 y este valor es 1.04 veces más elevado que el valor del cultivo control. Por otra parte, los cultivos a pH's por arriba del cultivo control, presentan velocidades de crecimiento negativas, lo cual confirma que estos pH's tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de las células Sf9. La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo a pH de 5.0, sin embargo, este valor no difiere significativamente de los observados para pH's de 5.35 y 5.5. Los cultivos con pH's por arriba del control no muestran un incremento en la máxima concentración celular viable. Los máximos valores para la concentración celular viable llegan a ser hasta 1.5 veces más altos que la máxima concentración celular viable obtenida en el cultivo control.

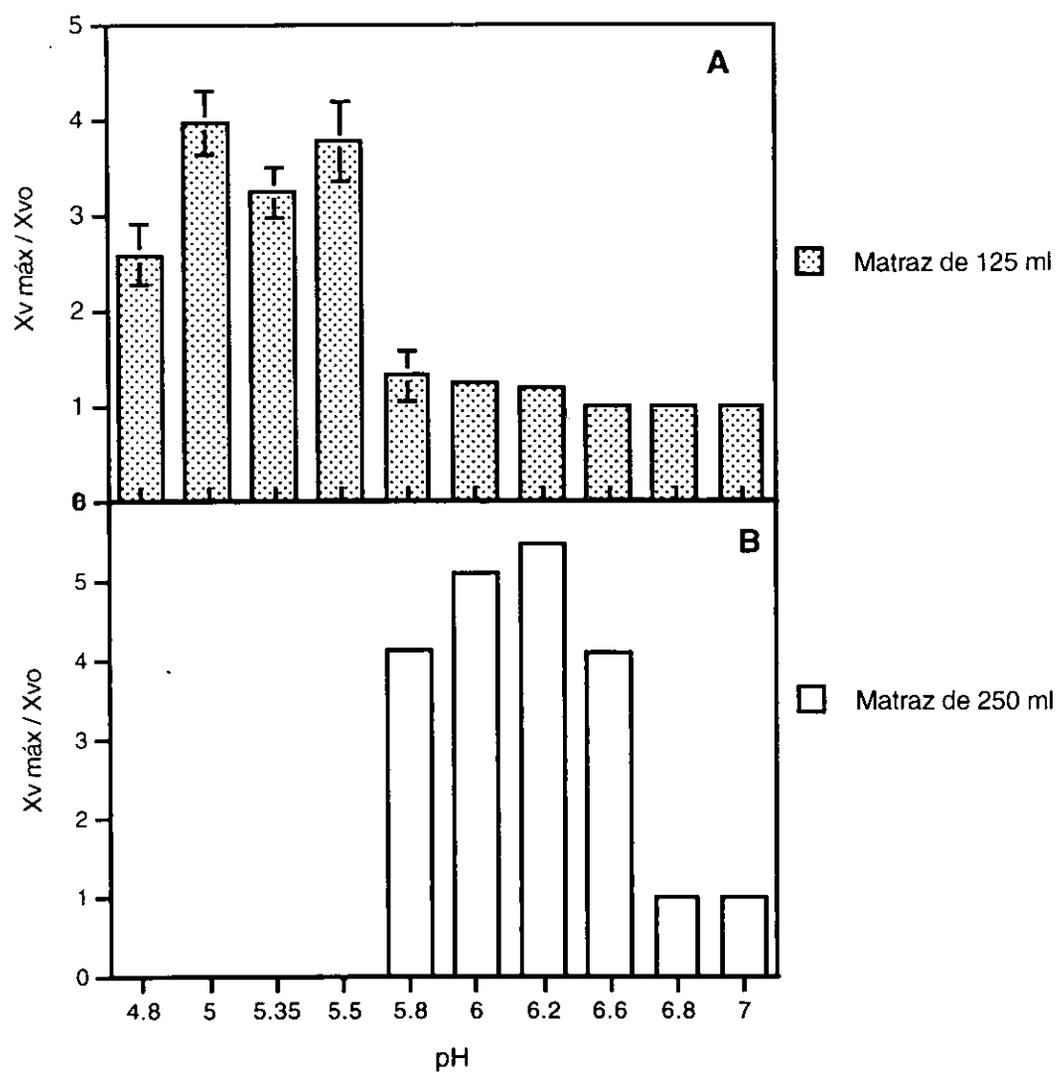


Figura 5.11 Efecto del pH en cultivos sin infectar sobre el incremento máximo de la concentración celular. Matraces de 125 ml (A) y matraces de 250 ml (B). Se muestra la media y desviación estándar de 3 experimentos (para 125ml) y la media de 2 experimentos (para 250ml).

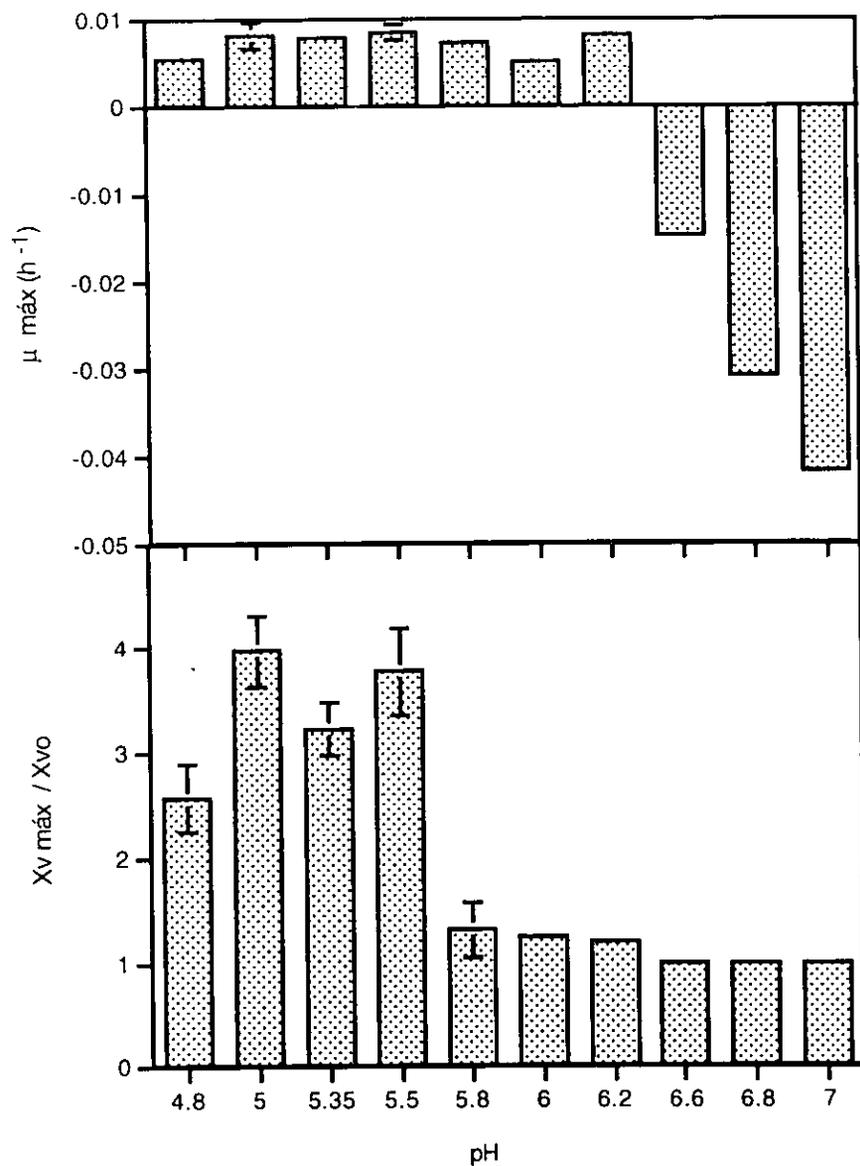


Figura 5.12 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces agitados de 125 ml. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. Las columnas que no muestran barras de error es debido a que el valor de la desviación estándar es muy pequeño.

Las variaciones en el crecimiento celular observadas en este trabajo se deben al efecto del pH y no al efecto osmótico de los iones Na^+ y Cl^- (con los que se hicieron las modificaciones de pH). Los pH's por debajo del pH control de 6.2 favorecen el crecimiento celular independientemente del tipo de cultivo (cultivos estáticos o cultivos agitados en matraces de 125 ml o 250 ml). pH's por arriba del cultivo control no son favorables para los cultivos de células Sf9 ya que muestran velocidades de crecimiento negativas, es decir que presentan velocidades específicas de muerte reales mayores a las velocidades reales de crecimiento.

5.4. Efecto del pH inicial en el título viral y en la producción de VP4

El título viral obtenido a pH de 4.8 fue 18.6 veces mayor que el del control, mientras que a pH de 5 el título fue 16.7 veces mayor que el del control. Por otra parte los pH's de 5.35 a 5.8 no mostraron diferencias significativas con respecto al control. En contraste, a pH's de 6.6, 6.8 y 7.0, se observaron títulos virales menores que los del control (panel A, **Figura 5.13**). Este resultado puede explicarse en terminos del efecto del pH sobre la interacción entre el virus y la membrana celular. Se ha visto que pH's ácidos inducen la fusión del virus con la membrana, favorecen la formación de sincicio (Leikina et al., 1992; Randolph y Stollar, 1990) y suelen promover la entrada del virus a la célula por endocitosis mediada por receptores (Volkman et al., 1985). La fusión del virus con la membrana celular es crítica para el ciclo de infección, ya que cataliza la penetración del virus desde el compartimento ácido del endosoma (Kielian y Helenius, 1985). Sin embargo, también se han observado casos en los que pH's por arriba del control son capaces de llevar a cabo una fusión directa con la membrana y no requieren de compartimentos ácidos para su entrada a la célula (como en el caso del virus de la influenza y del virus Semliki Forest) (Payne et al., 1990; Sturman et al., 1990).

Ya que el cambio de tamaño celular promedio se ha correlacionado tanto con la infección viral como con la replicación de la célula (Al-Rubeai et al., 1995; Jain et al., 1991), se procedió a determinar este parámetro a las diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo, con los distintos pH's no se observó un cambio significativo en este parámetro (panel B, **Figura 5.13**).

Los máximos valores de proteína se observaron a pH's entre 5.8 y 6.2, donde se demostró que el crecimiento celular es mayor, mientras que a pH's entre 6.6 y 7.0 la concentración de

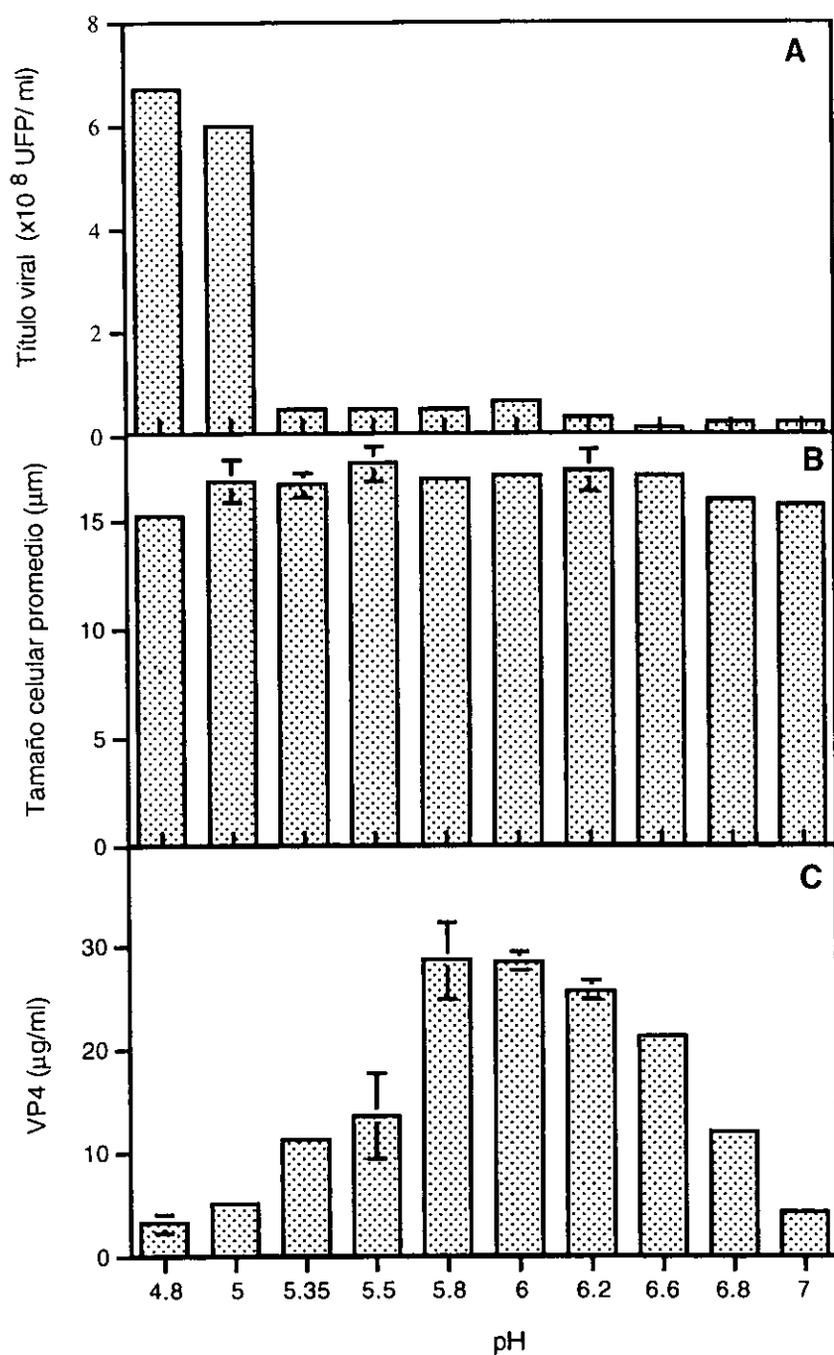


Figura 5.13. Efecto del pH en cultivos infectados en frascos agitados de 250 ml. Título viral (A), tamaño celular promedio (B), concentración de VP4 recombinante (C). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es muy pequeño.

proteína es baja ya que las células se encuentran en condiciones de cultivo no apropiadas para su crecimiento. Esto también correlaciona con que a valores de pH's más ácidos se promueve la entrada del virus a la célula. Si la entrada del virus es más eficiente, se puede promover un incremento en la transcripción de la proteína de interés (Fields et al., 1995).

En la **Figura 5.14** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima para cultivos infectados, agitados en matraces de 250 ml. Los resultados muestran diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento a los diferentes pH's probados. La máxima velocidad específica de crecimiento se obtiene en cultivos con pH de 6.0 y este valor es 2.5 veces mayor que el valor presentado por el cultivo control. La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo a pH de 4.8 y fue de 1.4 veces mayor que el control, sin embargo, este valor no difiere significativamente del valor observado a pH de 5.0.

Al igual que en el análisis del efecto del pH sobre el crecimiento de las células Sf9, es claro como pH's por debajo de 6.2, pero mayores a 5.5, permiten obtener concentraciones de VP4 mayores. Los títulos virales más elevados se obtienen a pH's de 4.8 y 5.0. Al parecer estos cambios de pH no tienen un efecto sobre el tamaño de las células infectadas, aún cuando se esperaría observar un incremento como resultado de la infección viral.

En la **Figura 5.15** se muestran la velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (panel A) y el rendimiento específico máximo para VP4 (panel B). Sin lugar a dudas a pH de 5.35 se favorece tanto la velocidad específica de producción de proteína recombinante como el rendimiento específico máximo. Esto probablemente se deba a que a este pH se favorece tanto la expresión de los genes que controlan la fase muy tardía (en la que se produce la proteína en este sistema) como los genes que controlan la fase temprana (en la que se produce el virus recombinante).

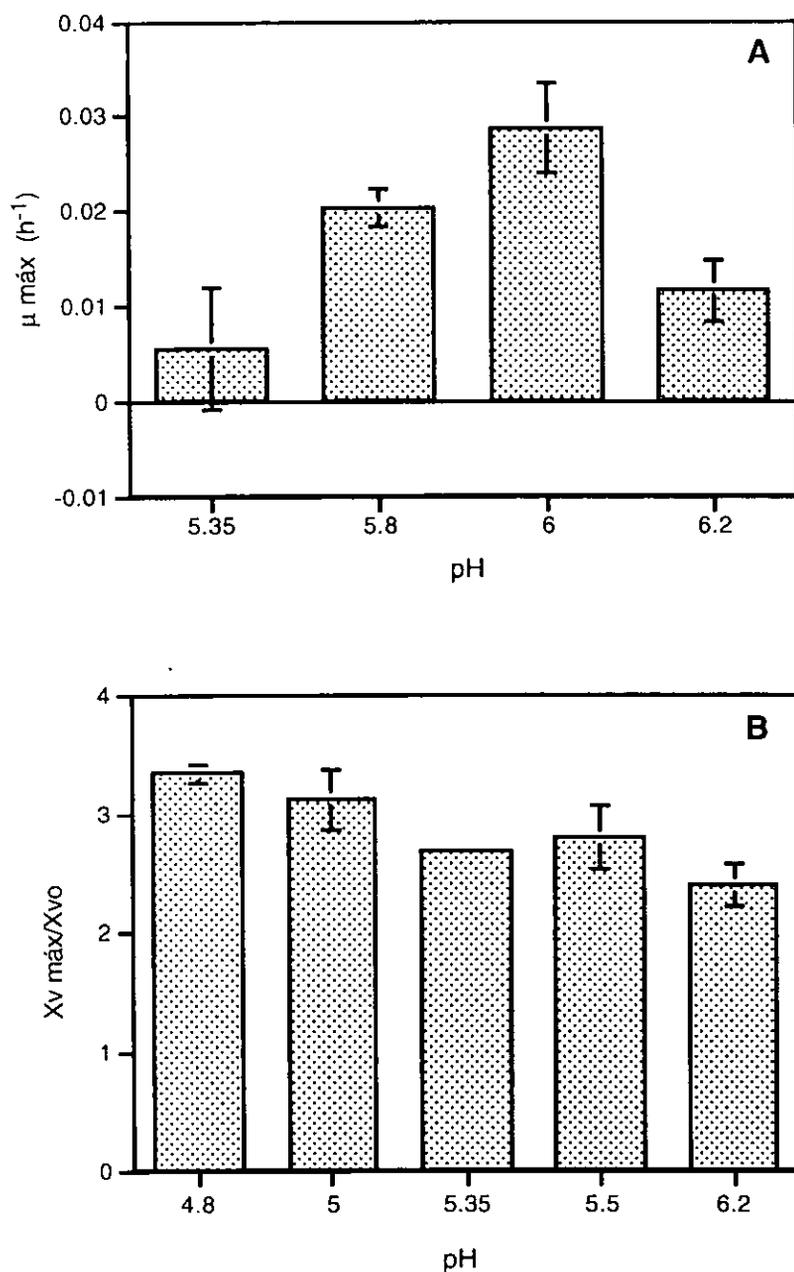


Figura 5.14 Efecto de variaciones en el pH en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces agitados de 250 ml. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es muy pequeño.

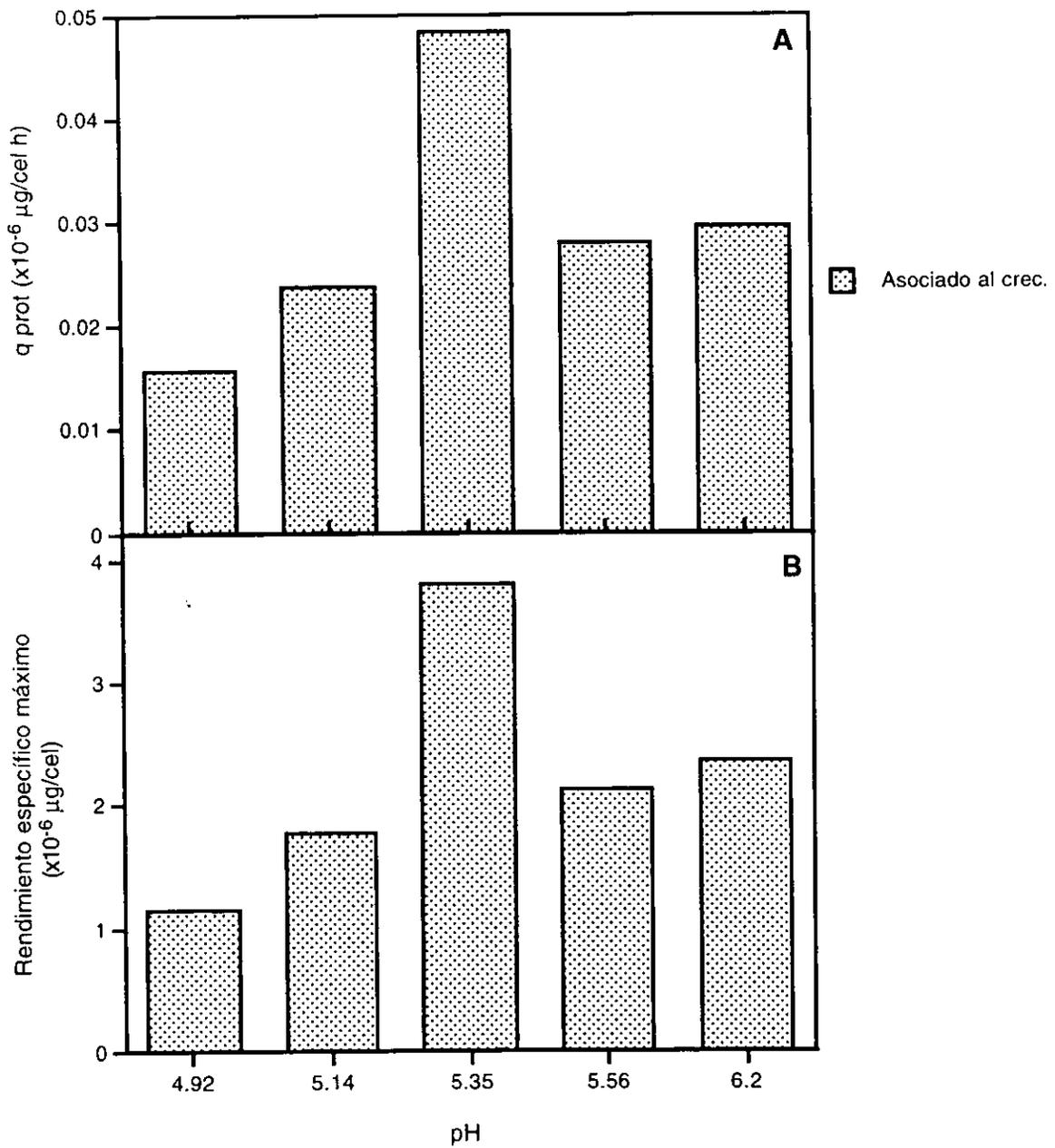


Figura 5.15 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (A) y rendimiento específico máximo para VP4 (B) en cultivos infectados a distintos pH's.

5.5. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento, la producción de VP4 y sobre el título viral

Existen algunos reportes en los que se ha demostrado que la temperatura para obtener un crecimiento celular adecuado y la temperatura para la producción de proteína recombinante no necesariamente son iguales (Reuveny et al., 1993; Shao-Hua et al., 1998). Por lo anterior se decidió probar distintas temperaturas con la finalidad de identificar una temperatura que favorezca el crecimiento celular y la producción de proteína y/o virus recombinantes.

En los cultivos sin infectar tanto a 30°C como a 37°C, a las 168 horas de cultivo casi todas las células estaban muertas mientras que el control mantenía aún una viabilidad de casi el 100% (panel A, **Figura 5.16**). En los cultivos sin infectar a 37°C fue posible calcular una constante de muerte desde el comienzo del cultivo, mientras que en el caso del control se calculó una constante de crecimiento de las 0 a las 168 horas (panel A, **Figura 5.16**). Tanto la viabilidad celular como el tamaño celular promedio mostraron decrementos considerables a temperaturas de 30°C y 37°C, mientras que los valores para el control se mantuvieron relativamente constantes durante todo el cultivo (panel B y C, **Figura 5.16**).

La disminución en la viabilidad podría ser compensada por medio de oscilaciones de temperatura. Se ha encontrado que al efectuar oscilaciones de temperatura se puede mantener la viabilidad de células no infectadas durante periodos más largos que en los cultivos control (Shao-Hua et al., 1998). Inclusive se han realizado trabajos en los que se ha oscilado la temperatura con la finalidad de prolongar la viabilidad de cultivos infectados (Shao-Hua et al., 1998), para de esa manera prolongar también la expresión de proteínas recombinantes (Shao-Hua et al., 1998). Además, las oscilaciones se proponen, ya que de esta manera las células se adaptan gradualmente a los cambios de temperatura y de esa manera se evita un choque térmico que generalmente se ve reflejado en la disminución de la viabilidad. En el caso de los cultivos infectados, las oscilaciones promueven también la producción de virus. Aunque temperaturas bajas se reflejan en una disminución en la velocidad de infección, esto permite que en el cultivo queden algunas células viables sin infectar, las cuales se replican y dan lugar a

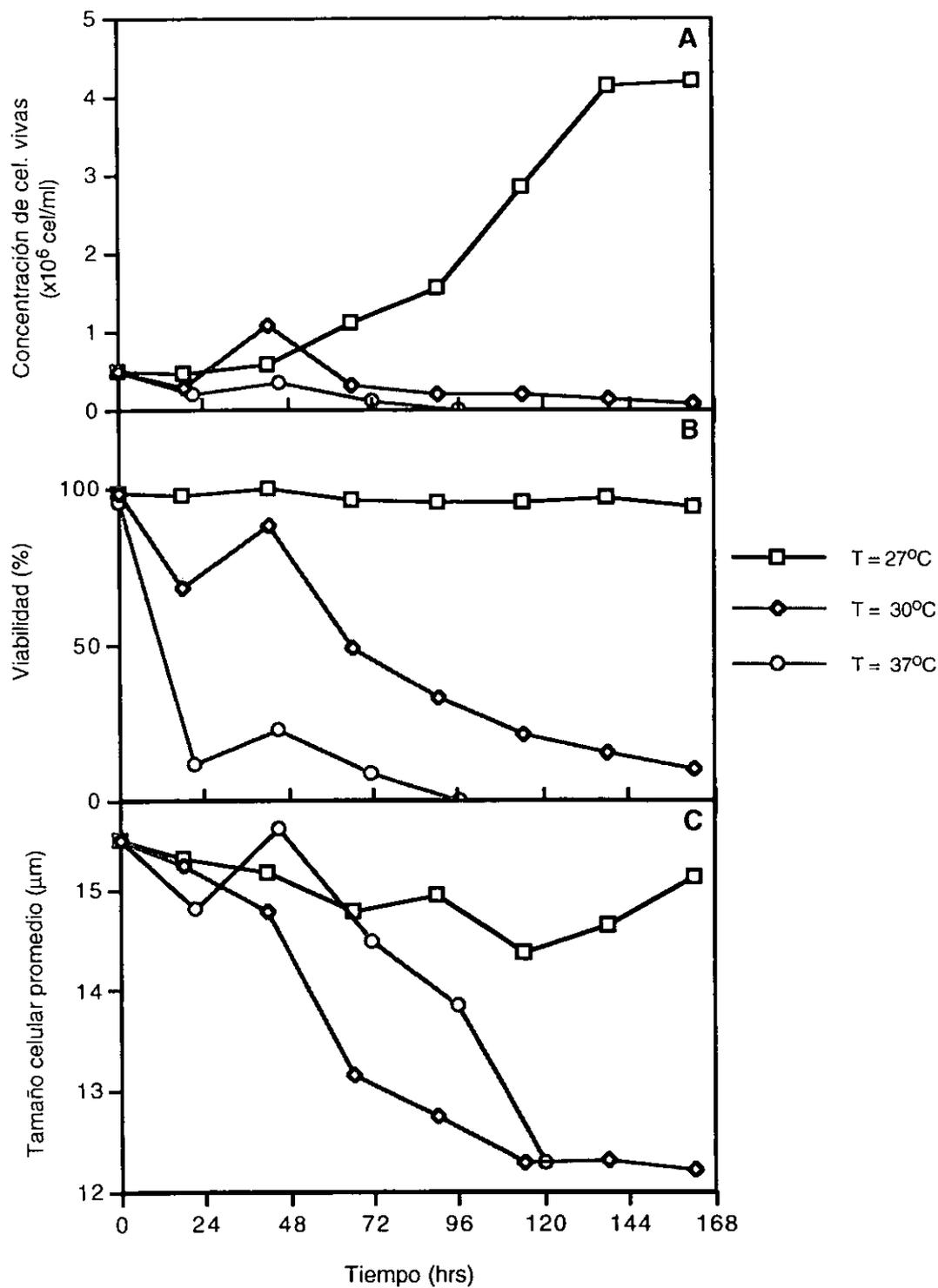


Figura 5.16 Efecto de la temperatura en cultivos sin infectar. Concentración celular viable (A), viabilidad (B), tamaño celular promedio (C). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

una infección secundaria, incrementando de esa manera la producción de proteína y virus recombinante (Shao-Hua et al., 1998; Weidemann et al., 1994).

En las cinéticas de infección, la concentración celular viable a las 96 horas post-infección para el cultivo control había aumentado en un 28%, mientras que las concentraciones para los cultivos a 30°C y 37°C, a ese mismo tiempo, disminuyeron en un 51% y en un 90%, respectivamente (panel A, **Figura 5.17**). A las 96 horas pi, la viabilidad del cultivo control era del 69%, mientras que las viabilidades de los cultivos a 30°C y 37°C eran de tan sólo el 31% y 7%, respectivamente (panel B, **Figura 5.17**). Por otra parte, a este mismo tiempo no hubo diferencia entre el valor del tamaño celular promedio a 27°C y a 30°C (solamente se detectó una disminución del 3% del tamaño con respecto al tamaño inicial), mientras que el cultivo a 37°C si mostró una disminución del 11% con respecto a su valor inicial (panel C, **Figura 5.17**).

En relación con efecto de la temperatura sobre la producción de proteína recombinante, se observó que temperaturas por arriba de 27°C (30°C y 37°C) abaten totalmente la producción de VP4 (datos no mostrados). Una posible explicación a este resultado es que las células se estén muriendo antes de que el sistema sea capaz de sintetizar la proteína. Lo anterior es lógico si se considera que el promotor de la polihedrina es un promotor muy tardío. Un resultado similar al observado para la producción de proteína recombinante era de esperarse para la producción de virus; sin embargo, en este caso se obtuvo un resultado diferente. El máximo título viral a 30°C (4.5×10^8 UFP/ml) se obtuvo alrededor de las 138 horas mientras que el valor máximo para el control se obtuvo desde las 90 horas (panel D, **Figura 5.17**). El máximo título viral (5.0×10^8 UFP/ml) para el cultivo control -obtenido a las 90 horas- fue 1.1 veces mayor que el máximo título viral a 30°C (a las 138 horas). En el caso de los cultivos a 37 °C el máximo título viral (5.0×10^8 UFP/ml) se registró a las 66 horas post-infección y este fue igual al máximo valor presentado por el control (alcanzado a las 90 horas post-infección) (panel D, **Figura 5.17**).

En la **Figura 5.18** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima para cultivos sin infectar e infectados, agitados en spinners de 50 ml. Los resultados muestran diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento a las diferentes temperaturas probadas. El máximo para la velocidad específica de crecimiento se obtiene en el cultivo control (27°C) tanto para los cultivos sin infectar como para

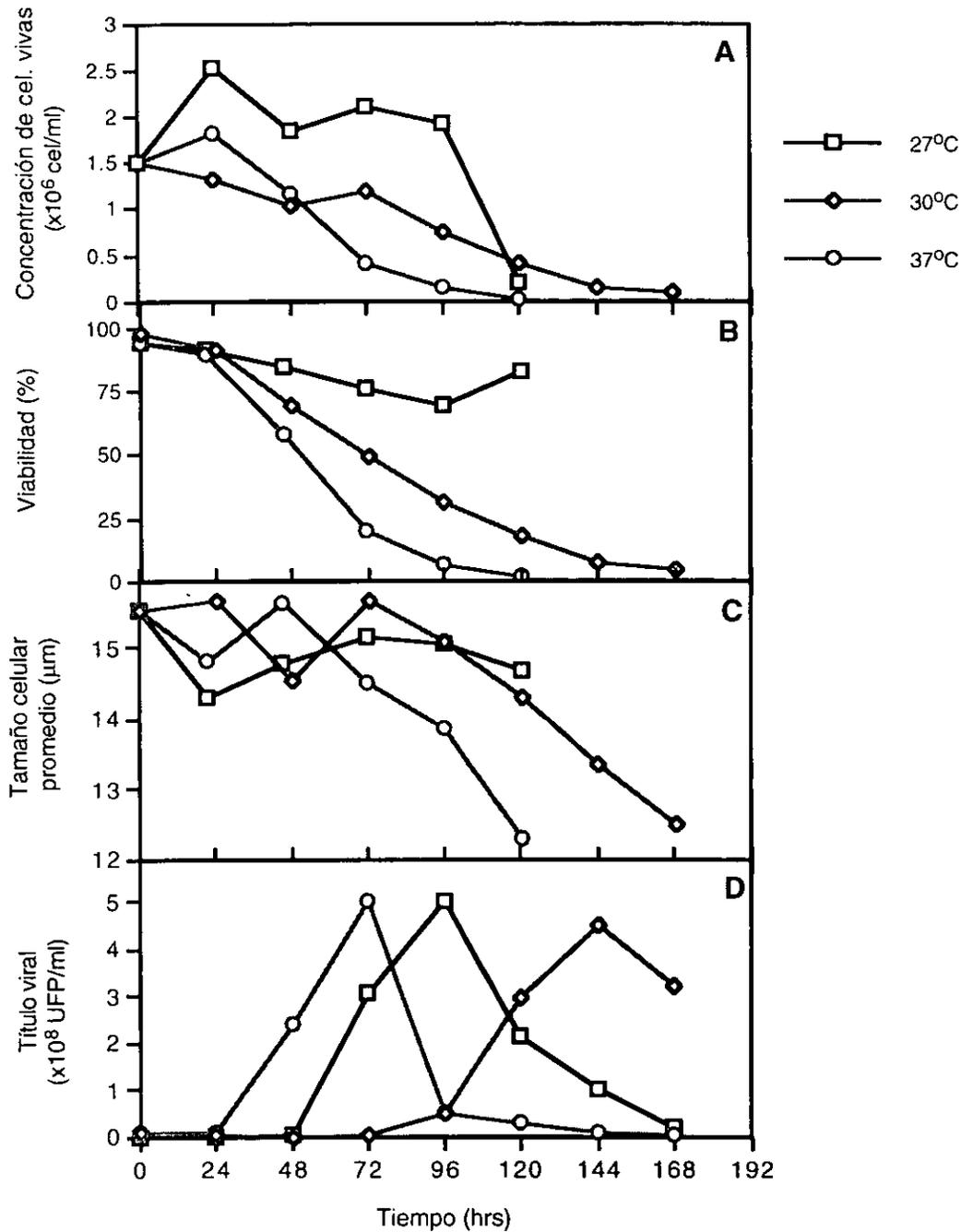


Figura 5.17 Efecto de la temperatura sobre cultivos infectados. Concentración celular viable (A), viabilidad (B), tamaño celular promedio (C), título viral (D). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

los cultivos infectados. Sin embargo la velocidad de crecimiento presentada por los cultivos infectados es de 1.3 veces mayor que la velocidad de crecimiento de los cultivos sin infectar. Esto podría deberse a que los inóculos celulares pueden haber estado en diferentes fases de crecimiento. A 30°C y 37°C se presentan velocidades específicas de crecimiento negativas, lo cual confirma que esta temperatura tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de cultivos sin infectar e infectados. En estos experimentos a diferencia del control, los valores de las velocidades de crecimiento no presentan diferencias significativas entre los cultivos infectados y los cultivos sin infectar. Resultados similares ya habían sido obtenidos para otras líneas celulares de insecto (Reuveny et al., 1993; Shao-Hua et al., 1998).

La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo control (27°C), tanto en cultivos infectados como en cultivos sin infectar. Al igual que en el caso de la velocidad de crecimiento, el incremento en la concentración celular viable muestra diferencias entre el cultivo control sin infectar y el cultivo control infectado (ambos a 27°C). En este caso el cultivo sin infectar presenta una $X_v \text{ máx}/X_{v0}$ de 2.6 veces más alta que la observada en el cultivo infectado. Los valores para $X_v \text{ máx}/X_{v0}$ presentados a 30°C y 37°C no muestran diferencias significativas entre los cultivos infectados y sin infectar.

En conclusión temperaturas por arriba de 27°C no son favorables para el crecimiento de células Sf9, para la producción de la proteína VP4 recombinante pero si favorecen la producción de baculovirus. Probablemente, habría que probar temperaturas por debajo del control con la finalidad de saber si estas temperaturas pudieran ser benéficas para este tipo de cultivos (tanto para el crecimiento celular como para la producción de proteínas recombinantes). Lo anterior se sugiere ya que en otros casos se ha encontrado que disminuciones de temperatura pueden influir directamente en una mejor síntesis de proteínas recombinantes o bien que prolongan la síntesis de tal manera que la etapa de degradación se retrasa (Reuveny et al., 1993). Sin embargo no hay que olvidar que los resultados están tanto en función de la línea celular como de la proteína recombinante a expresar.

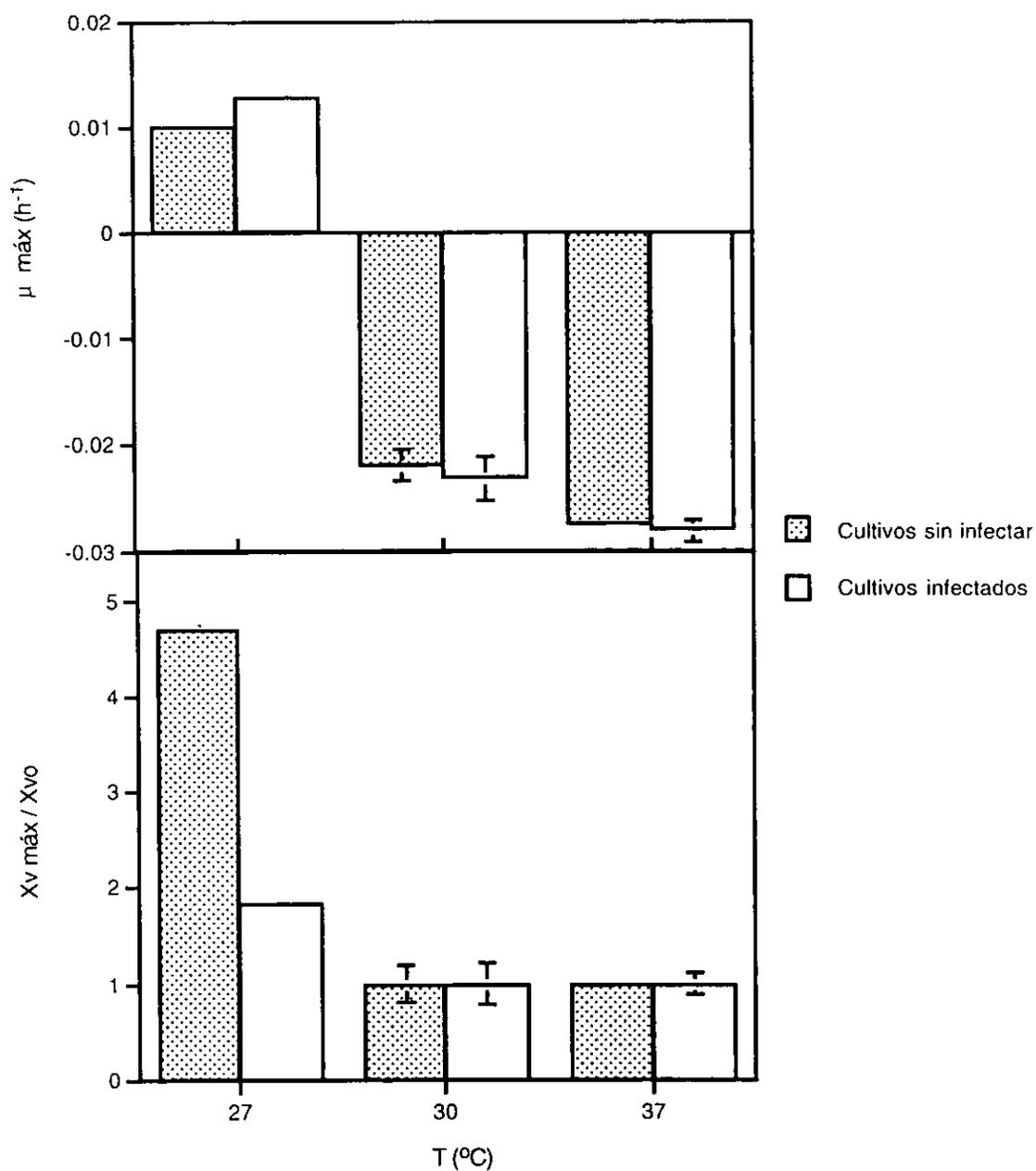


Figura 5.18 Efecto de la temperatura sobre la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar e infectados en spinners de 50 ml. Se presentan la media y la desviación estándar de 3 experimentos. Los valores negativos de μ indican velocidades de muerte reales mayores a las velocidades reales de crecimiento.

5.6. Efecto del amonio sobre el crecimiento celular

La adición de NH_4Cl tuvo un efecto negativo sobre el cultivo de células Sf9, a diferencia de cultivos adicionados con NaCl (usados como control de los experimentos de NH_4Cl , ver sección 5.8) (**Figura 5.19**). La concentración de células viables disminuyó hasta en un 68% en cultivos adicionados con 25 mM NH_4Cl comparándolos con el control a las 192 horas de cultivo.

Por otra parte, se observó un efecto significativo sobre el tamaño celular promedio al comparar los cultivos adicionados con NH_4Cl con el cultivo control, lo cual podría ser indicativo de que el NH_4Cl está teniendo un efecto osmótico sobre estas células a las concentraciones ensayadas (panel C, **Figura 5.19**). Es claro como a tiempos avanzados de cultivo (192 horas), la adición de 25 mM NH_4Cl provoca una disminución en el tamaño celular de 1.1 veces con respecto al tamaño presentado por el cultivo control al mismo tiempo. Se cree que el decremento en la viabilidad de los cultivos adicionados con NH_4Cl , con respecto a la viabilidad del cultivo control, podría atribuirse también al efecto tóxico del amonio (Ramírez, 1996).

En la **Figura 5.20** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima. No se observan diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento al comparar la velocidad específica del control con las velocidades mostradas en los experimentos a las diferentes concentraciones de amonio probadas. La máxima concentración celular viable alcanzada con respecto al valor de la concentración celular viable inicial se observó en el cultivo control, lo cual es indicativo del efecto tóxico sobre el crecimiento celular que causa la adición de estas concentraciones de NH_4Cl a cultivos de células de insecto. Los valores máximos de las concentraciones celulares viables para los cultivos adicionados con NH_4Cl llegan a ser hasta de 3.2 veces menores que el valor registrado para el cultivo control.

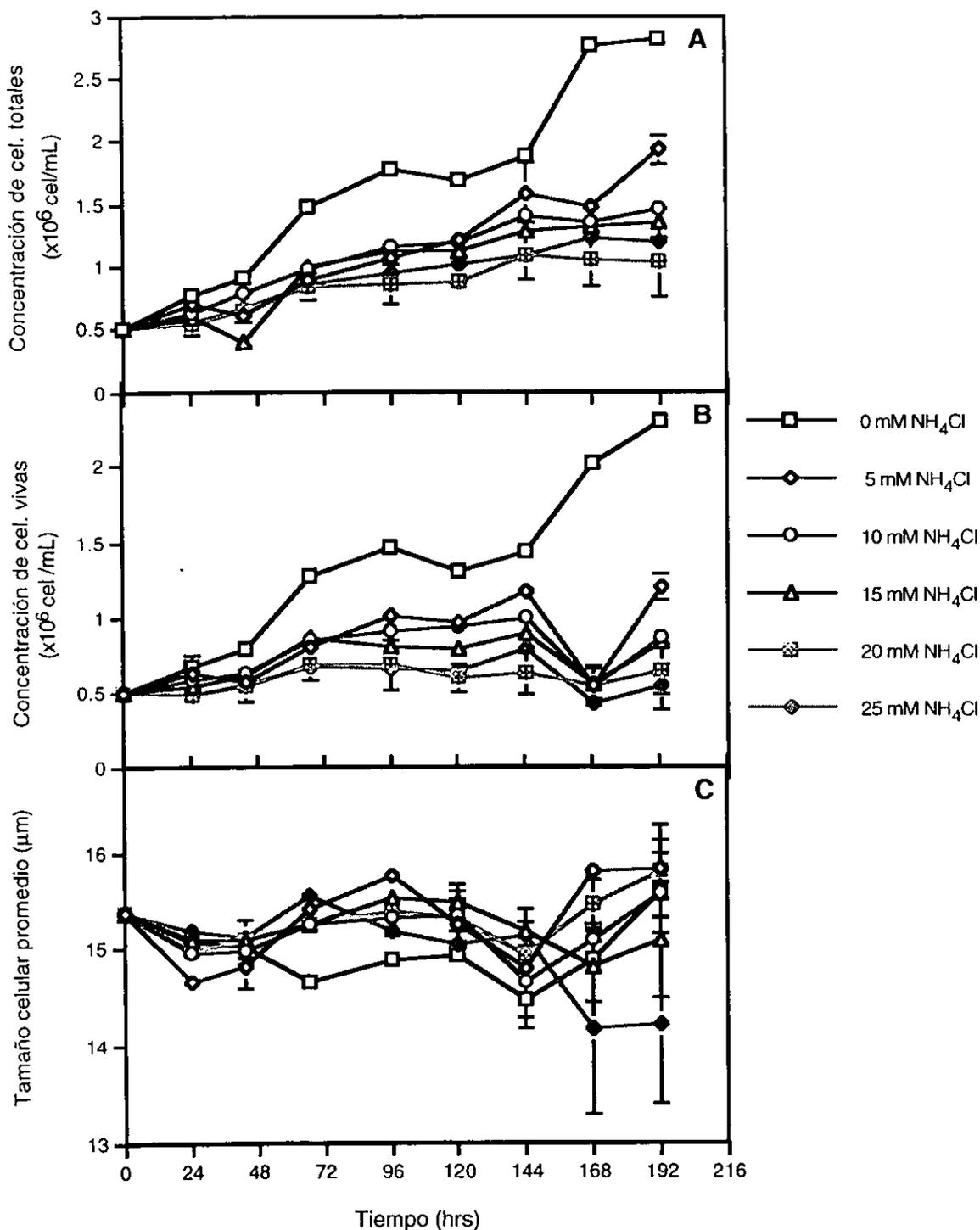


Figura 5.19 Efecto de la adición de NH₄Cl a cultivos sin infectar. Concentración de células totales (A), concentración de células viables (B), tamaño celular promedio (C). Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El efecto tóxico de la adición de NH_4Cl a cultivos de mielomas ha sido descrito por Martinelle y Haggstrom en términos de la competencia por el transporte entre el ion NH_4^+ y el K^+ . El transporte del ion amonio en lugar del ion potasio provoca una disminución en los niveles de K^+ intracelular y por eso se afecta el gradiente entre el interior de la célula y la membrana. Además, algunas enzimas que dependen de K^+ no pueden estar en su forma activa en presencia de NH_4^+ . Otra consecuencia de este transporte, es el incremento en el gasto energético de la célula, ya que se requiere de ATP si se emplea el transportador Na^+ / K^+ , o bien se requiere expulsar el exceso de Na^+ presente en la célula en caso de utilizar el cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$. Además, para contrarrestar la carga ácida generada, la célula tiene que bombear protones hacia el exterior de la misma, lo cual también requiere de energía (es decir, un gasto innecesario para la célula). El efecto tóxico causado por el amonio podría deberse al incremento en la demanda energética - existe la necesidad de conservar el gradiente de iones entre el interior de la célula y la membrana citoplasmática - provocada por la exposición del cultivo a $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$ (Martinelle y Haggstrom, 1993). En otro tipo de cultivos, tales como hibridomas, se ha visto que la adición de NH_4Cl provoca una disminución en los rendimientos relativos del cultivo, aunque este efecto está en función del pH (Doyle y Butler, 1990).

Por otra parte, se tiene evidencia de que la adición de NH_4Cl no tiene un efecto tóxico hasta 10 mM (para algunas líneas celulares) (Bédard y Kamen, 1993). La resistencia a concentraciones de amonio en el cultivo de células de insecto se debe a que estas son cultivadas a pH bajos (6.2) comparados con los pH empleados en cultivos de hibridomas, lo cual se traduce en una mayor tolerancia al amonio (Doyle y Butler, 1990; McLimans et al., 1981; McQueen y Bailey, 1991). Esta disminución en el pH desplaza el equilibrio ion amonio-amonio hacia el ion amonio, por lo cual se disminuye el daño causado por el amonio (McQueen y Bailey, 1991).

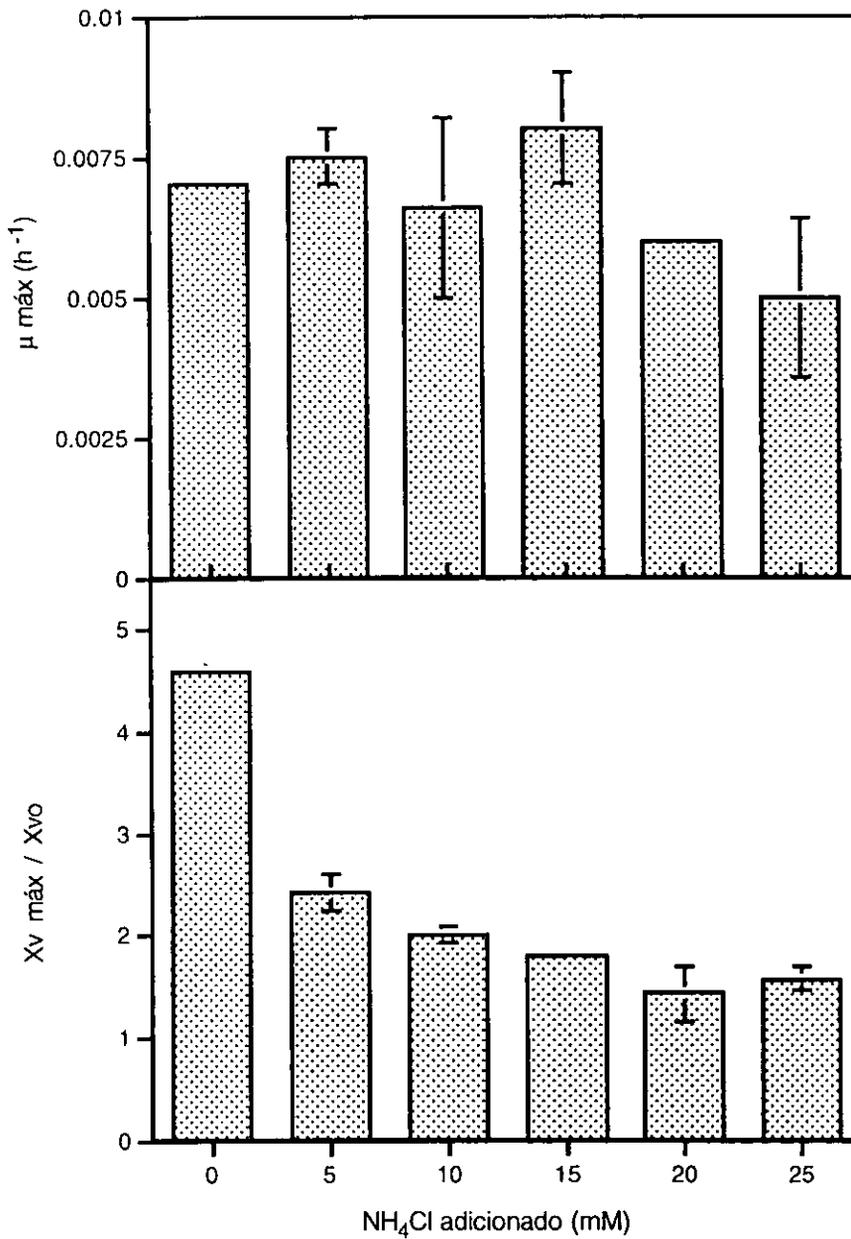


Figura 5.20 Efecto de la adición de NH₄Cl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se muestran barras de error ya que su valor es muy pequeño.

5.7 Efecto del amonio sobre la producción de VP4 y sobre el título viral

A diferencia de los cultivos sin infectar, los cultivos infectados adicionados con NH_4Cl no mostraron una disminución significativa en la concentración celular viable respecto al control (panel B, **Figura 5.21**). En cuanto al tamaño celular promedio, solamente se observan cambios significativos al comparar cultivos adicionados con NH_4Cl con el control a tiempos avanzados de la infección (panel C, **Figura 5.21**).

La concentración obtenida de la proteína VP4 se vió afectada por la adición de NH_4Cl a las concentraciones probadas. Se observó una relación inversa entre la concentración de proteína producida y el NH_4Cl adicionado. La cuantificación de la proteína VP4 fue posible solo con la adición de 5 y 10 mM NH_4Cl . A concentraciones más elevadas de NH_4Cl ya no fue posible cuantificar la proteína debido a que las bandas presentaban una intensidad casi imperceptible (panel D, **Figura 5.21**). Los resultados de esta cuantificación muestran que la máxima concentración de proteína recombinante fue obtenida en el cultivo control a las 114 horas post-infección y esta fue de 2.7 y 10.7 veces más alta que la obtenida en los cultivos adicionados con 5 y 10 mM NH_4Cl al mismo tiempo, respectivamente.

En cuanto al título viral máximo se observó que la adición de NH_4Cl tenía un efecto considerable sobre la producción del virus, ya que en el cultivo adicionado con 25 mM NH_4Cl se presentó un decremento del 69.6 % con respecto al cultivo control (panel E, **Figura 5.21**). Además, se observó una relación inversa entre el título viral y el NH_4Cl adicionado a los cultivos, es decir, a mayor cantidad de NH_4Cl adicionado el título viral máximo mostró valores más reducidos al compararlos con el control. El valor máximo para el título viral se obtuvo a las 90 horas en el cultivo control y este fue hasta 2.5 veces mayor que el valor del título viral para cultivos adicionados con 10 y 20 mM NH_4Cl . Para el resto de los experimentos la diferencia entre el control y los cultivos adicionados con NH_4Cl fue menor a 2.5 veces, a excepción del cultivo adicionado con 25 mM NH_4Cl , el cual presentó un valor 3.3 veces menor al presentado por el cultivo control.

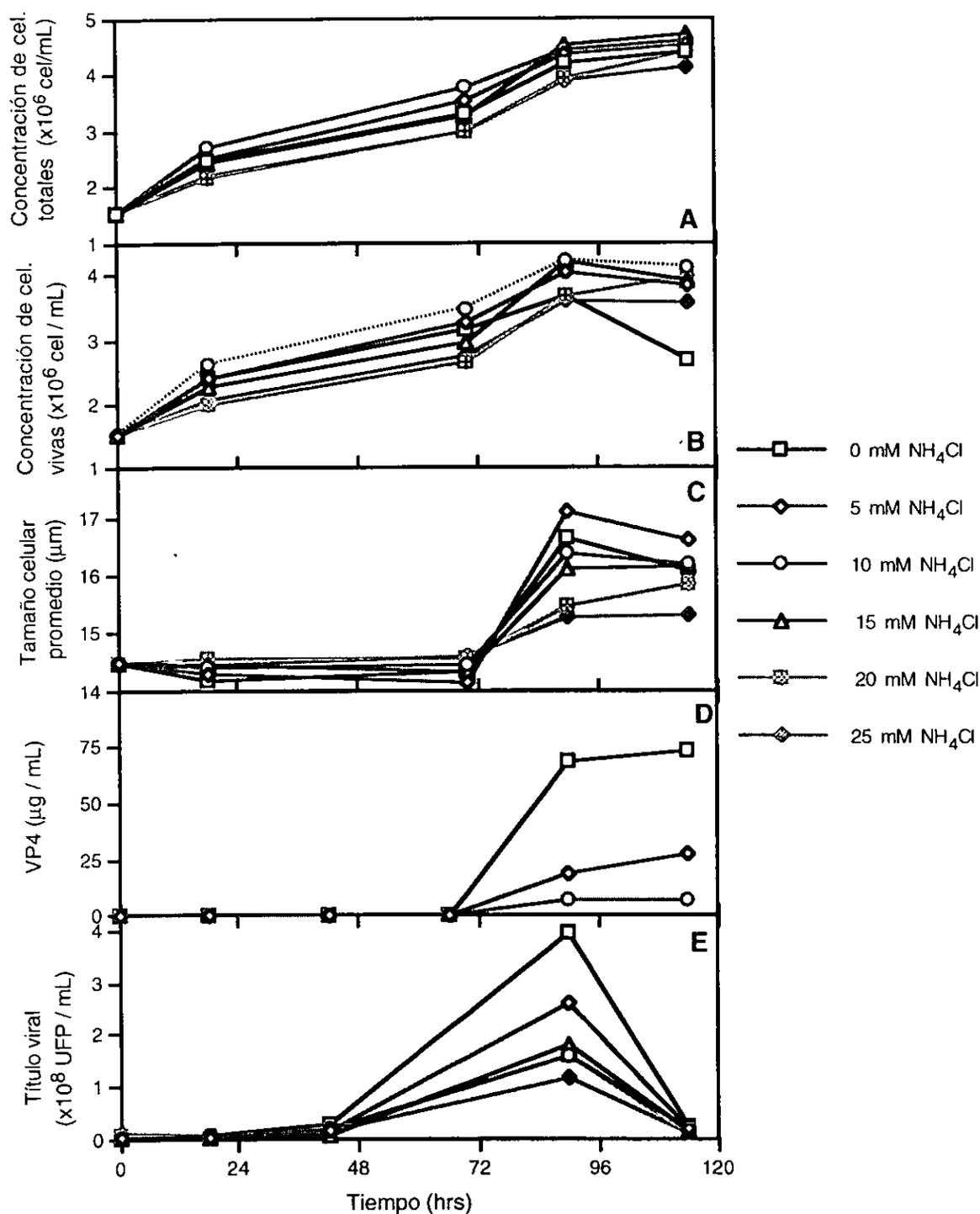


Figura 5.21 Efecto de la adición de NH_4Cl en cultivos infectados en matraces de 250 ml. Concentración de células totales (A), concentración de células vivas (B), tamaño celular promedio (C), concentración de VP4 recombinante (D), título viral (E). Se presenta la media de 2 experimentos.

En la **Figura 5.22** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular viable máxima. En el caso de la máxima velocidad específica de crecimiento no se observan diferencias al igual que en los cultivos sin infectar adicionados con NH_4Cl . El valor más alto para este parámetro se obtuvo en cultivos adicionados con 10 mM NH_4Cl y este fue 1.2 veces mayor que el valor presentado por el cultivo control. Sin embargo, al comparar la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar e infectados, en el primer caso si se observan diferencias significativas; en cambio en los cultivos infectados no existen estas diferencias. La concentración celular viable máxima alcanzada también se observó en el cultivo adicionado con 10mM NH_4Cl , lo cual es indicativo del efecto tóxico sobre el crecimiento celular que causa la adición de concentraciones más altas que 10 mM NH_4Cl a cultivos de células de insecto. Además, el cultivo adicionado con 10 mM NH_4Cl presentó una concentración celular viable máxima 1.2 veces mayor que la del cultivo control.

En la **Figura 5.23** se muestran la velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (panel A), la velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte (panel B), y el rendimiento específico máximo para VP4 (panel C), a distintas concentraciones de NH_4Cl . Es claro que ambos parámetros se ven altamente afectados por la adición de NH_4Cl (el máximo valor tanto para la velocidad específica de producción durante la fase de crecimiento como para el rendimiento específico máximo se obtienen a 0 mM NH_4Cl), lo cual podría justificarse en términos de que esta sustancia está teniendo un efecto tóxico sobre los cultivos infectados. Al respecto se ha reportado que altas concentraciones de amonio influyen significativamente sobre la productividad de algunos sistemas de cultivo de células animales (esto es dependiente de la línea celular utilizada) (Hansen y Enborg, 1994).

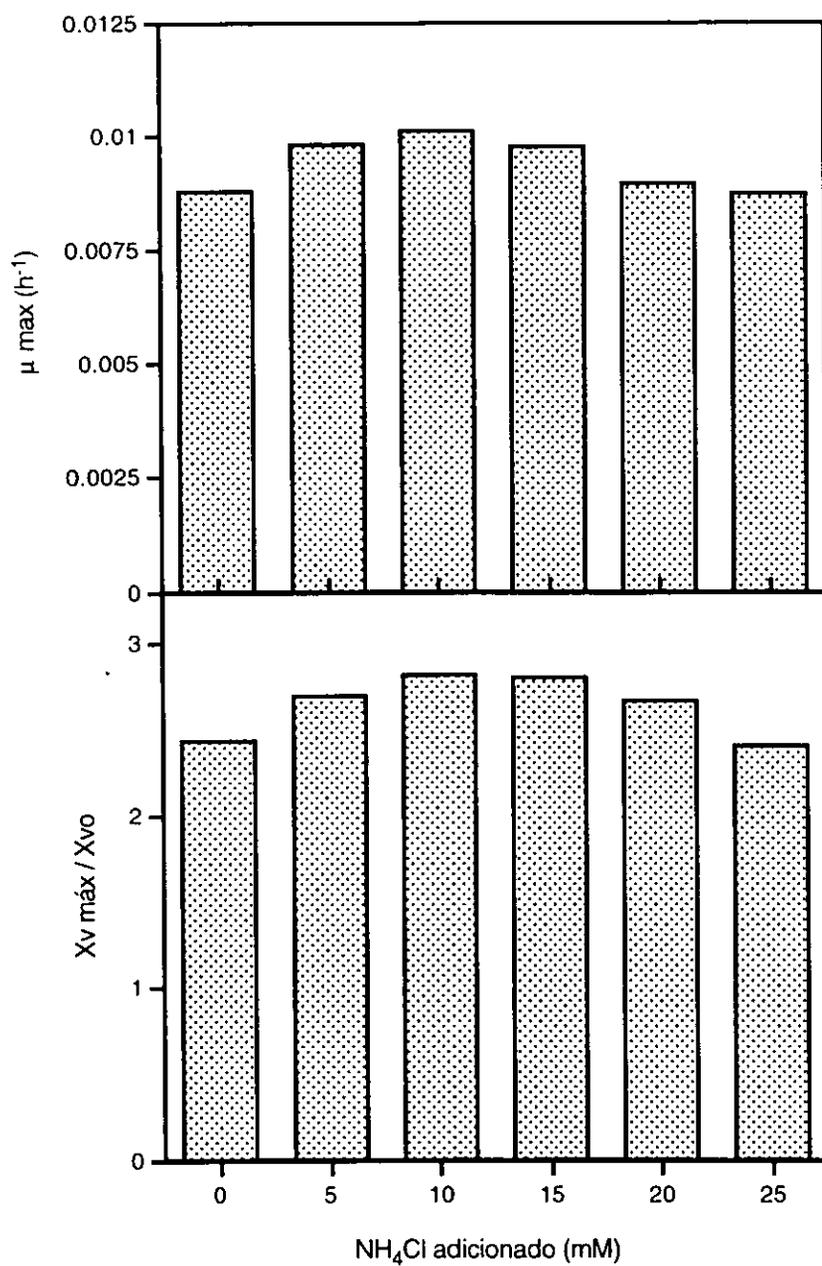


Figura 5.22 Efecto de la adición de NH₄Cl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces de 250 ml. Se presenta la media de 2 experimentos.

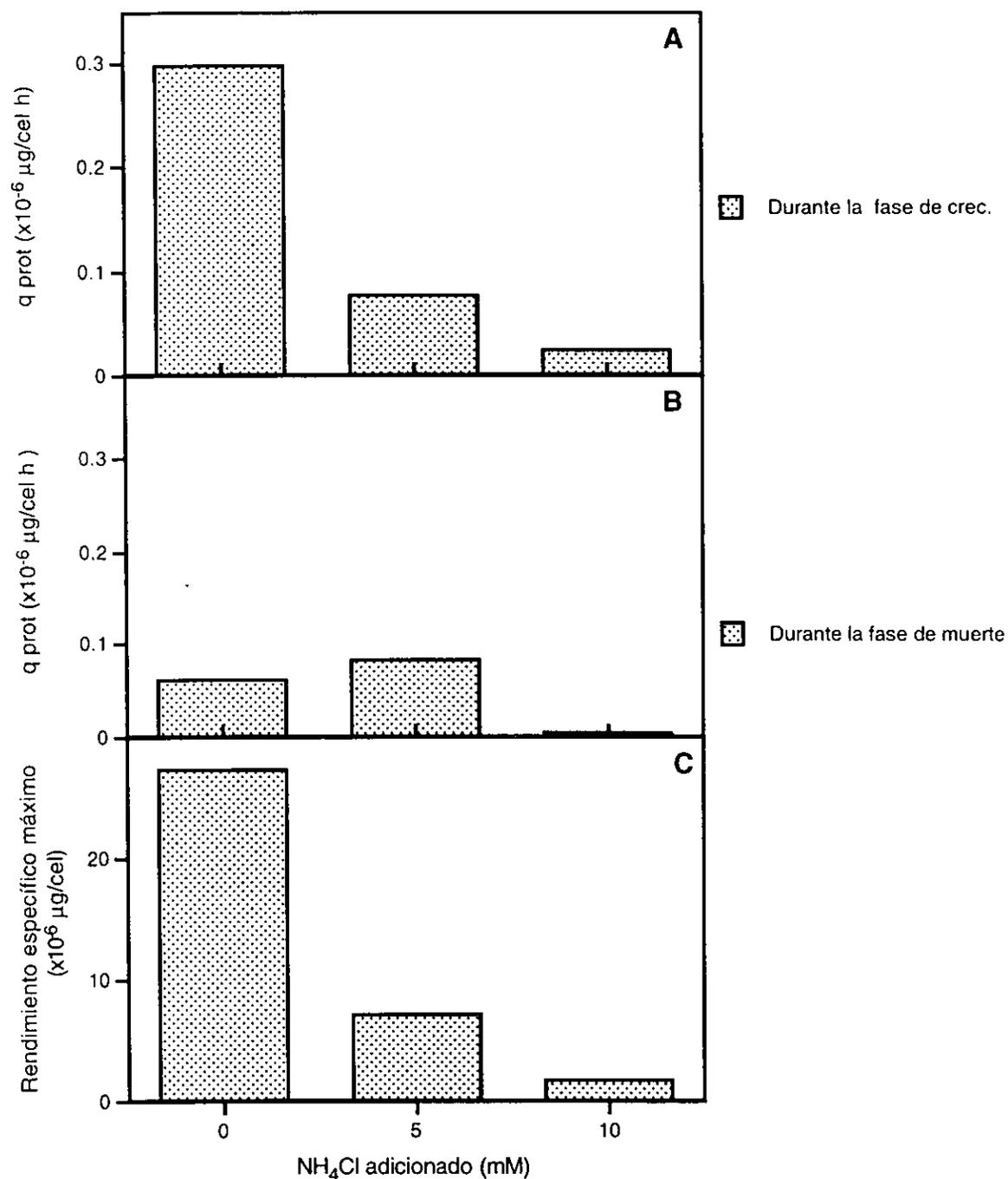


Figura 5.23 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (A), velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte (B) y rendimiento específico máximo para VP4 (C) en cultivos infectados adicionados con NH_4Cl .

Por otra parte, existen evidencias de que la adición de NH_4Cl puede llegar a inhibir la replicación de algunos virus. Al respecto se ha reportado que cantidades traza de iones amonio provocan la supresión de la replicación de varios virus (Jensen y Liu, 1961, Hacker y Hardy, 1997; Randolph y Stollar, 1990). También se sabe que otras sales de amonio, a bajas concentraciones, inhiben la proliferación del virus de la influenza (Eaton et al., 1962). Por otro lado, existe un efecto supresor sobre otro tipo de virus además del virus de la influenza, tales como el virus de la enfermedad de Newcastle (en cultivos de células tumorales ascíticas) (Jensen y Liu, 1961). Este podría ser el caso de los experimentos realizados en este trabajo, ya que las concentraciones más altas de NH_4Cl probadas podrían estar inhibiendo alguno de los mecanismos ya sea de unión, de penetración o de replicación del virus, dando como resultado una menor concentración de proteína.

Además, también se ha encontrado que la adición de NH_4Cl a cultivos de células de mosquito tiene un efecto sobre la fusión del virus (California encephalitis virus) a la membrana. Esta sustancia cruza la membrana plasmática y se acumula en las vacuolas intracelulares. La acumulación inhibe la fusión mediada por virus que se da en los endosomas, causando una acumulación de partículas virales en compartimentos del prelisosoma, en otras palabras, no permite la salida del virus de los endosomas (Gollins y Porterfield, 1984; Hacker y Hardy, 1997). Además, se ha visto que la adición de 50 mM NH_4Cl reduce hasta en un 90% los rendimientos de algunos virus, lo que se relaciona con la inhibición de la entrada de los virus a las células (Guirakhoo et al., 1993). Sin embargo, en algunos casos la inhibición es transitoria, ya que se ha demostrado que si se retira el NH_4Cl (aún cuando el mismo ha sido adicionado 5 horas antes), se puede recobrar la infectividad aunque en niveles mas reducidos (Hacker y Hardy, 1997).

Otros estudios han demostrado que el efecto del NH_4Cl se da sobre las células y no directamente sobre el virus (Jensen y Liu, 1961). Al parecer, los iones amonio están teniendo un efecto protector sobre las células y no inactivan directamente al virus, ni interfieren con la adsorción del mismo. Otra posibilidad es que los iones amonio provoquen la interferencia de algún mecanismo sintético intracelular que esté impidiendo la síntesis del virus de la influenza (Jensen y Liu, 1961). Sin embargo, otros tipos de virus requieren de cantidades más elevadas de NH_4Cl para que su actividad viral sea suprimida. No sólo se ha demostrado el efecto tóxico

del NH_4Cl sino también se encontró que el sulfato de amonio causa inhibición del efecto citopático, de la producción de hemaglutinina y de la replicación del virus Columbia Sk, en cultivos de células tumorosas ascíticas (Furasawa y Cutting, 1962).

En conclusión, se propone que la adición de NH_4Cl puede estar teniendo tanto un efecto osmótico (se observó una reducción en el tamaño celular promedio tanto de cultivos sin infectar como de cultivos infectados) como un efecto tóxico (se observó una disminución considerable en la viabilidad de cultivos sin infectar, se abate la producción de proteína recombinante a concentraciones de amonio por arriba de 10 mM NH_4Cl y se disminuye el título viral en cultivos adicionados con NH_4Cl). En relación con la disminución en el valor del título viral, una de las posibilidades es que la adición de NH_4Cl afecte alguno de los pasos de la replicación del virus (probablemente sea algún paso de la etapa tardía o muy tardía).

5.8. Efecto de la osmolaridad sobre el crecimiento celular

Para evaluar que efecto tenían cambios en la osmolaridad del medio de cultivo sobre el crecimiento celular y sobre la producción de proteína y baculovirus recombinantes se realizaron experimentos de adición de cloruro de sodio (NaCl). Se eligió emplear el ion cloruro para estos experimentos ya que este se encuentra presente en los cultivos, mientras que se tiene evidencia acerca de que otros iones tales como el sulfato, son tóxicos para los cultivos (Palomares, 1996).

Los cultivos adicionados con NaCl no mostraron un decremento significativo en la máxima concentración celular viable ni siquiera a las 168 horas de cultivo. La máxima concentración celular total y viable se alcanzó a las 168 horas de cultivo tanto para los cultivos adicionados con NaCl como para el cultivo control. Lo anterior es indicativo de que la adición de NaCl en este intervalo de concentraciones no afecta el crecimiento de este tipo de células (paneles A y B, **Figura 5.24**).

Por otra parte, al analizar el tamaño celular promedio tampoco se observaron cambios significativos en este parámetro hasta las 72 horas de cultivo. A partir de ese tiempo, se observó una disminución del tamaño celular promedio del cultivo control, aunque a las 168

horas no se presentó una diferencia significativa entre el valor del control y el del resto de los cultivos (panel C, **Figura 5.24**). En cultivos de hibridomas, se han registrado cambios en el tamaño celular con la adición de concentraciones similares de NaCl. Cuando las células son cultivadas bajo condiciones hipertónicas se observa una disminución en el tamaño celular durante las primeras diez horas de cultivo, seguido de un aumento durante las siguientes horas de cultivo (Cherlet y Marc, 1999; Ozturk y Palsson, 1991). Resultados similares al anterior han sido explicados con base en el transporte del ion sodio (Na^+). Bajo condiciones hiperosmóticas, se acumulan nutrientes en el citoplasma (este incremento se ve reflejado en la disminución del volumen de los hibridomas), los cuales son acarreados por los sistemas de transporte antes descritos. La acumulación de iones Na^+ en el exterior de la membrana, incrementa el gradiente electroquímico facilitando el flujo simultáneo de iones y de aminoácidos al interior de la célula. Es así como este exceso de nutrientes incrementa la producción tanto de proteína citoplasmática como de anticuerpo monoclonal en hibridomas (Oh et al., 1993).

En la **Figura 5.25** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable de cultivos sin infectar adicionados con NaCl. No se observan diferencias significativas en la máxima velocidad específica de crecimiento a las diferentes concentraciones de NaCl probadas. Este comportamiento se debe, probablemente, a que las concentraciones de NaCl usadas son muy bajas y no están teniendo un efecto osmótico sobre las células. Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con resultados obtenidos en otras líneas celulares tales como hibridomas. En este caso, se ha visto que condiciones hiperosmóticas provocan disminuciones en la velocidad de crecimiento, como consecuencia del estrés provocado por el medio hipertónico (Cherlet y Marc, 1999; Ozturk y Palsson, 1991). La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo adicionado con 5 mM NaCl, aunque la variación no es significativa con respecto al resto de los cultivos (incluyendo al cultivo control), lo cual es indicativo de que no existe un efecto sobre el crecimiento celular a las concentraciones de NaCl probadas.

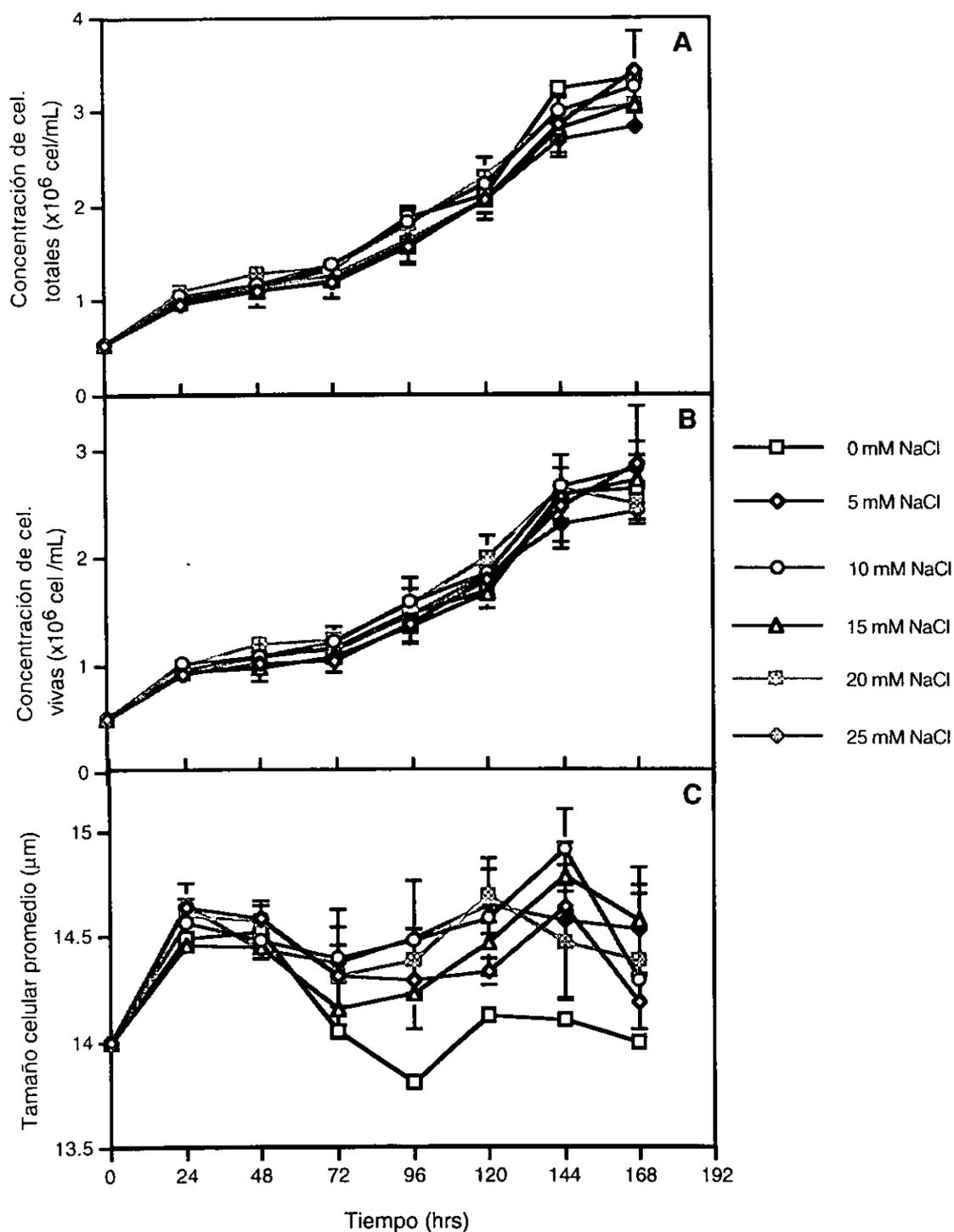


Figura 5.24 Efecto de la adición de NaCl en cultivos sin infectar. Concentración de células totales (A), concentración de células vivas (B), tamaño celular promedio (C). Se presentan la media y la desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es menor al símbolo del dato de la media.

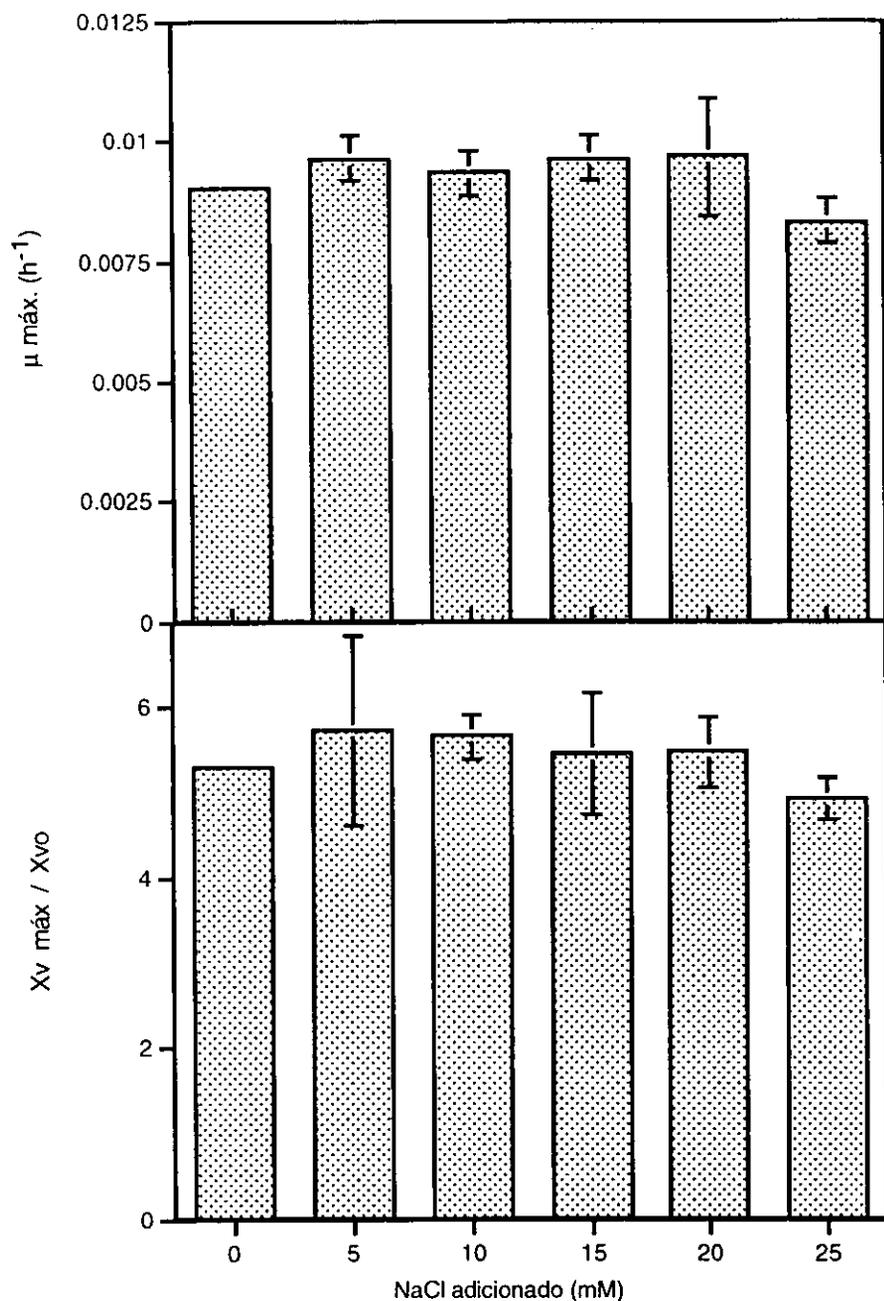


Figura 5.25 Efecto de la adición de NaCl en la máxima velocidad específica de crecimiento y en la máxima concentración celular viable en cultivos sin infectar en matraces de 125 ml. Se presentan la media y desviación estándar de 3 experimentos. En algunos casos no se presentan barras de error ya que su valor es muy pequeño.

5.9 Efecto de la osmolaridad sobre la producción de VP4 y sobre el título viral

En el caso de las células infectadas adicionadas con NaCl, a lo largo de las 114 horas post-infección, no se observó un decremento significativo ni en la concentración celular total ni en la concentración celular viable al comparar con los respectivos valores del cultivo control (paneles A y B, **Figura 5.26**). Sin embargo sí se observaron diferencias en el tamaño celular promedio. La adición de 5 y 10 mM NaCl permitió alcanzar tamaños celulares máximos de 1.1 veces (para ambos casos) el valor para el tamaño celular promedio para el cultivo control a las 114 horas (panel C, **Figura 5.26**). En otros trabajos se han reportado incrementos hasta del 25% en el volumen celular como resultado de condiciones de cultivo hipertónicas (Cherlet y Marc, 1999).

En cuanto a la producción de VP4, se obtuvieron los primeros indicios de la producción de la proteína recombinante a partir de las 66 horas post-infección para todas las concentraciones de NaCl probadas incluyendo al cultivo control (panel D, **Figura 5.26**). La máxima concentración de proteína recombinante se obtuvo a las 114 horas post-infección en cultivos adicionados con 15 mM NaCl y esta fue 3.6 veces más alta que la presentada por el cultivo control. Por otra parte, el máximo título viral se alcanzó a las 66 horas para los cultivos adicionados con 5 y 10 mM NaCl y para el cultivo control, mientras que para el resto de los cultivos el máximo título viral se obtuvo a las 90 horas (panel E, **Figura 5.26**). Al comparar el máximo título viral contra el título viral inicial, para cada concentración de NaCl adicionada, se observó que la adición de 25 mM NaCl mostraba un incremento mayor que el resto de las concentraciones de NaCl adicionadas.

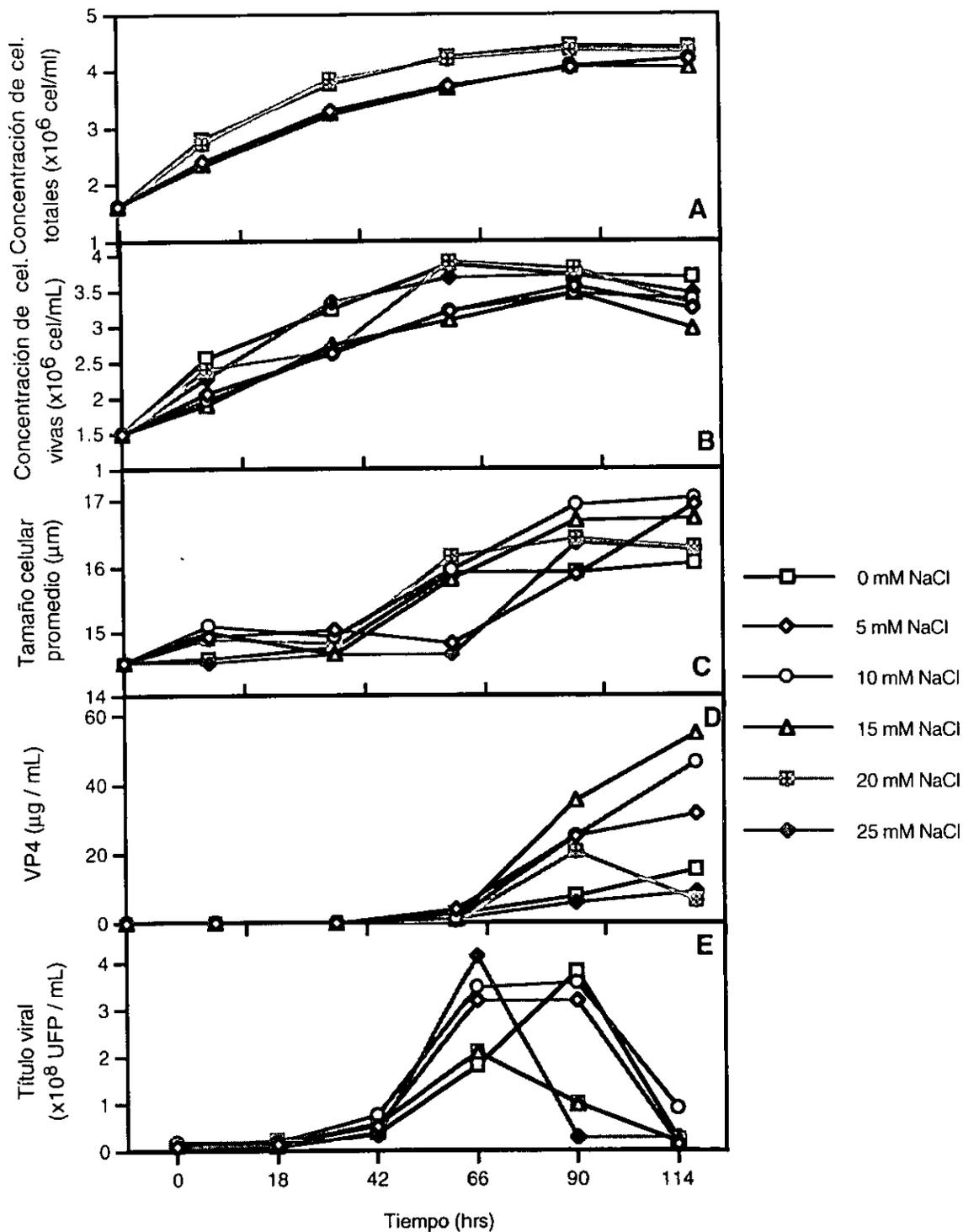


Figura 5.26 Efecto de la adición de NaCl en cultivos infectados en matraces de 250 ml. Concentración de células totales (A), concentración de células viables (B), tamaño celular promedio (C), concentración de VP4 recombinante (D), título viral (E). Se presenta la media de 2 experimentos.

En la **Figura 5.27** se muestran la máxima velocidad específica de crecimiento y la concentración celular máxima de cultivos infectados adicionados con NaCl. Se observan diferencias entre la media para la máxima velocidad específica de crecimiento del cultivo control y la media para la velocidad de crecimiento de los cultivos adicionados con NaCl. La máxima concentración celular viable alcanzada se observó en el cultivo adicionado con 20 mM NaCl, aunque esta variación no difiere de manera importante con respecto al cultivo control ni con el resto de los cultivos adicionados con NaCl, lo cual es indicativo de que no existe un efecto importante sobre el crecimiento celular de cultivos infectados a las concentraciones de NaCl probadas.

En la **Figura 5.28** se muestran la velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (panel A), la velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte (panel B) y el rendimiento específico máximo para VP4 (panel C) en cultivos infectados adicionados con diferentes concentraciones de NaCl. La adición de 15 mM de NaCl a cultivos infectados de células de insecto favorece la velocidad específica de producción de VP4 durante la fase de crecimiento y al rendimiento específico máximo para VP4. Probablemente, al adicionar esta concentración de NaCl se favorece el transporte de glucosa hacia el interior de la célula por lo que se puede tener un proceso de infección más eficiente.

En conclusión, la adición de concentraciones de NaCl en el intervalo probado no tienen un efecto osmótico sobre las células Sf9; sin embargo, fue posible aumentar la concentración de proteína recombinante producida así como el título viral con la adición de 15 mM NaCl y 25 mM NaCl, respectivamente. Esta es una alternativa clara para incrementar los rendimientos, ya sea de proteína o de virus recombinante en el sistema células de insecto-baculovirus.

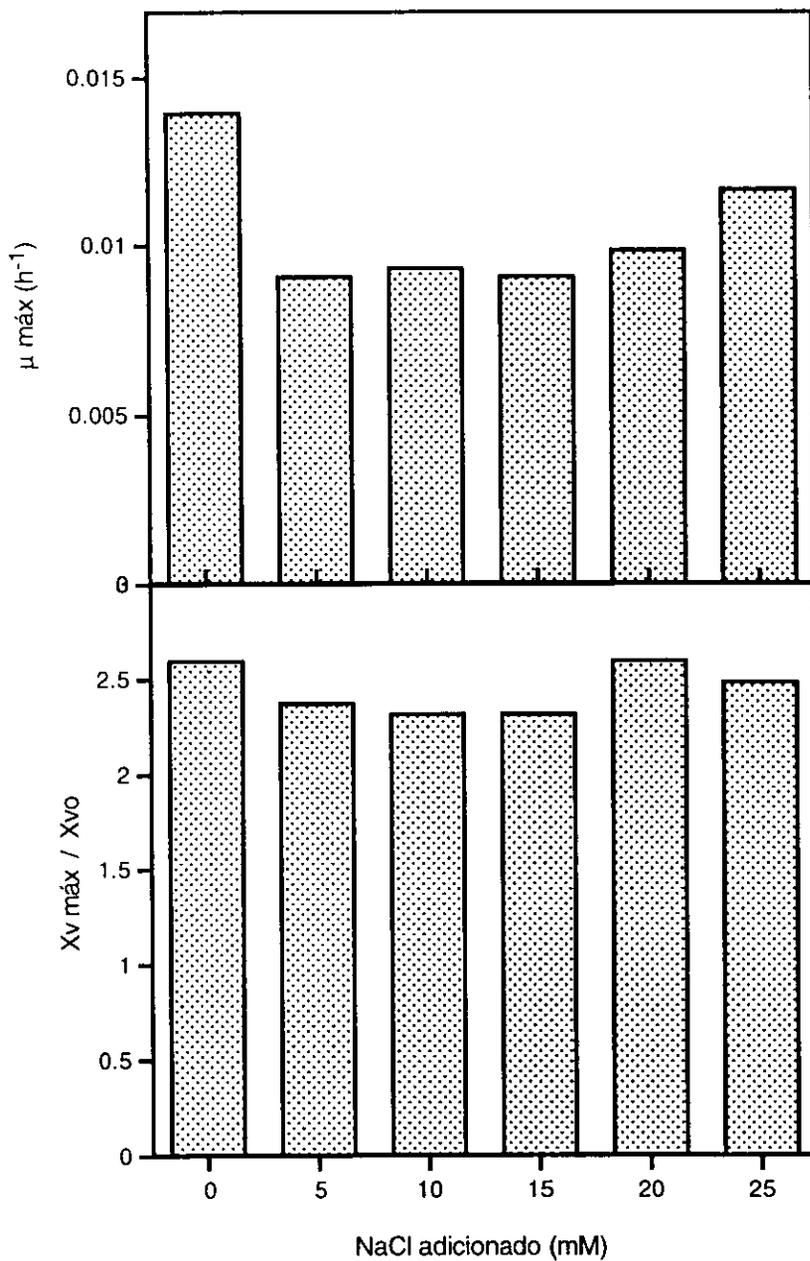


Figura 5.27 Efecto de la adición de NaCl en la máxima velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración celular viable en cultivos infectados en matraces de 250 ml. Se presenta la media de 2 experimentos.

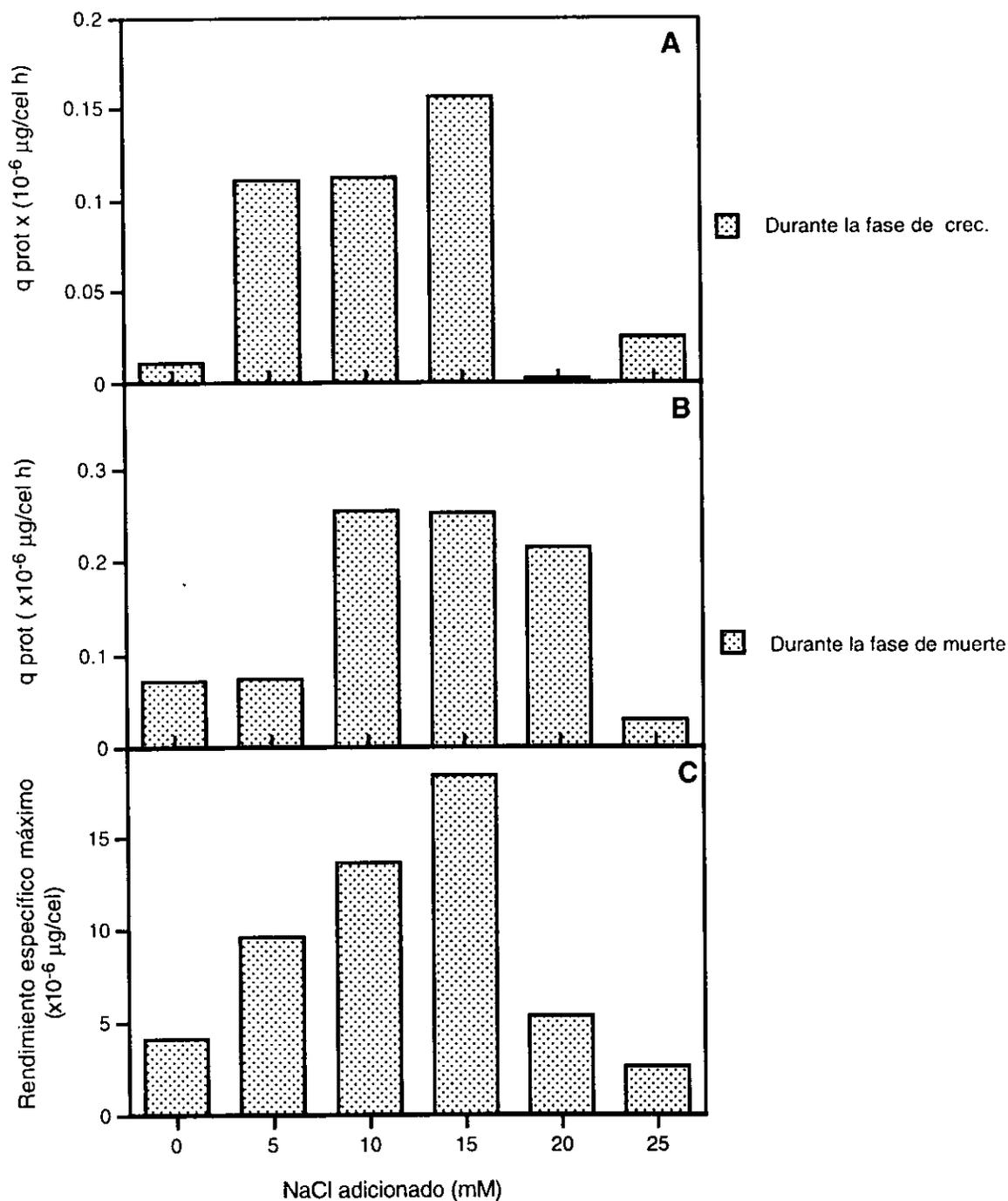


Figura 5.28 Velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de crecimiento (A), velocidad específica máxima de producción de VP4 durante la fase de muerte(B) y rendimiento específico máximo para VP4 (C) en cultivos infectados adicionados con NaCl.

6. Discusión

6.1 MDI

Los resultados de los experimentos de MDI muestran una relación logarítmica entre este parámetro y la concentración de VP7 obtenida (si se grafica el logaritmo natural de MDI contra la concentración de VP7 obtenida en los experimentos de MDI (0.1, 1 y 5) se obtiene una línea recta -datos no mostrados-). Al seguir aumentando la MDI por arriba de 5 no se consigue un aumento proporcional en la concentración de la proteína recombinante. Este resultado indica que el sistema llega a un punto en el cual se satura de tal manera que ya no es posible producir más proteína. Un resultado similar ha sido obtenido por otros autores (Licari y Bailey, 1991). Por otra parte, el máximo valor para el título viral se obtuvo a una MDI de 1.

Una posible explicación para los resultados descritos anteriormente, se fundamenta en el tipo de promotor requerido para la producción tanto de la proteína recombinante como de las partículas virales. En nuestro sistema, en particular, el gen que codifica para la proteína recombinante se encuentra bajo el control del promotor de la polihedrina el cual es un promotor fuerte de expresión muy tardía (de las 18 a las 72 horas post-infección). Las proteínas requeridas para la producción de la progenie viral se encuentran bajo el control de promotores tardíos. Ambos tipos de promotores requieren para su transcripción de la presencia de proteínas virales producidas a partir de la expresión de genes virales tempranos. A diferencia de los promotores tardíos, los muy tardíos requieren de la presencia de un activador o de la eliminación de un represor.

Existen condiciones en las que se favorece la expresión a partir de ciertos promotores. Nuestros resultados sugieren que a MDI de 5 se favorece la expresión a partir de promotores muy tardíos, esto probablemente debido a una rápida acumulación de la proteína activadora o eliminadora de la represión. Cuando se llega a la fase en la que los genes muy tardíos son expresados, se ha encontrado que más del 25% del RNA poliadenilado corresponde al producto de los genes bajo estos promotores. Sin embargo, esto depende de la sobrevivencia de la célula ya que se ha observado que si se incrementa la velocidad de lisis, la producción de productos a partir de estos promotores disminuye drásticamente. Lo anterior correlaciona con

los datos observados a una MDI de 10. Por otro lado, se observó que a una MDI de 1 es probable que se favorezca la expresión a partir de promotores tardíos, dando como resultado una mayor cantidad de progenie viral.

6.2 pH

Las modificaciones en el pH extracelular de cultivos de células animales se ha estudiado con la finalidad de determinar como puede afectar el comportamiento de los cultivos. Se han realizado trabajos con respecto al efecto que tienen cambios en el pH sobre la adherencia de las células, la producción de proteínas, título viral, etc. (Koval y Suppes, 1990; Taylor, 1962).

Al realizar modificaciones de pH extracelular se encontró que los resultados muestran coincidencias y algunas diferencias importantes con datos obtenidos a partir del estudio de otras líneas derivadas de lepidópteros. Entre las coincidencias destaca que no se detectaron fluctuaciones de pH a lo largo de la duración de cultivos, lo cual ha sido previamente reportado para estudios similares en células TN-368 (*Trichoplusia ni*) (Koval y Suppes, 1990). Entre las diferencias se encuentran que en nuestro caso, células Sf9, se observó que a pH de 6.6 se tiene un efecto negativo sobre el crecimiento. En contraste, para cultivos con células TN-368 este pH permite un crecimiento adecuado (Koval y Suppes, 1990).

También se observaron diferencias con respecto a la adherencia celular. En este trabajo se encontró que las células en cultivos en frascos estáticos de 75cm² a pH por arriba de 6.2 pierden la adherencia, mientras que pH por abajo del control (pH = 6.2) la promueven (datos no mostrados). Al respecto, Koval encuentra que pH básicos favorecen la adherencia, mientras que pH ácidos la desfavorecen (Koval y Suppes, 1990). En experimentos previos, ya se habían obtenido resultados similares a los observados en este trabajo. En esos casos, los fenómenos de adherencia fueron explicados en términos de que pH básicos promueven los movimientos celulares, mientras que pH ácidos los retardan (Taylor, 1962). Lo anterior indica que no es posible hacer generalizaciones aunque se empleen líneas provenientes de diferentes lepidópteros, por lo cual este tipo de estudios referentes a la variación de parámetros de cultivo es de gran importancia.

Por otra parte, en el presente estudio también se analizó el efecto de variaciones en el pH sobre la producción de proteínas recombinantes y progenie viral. A pH's por debajo del control se observó un incremento tanto de proteína como de virus. Esto puede ser explicado ya que se ha determinado que pH's ácidos promueven la fusión célula-célula (formación de sincicio), lo cual beneficia directamente el proceso de infección viral y por ende la productividad del sistema (incrementos tanto en la concentración de producto recombinante como en la progenie viral). En algunos estudios previos se ha visto que se requiere de la presencia de una glicoproteína de 64 kDa para que se de la fusión célula-célula (Leikina et al., 1992). Esta proteína está presente ya sea en el virus y es adsorbida en la superficie celular, o bien es sintetizada durante el curso de la infección y expresada en la superficie celular (Randolph y Stollar, 1990).

6.3 Temperatura

El efecto de la variación en la temperatura ha sido controversial. Por un lado se ha asociado que la temperatura tiene un efecto directo sobre la producción de proteínas recombinantes, en el incremento de la eficiencia de secreción de algunas proteínas, en la reducción de periodos de infección y en el incremento en la velocidad de lisis (Reuveny et al., 1993). Por otro lado, existen evidencias de que no es el aumento de temperatura *per se* el que provoca el incremento en la productividad, sino que tales incrementos se dan de manera secundaria en respuesta a cambios en el ciclo celular, metabolismo y en la viabilidad (Ramírez y Mutharasan, 1990).

Los resultados de este estudio, no muestran una mejoría en el proceso de infección, al menos si se considera que el sistema no está produciendo más proteína recombinante. De hecho, al efectuar los experimentos de infección a temperaturas de 30°C y 37°C no se pudo detectar la presencia de la proteína recombinante. Al respecto, podría argumentarse que a estas temperaturas no es posible detectar la proteína debido a que las células están siendo lisadas antes de poder sintetizar la misma (Shao-Hua et al., 1998). Para contender con esto se ha propuesto realizar oscilaciones de temperatura. Con esto las células infectadas sobreviven durante más tiempo (por lo que pueden producir más virus y proteína recombinante); o a temperaturas bajas la infección primaria es más lenta, lo cual deja algunas células sin infectar que tendrán la capacidad de dividirse y ser posteriormente infectadas durante la infección

secundaria (Shao-Hua et al., 1998). Otra opción es que la proteína si se produzca pero sea inestable a estas temperaturas por lo cual no puede ser detectada.

Al infectar los cultivos a 30°C y 37°C, los títulos virales no muestran un resultado similar al obtenido para la proteína recombinante. En estos experimentos no se abate la producción de virus, lo único que se modifica es el tiempo al cual se obtiene el máximo para el título viral. Al respecto no existen otros resultados similares que logren explicar este fenómeno, pero es posible que el tiempo de sobrevivencia de la célula si permita la producción de partículas virales.

6.4 Amonio

Uno de los productos del catabolismo de la glutamina y el glutamato es el amonio, el cual es un producto tóxico que es secretado al medio (Glaken, 1988). En este trabajo se encontró que el amonio tiene un efecto tanto de tipo osmótico (detectado por la reducción en el tamaño celular promedio) como uno de tipo tóxico (se abate la producción de proteína recombinante y se disminuyen los títulos virales). Una posible explicación sobre el efecto tóxico del amonio se basa en un cambio en la demanda energética para el mantenimiento de los gradientes iónicos a través de la membrana citoplasmática. El amonio es un competidor del potasio para ciertos mecanismos de transporte activo, lo cual provoca un desequilibrio iónico que se traduce en un incremento de los requerimientos energéticos para el transporte del potasio (Martinelle y Haggstrom, 1993).

Este efecto se ha observado claramente en cultivos de células de mamífero, adicionados con NH_4Cl , en los que se ha observado una reducción tanto de la velocidad específica de crecimiento como de la concentración celular final (Yang y Butler, 2000). Los resultados de nuestro trabajo muestran que el amonio no presenta un efecto importante en las cinéticas de crecimiento ni en las velocidades máximas de crecimiento. Sin embargo, es claro que el amonio tiene un efecto tóxico en la producción de proteína y virus recombinante. Este resultado es claramente observado al analizar la velocidad máxima específica de producción de proteína y el rendimiento del mismo.

Una posible explicación para la caída en la producción de la proteína recombinante se basa en el mecanismo de toxicidad del amonio, ya que al difundirse al interior de la célula se eleva el pH intracelular, lo cual pudiera causar alteraciones en la estructura terciaria de las proteínas. Previamente en este trabajo se demostró que la alcalinización del pH tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las células de insecto, aunque este efecto fue más drástico en la producción de proteína y virus recombinantes (ver secciones 5.3 y 5.4).

En algunos reportes acerca de experimentos de infección se ha demostrado que el amonio tiene un efecto inverso sobre el título viral y que la inhibición del mismo es directamente proporcional a la concentración de NH_4Cl empleada (Jensen y Liu, 1961).

6.5 Osmolaridad

La adición de sustancias osmóticamente activas se ha correlacionado con disminuciones en la viabilidad celular (Ozturk y Palsson, 1991; Takagi et al., 2000; Zhang et al., 1994). En este trabajo se trató de conocer que efecto tendrían modificaciones en la osmolaridad sobre el cultivo de células de insecto y sobre la producción de proteína y virus recombinantes. En nuestro trabajo no se vió un efecto negativo sobre la viabilidad de los cultivos de células de insecto (en cultivos sin infectar y en cultivos infectados). En trabajos previos se ha reportado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en cultivos de hibridomas (Cherlet y Marc, 1999) así como sobre la velocidad de crecimiento (Lee y Lee, 2000) bajo condiciones hiperosmóticas; sin embargo, a pesar de que estas condiciones afectan la viabilidad, se ha observado una estimulación sobre la producción de anticuerpo monoclonal (Cherlet y Marc, 1999; Lee y Lee, 2000).

Por otra parte, en este trabajo se vió que la adición de 15 mM ayuda a obtener concentraciones más altas de VP4 y la adición de 25 mM incrementa el título viral y adelanta el tiempo al cual se obtiene dicho valor. Esto podría deberse a que a estas concentraciones, probablemente se esté dando un transporte de glucosa (o de otros nutrientes) hacia el interior de la célula en respuesta a las condiciones hiperosmóticas. El incremento en el flujo de nutrientes hacia el

interior de las células conlleva un incremento en el RNA celular total, en la proteína celular y en la masa celular. Además este incremento de flujos podría causar un aumento en las velocidades específicas de producción de ATP a partir de glucosa y glutamina, lo cual se ve reflejado en el incremento en la producción de producto (Lee y Lee, 2000). Además, un incremento en el flujo de nutrientes hacia el interior de la célula beneficiaría el proceso de infección ya que se contarían con más precursores para la síntesis tanto de progenie viral como de proteína recombinante. Es claro como la adición de 15 mM tiene un efecto positivo sobre la velocidad específica máxima de producción de proteína recombinante (durante la fase de crecimiento) y sobre el rendimiento específico máximo de la proteína.

Otra alternativa es que las condiciones hiperosmóticas induzcan la activación transcripcional en respuesta a un cambio en la estructura de la cromatina. Bajo estas condiciones se despegan la histonas del DNA lo cual da lugar a que la cromatina se disperse. Estos fragmentos expuestos de cromatina están entonces más accesibles a la RNA polimerasa para la transcripción del mRNA (Lee y Lee, 2000).

7. Conclusiones

7.1 Conclusiones particulares

Se determinó el efecto de la MDI sobre las cinéticas de producción de la proteína recombinante de rotavirus VP7. La MDI que conlleva la obtención de un máximo en la concentración de proteína recombinante es la MDI de 5. Con esta MDI la máxima concentración de proteína se obtiene a tiempos más tempranos que con MDI mas bajas, por lo que también se ve favorecida la productividad. El máximo título viral se obtiene a MDI de 1.

Se demostró que pH's por debajo del control (pH = 6.2) favorecen la producción de proteína y virus recombinantes a pesar de que no tienen un efecto significativo sobre el crecimiento celular.

Se demostró que temperaturas mayores a 27°C (30°C y 37°C) no son favorables para el crecimiento celular ni para la producción de proteína aunque favorecen el tiempo al cual se obtiene el máximo título viral (los valores de título viral a 30°C y 37°C no difieren significativamente del valor del control).

La adición de NH₄Cl a cultivos de células de insecto tiene un efecto tanto osmótico (causa un decremento en el tamaño celular promedio) como tóxico sobre el crecimiento celular de cultivos sin infectar ya que aunque no se presentan diferencias significativas en la velocidad de crecimiento, si se observa un decremento significativo sobre la máxima concentración celular viable con respecto a los valores presentados por el cultivo control. Este comportamiento no se tiene en cultivos infectados a pesar de que se pudiera pensar que la infección pudiera estar afectando la viabilidad del cultivo. La adición de NH₄Cl tiene un efecto negativo sobre la producción de proteína y virus recombinantes.

La adición de NaCl no muestra un efecto importante sobre el crecimiento celular, tanto de cultivos infectados como de cultivos sin infectar, aunque la adición de 15 mM NaCl y de 25 mM NaCl si beneficia la producción de proteína y baculovirus recombinantes, respectivamente.

7.2 Conclusión general

El estudio de las condiciones de cultivo de células de insecto permite conocer que parámetros influyen la producción de proteínas recombinantes en este sistema. De ahí la importancia de la evaluación de los parámetros presentados en este estudio.

Modificaciones en las condiciones de cultivo permiten optimizar, bajo ciertas condiciones, tanto la producción de las proteínas de rotavirus recombinante VP7 y VP4, como la producción de virus recombinante. Este estudio es clave para la optimización de las proteínas estructurales del rotavirus. Esta información será de gran utilidad para el estudio de la optimización de la producción de pseudopartículas virales de rotavirus que pueden ser una alternativa como vacunas contra la infección de este virus.

Cabe mencionar que los resultados de este trabajo no pueden ser extrapolados a otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes o a otras proteínas recombinantes modelo, ya que inclusive empleando el mismo sistema de expresión se llegan a encontrar tendencias diferentes de producción; es decir que las características de producción de cada proteína están en función de varios parámetros como la línea celular y la proteína a expresar (Tsao et al., 1996).

7.3 Direcciones futuras

Se sugiere continuar con el estudio de diversos parámetros que afectan la producción de las proteínas estructurales de rotavirus. Un estudio similar al efectuado para la proteína estructural VP4 sería de gran utilidad para el resto de las proteínas que conforman al rotavirus. Con esta información sería posible mejorar el planteamiento de estrategias futuras para la producción racional de pseudopartículas virales; la importancia de la producción de éstas radica en que las mismas podrían ser empleadas como vacunas contra la infección por rotavirus, que es en la actualidad una de las causas de mortalidad más elevadas a nivel mundial, atacando sobre todo a una población comprendida por niños menores a 3 años de edad.

A pesar de que en este trabajo se presenta el estudio de algunos parámetros de cultivo y cómo estos afectan el crecimiento celular, la producción de proteína y virus recombinante, aún habría

que hacer una evaluación de otro tipo de parámetros que también se ha reportado que afectan el patrón de expresión de proteínas recombinantes. Dichos parámetros podrían ser agrupados en distintas categorías: aquellos relacionados con cuestiones de condiciones de trabajo, tales como la velocidad de agitación, la relación medio fresco/medio usado y el volumen de trabajo y otros relacionados con como variaciones de algunos parámetros pueden afectar tanto el crecimiento como la infección de células Sf9, tales como el monitoreo de la osmolaridad a lo largo del cultivo, la relación entre la osmolaridad y el pH extracelular, la relación entre el pH extracelular y el pH intracelular, la fase del ciclo celular en que se encuentran las células al momento de la infección, la relación entre el tamaño celular promedio y la infección, la relación entre la infección y el incremento en la demanda de O₂ de los cultivos, el número de pase del virus y de las células, la presencia de proteasas celulares y virales (se podrían crear líneas celulares deficientes en proteasas), métodos de detección más confiables para la detección de proteínas (ELISA), y la influencia del calcio sobre la infectividad de VP7.

Bibliografía

Al-Rubeai M., Chalder S., Bird R., Emery A.N., (1991), Cell cycle cell size, and mitochondrial activity of hybridoma cells during batch cultivation, *Cytotechnol.*, **7**: 179-188.

Al-Rubeai M., Singh R.P., Emery A.N., Zhang Z., (1995), Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**: 88-92.

Andrew M.E., Boyle D.B., Coupar B.E.H., Whitfield P.L., Both G.W., Bellamy R., (1987), Vaccina virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies, *J. Virol.*, **61**: 1054-1060.

Bédard C., Kamen A., (1993), Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism, *Biotechnol. Prog.*, **9**: 615-624.

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

Bhatia R., Jesionowski G., Ferrance J., Ataa M.M., (1997), Insect cell physiology, *Cytotechnol.*, **24**: 1-9.

Bibila T.A., Ranucci C.S., Glazomitsk K., Buckland B.C., Aunins J.G., (1994), Monoclonal antibody process development using medium concentrates, *Biotechnol. Prog.*, **10**: 87.

Bishop D.L., (1990), Gene expression using insect cells and viruses, *Current Opinion Biot.*, **1**: 62-67.

Both G.W., Mattick J.S., Bellamy A.R., (1983), Serotype-specific glycoprotein on simian 11 rotavirus: Coding assignment and gene sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3091-3095.

Butler M., Jenkins H., (1989), Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture, *J. Biotechnol.*, **12**: 97–110.

Caron A.W., Archambault J., Massie B., (1990), High level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**: 1133-1140.

Charlton C.A., Volkman L.E., (1993), Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces actin cable formation, *Viol.* **197**: 245–254.

Cheng D., Ramig R.F., (1992), Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification, *Viol.*, **186**: 228-237.

Cherlet M, Marc A., (1999), Hybridoma cell behaviour in continuous culture under hyperosmotic stress, *Cytotechnol.*, **29**: 71–84.

Crawford S.E., Labbé M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y., Estes M., (1994), Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells, *J. Virol.*, **68**: 5945-5952.

Davidson D.J., Fraser M.J., Castellino F.J., (1990), Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells, *Biochem.*, **29**: 5584-5590.

Davidson D.J., Castellino F.J., (1991), Structures of the asparagine-289-linked oligosaccharides assembled on recombinant human plasminogen expressed in a *Mamestra brassicae* cell line (IZD-MBO503), *Biochem.*, **30**: 6689-6696.

Davis T.R., Wood H.A., (1995), Intrinsic glycosylation potentials in insect cells and insect larvae, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **31**: 659-663.

- Dee K.U., Wood H.A., Shuler M.L., (1997), Inducing single-cell suspension of BTI-TN5B1-4 insect cells: II. The effect of sulfated polyanions on baculovirus infection, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**: 206-220.
- deGooijer C., van Lier F., van den End E., Vlak J., Tramper J., (1989), A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures, *App. Microb. Biotechnol.*, **30**: 497-501.
- Docherty P.A., Snider M.D., (1991), Effects of hypertonic and sodium-free medium on transport of a membrane glycoprotein along the secretory pathway in cultured mammalian cells., *J. Cell Physiol.*, **146**: 34-42.
- Donaldson M., Wood H.S., Kulakosky P.C., Shuler M.L., (1999), Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: Influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen, *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 255–262.
- Dougherty E.M., Weiner R.M., Vaughn J.L., Reichelderfer C.F., (1981), Physical factors that affect *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection, *App. Environm. Microbiol.*, **41**: 1166–1172.
- Doyle C., Butler M., (1990), The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma, *J. Biotechnol.*, **15**: 91-100.
- Dyken J.J., Sambanis A., (1993), Ammonium selectively inhibits the regulated pathway of protein secretion in two endocrine cell lines, *Enz. Microb. Technol.*, **16**: 90-98.
- Eaton M.D., Low I.E., Scala A.R., Uretsky S., (1962), Inhibition by ammonium ion of the growth of influenza virus in chorio allantoic tissue. *Virology*, **18**: 102-108.
- Estes M.K., Cohen J., (1989), Rotavirus gene structure and function., *Microbiol. Rev.*, **53**: 410-449.
- Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., (1995), Chapter 18 – Insect Viruses- Fields Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, pp. 535-544.

- Fraser M.J., (1989), Expression of eucaryotic genes in insect cell culture. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **25**: 225–235.
- Furakawa K., Ohsuye K., (1998), Effect of temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme, *Cytotechnol.*, **26**: 153–164.
- Furakawa K., Ohsuye K., (1999), Enhancement of productivity of recombinant α -amidating enzyme by low temperature culture, *Cytotechnol.*, **31**: 85-94.
- Furasawa E., Cutting W., (1962), Inhibitory effect of ammonium sulfate on Columbia SK Virus propagation in mouse ascites tumor cells in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**: 71-75.
- Garnier A., Voyer R., Tom R., Perret S., Jardin B., Kamen A., (1996), Dissolved carbon dioxide accumulation in a large scale high density production of TGF β receptor with baculovirus infected Sf-9 cells, *Cytotechnol.*, **22**: 53–63.
- Glaken M.W., (1988), Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio/Technol.*, **6**: 1041-1050.
- Glass R.I., Kilgore P.E., Holman R.C., Jin S., Smith J.C., Woods P.A., Clarke M.J., Ho M.S., Gentsch J.R., (1996), The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. *J. Infect. Dis.* **174**: (suppl. 1): S5-11.
- Godwin G., Whitford, (1993), Cell Culture Research and Development Life Technologies, Inc. (Grand Island, New York 14072), *Focus*, **15**: 44-46.
- Gollins S.W., Porterfield J.S., (1984), Flavivirus infection enhancement in macrophages: radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate, *J. Gen. Virol.*, **65**: 1261-1272.
- Gooche C.F., Monica T., (1990), Environmental effects on protein glycosilation, *Bio/Technol.*, **8**: 421-427.

Goosen M.F.A., Daugulis A.J. (eds), (1993), *Insect Cell culture Engineering*, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York. 3-4.

Guirakhoo F., Hunt A.R., Lewis J.G., Roehrig J.T., (1993), Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH, *Virology*, **194**: 219–223.

Hacker J.K, Hardy J.L., (1997), Adsorptive endocytosis of California Encephalitis Virus into mosquito and mammalian cells: A role for G1, *Virol.*, **235**: 40-47.

Hansen H.A., Emborg C., (1994), Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnol. Prog.*, **10**: 121–124.

Hara T., Nonaka K., Kawaguchi H., Ogata S., Etou N., (1993), Effects of temperature on Escherichia coli b-galactosidase expression in baculovirus-insect cell system, *Biotech. Biochem.*, **57**: 996–997.

Hensler W., Singh V., Agathos S.N., (1994), Sf9 insect cell growth and b-galactosidase production in serum and serum-free media, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **745**: 149–166.

Hink W.F., Thomsen D.R., Davidson D.J., Castellino F.J., (1991), Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines, *Biotechnol. Prog.*, **7**: 9 - 14.

Jain D., Ramasubramanian K., Seamans C., Wang S., Lenny A., Silberklang M., (1991), Production of antistatin using the baculovirus expression system. In *Expression systems and processes for rDNA products*. ACS Symposium Series No. 477. Hatch R., Gooche C., Moreira A., Alroy Y. *ACS Chs.* 97-100.

Jarvis D.L., Summers M.D., (1989), Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells, *Mol. Cell Biol.*, **9**:214-223.

Jarvis D.L., Fleming J.G.W., Kovacs G.R., Summers M.D., Guarino L.A., (1990), Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells, *Bio/Technol.*, **8**: 950-955.

Jarvis D.L., García A. Jr., (1994), Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclea polyhedrosis virus gp64 protein, *Virology*, **205**: 300–313.

Jenkins N., Hovey A., (1993), Temperature control of growth and productivity in mutant chinese hamster ovary cells synthesizing a recombinat protein, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 1029–1036.

Jensen E.M., Liu O.C., (1961), Studies of inhibitory effect of ammonium ions in several virus-tissue cultures systems, *P.S.E.B.M.*, **107**: 834–838.

Jeong Y., Wang S., (1995), Role of glutamine in hybridoma cell culture: effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism, *Enz. Microb. Technol.*, **17**: 47-55.

Jiang B., Barniak V., Smith R.P., Sharma R., Corsaro B., Hu B., Madore H.P., (1998), Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: Comparative and quantitative analysis, *Biotechnol. Bioeng.*, **60**: 369-374.

Jorjani P., Ozturk S.S., (1999), Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**: 349-356.

Kasermann F., Kempf C., (1996), Low pH-induced pore formation by spike proteins of enveloped viruses, *J. Gen. Virol.*, **77**: 3025–3032.

Kielian M., Helenius A., (1985), pH induced alterations in the fusogenic spike protein of Semliki Fosrest virus., *J. Cell Biol.*, **101**: 2284–2291.

Kioukia N., Nienow A.W., Emery A.N., Al-Rubeai M., (1995), Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus, *J. Biotech.*, **38**: 243-251.

- Kovacevic Z., McGivan J.D., (1983), Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance, *Physiol Rev.*, **63**: 547-605.
- Koval T.M., Suppes D.L., (1990), pH dependency of cell attachment and growth at both clonal and subculture densities of cultured lepidopteran cells, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **26**: 665-670.
- Labbé M., Charpilienne A., Crawford S.E., Estes M.K., Cohen J., (1991), Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles, *J. Virol.*, **65**: 2946-2952.
- Lanzrein M., Kasermann N., Weingart R., Kempf C., (1993), Early events of Semliki Virus-induced cell-cell fusion, *Virology*, **196**: 541–547.
- Lazarte E.J., Tossin P.F., Nicolau C., (1992), Optimization of the production of full length rCD4 in baculovirus –infected *Sf9* cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**: 214-217.
- Lee M.S., Lee G. M., (2000), Hyperosmotic pressure enhances immunoglobulin transcription rates and secretion rates of KR12H-2 transfectoma, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**: 260–268.
- Leikina E., Onaran H.O., Zimmerberg J., (1992), Acidic pH induces cell infected with baculovirus to form syncytia, *FEBS*, **304**: 221–224.
- Licari P., Bailey J.E., (1991), Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: Multiplicity of infection and intracellular protein degradation, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**: 238-246.
- Licari P., Bailey J.E., (1992), Modeling the population-dynamics of baculovirus-infected cells-optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 432–441.
- Lin J., Takagi M., Qu Y., Gao P., Yoshida T., (1999), Enhanced monoclonal antibody production by gradual increase of osmotic pressure, *Cytotechnol.*, **29**: 27–33.

- Lindsay D.A., Betenbaugh M.G., (1992), Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 614–618.
- Ljunggren J., Haggstrom L., (1990), Glutamine fed-batch culture reduces ammonium ion production in animal cells, *Biotechnol. Lett.*, **12**: 705–710.
- Lonergan G., (2001), What is a safe vaccine?, *Vaccine*, **19**: 1.
- Lynn D.E., Hink W.F., (1980), Comparison of nuclear polyhedrosis virus replication in five lepidopteran cell lines, *J. Invert. Pathol.*, **35**: 234–240.
- Maass D.R., Atkinson P.H., (1994), Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues, *J. Virol.*, **68**: 366-378.
- Maiorella B., Inlow D., Shanger A., Harano D., (1988), Large-scale insect cell culture for recombinant protein production, *Bio/Technol.*, **6**: 1406-1410.
- Markovic I., Pulyaeva H., Sokoloff A., Chernomordik L.V., (1998), Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates, *J. Cell Biol.*, **143**: 1155–1166.
- Marquardt M.T., Phalen T., Kielian M., (1993), Cholesterol is required in the exit pathway of semliki forest virus, *J. Cell Biol.*, **123**: 57–65.
- Martinelle, K., Haggstrom L., (1993), Mechanisms of ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes, *J. Biotechnol.*, **30**: 339-350.
- Massotte D., Pereira C.A., Pouliquen Y., Pattus F., (1999), Parameters influencing human μ opioid receptor over-expression in baculovirus-infected insect cells, *J. Biotechnol.*, **69**: 39-45.
- Mc Limans W.F., Blumenson E.R., Ito, M., (1981), Ammonia loading in cell culture systems, *Cell Biol. Intern. Rep.*, **5**: 653-660.

Mc Queen A., Bailey J.E., (1990), Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 1067-1077.

Mc Queen A., Bailey J.E., (1991), Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH., *Bioproc. Eng.*, **6**: 49-61.

Miller W.M., Lingg A.J., Bulla L.A., (1983), Bacterial, viral and fungal insecticides, *Science*, **219**: 715-721.

Miller W.M., Blanch H.W., Wilke C.R., (1988), A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**: 947-965.

Moore A., Mercer J., Dutina G., Donahue C.J., (1997), Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cells batch cultures, *Cytotechnol.*, **23**: 47-54.

Nagarathnamma M.M.R., Sureshkumar G.K., (1997), Apoptosis extent increases in hybridoma cultures with temperature, *Biotech. Lett.*, **19**: 669-673.

Neutra R., Levi B-Z., Shoham Y., (1992), Optimization of protein production by the baculovirus expression vector system in shake flasks, *App. Microb. Biotechnol.*, **37**: 74-78.

Newland M., Nazlee K.M., Greenfiel P.F., Nielsen L.K., (1994), Ammonia inhibition of hybridoma propagated in batch, fedbatch, and continuous culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**: 434-438.

Ogonah O.W., Freedman R.B., Jenkins N., Patel K., Rooney B.C., (1996), Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins, *Bio/Technol.*, **14**: 197-202.

Oh S.K.W., Vig P., Chua F., Teo W.K., Yap M.G.S., (1993), Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 601-610.

O'Reilly D.R., Miller L.K., Luckow V.A., (1994), *Baculovirus expression vectors – A laboratory manual*, Oxford University Press, New York, pp.

Ozturk S.S., Palsson B.O., (1991), Effect of the osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**: 989-993.

Palomares, L.A., (1996), Caracterización cinética y metabólica de cultivos de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9): Hacia el desarrollo de estrategias de control, Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Palomares L.A., González M., Ramírez O.T., (2000), Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production, *Enz. Microb. Technol.*, **26**: 324–331.

Palomares L.A., Ramírez O.T., (1997), Insect cell culture: Recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production, In *Advances in Bioprocess Engineering II*, Galindo E. y Ramírez O.T. editores) pp. 25-52.

Payne H.R., Storz J., Henk W.G., (1990), Initial events in bovine coronavirus infection: analysis through immunogold probes and lysosomotropic inhibitors, *Arch. Virol.*, **114**: 175–189.

Potera C., (1997), Vaccine for rotavirus seeks approval from the Food and Drug Administration, *Gen. Eng. News*, **24**.

Power J.F., Reid S., Radford K.M., Greenfield P.F., Nielson L.K., (1994), Modelling and optimization of the baculovirus expression vector in batch suspension culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**: 710-719.

Radford K.M., Cavegn C., Bertrand M., Bernard S.R., Greenfield P.F., (1997), The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products, *Cytotechnol.*, **24**: 73-81.

- Ramig R.F., (1994), Rotavirus, Current topics in microbiology & immunology, Ed. Springer Verlag, New York, pp. 45.
- Ramírez O.T., (1996), Alternativas para contender con el problema de la toxicidad del amonio en cultivos de células de eucariotes superiores, Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería, Ed. E. Galindo, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C, 219–232.
- Ramírez O.T., Mutharasan R., (1990), Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**: 839-848.
- Randolph V.B., Stollar V., (1990), Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures, *J. of Gen. Virol.*, **71**: 1845–1850.
- Rechtors C., McIntosh A.H., (1976), A cytotoxic substance in insect cell culture spent media, *In Vitro*, **10**: 678-681.
- Reuveny S., Kim Y.J., Kemp C.W., Shiloach J., (1993), Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **38**: 619-623.
- Rognoni F., Gianessello D., Maddalena F., Giuntini I., Herbst D., (1999), Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process, *Cytotechnol.* , **29**: 11–25.
- Sabara M., Parker M., Aha P., Cosco C., Gibbons E., Parsons S., Babiuk L., (1991), Assembly of double-shelled rotaviruslike particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins, *J. Virol.*, **12**: 6994-6997.
- Schlaeger E-J., Lundstrom K., (1998), Effect of temperature on recombinant protein expression in Semliki forest virus infected mammalian cell lines growing in serum-free suspension, *Cytotechnol.*, **28**: 205–211.

Schneider M., Marison I.W., von Stockar U., (1996), The importance of ammonia in mammalian cell culture, *J. Biotechnol.*, **46**: 161-185.

Schopf B., Howaldt M.W., Bailey J.E., (1990), DNA distribution and respiratory activity of *Spodoptera frugiperda* populations infected with wild-type and recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *J. Biotechnol.*, **15**: 169-186.

Scott T.R.I., Blanchard J.H., Ferguson C.H.R., (1992), Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells, *Enz. Microb. Technol.*, **14**: 798-804.

Shao-Hua C., Hong-Liang S., Zuo-Hu L., (1998), Effect of temperature oscillation on insect cell growth and baculovirus replication, *App. Environ. Microbiol.*, **64**: 2237-2239.

Shaw A.L., Rotthnagel R., Chen D., Ramig R.F., Chiu W., Prasad B.V.V., (1993), Three dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure, *Cell*, **74**: 693-701.

Smith G., Summers M., Fraser M., (1983), Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, *Mol. Cell Biol.*, **3**: 2156-2165.

Smith N.A., King G.A., Faulkner P., Daugulis A.J., Harris T.J., Goosen M.F.A., (1990), Toxicity and mass transfer effects in the immobilization and cultivation of insect cell. In: *Symposium on insect cell culture and baculovirus expression systems*. American Chemical Society, 199th National Meeting, Boston, MA, April 24.

Takagi M., Hayashi H., Yoshida T., (2000), The effect of osmolarity on metabolism and morphology in adhesion and suspension chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator, *Cytotechnol.*, **32**: 171-179.

Taylor A.C., (1962), Responses of cell to pH changes in the medium, *J. Cell Biol.*, **15**: 201-209.

Tramper J., Van Den End E.J., De Gooijer C.D., Kompier R., Van Lier F.L.J., Usmany M., Vlak J.M., (1990), Production of baculovirus in a continuous insect cell culture, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **589**: 423-430.

Tsao E., Mason M., Cacciuttolo M., Bowen S., (1996), Production of Parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus., *Biotechnol. Bioeng.*, **49**: 130-138.

Vallaza M., Petri T., (1999), Optimization of the production of triabin, a novel thrombin inhibitor, in High Five™ insect cells with a recombinant baculovirus, *Cytotechnol.*, **29**: 85-92.

Vanlandschoot P., Beirnaert E., Grooten J., Min Jou W., Fiers W., (1998), pH-dependent aggregation and secretion of soluble monomeric influenza hemagglutinin, *Arch. Virol.*, **143**: 227–239.

Van Lier F.L.J., Van Den End E.J., De Gooijer C.D., Vlak J.M., Tramper J., (1990), Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **33**: 43-47.

Vaughn J., Goodwin R., Tomkins G., McCawley P., (1979), The establishment of two cell lines from the insect (Lepidopteran: Noctuide), *In vitro*, **13**: 213-217.

Volkman L.E., Goldsmith P.A., (1985), Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* Nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis., *Virology*, **143**: 185-195.

Wang M.Y., Kwong S., Bentley W.E., (1993), Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect cell baculovirus protein expression: A study on the Epoxide Hydrolase Production., *Biotechnol. Prog.*, **9**: 355–361.

Weidemann R., Ludwig A, Kretzmer G., (1994), Low temperature cultivation – A step towards process optimization, *Cytotechnol.*, **15**: 111–116.

Wickham T.J., Davis T., Granados R.R., Hammer D.A, Shuler M.L., (1991), Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection, *Biotechnol. Lett.*, **13**: 483-488.

Wickham T.J., Davis T., Granados R.R., Shuler M.L., Wood H.A., (1992), Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system, *Biotechnol. Prog.*, **8**: 391-396.

Wong K.T.K., Peter C.H., Greenfield P.F., Reid S., (1996), Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**: 659-666.

Wood, (1995), *Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques - Virus Plaque Assay-*, pp.12.

Wu J., King G., Daugulis A.J., Faulkner P., Bone H.D., Goosen M.F.A., (1990), Adaptation of insect cells to suspension culture, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**: 90-93.

Yang J.D., Gecik P., Collins A., Czarnecki S., Hsu H.H., Lasdun A., Sundaram R., Muthukumar G., Solberklang M., (1996), Rational scale up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth., *Biotechnol. Bioeng.*, **53**: 696-706.

Yang M., Butler M., (2000), Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production and glycosylation, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**: 370-380.

Zhang J., Kalogerakis N., Behie L.A., (1994), Optimization of the physiochemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cells used in recombinant protein production, *J. Biotechnol.*, **33**: 249-258.

Zheng Y. Z., Greenfield P.F., Reid S., (1999), Optimized production of recombinant bluetongue core-like particles produced by the baculovirus expression system, *Biotechnol. Bioeng.*, **65**: 600-604.

Zu Pulitz J., Kubasek W.L., Duchene M., Margaret M., Von Specht B.U., Domdey H., (1990), Antibody production in baculovirus-infected insect cells, *Bio/Technol.*, **8**: 651-654.

Apéndice

A1. Tabla resumen de parámetros obtenidos en este trabajo

En las siguientes tablas se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo. Se presentan valores de cultivos sin infectar e infectados para la velocidad específica de crecimiento y para el tamaño celular promedio (estos están separados por una diagonal, el lado izquierdo corresponde a los cultivos sin infectar).

A: μ máx (h^{-1}), **B:** Máximo tamaño celular promedio (μm), **C:** Título viral ($\times 10^8$ UFP/ml), **D:** Proteína máxima ($\mu g/ml$), **E:** Velocidad específica máxima de producción de proteína ($\times 10^{-6}$ $\mu g/cel h$), **F:** Rendimiento específico máximo para proteína ($\times 10^{-6}$ $\mu g/cel$)

	MDI (UFP/cél)				
	0	0.1	1	5	10
A	0.009	0.004	0.004	0.003	0.001
B	13	14.27	16.23	16	16.13
C	0	0.46	1.3	0.36	0.46
D	0	11.45	15.12	51.11	21.87
E	0	0.0937	0.1288	0.997	0
F	0	8.67	16.37	68.3	51.2

	pH				
	4.8	5	5.35	5.5	5.8
A	0.005	0.008	0.008/0.006	0.008	0.007/0.02
B	15.37/15.25	18.02/16.80	17.35/16.65	17.53/17.64	14.12/16.97
C	6.7	6	0.49	0.53	0.5
D	3.32	5.15	11.36	13.67	28.68
E	0.01573	0.02378	0.0483	0.0278	
F	1.16	1.77	3.79	2.127	

	pH				
	6	6.2	6.6	6.8	7
A	0.005/0.03	0.008/0.01	-0.015	-0.031	-0.042
B	15.67/17.05	17.17/17.32	13.75/17.03	12.01/16.01	13.35/15.72
C	0.66	0.36	0.15	0.25	0.25
D	28.59	25.75	21.31	12.2	4.42
E		0.0294			
F		2.35			

	Temperatura (°C)		
	27	30	37
A	0.01/0.0127	-0.022-0.023	-0.28-0.028
B	15.13/15.24	15.5/ 15.65	15.6/ 15.61
C	5.024	4.5	5
D	6.33	0	0

	NH ₄ Cl adicionado (mM)					
	0	5	10	15	20	25
A	0.007/0.008	0.008/0.009	0.007/.01	0.008/0.009	0.006/0.008	0.005/0.008
B	15.61/16.64	15.83/17.11	15.58/16.38	15.54/16.15	15.82/15.87	15.55/15.32
C	4	2.6	1.6	1.8	1.6	1.2
D	73.23	27.15	6.84	0	0	0
E	0.2977	0.0766	0.02508	0	0	0
F	27.39	7.08	1.667	0	0	0

	NaCl adicionado (mM)					
	0	5	10	15	20	25
A	0.009/0.014	0.01/0.009	0.01/0.009	0.009/0.009	0.009/0.01	0.008/0.01
B	14.52/16.04	14.64/16.93	14.91/17.05	14.78/16.75	14.69/16.42	14.65/16.37
C	3.8	3.2	3.6	2.1	3.6	4.15
D	15.09	31.4	46.13	54.6	6.56	8.93
E	0.01186	0.1104	0.1124	0.1566	0.002092	0.02487
F	4.086	9.634	13.67	18.39	5.346	2.569