



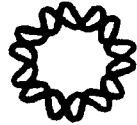
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

---

00551

19



**EFFECTO DEL TIEMPO DE INFECCIÓN Y DE LA MULTIPLICIDAD DE  
INFECCIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA MODELO  
EXPRESADA EN DOS LÍNEAS CELULARES DE INSECTO:  
HIGH FIVE Y SF9 EN CULTIVOS EN SUSPENSIÓN**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**P R E S E N T A :**

**I.B.Q. ANGÉLICA ORTEGA GARCÍA**

CUERNAVACA, MOR.

2003

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Sandino Estrada Mondaca, en el grupo de investigación del Dr. O. 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 158937 y del proyecto I33104-B, 33348-B, NC-230, así como con el proyecto IN216100 de DGAPA/UNAM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

---

Gracias a todos aquellos que hicieron posible este trabajo:

A mi tesoro máspreciado:  
mi familia y amigos.

A los que no estuvieron físicamente, pero si en mi corazón y pensamiento, incluyéndote a ti.

---

TEES CON  
FALLA DE ORIGEN

---

**Agradecimientos:**

Al Dr. Sandino Estrada Mondaca, por soportar mis torpezas y mi mal genio.

Al Dr. O. Tonatiuh Ramírez Reivich, por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación y por ser un ejemplo a seguir.

Al Comité tutorial: Dra. Susana López y Dr. Rafael Vázquez D.

A los miembros del jurado: Dr. Roberto Stock Silberman  
Dr. Fernando López Casillas  
Dra. Clarita Olvera Carranza  
Dr. Ernesto Méndez Salinas

A Karin Levy por su apoyo en los últimos momentos y a Javier Dorantes por su apoyo técnico.

---

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

	Página
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	vi
Nomenclatura	vii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>II. ANTECEDENTES</b>	5
II. 1. Baculovirus y ciclo de infección.	5
II. 2. Expresión de proteínas recombinantes en el sistema Célula de Insecto-Baculovirus (CI-BV).	7
II. 3. Líneas celulares modelo.	8
II. 4. Metabolismo de las líneas celulares de insecto.	9
II. 5. Condiciones de cultivo.	12
II. 6. Variables de infección: multiplicidad y tiempo de infección.	13
II. 7. Alternativas utilizadas para la optimización de la producción de la proteína recombinante.	17
<b>III. OBJETIVOS</b>	19
III.1. Objetivo General.	19
III.2. Objetivos específicos.	19

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
IV. 1. Líneas celulares.	20
IV. 2. Criopreservación de las líneas celulares.	20
IV. 3. Baculovirus recombinante.	21
IV. 4. Cinéticas de producción en matraces agitados.	22
IV. 5. Métodos analíticos.	22
IV. 6. Consideraciones matemáticas.	26
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	31
V. 1. Caracterización de las líneas celulares High five y Sf9 en cultivos control no infectados	31
V. 2. Caracterización de los cultivos infectados de las líneas celulares High five y Sf9.	42
V. 3. Caracterización de la producción de la proteína recombinante.	50
V. 4. Tendencia de los nutrientes clave: glucosa y glutamina.	57
V. 4. 1. Tendencia de la glucosa remanente.	57
V. 4. 2. Tendencia de la glutamina remanente.	62
V. 5. Generación de lactato.	66
V. 6. Determinación del rendimiento de proteína recombinante con respecto a los sustratos clave: glucosa y glutamina de las líneas celulares de insecto.	68
V. 7. Determinación del rendimiento de la generación de biomasa con respecto al sustrato en las líneas celulares de insecto.	70
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	72
<b>VII. PERSPECTIVAS</b>	74

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

---

<b>VIII. REFERENCIAS</b>	75
<b>Anexo I: Cuantificación de metabolitos en el medio de cultivo.</b>	87
<b>Anexo II: Montaje de las técnicas para el análisis de carbohidratos por Electroforesis capilar.</b>	89

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Índice de figuras**

	<b>Página</b>
Figura 1. Metabolismo en células de insecto	11
Figura 2. Cinética de crecimiento de células High five..	32
Figura 3. Cinéticas de consumo de nutrientes en cultivos sin infectar de células High five.	34
Figura 4. Cinética de producción de metabolitos de desecho en cultivos sin infectar de células High five.	36
Figura 5. Cinética de crecimiento de células Sf9.	38
Figura 6. Cinéticas de consumo de nutrientes en cultivos sin infectar de células Sf9.	39
Figura 7. Densidad celular viable típica de cultivos infectados.	42
Figura 8. Expansión celular de células High five infectadas.	44
Figura 9. Viabilidad de células High five durante las cinéticas de infección.	45
Figura 10. Expansión celular de células Sf9 infectadas.	47
Figura 11. Viabilidad de células Sf9 durante las cinéticas de infección.	48
Figura 12a. Geles para la detección de proteína.	50
Figura 12b. Geles para la detección de proteína.	52
Figura 13. Velocidad específica de generación de proteína en células High five.	55
Figura 14. Velocidad específica de generación de proteína en células Sf9	56
Figura 15. Cinéticas de consumo de glucosa en cultivos infectados de células High five.	58
Figura 16. Cinéticas de consumo de glucosa en cultivos infectados de	

células Sf9.	59
Figura 17. Velocidades específicas de consumo de glucosa en la línea celular High five.	61
Figura 18. Velocidades específicas de consumo de glucosa en la línea celular Sf9	62
Figura 19. Cinéticas de consumo de glutamina en cultivos infectados de células High five.	63
Figura 20. Cinéticas de consumo de glutamina en cultivos infectados de células Sf9.	64
Figura 21. Velocidades específicas de consumo de glutamina en la línea celular High five.	65
Figura 22. Velocidades específicas de consumo de glutamina en la línea celular Sf9.	66
Figura 23. Velocidades específicas de generación de lactato en la línea celular High five.	67
Figura 24. Rendimiento de proteína recombinante con respecto al sustrato.	69
Figura 25. Rendimiento de la biomasa generada con respecto al sustrato.	71
Figura A1. Fetuina bovina sometida al tratamiento sin/con PNGasa F	91
Figura A2. Electroferogramas de los carbohidratos correspondientes a la fetuina bovina.	93
Figura A3. Electroferogramas de la proteína control procesada bajo las condiciones de purificación que la proteína recombinante.	96
Figura A4. Proteína recombinante sometida al tratamiento del análisis de glicanos	97

**Índice de tablas**

	<b>Página</b>
Tabla 1. Modificaciones postraduccionales y rendimiento de proteínas en diferentes sistemas de expresión.	8
Tabla 2. Velocidades específicas de consumo y generación de metabolitos en cultivos control de la línea celular High five.	35
Tabla 3. Velocidades específicas de consumo y generación de metabolitos en cultivos control de la línea celular Sf9.	40
Tabla 4. Densidades celulares máximas alcanzadas a los diferentes TDI y MDI en las líneas celulares High five y Sf9.	43
Tabla 5. Comparación de la concentración de proteína y rendimiento por $10^6$ células viables en células High five.	51
Tabla 6. Comparación de la concentración de proteína y rendimiento por $10^6$ viables células en células Sf9.	53
Tabla A1. Resumen de las estructuras de los N-glicanos encontrados en la Fetuina Bovina obtenida por HPLC/MS.	92

## Nomenclatura

$x_{vm}$ -	Concentración celular máxima.
$x_0$ -	Concentración celular inicial.
$x_v$ -	Concentración celular viable.
$P_{máx}$ -	Concentración de proteína máxima.
$x$ -	Densidad celular viable.
$x_0$ -	Densidad celular viable al inicio del cultivo.
$x_{vm}$ -	Densidad celular viable máxima.
$E_c$ -	Expansión celular.
$\int x_v dt$ -	Índice de viabilidad.
MDI-	Multiplicidad de infección.
$N_c$ -	Número de células.
%v.-	Porcentaje de viabilidad.
TDI-	Tiempo de infección.
$t_d$ -	Tiempo de duplicación.
$Y_{p,glc}$ -	Rendimiento de proteína con respecto a glucosa.
$Y_{p,gln}$ -	Rendimiento de proteína con respecto a glutamina.
$Y_{p,x}$ -	Rendimiento de proteína con respecto a biomasa.
$td$ -	Tiempo de duplicación.
$\mu$ -	Velocidad específica de crecimiento.
$k_{glc}$ -	Velocidad específica de consumo de glucosa.
$k$ -	Velocidad específica de generación de proteína ó consumo de sustrato.
PNGasa F.-	Enzima que hidroliza el enlace N-glicosídico formado entre el residuo de Asp y el glicano.

El cultivo de células animales como herramienta para la expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico, profiláctico o de diagnóstico ha aumentado en el mercado biotecnológico en los últimos años. Aún cuando los cultivos son relativamente caros, el trabajar con líneas celulares establecidas garantiza la calidad del producto seleccionado. Entre los sistemas de expresión en uso, destaca el de Células de Insecto-Baculovirus (CI-BV). En los últimos 15 años, el sistema CI-BV ha sido utilizado como un sistema modelo, debido a su capacidad para expresar una gran variedad de proteínas recombinantes y a su capacidad de realizar las modificaciones postraduccionales presentes en dichas proteínas de una manera muy similar a las realizadas por las células de mamíferos. La optimización de la producción de la proteína recombinante en este sistema se ha dado a través de la selección de la línea celular utilizada, de la manipulación de la multiplicidad de infección (MDI), del tiempo de infección (TDI) y del tiempo de cosecha.

El objetivo principal de este trabajo es hacer la comparación del comportamiento de dos líneas celulares de insecto como consecuencia de la manipulación de la MDI y del TDI. Los resultados obtenidos se centran en la expresión de la proteína recombinante utilizada como modelo y la repercusión de éstas dos variables sobre el consumo de metabolitos clave. La proteína recombinante modelo seleccionada tiene un peso molecular 60 kDa.

Las líneas celulares de insecto utilizadas fueron TN-5B1-4 (High five) derivada de *Trichoplusia ni* y Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda*, las cuales fueron cultivadas en matraces agitados. Se seleccionaron tres TDI para cada una de las líneas celulares. Para los cultivos de células High five los TDI seleccionados fueron:  $0.3 \times 10^6$  ( $T_1$ ),  $1.5 \times 10^6$  ( $T_2$ ) y  $3 \times 10^6$  ( $T_3$ ) células/mL. Para los cultivos de células Sf9 los TDI seleccionados fueron:  $0.5 \times 10^6$  ( $T_1$ ),  $1.5 \times 10^6$  ( $T_2$ ) y  $4.4 \times 10^6$  ( $T_3$ ) células/mL. Igualmente tres MDI fueron seleccionadas para ambos cultivos 0.1, 1 y 10 ufp/cél.

Se observó que la producción de la proteína recombinante depende fuertemente de la línea celular utilizada. En lo que respecta a la producción de proteína por unidad de volumen, células High five produjeron de 2.4 a 3.8 veces más que células Sf9 a un  $T_2$ , sin encontrar ninguna diferencia entre las demás condiciones de infección. En cuanto a los

# PAGINACION DISCONTINUA

rendimientos específicos encontramos que éstos disminuyen al aumentar el TDI, resultados que coinciden con lo reportado ya en la bibliografía. En células High five, los valores de dicho parámetro a un  $T_2$  disminuyeron hasta 1.5 veces con respecto al  $T_1$ , mientras que en células Sf9 la disminución es de 3 a 5.5 veces. Al comparar los valores entre las líneas celulares a un mismo TDI encontramos que a un  $T_1$  células High five producen en promedio 1.5 veces más proteína que células Sf9, mientras que a un  $T_2$  esta diferencia es en promedio 4.3 veces mayor. En cultivos infectados a altas concentraciones celulares ( $3 \times 10^6$  cel/mL para High five y  $4.4 \times 10^6$  cel/mL para Sf9) no se detectó producción de proteína recombinante, posiblemente como consecuencia de las condiciones del cultivo celular ó del medio de cultivo.

El análisis del consumo de metabolitos mostró que la línea celular High five consumió de manera comparable glucosa y glutamina, más de lo consumido por la línea celular Sf9. Las velocidades específicas de consumo para cada nutriente son mayores a bajas concentraciones celulares. La velocidad de consumo de glucosa de cultivos a altas concentraciones de células High five es 2 veces superior a cultivos similares de células Sf9. La velocidad de consumo de glutamina es 5 veces superior en células High five.

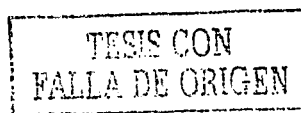
En lo que respecta a los rendimientos de proteína recombinante con respecto a los nutrimentos clave, aún cuando las diferencias del consumo son mayores para células High five no hay diferencias importantes con respecto a los rendimientos obtenidos por células Sf9. Los resultados globales indican que células Sf9 producen proteína recombinante sin que exista un agotamiento de los nutrimentos claves, siendo una línea celular más eficiente.

Los rendimientos de biomasa con respecto a los nutrimentos clave indican que a  $T_1$  ambas líneas celulares utilizan de la misma manera los nutrimentos consumidos, sin embargo al aumentar el TDI, células Sf9 se caracteriza por una eficiencia metabólica que no se observa en células High five y que se mantiene a TDI mayores, en donde los nutrimentos son utilizados preferencialmente para el mantenimiento del cultivo celular.

El sistema celular de elección para la expresión heteróloga de proteínas ha sido *E. coli*. Sin embargo el gran problema de este sistema es que la mayoría de las veces las proteínas recombinantes son expresadas en el citoplasma bacteriano de manera insoluble e inactivas. Estos inconvenientes no se observan cuando las proteínas son expresadas en líneas celulares derivadas de organismos eucariotas superiores. Adicionalmente, éstas líneas celulares tienen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, fosforilación, y acilación (Geisse *et al.*, 1996). Entre las líneas celulares más comúnmente utilizadas como sistemas de expresión destacan las células de ovario de hamster chino (CHO) (Page y Sydenham, 1991; Cosgrove *et al.*, 1995; Lindberg *et al.*, 1991) y las células de riñón de hamster bebé (BHK) (Wirth *et al.*, 1988), entre otras. La expresión de la proteína recombinante depende fuertemente de la línea celular utilizada, de la propia construcción del plásmido (Wenger *et al.*, 1994), del procedimiento de transfección para obtener la línea celular transformada y del mantenimiento de la misma como una línea celular estable (Bebbington *et al.*, 1992; Kellems, 1991).

Otro sistema de expresión que ha ganado gran importancia en los últimos 15 años es el derivado de líneas celulares de insecto en donde éstas células son infectadas con un baculovirus recombinante (Células de insecto-Baculovirus, CI-BV). Este sistema se originó a principios de 1960 al generarse la primera línea celular *in vitro*. El éxito alcanzado por este sistema se debe a su capacidad para expresar una gran variedad de proteínas intracelulares, de membrana o bien secretadas al medio de cultivo.

Las ventajas que presenta este sistema sobre el de células de mamífero están basadas principalmente en: la productividad, considerando que el promotor utilizado por CI-BV es muy fuerte, éstas pueden producir hasta 250 veces más que las células de mamífero (Luckow, 1991). Seguridad, el baculovirus no puede replicarse en células de mamífero, sin embargo es capaz de incorporarse en ciertas células animales por lo que recientemente se le ha empleado como un vector para tratamientos de terapia génica (Ghosh *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 1995; Boyce y Bucher, 1996; Shoji *et al.*, 1997; Condrey *et al.*, 1999). Procesamiento postraduccional, las líneas celulares son capaces de realizar un amplio rango de modificaciones postraduccionales muy semejantes a las





realizadas por mamíferos. Finalmente el costo ya que estas líneas celulares están adaptadas a crecer en medios libres de suero, por lo que esto representa un ahorro significativo sobre el costo total de mantenimiento y producción (Sanderson *et al.*, 1999).

La estrategia utilizada para producir proteínas heterólogas en el sistema de expresión CI-BV involucra tres etapas: (1) el crecimiento de las células de insecto a una concentración celular dentro de la fase de crecimiento exponencial, (2) la infección de las células por el baculovirus que contiene el gen que codifica para la proteína de interés bajo el control del promotor de la poliedrina y por último (3) la recolección y purificación de la proteína (Murhammer, 1991).

La optimización de la producción de la proteína recombinante en este sistema se ha realizado principalmente mediante la manipulación de la multiplicidad de infección (MDI) y del tiempo de infección (TDI) una vez que ha sido seleccionada una línea celular en particular. Los trabajos realizados indican que la productividad específica disminuye de manera drástica al aumentar el TDI, mientras que en lo referente a la manipulación de la MDI no se han encontrado diferencias en la expresión de la proteína, pero si se ha observado que el trabajar con MDI menores a 1 unidad formadora de placa/célula disminuye la probabilidad de llevar a cabo infecciones con partículas virales defectivas.

Los trabajos existentes se basan en la manipulación de la MDI sin tomar en consideración de manera estricta el concepto del TDI, aunado a que no existe ningún trabajo en donde se reporte una comparación bajo nuestras condiciones de infección de una manera tan rigurosa. El objetivo principal de éste trabajo fue el de realizar una comparación del comportamiento de dos líneas celulares de insecto: High five y Sf9 como consecuencia de la manipulación de la MDI y del TDI en términos del consumo de los metabolitos principales, y de la producción de la proteína recombinante.

Los resultados generados durante este estudio contribuirán, junto con los ya existentes al conocimiento del sistema, así como la aportación de condiciones claves para la optimización de la producción de proteínas recombinantes.

## II. 1. Baculovirus y ciclo de infección.

Los baculovirus están clasificados dentro de la familia *Baculoviridae*. Es un virus de doble cadena de AND circular, superenrollada con una longitud de 80-200 kilopares de bases (kpb) contenida dentro de una nucleoproteína conocida como *core*. La cápside es de forma bacilar. La cápside y el *core* en conjunto son denominadas nucleocápside (O'Reilly *et al.*, 1994). Dentro de esta familia existen dos géneros: el género *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y el género *Granulovirus* (GV) (Volkman *et al.*, 1995).

Los vectores de expresión han sido construidos a partir de dos especies del género *Nucleopolyhedrovirus* (NPV): *Autographa californica* NPV (AcMNPV), y *Bombyx mori* NPV (BmNPV), con aproximadamente 130 kpb de longitud.

Los virus del género NPV se caracterizan por producir dos tipos de partículas virales bioquímica y morfológicamente diferentes durante la infección (O'Reilly *et al.*, 1994). Estos virus son: virus ocluidos (VO) y virus sin cubierta (VSC). Los VO se forman en el núcleo de las células infectadas y pueden contener una o múltiples nucleocápsides (MNPV). Estas nucleocápsides son recubiertas por una matriz de proteína cristalina conocida como poliedrina. El fenotipo VSC, se produce durante la replicación. Este virión tiene una única nucleocápside y su envoltura es obtenida de la membrana plasmática de las células infectadas (O'Reilly *et al.*, 1994; Volkman *et al.*, 1995). La nucleocápside es idéntica para ambos virus. La diferencia bioquímica que existe es la presencia de la glicoproteína de fusión gp64 en la membrana de los VSC pero no en los VO (O'Reilly *et al.*, 1994). Esta proteína da lugar a estructuras prominentes de la envoltura conocidas como peplómeros (O'Reilly *et al.*, 1994), cuya función es de reconocimiento de receptores específicos de la superficie celular (Tani *et al.*, 2001). Por lo tanto la proteína gp64 se adhiere a la célula, lo que permite que el virus penetre en ella mediante un mecanismo de endocitosis absorptiva (O'Reilly *et al.*, 1994).

La infección y replicación del baculovirus comprende una serie de eventos consecutivos, divididos en cuatro fases básicas que constituyen el ciclo viral. Estas fases consisten en 1) ingestión de baculovirus por la larva (*in vivo*) ó endocitosis absorptiva del virus sobre la célula (*in vitro*), 2) reprogramación celular para la replicación viral (infección temprana), 3) producción de los VO (infección tardía) y 4) producción de VSC (infección muy tardía) (O'Reilly *et al.*, 1994).

Durante estas fases se lleva a cabo la síntesis de proteínas virales en forma de cascada: las proteínas del baculovirus divididas temporalmente en inmediatas ( $\alpha$ ), tempranas ( $\beta$ ), tardías ( $\gamma$ ), y muy tardías ( $\delta$ ). Existen proteínas no virales que se requieren para la iniciación de la producción del RNA mensajero (transcripción) o para la síntesis temprana de proteínas (traducción) (Granados, 1980; Blissard y Rohrmann, 1990; Lucklow, 1991; O'Reilly *et al.*, 1994;).

El ciclo de infección *in vivo* inicia cuando la larva de un insecto susceptible, consume alimentos contaminados con VO. La matriz cristalina de la poliedrina es solubilizada por el pH alcalino del tracto digestivo del insecto, liberando viriones que entran en las células epiteliales columnares del intestino medio por fusión a la membrana plasmática (Granados, 1980; Volkman y Goldsmith, 1985; Blissard y Rohrmann, 1990). Los VO liberados se difunden a través del citoplasma hasta el núcleo al que entran a través de los poros nucleares. En el interior del núcleo, el virus es desnudado iniciando así su replicación.

La primera etapa de la transcripción inicia cuando los genes virales de transcripción inmediata ( $\alpha$ ) son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula huésped. La presencia de estos genes desencadenan la transcripción de los genes  $\beta$ . La síntesis de las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  se lleva a cabo entre las 3 y 6 horas de que ha iniciado la infección viral, iniciando así la síntesis del ADN viral. En las primeras 6 horas postinfección (hpi), se llevan a cabo rearrreglos en el citoesqueleto de las células infectadas. También se observa hipertrofia, es decir existe un aumento anormal del volumen de ciertos organelos como el núcleo y la acumulación de cromatina granular.

La fase de infección tardía se extiende a partir de las 6 hpi en donde inicia la transcripción de los genes tardíos ( $\gamma$ ). Estos genes incluyen la mayoría de las proteínas estructurales de los viriones ocluidos. El ensamblaje de los viriones inicia con la formación del estroma virogénico entre las 12 y las 18 hpi. Las nucleocápsides se ensamblan durante este periodo gemando del núcleo y siendo transportadas hacia la membrana plasmática en donde se llevará a cabo el proceso de inserción de la glicoproteína viral gp64.

La fase de infección muy tardía inicia entre las 18 y las 20 hpi. Algunos de los viriones que permanecen en el núcleo celular entran en un proceso de oclusión. Otros saldrán del núcleo, se transferirán a través de la membrana plasmática hasta el exterior de la célula, e infectarán otras células. La oclusión es el resultado de la transcripción de los genes  $\delta$ , que codifican para las proteínas virales: p10 y poliedrina. Posteriormente la poliedrina recubrirá a los viriones individuales o en grupos. La acumulación de estos cuerpos ocluidos en el interior de la célula

genera lisis celular. En cultivos *in vitro*, si la oclusión existiera, dependería de la fase de crecimiento del cultivo celular, de las condiciones del medio de cultivo así como de los niveles de oxígeno (O'Reilly, *et al.*, 1994).

En la mayoría de los cultivos realizados *in vitro*, la expresión de proteínas recombinantes se lleva a cabo utilizando preferencialmente al promotor de la poliedrina (*polh*). Este promotor muy tardío es un promotor muy fuerte. La poliedrina puede corresponder en porcentaje, a más del 50% de la proteína celular, obteniéndose concentraciones de 500-1000 mg/L de poliedrina utilizando el baculovirus silvestre (Smith y Summers, 1978). Al poner al gen heterólogo bajo el control del promotor de la poliedrina, se garantiza su expresión abundante en etapas muy tardías del ciclo de infección del baculovirus (O'Reilly *et al.*, 1994).

## **II. 2. Expresión de proteínas recombinantes en el sistema Célula de Insecto-Baculovirus (CI-BV).**

Este sistema de expresión ha sido utilizado para la producción de proteínas recombinantes desde hace muchos años cuando Smith y Summers lo desarrollaron (1983 a-b). Desde entonces a la fecha ha sido utilizado ampliamente para la expresión de proteínas que son acumuladas en el interior de la célula, asociadas a la superficie celular e incluso secretadas al medio de cultivo. Aunado a esto, el sistema es capaz de expresar proteínas recombinantes a altas concentraciones, de tamaños y complejidad variados, así mismo es capaz de realizar diferentes modificaciones postraduccionales típicas de células eucariotas (tabla 1).

El sistema CI-BV ha sido empleado en la producción de proteínas modelo que han servido para el conocimiento y caracterización del sistema (Jarvis y Summers, 1989; Davis *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994a-b), para la expresión de proteínas que en la naturaleza se encuentran en muy bajas concentraciones o son muy difíciles de aislar, tales como oncoproteínas (Meij *et al.*, 2000), proteínas de la matriz extracelular (Misenheimer *et al.*, 2000), proteínas que participan en la traducción de señales (Rankl *et al.*, 1994), así como chaperonas (Cala, 2000). También ha sido utilizado para la producción de hormonas que presentan actividad *in vitro* e *in vivo* (Grossmann *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2000; Nagata *et al.*, 2002), debido a que el sistema es capaz de realizar modificaciones postraduccionales encontradas en células de mamífero (ver tabla 1); así como en la expresión de proteínas del sistema nervioso central (Nguyen *et al.*, 1993); expresión y caracterización de partículas virales para estudios inmunológicos y terapéuticos

(Smith *et al.*, 1983b; Horiuchi *et al.*, 1987; Chanzenbalk y Rapoport, 1995), incluyendo la producción de vacunas (Wagner *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1999).

**Tabla 1. Modificaciones postraduccionales y rendimiento de proteínas en diferentes sistemas de expresión (Luckow y Summers, 1988).**

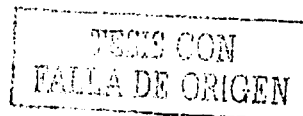
Sistema de expresión / Modificación Postraduccional	E. coli	Levadura	Células de mamífero	Células de insecto
Proteólisis	+/-	+/-	+	+
Glicosilación *	-	+	+	+
Secreción *	+/-	+	+	+
Plegamiento	+/-	+/-	+	+
Fosforilación	-	+	+	+
Acilación	-	+	+	+
Amidación	-	-	+	+
Rendimiento, % peso seco	1-5%	1%	<1%	30%

\* Modificaciones postraduccionales más estudiadas en el sistema CI-BV.

### II. 3. Líneas celulares modelo.

Estudios realizados sobre la producción de proteínas recombinantes en células de insecto (Wickham *et al.*, 1992a; Davis *et al.*, 1993a) han utilizado esencialmente dos líneas celulares, una derivada de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y la otra de *Trichoplusia ni* (High five).

Sf9 fue clonada por Smith y Cherry en 1983 a partir de la línea celular primaria IPLB-SF21 AE, derivada del tejido del ovario de la pupa de *Spodoptera frugiperda*. Esta línea celular ha sido de las más estudiadas, se ha caracterizado su metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (Reuveny *et al.*, 1992; Bédard *et al.*, 1993; Ferrance *et al.*, 1993; Drews *et al.*, 1995; Öhman *et al.*, 1995), su crecimiento en cultivos en suspensión (Murhammer y Gooche, 1988; Murhammer y Gooche, 1990), así como el efecto de las concentraciones de oxígeno sobre su



crecimiento y sobre la expresión de la proteína recombinante (Reuveny *et al.*, 1993b; Palomares, 1996; Arróniz, 2003).

High five (Tn-5B1-4), es una línea celular derivada de células embriogénicas de *Trichoplusia ni*. En años recientes, ha recibido considerable atención por producir mayores rendimientos de proteína recombinante que la línea celular Sf9 (Wickman *et al.*, 1992a; Davis *et al.*, 1993; Saarinen *et al.*, 1999). Se ha caracterizado su metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (Rhiel *et al.*, 1997) y se observó que su crecimiento en cultivos en suspensión genera agregados celulares (Saarinen *et al.*, 1999). Para evitar la formación de éstos agregados se ha adicionado un surfactante comercial Pluronic F-68. Sin embargo se ha comprobado que células en suspensión o en agregados tienen las mismas velocidades específicas de crecimiento, metabolismo y capacidad de síntesis de proteína recombinante cuando son infectados con un baculovirus (Saarinen *et al.*, 1999).

Ambas líneas han sido caracterizadas de manera independiente, sin embargo, hasta la fecha no se ha mostrado ninguna comparación exhaustiva entre éstas líneas celulares, cultivadas e infectadas bajo las mismas condiciones.

#### II. 4. Metabolismo de las líneas celulares de insecto

Las fuentes principales de carbono y energía para células de insecto son glucosa (Grace y Brzostowski, 1966; Clements y Grace, 1967; Ferrance *et al.*, 1993; Reuveny *et al.*, 1992) y glutamina, aminoácido esencial para la obtención de energía (figura 1, O'reilly *et al.*, 1994). Sin embargo existen otros carbohidratos (maltosa, sacarosa, fructosa) que han sido utilizados por algunas líneas celulares de insecto como fuentes de carbono alternas después de que la glucosa ha sido consumida completamente (figura 1, Stavroulakis *et al.*, 1991; Bédard *et al.*, 1993).

El consumo total de glucosa desencadena una serie de eventos metabólicos. La viabilidad celular disminuye (Wang *et al.*, 1993a), mientras que la acumulación de amonio es consecuencia de utilizar a la glutamina como fuente alterna de energía (figura 1, Bédard *et al.*, 1993).

Öhman y col. (1995), analizaron el efecto de la limitación de glucosa y glutamina en cultivos alimentados comparándolos con un cultivo en lote, observando principalmente la generación de dos productos metabólicos de desecho: alanina y amonio (figura 1). Cuando hay glucosa en exceso en el medio de cultivo, es consumida por las células y metabolizada en la vía

glicolítica para la producción de energía. Una posible consecuencia de éste metabolismo es la acumulación de piruvato y por lo tanto el flujo hacia el ciclo de Krebs se ve saturado. En células de insecto se ha observado que la vía alterna para disminución de este sobre flujo es la generación de alanina (figura 1). Por otra parte, se genera amonio cuando la glucosa se encuentra en condiciones limitantes, y la glutamina es utilizada para el abastecimiento energético celular (figura 1, Bédard *et al.*, 1993). Cuando la glucosa se encuentra en concentraciones limitantes, existe una disminución del flujo de piruvato hacia el ciclo de Krebs, limitando así la generación de alanina.

Bajo limitaciones de oxígeno en el sistema las líneas celulares de insecto producen lactato. En células Tn5B1-4 los reportes varían indicando una acumulación de hasta 28 mM (Rhiel *et al.*, 1997), mientras que células Sf9 no acumulan concentraciones significativas de lactato (1.5-11 mM, Kamen *et al.*, 1991; Bédard *et al.*, 1993; Rhiel *et al.*, 1997).

El metabolismo de células infectadas también ha sido estudiado. Los reportes indican que en períodos de postinfección, la glucosa es consumida a altas velocidades específicas (0.05  $\mu\text{mol}/10^6$  células\*h) por ambas líneas celulares (Tn5B1-4 y Sf9), siendo hasta dos veces mayor a la observada en cultivos en crecimiento (Wang *et al.*, 1993a; Taticek y Shuler, 1997).

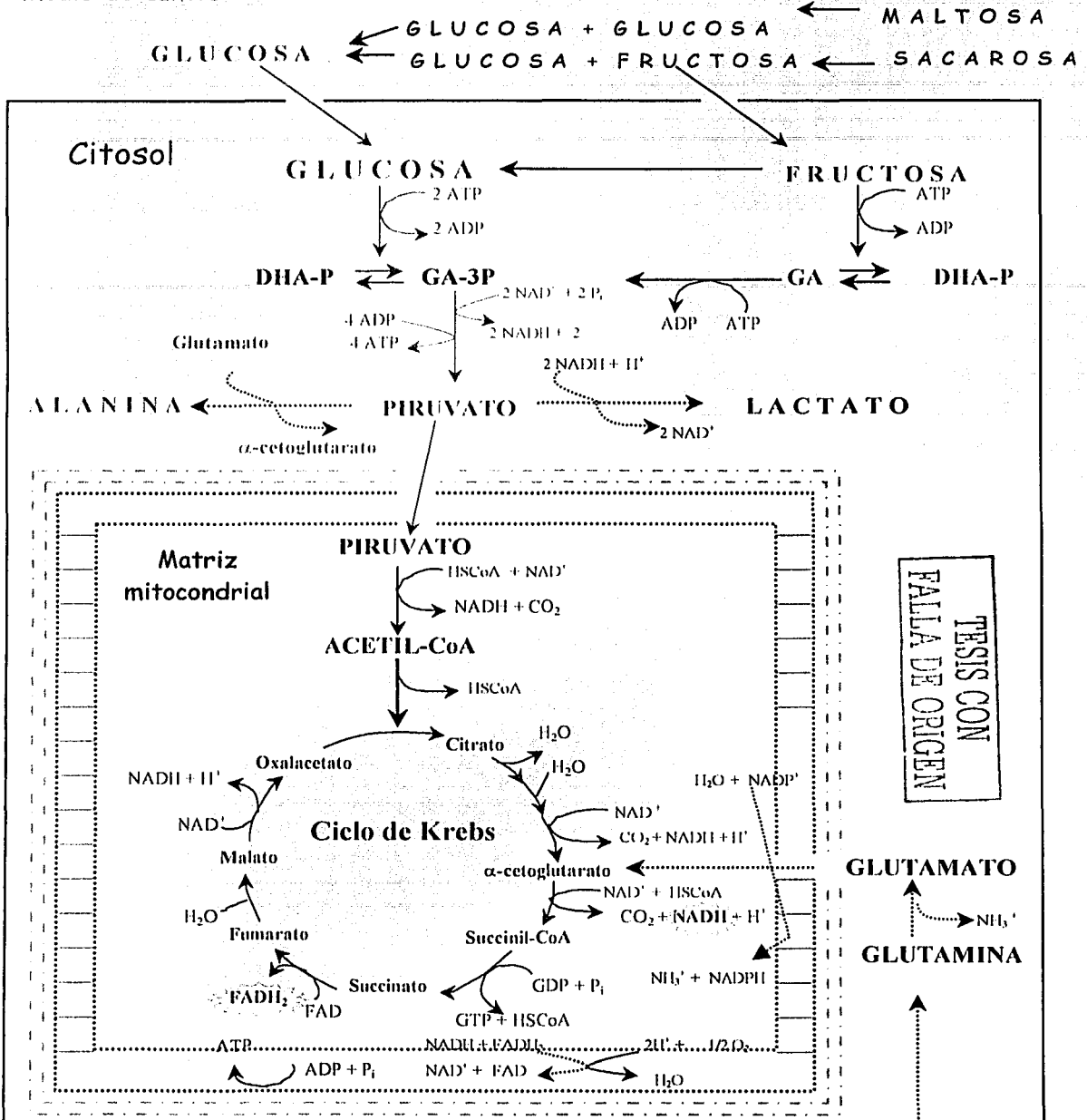
En lo que corresponde a las velocidades específicas de consumo de glutamina, éstas no varían entre cultivos sin infectar e infectados (Rhiel *et al.*, 1997). Se cree que este aporte suplementario de energía es utilizado para la producción del ADN viral así como de la proteína recombinante (Wang *et al.*, 1993a; Taticek y Shuler, 1997).

En cuanto a la acumulación de lactato y amonio (cambios de pH intracelular), pocos reportes indican un incremento en la acumulación de lactato (Graf y Schugerl, 1991; Kamen *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993a), mientras que los valores reportados de amonio producido en cultivos infectados son variados (Wang *et al.*, 1993a; Radford *et al.*, 1997; Rhiel, *et al.*, 1997).

Rhiel y col. (1997), observaron una acumulación de amonio durante la infección (2.5 mM a 7 mM), mientras que Wang y col. (1993a) reportaron que la concentración de amonio disminuyó de 2 mM a 0.5 mM después de que el cultivo fue infectado, manteniéndose constante después de las 80 hpi. Radford y col., (1997) observaron concentraciones de amonio de 2.5 mM manteniéndose constantes durante el periodo de infección. Se ha visto que la caída en la concentración de lactato y amonio coinciden con la producción de alanina después de la infección, sugiriéndose que el lactato puede ser convertido a piruvato, para la generación de alanina (Hassell *et al.*, 1991).

II. Antecedentes

Medio de cultivo



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

----- Membrana mitocondrial interna.  
 ..... Membrana mitocondrial externa.

- Metabolismo aeróbico (Citosol).
- ..... Metabolismo aeróbico (Matriz mitocondrial).
- Metabolismo anaeróbico.
- Fuente de carbono alterna.
- ..... Metabolismo aeróbico (citósol).
- Exceso de energía.

Figura 1. Metabolismo en células de insecto



## II. 5. Condiciones de cultivo

Las células de insecto han sido cultivadas en recipientes estáticos, y en suspensión ya sea en matraces ó en tanques de fermentación de diferentes tipos y geometrías. Los sistemas de cultivo en suspensión han servido para caracterizar el crecimiento y metabolismo de las líneas celulares de insecto utilizadas (Kioukia *et al.*, 1995a), pues este tipo de cultivo genera condiciones homogéneas que facilitan la predicción del comportamiento del cultivo celular.

En matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL presentan un área superficial suficiente para que las células obtengan el oxígeno necesario para su mantenimiento. Sin embargo, para airear volúmenes de fermentación mayores a los 10 L se requieren tubos permeables a través de los cuales el oxígeno es introducido (Miltenburger y David, 1980; Tramper *et al.*, 1986) evitando que las células resulten seriamente dañadas por la agitación y la aireación utilizada.

A las células animales, incluyendo las células de insecto, se les ha considerado líneas celulares sensibles al estrés, cuando son sometidas a condiciones hidrodinámicas severas (baffles, la presencia de vórtex, esfuerzos de corte en la punta del impulsor, la turbulencia caracterizada por el tamaño de los remolinos de Kolmogoroff, ó burbujeo) (Kioukia *et al.*, 1996). Para mitigar el efecto del daño celular debido a la ruptura de las burbujas se ha utilizado ampliamente el surfactante no iónico poliol Pluronic F-68 (Handa *et al.*, 1987; Murhammer y Gooche, 1988). Este surfactante es un bloque de copolímeros de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno) con un peso molecular de 8.36 kDa. El bloque central de poli(oxipropileno) de la molécula es hidrofóbico y el bloque de poli(oxietileno) es hidrofílico (Yusuf, 2000). Este polímero reduce la fluidez de la membrana plasmática (Ramírez y Mutharasan, 1992), evitando que las células se adhieran a las burbujas (Murhammer y Gooche, 1988; Handa-Corrigan, 1989; Chalmers y Bavarian, 1991; Trinh *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1997; Michaels *et al.*, 1995). De acuerdo con Mizzrahi (1984), éste surfactante establece alrededor de la célula una estructura interfacial (de tipo micelar) que amortigua la intensidad del golpe generado por la ruptura de la burbuja de oxígeno.

Las líneas celulares de insecto Sf9 y Tn5B1-4 han sido cultivadas en fermentadores airlift o en tanques perfectamente agitados (Maiorella *et al.*, 1988; Kamen *et al.*, 1991; Murhammer y Gooche, 1988), obteniéndose velocidades específicas de crecimiento y concentraciones celulares máximas comparables con las obtenidas en matraces agitados. También han sido cultivadas

continuamente hasta por 4 meses. Este tipo de fermentación, proporciona condiciones ambientales constantes y homogéneas. Sin embargo se han obtenido concentraciones celulares viables bajas (Gooijer *et al.*, 1989; van Lier *et al.*, 1992; Wang y Bentley, 1994), comparadas con las obtenidas en cultivos en lote (Caron *et al.*, 1990; King *et al.*, 1991; Kamen *et al.*, 1991) e incluso en cultivos en perfusión (Wu *et al.*, 1989; Caron *et al.*, 1994), como consecuencia de la limitación de nutriente o acumulación de productos tóxicos. Cultivos infectados mantenidos en este sistema de fermentación, han mostrado un decaimiento eventual en la productividad al utilizar virus que han sido utilizados continuamente.

## **II. 6. Variables de infección: multiplicidad y tiempo de infección.**

El trabajar con el sistema CI-BV ha implicado el establecimiento y optimización de estrategias de infección y recolección del producto. Los factores claves e importantes a considerar son: concentración celular (Licari y Bailey, 1991; Lindsay y Betenbaugh, 1992), fase de crecimiento (O'Reilly *et al.*, 1994), composición del medio de cultivo (O'Reilly *et al.*, 1994), multiplicidad de infección (Licari y Bailey, 1991; Maiorella *et al.*, 1988; Murhammer and Gooche, 1988), y la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo en el momento de la infección (Caron *et al.*, 1990; Lindsay y Betenbaugh, 1992; Reuveny *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 1996).

Las características del inóculo deben de cuidarse especialmente para garantizar un adecuado desarrollo del cultivo, principalmente cuando serán infectados (Kioukia *et al.*, 1995b). Es muy importante que las células se encuentren en un estado fisiológico saludable, libres de limitaciones por nutrientes u oxígeno. Durante la infección, la división celular se detiene, mientras que otras actividades celulares continúan, tales como la respiración, la maquinaria transcripcional y traduccional que serán utilizadas para la multiplicación viral y la expresión de sus genes (Kioukia *et al.*, 1995b).

La concentración de proteína recombinante producida por células de insecto varía ampliamente de 1 a 1220 mg/L (Caron *et al.*, 1990; Maiorella *et al.*, 1988; Reuveny *et al.*, 1993b). El nivel de expresión está afectado principalmente por la línea celular utilizada como

huésped, por el promotor utilizado, así como por la proteína de interés (Matsuura *et al.*, 1986; Wickman *et al.*, 1992a; Johnson *et al.*, 1993).

**Tiempo de infección.** La concentración celular a la cual el cultivo de células de insecto es infectado con el baculovirus recombinante es conocida como el tiempo de infección (TDI) cuyas unidades son células/mL (Palomares y Ramírez, 1998). El tiempo de infección óptimo de un cultivo, está fuertemente influenciado por el cambio en la concentración de los nutrientes y los productos de desecho celulares existentes en el medio de cultivo. La concentración de los nutrimentos claves debe ser lo suficientemente alta para evitar su agotamiento prematuro antes de que el proceso de infección se lleve a cabo completamente. La concentración de los metabolitos de desecho debe ser lo suficientemente baja para permitir que la infección viral y la producción de proteína se lleven a cabo adecuadamente (Yang *et al.*, 1996).

**Multiplicidad de infección.** Escogiendo un TDI apropiado es posible obtener un rendimiento de proteína por célula óptimo a cualquier multiplicidad de infección (MDI). La multiplicidad de infección es el número de partículas virales infecciosas por célula que se adicionan al cultivo en el momento de la infección. Las unidades de MDI son ufp/cel (unidades formadoras de placa/célula).

A altas MDI (>5 ufp/cel) todas las células serán infectadas de inmediato, llevándose a cabo una infección de tipo sincrónica, por lo que el crecimiento celular se detiene casi inmediatamente (Wong *et al.*, 1996). El rendimiento de proteína con respecto a biomasa, dependerá de la concentración celular alcanzada al TDI utilizado.

A MDI muy bajas, sólo una parte de la población celular es infectada inicialmente. La población restante seguirá reproduciéndose como una población no infectada. Ésta población y su progenie serán infectadas posteriormente por los virus generados en la primera generación de células infectadas (Wong *et al.*, 1996), fenómeno conocido como infección secundaria.

El estudio del efecto del TDI y MDI sobre la expresión de la proteína recombinante ha sido abordado ampliamente, sin embargo los resultados obtenidos están influenciados directamente por la línea celular utilizada, la proteína recombinante expresada y el sistema de cultivo.

**Manipulación del TDI.** Con el interés de optimizar la producción de la proteína recombinante se ha estudiado la etapa de crecimiento celular en donde se obtiene la máxima productividad específica (Zhang *et al.*, 1994a). Utilizando un baculovirus recombinante que contiene el gen de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, se infectaron células en cultivo al inicio, a la mitad y al final de la fase de crecimiento exponencial. Se encontró que las células infectadas a la mitad de la fase exponencial fueron las que generaron la productividad máxima. Mientras que la productividad obtenida en los cultivos infectados al final de la fase exponencial corresponde únicamente al 48% de lo obtenido por los cultivos infectados a la mitad de la fase exponencial (Zhang *et al.*, 1994a).

Por otra parte, se ha encontrado una disminución de 10 veces en la producción de proteína recombinante cuando los cultivos fueron infectados a una concentración celular de  $2 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  células/mL (bioreactor de 4 L, Caron *et al.*, 1990), sin que se detectara proteína recombinante a una concentración celular de  $4 \times 10^6$  células/mL, concentración celular que corresponde a la fase de crecimiento exponencial tardía. Maiorella y col. (1988) observaron una disminución del 60% de producción de proteína recombinante (bioreactor de 21 L) cuando las células fueron infectadas en la fase estacionaria, con respecto a la concentración de proteína recombinante producida en células infectadas durante la fase exponencial.

Estudiando la influencia de la composición del medio de cultivo como consecuencia de la concentración celular (yestolato ultrafiltrado, lípidos, aminoácidos, vitaminas, elementos traza y glucosa) sobre los rendimientos específicos de producción de proteína en el medio Sf900 II SFM, se observó una disminución en este parámetro cuando los cultivos de células Sf9 fueron infectados a concentraciones entre 3 y  $4 \times 10^6$  células/mL sin que existiera un recambio de medio de cultivo (Chan *et al.*, 1998). Utilizando el mismo medio (Sf900 II), se encontró que los rendimientos específicos obtenidos a TDI altos (infección realizada a concentraciones celulares iguales o mayores a  $5 \times 10^6$  células/mL cultivadas en matraces agitados de 250 cm<sup>3</sup>), disminuyen al aumentar el TDI. Los análisis de metabolitos realizados sobre las muestras, indican que no es el consumo total de la fuente de carbono como en la mayoría de los casos, lo que está limitando la expresión de la proteína recombinante (Radford *et al.*, 1997), pero si el agotamiento de la cisteína, que pareciera ser un amino ácido esencial en el cultivo de células de insecto (Tremblay *et al.*, 1992; Doverskog, *et al.*, 1998).

Todos los medios de cultivo contienen uno o más componentes que eventualmente limitan el crecimiento y la productividad en cultivos lote, generando cambios en la fisiología celular (Doverskog *et al.*, 2000). Además, otros factores que influyen en la fisiología celular son: número de pasaje, concentración celular, fase de crecimiento del inóculo así como la duración de la fase lag. Por lo tanto, resultados diferentes e incluso contradictorios se pueden obtener al utilizar la misma línea celular y medio de cultivo si no se tiene en consideración la historia del cultivo.

**Manipulación de la MDI.** Al utilizar MDI bajas, la concentración celular en el momento de la infección se vuelve un parámetro crítico a controlar para alcanzar altas concentraciones de proteína recombinante, particularmente cuando la infección se lleva a cabo al final de la fase exponencial (Caron *et al.*, 1990; Carpentier *et al.*, 2001). Las caídas observadas en los rendimientos específicos de producción de proteína obtenidos en las infecciones realizadas bajo estas condiciones dependen principalmente de las limitaciones de nutrientes existentes en los medios de cultivo (Bédard *et al.*, 1994; Elias *et al.*, 2000; Radford *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994a).

Zhang y col. (1994a), infectaron cultivos suspendidos a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células/mL a diferentes MDI, para observar su efecto sobre la expresión de la proteína recombinante. A MDI de 0.1 y 1 no existió diferencia entre las productividades obtenidas, pero sí fueron más bajas que las obtenidas a la MDI de 5 y 20. Se ha observado que los rendimientos de proteína recombinante no son significativamente afectados por la MDI en un rango de 1-20 ufp/célula al trabajar con Sf9 en cultivos suspendidos a la mitad o al final de la fase de crecimiento exponencial (Maiorella *et al.*, 1988; Murhammer y Gooche, 1988; Neutra *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos de la manipulación de la MDI en este sistema de expresión, han demostrado que al utilizar una MDI muy alta (100 ufp/celula) y una alta concentración celular ( $4.3 \times 10^6$  células/mL) se obtienen las máximas productividades, mientras que la productividad máxima de proteína a una baja concentración celular ( $1.2-2.5 \times 10^6$  células/mL) es obtenida cuando se trabaja con MDI bajas (menor a 1 ufp/célula) (Licari y Bailey, 1991; Bédard *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996).

Yang y col., (1996) expresaron la enzima lisosomal glucocerebrosidasa secretada en la línea celular TN-5B1-4, optimizaron la producción de la proteína manipulando el TDI, el MDI y

el tiempo de cosecha. Encontraron que cultivos con altas concentraciones celulares ( $4.7 \times 10^6$  células/mL) expresan proteína al ser infectados a una MDI de 0.3 ufp/cel, pero la expresión máxima es a una baja concentración celular ( $2.5 \times 10^6$  células/mL) al utilizar MDI de 0.015 ufp/cel.

## **II. 7. Alternativas utilizadas para la optimización de la producción de la proteína recombinante**

Uno de los problemas clave en la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células de insecto es la disminución de la productividad específica al aumentar la concentración de células infectadas por el baculovirus (Licari y Bailey, 1991; Whitford y Mertz, 1998).

Las primeras evidencias encontradas al respecto fueron las reportadas por Lynn y Hink (1978), quienes demostraron que cultivos de células TN-368 infectadas con el baculovirus silvestre a la mitad o al final de la fase S del ciclo celular contienen altos porcentajes de células infectadas en comparación con aquellos cultivos que fueron infectados durante la fase  $G_2$ , fase de arresto celular como consecuencia del consumo de nutrimentos (Ferting *et al.*, 1990). El estado del cultivo y la etapa del ciclo celular en que se encuentren las células repercutirá en el éxito de la infección por el baculovirus.

Agathos (1996), indica que las evidencias existentes no son suficientes para justificar la disminución de la productividad a altas concentraciones celulares, existiendo una influencia simultánea de diferentes factores que son clave en la infección así como en la expresión de la proteína. Sin embargo el incremento en la producción de la proteína recombinante a altos TDI se ha obtenido reemplazando el medio de cultivo en el momento de la infección para suministrar fuente de carbono y eliminar los metabolitos tóxicos acumulados en el medio de cultivo (Licari y Bailey, 1992; Bédard *et al.*, 1994; Power *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1996; Taticek y Shuler, 1997); o cuando el medio ha sido reemplazado parcial o completamente después de la infección (Zhang *et al.*, 1994a; Kioukia *et al.*, 1995a), o cuando algún componente del medio de cultivo es suplementado durante el proceso de infección (Caron *et al.*, 1990; Lindsay y Betenbaugh, 1992; Nguyen *et al.*, 1993; Reuveny *et al.*, 1993a; Hensler *et al.*, 1994; Taticek y Shuler, 1997; Bédard *et al.*, 1997).

En un experimento realizado por Reuveny y col. (1993a) para observar el efecto del consumo de los nutrientes y la generación de compuestos tóxicos que causan la disminución en la productividad, se utilizaron células en diferentes etapas de crecimiento. Fueron infectadas a MDI de 1 y 10 ufp/célula al inicio, a la mitad y al final de la fase exponencial observando diferencias en el rendimiento específico. Posteriormente recolectaron células en las mismas fases de crecimiento, que fueron resuspendidas en medio fresco al momento de la infección a una concentración celular de  $0.5 \times 10^6$  células/mL. Se observó una recuperación en la productividad, concluyéndose entonces que la caída en la productividad depende de la concentración de los nutrientes o de los productos de desecho en el medio de cultivo.

El recambio del medio de cultivo puede ser una solución incosteable y poco práctica, cuando se trata de producciones a nivel industrial. Sin embargo una alternativa más atractiva es la alimentación de glucosa, amino ácidos y yestolato de manera independiente (Carpentier *et al.*, 2001). Se ha observado que la adición de glucosa no generó ningún cambio con respecto al cultivo control. Sin embargo al adicionar una mezcla de amino ácidos, se dió un incremento de 2 veces con respecto al cultivo control y de 7 veces más si lo que se alimenta es yestolato (Carpentier *et al.*, 2001). El mismo efecto ha sido reportado por otros autores al expresar otras proteínas recombinantes (Bérdard *et al.*, 1994; Radford *et al.*, 1997; Reuveny *et al.*, 1993a).

**III. 1. Objetivo General**

Determinar el efecto de la manipulación de dos variables de infección, TDI y MDI, sobre el crecimiento de dos líneas celulares de insecto: BTI-Tn-5B1-4 de *Trichoplusia ni* (High five) y *Spodoptera frugiperda* (Sf9); así como el efecto sobre la producción de la proteína recombinante modelo.

**III. 2. Objetivos específicos**

- Analizar el efecto de la manipulación del TDI y MDI sobre los parámetros cinéticos de células High five y Sf9 en cultivos suspendidos.
- Analizar el efecto de la manipulación del TDI y MDI en la producción de la proteína recombinante modelo en cada una de las líneas celulares en cultivos en suspensión.
- Analizar el efecto que la manipulación del TDI y MDI tienen en el consumo de glucosa y glutamina de las dos líneas celulares en cultivos en suspensión.



#### **IV. 1. Líneas celulares.**

Las líneas celulares que se utilizaron para realizar este trabajo fueron Sf9 (ATCCCL-1711) derivada de *Spodoptera frugiperda* y High five (BTI-Tn-5B1-4) derivada de *Trichoplusia ni*. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 30 ml, agitados a 115 rpm a 27°C, utilizando como medio de cultivo Sf-900 II SFM suplementado con 0.1% Pluronic F-68. Las densidades iniciales de los cultivos diferían para cada línea celular. Para la línea celular High five se utilizaron densidades de  $0.3 \times 10^6$  células/mL y para la línea celular Sf9 las densidades fueron de  $0.5 \times 10^6$  células/mL. Generalmente se trató de trabajar con pasajes celulares bajos, utilizando para la línea celular High five pasajes del 40 al 60 y para la línea celular de Sf9 pasajes entre 35 y 50.

#### **IV. 2. Criopreservación de líneas celulares.**

Cada línea celular se encuentra conservada en nitrógeno líquido. Las células destinadas al congelamiento deben encontrarse creciendo en fase exponencial y tener una viabilidad mayor al 98%. Durante la criopreservación se pueden generar cristales de hielo en el interior de las células y como consecuencia éstas pueden sufrir choque osmótico al disminuir el contenido de agua intracelular. Para disminuir el daño celular durante la criopreservación, la velocidad de congelamiento debe ser controlada cuidadosamente utilizando un crioprotector. Los crioprotectores utilizados fueron el Dimetilsulfoxido (DMSO) y el suero fetal bovino. El procedimiento utilizado es una modificación de lo reportado por O'Reilly y col., (1994) y por Meneses (2001), describiéndose a continuación:

1. Centrifugar el cultivo celular a 800 rpm durante 10 minutos.
2. Resuspender la pastilla celular en medio fresco conteniendo 40% de suero fetal bovino (SFB) obteniendo una densidad celular de  $1-10 \times 10^6$  células/mL.
3. Preparar el medio de criopreservación (medio de cultivo con 15% DMSO).
4. Colocar 500  $\mu$ L de medio celular y 500  $\mu$ L de medio de criopreservación en viales estériles de 2 mL.

5. Los viales se colocan en cajas de cartón sobre un lecho de algodón; se almacenan a 4°C por una hora, después a -70°C por un día.
6. Finalmente los viales son almacenados en nitrógeno líquido.

***El Descongelamiento de líneas celulares***, debe ser lo más rápido posible. Por cada vial a descongelar se procede de la siguiente manera:

1. Preparar un frasco T de 25 cm<sup>2</sup> con 4 mL de medio de cultivo al que las células se encuentran adaptadas.
2. Descongelar el vial en un baño a 27°C.
3. Colocar el medio de cultivo contenido en el vial dentro del frasco T, y colocarlo en la incubadora a 27°C por 10 min para que las células se adhieran.
4. Retirar el medio de cultivo junto con las células no adheridas.
5. Lavar las células con medio fresco evitando desprenderlas, para eliminar el medio de congelamiento remanente; adicionar 5 mL de medio fresco para su cultivo.

### **IV. 3. Baculovirus recombinante.**

El baculovirus recombinante contiene el gen que codifica para una proteína de 60 kDa. El stock viral utilizado tiene un título de  $3 \times 10^8$  ufp/mL, determinado por el método de dilución final.

***Determinación del título viral: Dilución final.*** Este método se lleva a cabo utilizando placas para cultivo celular de 96 pozos (O'Reilly *et al.*, 1994). Las células Sf9 deben encontrarse en fase exponencial de crecimiento con una viabilidad mayor al 95%. La metodología empleada se describe a continuación:

1. Preparar células en medio fresco con una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL.
2. Poner 100  $\mu$ L de medio de cultivo/pozo y colocar las placas en la incubadora a 27°C para que las células se adhieran.

3. Realizar diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  del virus a titular (50  $\mu$ L del virus en 450  $\mu$ L de medio); colocar 10  $\mu$ L de cada dilución por pozo (en 10 columnas) dejando como pozos control 2 columnas de pozos sin infectar.
4. Incubar las placas a 27°C por 10 días en lechos húmedos.
5. Comparar la morfología celular (tamaño, apariencia y confluencia celular) de los pozos expuestos al virus contra el control.

**Conservación del virus.** Para conservar el título viral, el virus se almacena a 4°C con SFB al 5%.

#### **IV. 4. Cinéticas de producción en matraces agitados.**

Para las cinéticas de cultivos infectados con la línea celular High five se seleccionaron diferentes tiempos de infección, infectándose a  $0.3 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) o dejándose crecer hasta alcanzar una densidad de aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) o una densidad de  $3 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ). Para cada infección se determinó el efecto de una multiplicidad de infección de 0.1, 1 y 10 ufp/cel. De la misma manera se procedió para las cinéticas realizadas con Sf9, aunque los tiempos de infección en este caso fueron de  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ), de  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) y  $4.4 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ). Las cinéticas se realizaron por duplicado.

#### **IV. 5. Métodos analíticos.**

**Determinación de viabilidad por exclusión.** La viabilidad fue determinada con el método de tinción con azul de tripano en cámara de Neubauer. El colorante penetra en la membrana de células no viables, las cuales son teñidas de azul, distinguiéndose perfectamente de las células viables. La metodología empleada se describe a continuación:

1. Preparar el reactivo de azul de tripano al 10% en buffer de fosfatos (PBS; 0.1 M NaCl, 8.5 mM KCl, 0.13 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).
2. Preparar una dilución de la muestra celular en un volumen de azul de tripano conocido.
3. Contar las células de los 10 campos (20 a 50 células por campo).
4. Para determinar el número de células (Nc, células/mL):

$$Nc = \text{número de células contadas en los 10 campos} \times \text{factor de dilución} \times (1 \times 10^4) \quad (1)$$

5. Para determinar el porcentaje de viabilidad (%v)

$$\%v = (\text{número de células no teñidas} / \text{número de células totales}) \times 100 \quad (2)$$

***Determinación de la densidad celular utilizando el Coulter Counter.*** El principio del contador celular electrónico consiste en que un volumen predeterminado de la suspensión celular es diluido en un buffer salino y es forzado a pasar a través del orificio (diámetro de 100  $\mu\text{m}$ ) de un tubo por succión. Las células interrumpen el flujo de la corriente existente entre dos electrodos, uno en el interior y otro en el exterior del tubo. Esto produce una serie de pulsos que son reconocidos como una señal para el equipo. Las partículas más pequeñas que las células pueden ser eliminadas del conteo al reducir el rango de registro del tamaño de partícula. La suspensión celular se diluye en un volumen final de 10 mL. Para asegurar que el conteo es preciso, el índice de coincidencia debe encontrarse entre 5% y 10%. Si el equipo indica un índice de coincidencia mayor al 15%, el operador debe hacer una dilución mayor. El índice de coincidencia es un porcentaje de partículas que indica al operador si la dilución utilizada se encuentra dentro de los límites de precisión del equipo.

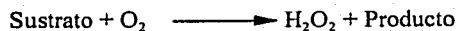
#### ***Cuantificación de metabolitos en el medio de cultivo.***

***Glucosa, lactato y glutamina.*** Se cuantificó la concentración de glucosa, lactato y glutamina residual de cada una de las muestras en un aparato YSI 2700, a través de reacciones catalizadas por una o más enzimas inmovilizadas en membranas de policarbonato generando como producto final peróxido de hidrógeno. Este es electroquímicamente oxidado en un ánodo de platino, generando un flujo de electrones

que es proporcional a la concentración de peróxido y a la concentración de sustrato. Este ánodo es protegido de otras sustancias oxidables por una capa de acetato de celulosa haciéndolo específico para el peróxido de hidrógeno.

La reacción general ocurre de la siguiente manera:

Enzima-Sustrato:



Peróxido de hidrógeno-Anodo de platino:



Se utilizaron soluciones estándar para cada metabolito. Las concentraciones utilizadas fueron: 2.5 g/L glucosa, 0.5 g/L Lactato y 4 mM Glutamina. Las reacciones enzimáticas para cada metabolito se muestran en el anexo 1.

*Amonio.* El amonio se cuantificó utilizando el método de indofenol. Se requirieron las siguientes soluciones: Solución A, fenol 0.11 M. Solución B, hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM. Una solución para la curva estándar de sulfato de amonio 6 mM, equivalente a 12 mM de  $\text{NH}_4^+$ . Todas las soluciones deben ser almacenadas a 4°C en frascos ámbar. La metodología empleada se describe a continuación:

1. Preparar una curva de calibración con soluciones que cubran un rango de concentraciones de 0.13 a 10 mM de sulfato de amonio desecado. El blanco debe estar constituido por 1 mL de la solución A, 1 mL de la solución B y 25  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q.
2. Para cada muestra, colocar 1 mL de la solución A en un tubo con tapa.
3. Adicionar 25  $\mu\text{L}$  de la muestra, taparlo y agitar vigorosamente.
4. Adicionar 1 mL de la solución B, taparlo y agitar vigorosamente.
5. Dejar reposar las muestras durante 30 min. El tiempo se cuenta a partir de que se adicionó la solución B a la mezcla solución A-muestra. Durante este tiempo, las muestras desarrollarán un color azul, característico de la reacción.
6. Leer las muestras en el espectofotómetro a 635 nm.

Nota: Los tubos deben estar aislados de la luz. Este reactivo se adiciona cada 30 s a cada muestra. La lectura de absorbancia debe realizarse también cada 30 s (lo equivalente al tiempo de reacción), en el mismo orden en que se adicionó el reactivo para que las muestras tengan el mismo tiempo de reacción.

**Solubilización y cuantificación de la proteína modelo.** El cultivo celular fue centrifugado a 2000 rpm por 15 min para la recuperación del pelet celular. Éste fue resuspendido en buffer 25 mM Tris pH 7.0; sonicado por 3 min con ciclos de 9 s. A cada muestra se le adicionó Tritón X-100 (t-octilfenoxilpoli-etoxietanol de SIGMA) al 1.25% para solubilizar la proteína recombinante. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 8 min para eliminar el debris celular.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes, migrando las proteínas solubilizadas previamente (10  $\mu$ L de muestra). Se incluyeron en un carril 2  $\mu$ g de albúmina de suero bovino utilizado como indicador del peso molecular (66 kDa).

La cuantificación de la proteína se realizó por densitometría. La metodología empleada se describe a continuación:

1. Escanear el gel obtenido de la electroforesis.
2. Utilizar el programa de análisis de imágenes NIH image 1.61 para cuantificar la magnitud del área (A) e intensidad (I) de cada banda seleccionada.
3. Seleccionar las bandas correspondientes al marcador de peso molecular, así como a la proteína recombinante. Esta selección se realiza a partir de un recuadro que delimita la zona de interés, adicionalmente, se delimita a través de la herramienta a mano alzada del programa de análisis de imágenes.
4. Promediar los parámetros obtenidos a partir de ambas selecciones.
5. Utilizar estos parámetros y, teniendo al estándar como referencia se realizan los cálculos correspondientes:

Se conoce la concentración que se cargó del estándar (2  $\mu$ g de albúmina en 15  $\mu$ L), por lo que el valor correspondiente al producto de A\*I corresponderá a la masa del marcador cargado. Por ejemplo, si el valor correspondiente al (A\*I) promedio del

estándar corresponde a 17,221 y el (A\*I) promedio de la muestra es de 5,027, la masa de la muestra en los 10  $\mu$ L cargados en el gel corresponderá a:

$$\text{Muestra} = \frac{2 \mu\text{g} * 5,027}{17,221} = 0.584 \mu\text{g}/10 \mu\text{L} \quad (3)$$

Como los 10  $\mu$ L provienen de 1 mL en donde fue resuspendida la pastilla celular recuperado de un volumen de cultivo de 30 mL, entonces la concentración de proteína será:

$$\text{Concentración de proteína en cultivo} = \frac{0.584 \mu\text{g} * 1 \text{ mL} * 1000 \mu\text{L}}{10 \mu\text{L} * 30 \text{ mL} * 1 \text{ mL}} = 1.95 \mu\text{g}/\text{mL} \quad (4)$$

Nota: En el anexo II se muestra el montaje de las técnicas de electroforesis capilar y los analisis de glicosilación realizados sobre la proteína recombinante.

#### IV. 6. Consideraciones matemáticas

*Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación de los cultivos control.* La velocidad específica de crecimiento aparente ( $\mu$ ) de los cultivos control fue calculada a lo largo de la fase exponencial de los cultivos, en donde:

$$dx/dt = \mu x \quad (5)$$

Integrando:

$$\ln(x/x_0) = \mu t \quad (6)$$

Donde,  $x$  y  $x_0$  son las densidades celulares al tiempo  $t$  y al inicio del cultivo, respectivamente. La  $\mu$  está representada por la pendiente obtenida a partir de la regresión lineal obtenida de la gráfica de  $\ln(x/x_0)$  vs  $t$ . El tiempo de duplicación se calcula a partir de la siguiente ecuación, utilizando la  $\mu$  calculada anteriormente.

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (7)$$

***Cálculo de la expansión celular de los cultivos infectados.*** Para el caso de células infectadas, la velocidad específica de crecimiento disminuye como consecuencia del proceso de infección por el baculovirus recombinante. Las curvas características de las células viables infectadas no cumplen con la tendencia exponencial que corresponde a un cultivo en crecimiento. Por lo tanto, es necesario evaluar un parámetro que permita caracterizar la población celular viable de un cultivo infectado, dándole el nombre de expansión celular ( $E_c$ ). La  $E_c$  no es más que el cociente de la concentración celular máxima ( $x_{vm}$ , células/mL) alcanzada en cada cultivo entre la concentración celular del cultivo ( $x_o$ , células/mL) en el momento de la infección. El parámetro indica las veces que la población celular aumentó después de la infección, definiéndose como:

$$E_c = x_{vm} / x_o \quad (8)$$

***Determinación de las velocidades específicas de producción de la proteína recombinante.*** Un modelo utilizado para evaluar la velocidad de producción del producto deseado en función de si éste es asociado o no al crecimiento de la línea celular utilizada, es el modelo de Luedeking-Piret:

$$dP/dt = (\alpha * \mu + \beta) x_v \quad (9)$$

donde  $dP/dt$  es la velocidad volumétrica de producción de proteína recombinante ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ ),  $\alpha$  es una constante estequiométrica y  $\beta$  es una constante cinética. Para aplicar este modelo es necesario tener en cuenta el comportamiento de la población celular y la generación de la proteína recombinante. Como se mencionó en el apartado anterior, la velocidad específica de crecimiento disminuye como consecuencia de la infección, por lo que la generación de células viables variará dependiendo del TDI y MDI utilizada. Se detectó proteína recombinante a partir de las 48 hpi en cultivos de células High five, y a



las 72 hpi en cultivos de células de Sf9, dependiendo de la línea celular utilizada. El descenso de la concentración celular viable coincide en la mayoría de los casos con la producción de proteína recombinante. El comportamiento de ambos eventos, simula un modelo mixto como el que se propone en la ecuación 9. Sin embargo,  $\mu$  es muy pequeña si se compara con los otros términos de la ecuación, reduciéndose a la siguiente expresión:

$$dP/dt = \beta * x_v \quad (10)$$

donde  $\beta$  es una constante del producto no asociado al crecimiento equivalente a la velocidad específica de producción de proteína recombinante ( $\mu\text{g}/\text{cel}*\text{h}$ ). Integrando la ecuación 10 obtenemos la siguiente ecuación:

$$P = P_0 + \beta \int x_v dt, \text{ evaluada de } 0 \text{ a } t \quad (11)$$

de donde  $P_0$  es la concentración de proteína en el tiempo cero, siendo cero para el sistema de expresión aquí utilizado.

El término  $\int x_v dt$  es conocido como índice de viabilidad ( $\text{células}*\text{h}/\text{L}$ ), y se determina como el área bajo la curva de la concentración celular viable ( $\text{células}/\text{L}$ ) contra el tiempo. Este parámetro es fácilmente calculado por el método de los trapecios, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Luan y col., (1987), Ramírez y Mutharasan (1990), Meneses (2001), Serrato (2002) y Arróniz (2003).

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

1. Promediar la concentración de células viables de la cinética a cada intervalo de tiempo ( $\text{células}/\text{L}$ ).
2. Obtener el intervalo de tiempo entre muestras.
3. Calcular el índice de viabilidad que corresponde al producto de los valores calculados en el punto 1 y 2.
4. Obtener el índice de viabilidad acumulado, sumando cada uno de los términos parciales calculados en 3.

**Determinación de las velocidades específicas de consumo de nutrientes y generación de metabolitos.** Las velocidades específicas de consumo de glucosa y glutamina se determinaron a partir de la ecuación propuesta por Yamaji y col., 1999:

$$S(t) = \beta \int x_v dt, \text{ evaluada de } 0 \text{ a } t \quad (12)$$

$$S_0 - S = \beta \int x_v dt \text{ evaluada de } 0 \text{ a } t \quad (13)$$

donde  $\beta$  es la velocidad específica de consumo de glucosa o glutamina,  $S_0$  es la concentración del sustrato al tiempo cero (mM),  $S$  es la concentración del sustrato (mM) en el tiempo  $t$  y  $\int x_v dt$  es el índice de viabilidad (células\*h/L). Los cálculos fueron realizados de la misma manera que en el apartado anterior.

**Determinación del rendimiento de proteína con respecto a glucosa y glutamina.** El rendimiento de proteína con respecto a glucosa ( $Y_{p/glc}$ ) en ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol glc}$ ), fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_{p/glc} = k_p/k_{glc} \quad (14)$$

donde,  $k_p$  es la velocidad específica de producción de proteína en ( $\mu\text{g}/1 \times 10^6$  células\*h) y  $k_{glc}$  es la velocidad específica de consumo de glucosa en ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células\*h).

**Determinación del rendimiento de proteína con respecto a biomasa.** El rendimiento de la proteína con respecto a la biomasa ( $Y_{p/x}$ ) en ( $\mu\text{g}/1 \times 10^6$  células) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_{p/x} = P_{m\acute{a}x} / x_{vm\acute{a}x} - x_0 \quad (15)$$

donde,  $P_{\text{máx}}$  es la concentración de proteína máxima en ( $\mu\text{g/L}$ ),  $x_{\text{vmax}}$  es la densidad celular máxima viable (células/L) y  $x_0$  es la densidad celular viable al inicio de la cinética (células/L).

***Determinación del rendimiento de generación de biomasa con respecto a glucosa y glutamina.*** El rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{x/\text{glc}}$  ó  $Y_{x/\text{gln}}$ ) en ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$Y_{x/S} = x_{\text{vmax}} - x_0 / S_0 - S \quad (16)$$

De donde,  $x_{\text{vmax}}$  es la concentración celular máxima viable (células/L);  $x_0$  es la concentración celular viable al inicio de la cinética (células/L);  $S_0 - S$  es la diferencia de sustrato existente al inicio de la cinética con respecto a la concentración de glucosa remanente al final de la cinética (mmol/L).

Este reporte se dividió en dos partes para una mejor comprensión. En la primera de ellas se describen y analizan los resultados correspondientes a los cultivos no infectados. La segunda parte esta dedicada al análisis de los resultados de los cultivos infectados con el baculovirus recombinante.

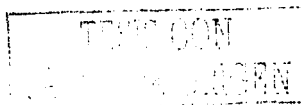
### **V. 1. Caracterización de los cultivos no infectados.**

Es necesario conocer la cinética de crecimiento de cada línea celular para poder controlar la densidad del inóculo y conocer la duración del cultivo. Las células durante cada una de las fases de crecimiento tienen comportamientos diferentes en cuanto a su velocidad de crecimiento, actividades enzimáticas, actividades metabólicas, respiración y síntesis de metabolitos, entre otros.

#### ***Cinética de crecimiento y metabolismo de la línea celular High five en cultivos control no infectados.***

Esta línea celular fue adaptada a crecer en cultivos en suspensión libres de suero. Los cultivos presentaron una fase lag de aproximadamente 2 días (figura 2a), en donde se ve poca evidencia de un incremento en el número celular. Éste es un período de adaptación, en donde la actividad metabólica de las células se basa en un aumento en la síntesis de DNA polimerasa, así como de proteínas estructurales (Freshney, 1983). Seguida de esta fase se encuentra la fase exponencial donde el cultivo crece por 4 días. La concentración celular máxima alcanzada es de  $4.5 \times 10^6$  células/mL a las 144 h de cultivo. El crecimiento cesa después de que la población se ha duplicado 3.5 veces, manteniendo una viabilidad mayor al 90% (figura 2b). Posteriormente, el cultivo entra en fase estacionaria con una duración de un día, seguida de la fase de muerte celular en donde la viabilidad del cultivo disminuye hasta un 60%.

La velocidad específica de crecimiento alcanzada por esta línea celular fue de  $0.026 \text{ h}^{-1}$ , cuyo tiempo de duplicación corresponde a 26.7 h. Valores muy próximos a los



reportados por Rhiel y col. (1997) al caracterizar la misma línea celular bajo las mismas condiciones de cultivo.

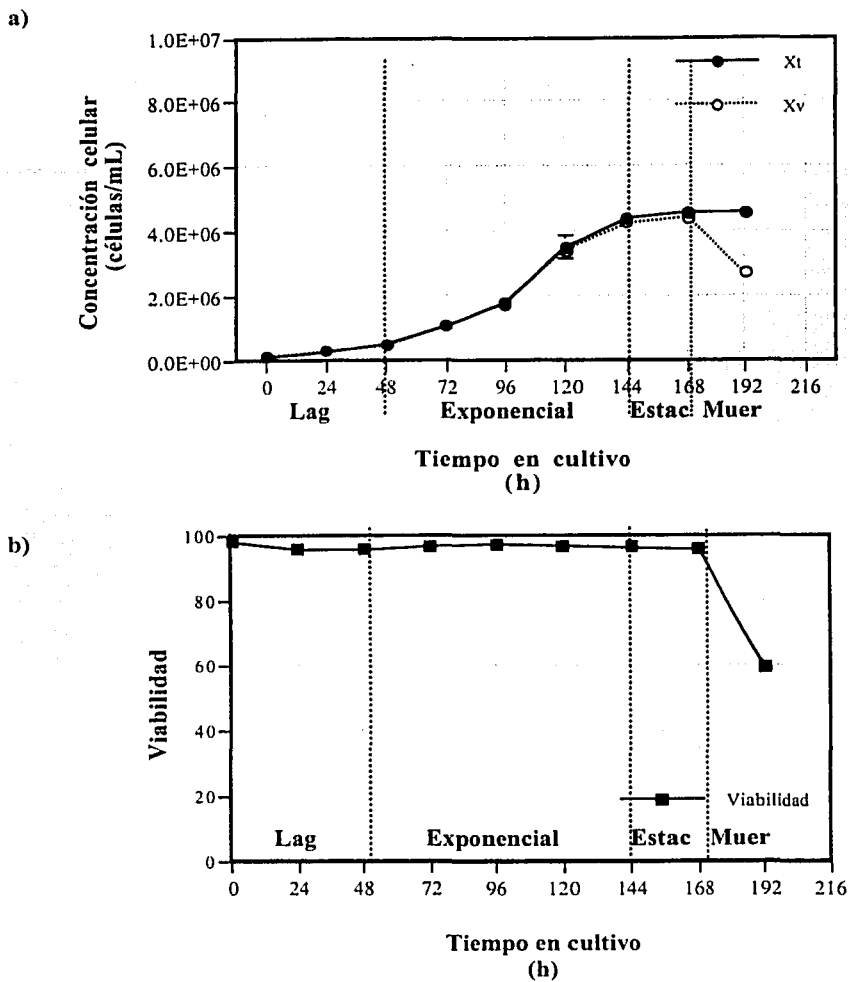


Figura 2. Cinética de crecimiento de células High five. Concentración celular total y viable (a), y viabilidad celular (b) en cultivos control sin infectar.  $X_t$ = células totales,  $X_v$ = células viables.

La glucosa es la principal fuente de carbono de las líneas celulares de insecto, ocupando un papel central en su metabolismo, siendo precursor de un gran número de intermediarios metabólicos (Stryer, 1995; Lehninger *et al.*, 1993). Los estudios realizados en los inicios de éstas líneas celulares de insecto se centran en la caracterización de las células Sf9. En ellos se han reportado que el agotamiento de este carbohidrato ocasiona el cese de la fase de crecimiento exponencial así como el consumo en algunos casos, de otro carbohidrato para su mantenimiento (Bédard *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993a-b; Ferrance *et al.*, 1993; Drews *et al.*, 1995; Palomares y Ramírez, 1996; Mendonca *et al.*, 1999).

Caracterizando el comportamiento del consumo de glucosa en la línea celular High five, se encontró que la concentración inicial fue de 50 mM, manteniéndose alrededor de los 48 mM durante la fase lag, disminuyendo a 25 mM al final de la fase exponencial (figura 3a). En el momento en el que el cultivo entra en fase estacionaria la viabilidad sigue siendo mayor del 90%, y la concentración de glucosa en el medio es de 15 mM. Es hasta el final del cultivo cuando la viabilidad baja al 60% y coincide con el consumo total de la glucosa. Los resultados indican que a diferencia de lo observado por otros autores en cultivos de células Sf9 (Mendonca *et al.*, 1995; Rhiel *et al.*, 1997; Bédard *et al.*, 1993; Reuveny *et al.*, 1992), en células High five no es necesario que la glucosa se agote para que el cultivo entre en fase estacionaria, ya que cuando esto sucede, su concentración en el medio es de 15 mM, coincidiendo con la caracterización realizada por Rhiel y col., de la misma línea celular (1997, en un cultivo en bioreactor de 3 L). Sin embargo todo pareciera indicar que es el agotamiento de otro nutrimento el que esta coincidiendo con la entrada del cultivo en fase estacionaria.

Siguiendo con la idea anterior, se analizó el consumo de glutamina (amino ácido de mayor importancia en el cultivo de células animales), siendo esencial en la síntesis de nucleótidos e indispensable para la proliferación y sobrevivencia celular (figura 1). Es un aminoácido lábil y su degradación genera el 81% del amonio residual detectado en el medio de cultivo. Sin embargo se ha observado que en el medio DMEM para el cultivo de células de insecto se degrada 0.5 mM de glutamina en 120 h (Palomares, 1996). Analizando el comportamiento del consumo de glutamina, encontramos que la concentración inicial de glutamina en el medio no definido SF900 II SFM es de 11 mM (figura 3b). Al final de la fase lag la concentración es de 6.5 mM, amino ácido que fue

utilizado como lo sugiere Freshney (1983), para la síntesis de proteínas estructurales y ácidos nucleicos. Finalmente la glutamina se agotó al término de la fase exponencial. Como se venía discutiendo anteriormente, el agotamiento de glutamina coincide perfectamente con el inicio de la fase estacionaria, lo que indica que el cese del crecimiento celular fue debido al agotamiento de esta fuente de energía.

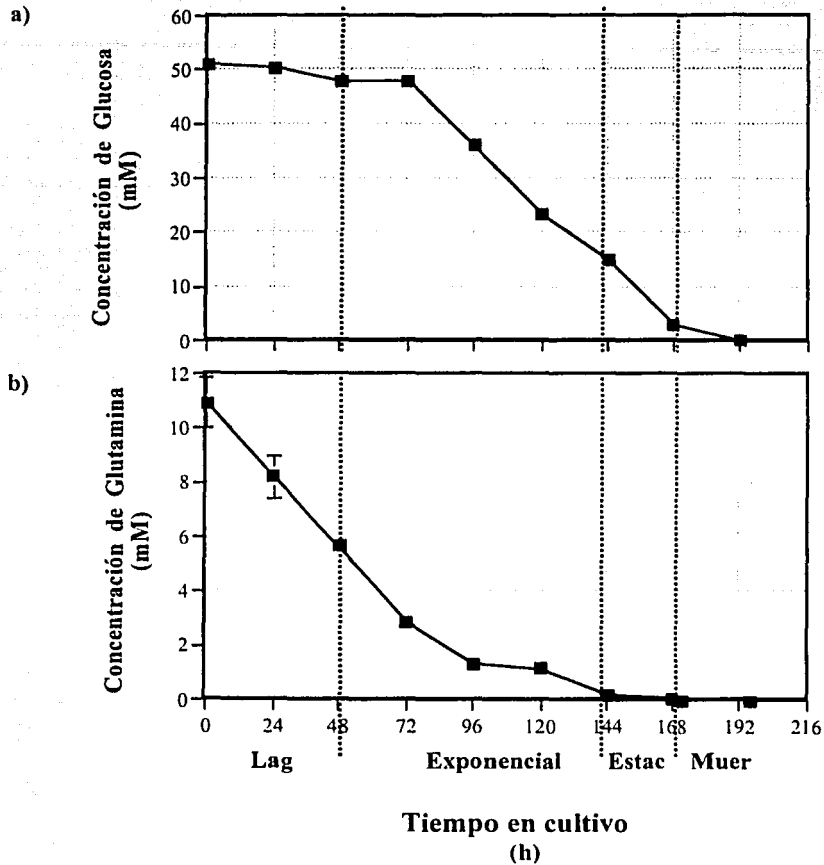


Figura 3. Cinéticas de consumo de nutrientes en cultivos sin infectar de células High five. Glucosa (a) y glutamina (b).

En la tabla 2 se reportan las velocidades específicas de consumo (glucosa y glutamina) y generación de metabolitos (lactato y amonio) de la cinética control, comparándose con las velocidades reportadas en la bibliografía. La única referencia utilizada para la comparación de los valores experimentales fue la de Rhiel y col. (1997), debido a que utilizaron al igual que en nuestro trabajo el mismo medio de cultivo, las mismas líneas celulares, con la diferencia de que éstas fueron cultivadas en un fermentador de 3L. Células High five bajo las condiciones experimentales reportadas por Rhiel y col. (1997) consumen 2.5 veces más glucosa que el consumo observado en este trabajo, mientras que el consumo de glutamina en nuestras condiciones experimentales es 1.7 veces mayor.

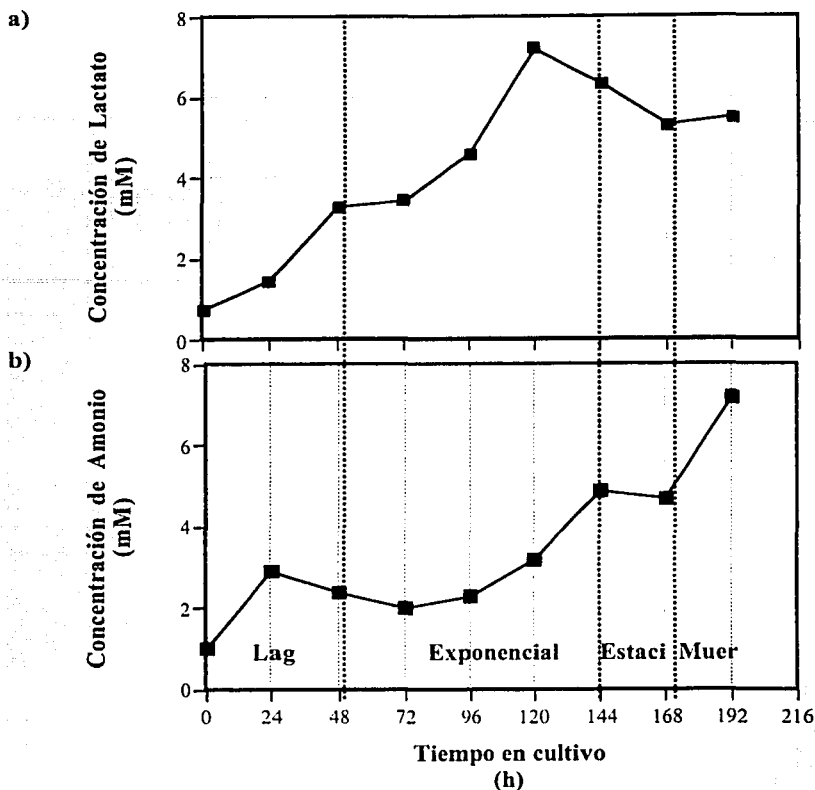
**Tabla 2. Velocidades específicas de consumo y generación de metabolitos en cultivos control sin infectar de la línea celular High five.**

Metabolito	Velocidad específica <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$ )	Velocidad específica <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$ )	Referencia
Glucosa	0.1	0.250	Rhiel <i>et al.</i> (1997).
Glutamina	0.03	0.018	Rhiel <i>et al.</i> (1997).
Lactato	0.03	0.210	Rhiel <i>et al.</i> (1997).
Amonio	0.01	0.151	Rhiel <i>et al.</i> (1997).

<sup>a</sup> Calculados. <sup>b</sup> Reportado en la bibliografía.

El lactato es producido por las células de insecto durante condiciones de limitación de oxígeno como una alternativa catabólica de la incompleta degradación de glucosa (figura 1). La generación de lactato se da desde el inicio del cultivo y es a las 120 h donde se detectó la concentración de lactato máxima de 7.5 mM (figura 4a). Después de alcanzar tal concentración se observa que es consumido por el cultivo. El consumo de lactato coincide con el inicio de la fase estacionaria, que como se discutió anteriormente es consecuencia del agotamiento de glutamina. A diferencia de lo observado en células Sf9 reportado por Bédard y col., (1993) y Palomares (1996), en células High five el lactato fue utilizado como un nutrimento alterno sustituyendo a la glutamina agotada. Al comparar la concentración máxima de lactato generado en células High five con respecto al generado por células Sf9, el valor se encuentra por arriba de lo reportado por Palomares y Ramírez (2.75 mM, 1996). Sin embargo al compararlo con el valor reportado por Rhiel y col. (1997) con la línea celular High five, es muy cercano (10 mM). Ambos reportes indican que estas concentraciones no son tóxicas para las células.





**Figura 4. Cinéticas de producción de metabolitos de desecho en cultivos sin infectar de células High five. Lactato (a) y amonio (b).**

La generación de amonio en células de insecto es producto de la desaminación de la glutamina u algún otro aminoácido, generando cambios en el pH intracelular. El metabolismo celular puede ser afectado por éstos cambios de pH, un ejemplo claro es el observado con la enzima glicolítica fosfofructocinasa que es desactivada con una variación de 0.2 unidades de pH (Mathews y van Holde, 1999). Se ha determinado que el aumento en el pH extracelular (6.6-7.0) y el incremento de la concentración del ión amonio extracelular (mayor o igual a 15 mM) causa acidificación citoplasmática, trayendo como consecuencia la inhibición del crecimiento y la falta de expresión de

proteína recombinante cuando se trabaja con cultivos infectados (McQueen y Bailey, 1990; González, 2000). En lo que respecta a los resultados obtenidos, se puede discutir que el amonio se generó desde el inicio del cultivo, acumulándose a lo largo de la fase exponencial, alcanzando una concentración de 7.5 mM a las 192 h del cultivo (figura 4b). Concentración máxima generada durante la cinética que coincide con el momento en el que la glucosa se encuentra en la mínima concentración, evento reportado ya anteriormente atribuyéndose a la utilización de glutamina para proveer la energía celular de mantenimiento (Bérdard *et al.*, 1993; Drews *et al.*, 1995; Öhman *et al.*, 1995; Mendonca *et al.*, 1999; Bathia *et al.*, 1997). Sin embargo para este tiempo del cultivo ya no había glutamina en el medio, por lo que el amonio generado debe provenir de otros aminoácidos que constituyen el medio de cultivo.

Una vez caracterizado el comportamiento de los cultivos en suspensión de la línea celular High five, y sabiendo que la fase exponencial dura 4 días, se seleccionaron los tiempos de infección que serían usados:  $T_1=0.3 \times 10^6$  células/mL,  $T_2=1.5 \times 10^6$  células/mL y el  $T_3= 3 \times 10^6$  células/mL.

***Cinética de crecimiento y metabolismo de la línea celular Sf9 en cultivos control no infectados.*** La cinética de crecimiento de la línea celular Sf9 se representa en la figura 5a. Las células Sf9, a diferencia de lo observado en células High five, no presentaron fase lag debido a que se utilizó un inóculo de concentración celular mayor. Por lo tanto, la fase exponencial duró durante las primeras 96 h del cultivo, tiempo en donde alcanzó una concentración celular máxima de  $8 \times 10^6$  células/mL. Al final de la fase exponencial, la población se ha duplicado 16 veces conservando una viabilidad celular mayor al 90% (figura 5b). Posteriormente el cultivo entra en fase estacionaria con una duración de tres días, en donde la población celular viable se mantiene constante hasta las 168 h de cultivo. Las últimas 24 h del cultivo se caracterizan por un aumento de la muerte celular disminuyendo la viabilidad hasta el 82%.

La velocidad específica de crecimiento fue de  $0.0304 \text{ h}^{-1}$  y el tiempo de duplicación corresponden a 22.8 h. Los valores reportados en la literatura se encuentran entre  $0.02\text{-}0.04 \text{ h}^{-1}$  correspondiendo a tiempos de duplicación de 35-17 h. Estos valores son comunes para esta línea celular cuando se encuentra adaptada a crecer en cultivos en

suspensión en medios libres de suero (Wu *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992; Neutra *et al.*, 1992; Power *et al.*, 1994; Rhiel *et al.*, 1997; Radford *et al.*, 1997; Taticek *et al.*, 2001).

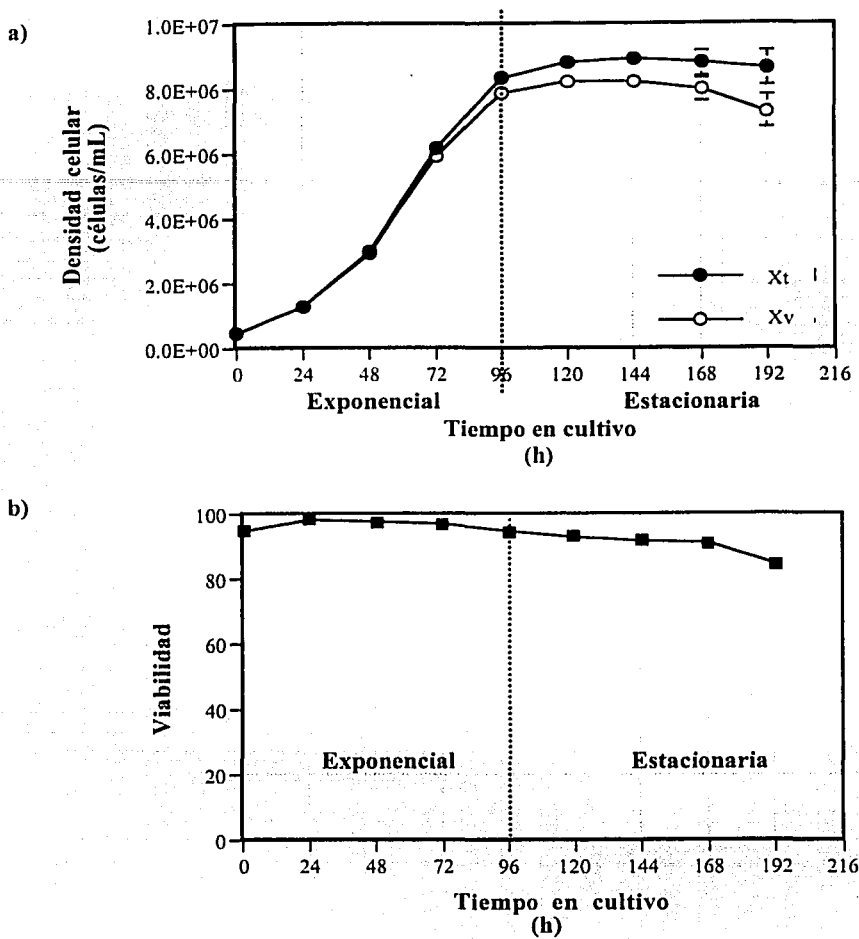


Figura 5. Cinética de crecimiento de células S19. Concentración celular total y viable (a), y viabilidad celular (b) en cultivos control sin infectar. Xt= células totales, Xv= células viables.

El consumo de glucosa para esta línea celular se muestra en la figura 6a. Al inicio de la cinética, el consumo es mínimo por lo que posiblemente el cultivo está utilizando una fuente de carbono alterna para su crecimiento. Al final de la fase exponencial la concentración de glucosa en el medio de cultivo es mayor al 50% de la concentración inicial. A las 192 h, se conservan 12 mM de glucosa en el medio de cultivo. Se calculó la velocidad específica de consumo de glucosa siendo de 0.013 a 0.061  $\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{células} \cdot \text{h}$  por debajo de valores reportados en la literatura (tabla 3).

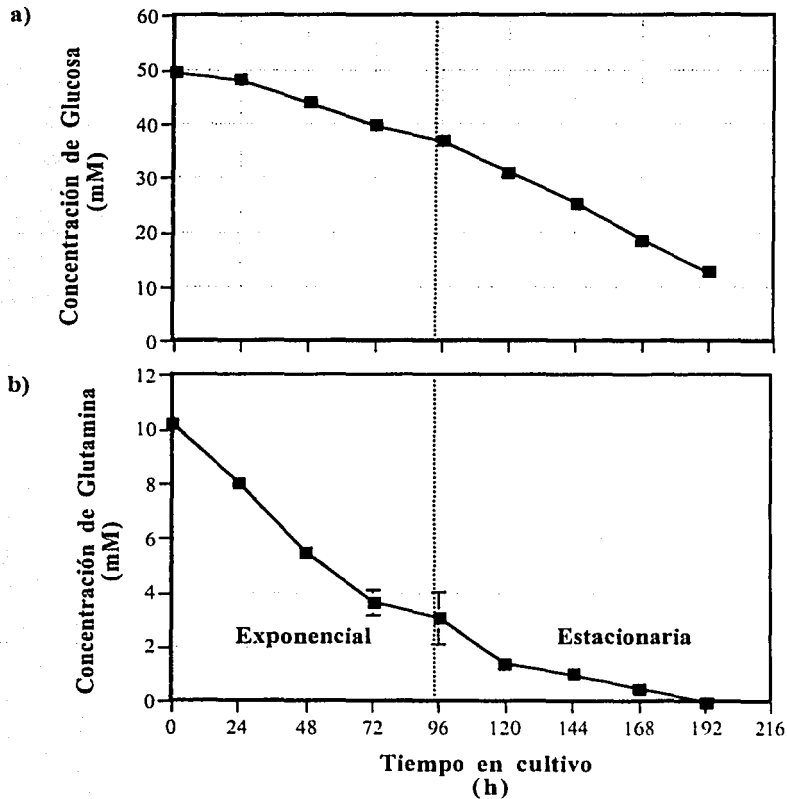


Figura 6. Cinéticas de consumo de nutrientes en cultivos sin infectar de células Sf9. Glucosa (a) y glutamina (b).

Se midió la concentración de glutamina residual con respecto al tiempo (figura 6b). La concentración inicial en el medio de cultivo fue de 10 mM, y al final de la fase exponencial la concentración de este aminoácido fue de 3 mM, siendo totalmente consumido a las 192 h. La velocidad específica de consumo fue de  $0.015 \mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ , valor muy cercano a lo reportado por otros autores (tabla 3).

**Tabla 3. Velocidades específicas de consumo y generación de metabolitos en cultivos control de la línea celular Sf9.**

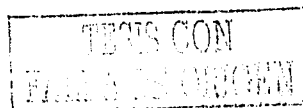
Metabolito	Velocidad específica <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ )	Velocidad específica <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ )	Referencia
Glucosa	0.065	0.078-0.126.	Mendonça <i>et al.</i> , (1995); Rhiel <i>et al.</i> , (1997); Bédard <i>et al.</i> , (1993); Reuveny <i>et al.</i> , (1992)
Glutamina	0.015	0.017-0.037	Mendonça <i>et al.</i> , (1995); Rhiel <i>et al.</i> , (1997); Bédard <i>et al.</i> , (1993)
Lactato	0.006	ND	-
Amonio	ND	ND	-

<sup>a</sup> Calculados. <sup>b</sup> Reportado en la bibliografía. ND, No determinado.

No se detectó amonio en los cultivos, mientras que Rhiel y col. (1997) encontraron una acumulación poco significativa de amonio (2 a 5 mM) durante el crecimiento y/o infección de los cultivos. En lo que respecta a las concentraciones de lactato producidas son muy bajas, alcanzando una máxima concentración de 1.5 mM a las 72 h de cultivo, valor 1.8 veces menor que la concentración reportada por Mendonça y col. (1999), coincidiendo con otros reportes previos (Bédard *et al.*, 1993; Drews *et al.*, 1995). Se ha demostrado que células Sf9 en crecimiento sólo acumulan lactato bajo concentraciones de oxígeno limitante (Reuveny *et al.*, 1993b), lo que indica que los cultivos aquí reportados no presentan esta limitación.

Una vez caracterizada esta línea celular, se seleccionaron los tiempos de infección que serían usados:  $T_1=0.5 \times 10^6$  células/mL,  $T_2= 1.5 \times 10^6$  células/mL y  $T_3= 4.4 \times 10^6$  células/mL.

**Comparación del comportamiento cinético y metabólico de las líneas celulares High five y Sf9 en cultivos control no infectados.** Realizando una breve comparación de los resultados obtenidos durante la caracterización de los cultivos suspendidos de las líneas celulares High five y Sf9, se encontró que las velocidades específicas de crecimiento y



los tiempos de duplicación entre las líneas celulares son muy parecidos. Sin embargo, existe una marcada diferencia en las densidades celulares máximas alcanzadas por cada línea celular ( $4.5 \times 10^6$  células/mL para High five y  $8 \times 10^6$  células/mL para Sf9), aún cuando la densidad celular del inóculo fue del mismo orden de magnitud ( $0.3 \times 10^6$  células/mL para High five y  $0.5 \times 10^6$  células/mL para Sf9).

Comparando los resultados de consumo de nutrientes, éstos indican que la glucosa es metabolizada más lentamente en células Sf9 que en células High five. La velocidad específica de consumo de glucosa en la línea celular High five es 1.5 veces más alta que la de Sf9, valor que justifica el consumo total del carbohidrato en células High five y no en Sf9 al final del cultivo. Con lo que respecta al consumo de glutamina, la tendencia entre las dos líneas celulares es muy parecida hasta las 24 h del cultivo, tiempo a partir del cual se observa mayor consumo por células High five. La comparación de las velocidades específicas de consumo indica que células High five consumen 2 veces más glutamina que células Sf9.

La generación de lactato y amonio en células High five es mayor que en células Sf9. Bonarius y col. (2001) observaron que era posible disminuir la generación de lactato si se optimizaba el flujo vía la enzima piruvato carboxilasa haciendo más eficiente el metabolismo de la glucosa, reduciendo la producción de lactato y como consecuencia directa, dirigir al piruvato directamente al ciclo de Krebs (figura 1). Elias y col. (2003) estudiaron la presencia del gen que codifica para tal enzima en células de insecto: High five y Sf9. Ellos comprobaron que células Sf9 sí contienen el gen de la piruvato carboxilasa mientras que está ausente en células High five. Evidentemente al existir dicha enzima en células Sf9, ésta línea celular utiliza más eficientemente la glucosa disminuyendo considerablemente las concentraciones de lactato producido. Elias y col. (2003) observaron el metabolismo de células High five una vez que la línea celular había sido transformada con el gen de la enzima (piruvato carboxilasa de levadura). El consumo de glucosa es el mismo, sin embargo la generación de lactato disminuye de un 40-70% con respecto a las células no transformadas. De la misma manera observaron una disminución de la generación de amonio del 40-50%, sugiriendo que líneas celulares transformadas modifican el consumo de aminoácidos reduciendo considerablemente la



generación de amonio, lo que justificaría el hecho de no detectar amonio en cultivos de células Sf9.

V. 2. Caracterización de los cultivos infectados de las líneas celulares High five y Sf9.

Los cultivos de las líneas celulares se realizaron en lote sin recambio de medio, infectados a diferentes TDI, utilizando tres MDI (0.1, 1 y 10 ufp/cel).

La figura 7 muestra el comportamiento típico de cultivos infectados de la línea celular High five, mientras que en la tabla 4 se presentan las concentraciones celulares máximas y el tiempo postinfección en el que se alcanzaron.

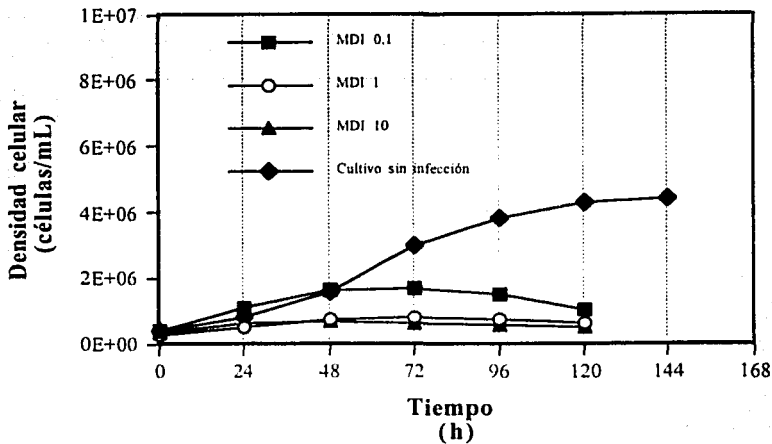
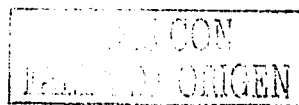


Figura 7. Densidad celular viable típica de cultivos infectados. Las tendencias corresponden a células High five a MDI de 0.1, 1 y 10 ufp/cel a un TDI de  $0.3 \times 10^6$  células/mL.

A la MDI de 0.1 y 1 la población celular se mantiene en crecimiento 72 h después de la infección, alcanzando una densidad celular viable máxima 2.7 y 5.8 veces menor que la cinética sin infección, respectivamente. Esto se debe a que se está llevando a cabo



una infección de tipo no sincrónica, es decir, sólo una fracción de la población fue infectada inicialmente (infección primaria), mientras que la población no infectada continuó creciendo. Posteriormente, el resto de las células fueron infectadas (infección secundaria) con la progenie viral generada durante la infección primaria (Wong *et al.*, 1996). Al utilizar MDI de 10, el crecimiento es arrestado casi inmediatamente como resultado de una infección sincrónica.

**Tabla 4. Densidades celulares máximas alcanzadas a los diferentes TDI y MDI en las líneas celulares High five y Sf9.**

Línea celular	TDI (10 <sup>6</sup> células/mL)	MDI (ufp/cel)	Concentración celular viab máx (10 <sup>6</sup> células/mL)	Tiempo de máxima concentración celular (hpi)
High five	0.3	0.1	1.67	72
		1.0	0.79	72
		10.0	0.69	48
	1.5	0.1	2.89	72
		1.0	2.31	48
		10	2.09	48
	3	0.1	3.65	72
		1.0	3.39	48
		10	3.61	24
Sf9	0.5	0.1	0.98	72
		1.0	0.72	48
		10	0.62	48
	1.5	0.1	4.05	72
		1.0	3.28	48
		10	2.94	48
	4.4	0.1	6.24	24
		1.0	5.98	48
		10	5.06	24

\* Concentración celular viable máxima del cultivo control sin infectar: 4.5x10<sup>6</sup> células/mL (High five) y 8x10<sup>6</sup> células/mL (Sf9).

Un resumen de las densidades celulares viables máximas alcanzadas en cada tratamiento para las líneas celulares se muestra en la tabla 4. En general, las concentraciones celulares máximas alcanzadas disminuyen al aumentar la MDI, los tiempos postinfección a los cuales se obtienen dichos valores disminuyen al aumentar el TDI. Esto es debido a que se están infectando células que se encuentran en fase exponencial tardía (la capacidad de duplicación disminuye como consecuencia del



agotamiento de nutrientes y acumulación de subproductos tóxicos en el medio de cultivo, ver sección V.4).

**Caracterización de la población viable en cultivos infectados de la línea celular High five.** El comportamiento de las concentraciones celulares viables en cultivos infectados difieren del típico crecimiento exponencial de los cultivos control. Por tal motivo, la evaluación del efecto de la MDI sobre el crecimiento de la población infectada se hizo a través del parámetro de expansión celular.

En células High five a un TDI de  $0.3 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) la población se duplica, independientemente de la MDI utilizada (figura 8). La expansión máxima alcanzada a la MDI de 0.1 es de 5.6 y disminuye hasta 2.3 a una MDI de 10. Al aumentar el TDI, la capacidad de expansión se reduce. Este efecto puede deberse a la limitación por nutrientes después de varios días de cultivo (Hink *et al.*, 1977; Wood *et al.*, 1982; Bédard *et al.*, 1994).

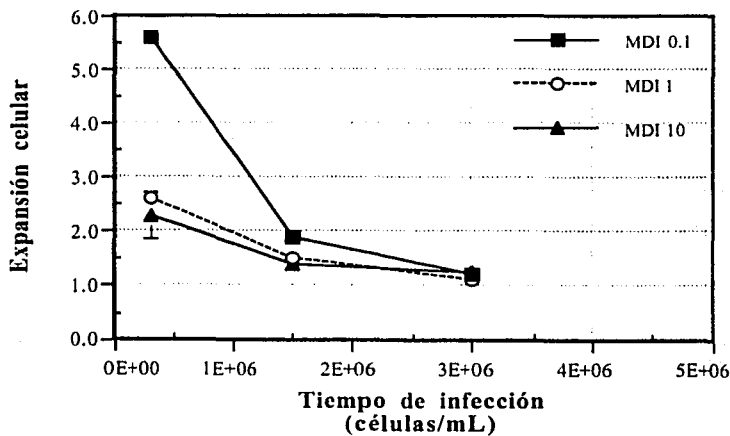


Figura 8. Expansión celular de células High five infectadas. Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

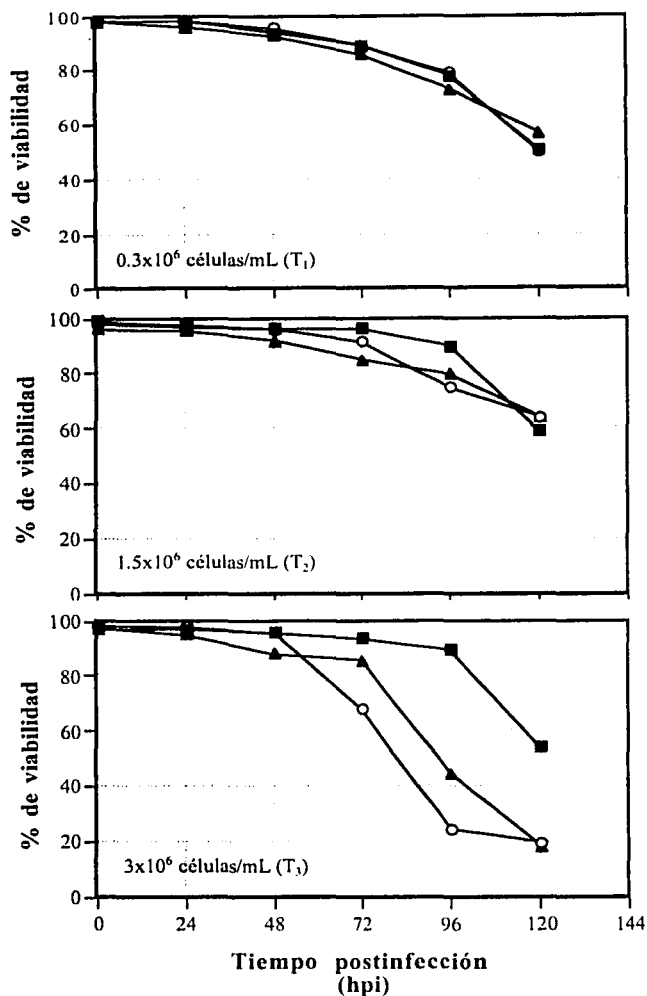
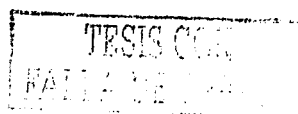


Figura 9. Viabilidad de células High five durante las cinéticas de infección.

■ MOI 0.1 ○ MOI 1 ▲ MOI 10

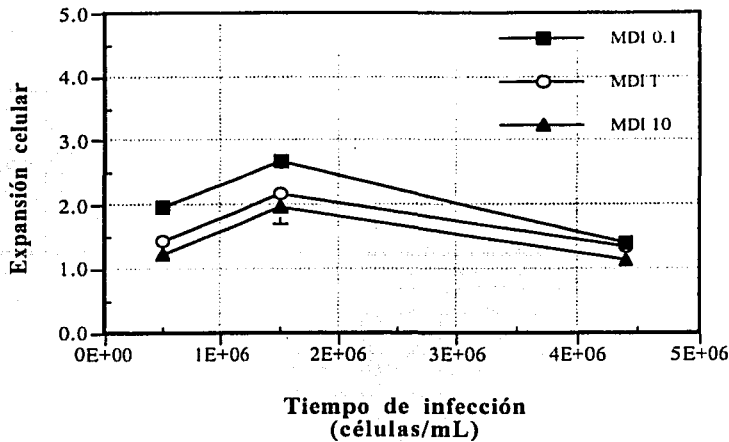
Se observaron también cambios en la viabilidad celular de los cultivos (figura 9), obteniéndose que, a una baja concentración celular (T<sub>1</sub>), los cultivos tienen una viabilidad



alrededor del 94% a las 48 hpi (figura 9), mientras que en el cultivo sin infectar la viabilidad del 96%. Es a partir de las 48 hpi, que las viabilidades comienzan a disminuir para todas las condiciones. La viabilidad mínima obtenida a una concentración celular de  $0.3 \times 10^6$  células/mL se encuentra alrededor del 55% para las diferentes MDI. Cuando las células fueron infectadas a  $1.5 \times 10^6$  células/mL, hubo menos muerte celular (viabilidad del 60%, mínima alcanzada al final del cultivo). Este mismo evento fue observado por Scott y col., (1992) al trabajar con células Sf9 en spinners, quienes sugirieron que éste puede ser consecuencia de una deficiente infección debida a las altas concentraciones celulares y a posibles limitaciones de oxígeno en el sistema. Sin embargo a  $3 \times 10^6$  células/mL, el comportamiento de la viabilidad no es el mismo al final de la cinética. La viabilidad mínima fue 54% (MDI 0.1) y 19% (MDI 1 y 10). Las viabilidades más bajas fueron observadas a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/mL, lo que indica que el cultivo no sólo es afectado por la infección viral sino también por las condiciones del medio después de 288 h de cultivo (ver discusión en la sección V.4).

**Caracterización de la población viable en cultivos infectados de la línea celular Sf9.** De la misma manera que en el apartado anterior, al analizar el comportamiento de la expansión de la línea celular Sf9 (figura 10), se observa que a una concentración celular de  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) la población se duplica en las tres MDI. Los valores de expansión celular a éste TDI van de 1.9 a 2.7. A  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) y  $4.4 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ) la población no se duplica, ni aún a la MDI más baja. De manera general, la expansión celular disminuye al aumentar la MDI a los diferentes TDI.

A diferencia de lo observado en las células High five a un  $T_1$ , en células Sf9 los cultivos no logran duplicarse una vez infectados, aún cuando el inóculo utilizado provenía de un cultivo en fase exponencial y la concentración celular del mismo fue seleccionada dentro del rango de concentraciones reportadas como las óptimas para cultivos de células Sf9 (Kioukia *et al.*, 1995a-b). La concentración celular máxima a la MDI de 0.1 se alcanza a las 72 hpi, tiempo en el que el cultivo control logra duplicarse, pero tiempo insuficiente para la duplicación de éstas células infectadas. Por lo tanto, el arresto del crecimiento celular es atribuido directamente a la infección viral.



**Figura 10. Expansión celular de células Sf9 infectadas.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

A una concentración celular de  $4.4 \times 10^6$  células/mL, la expansión celular es menor que la obtenida a  $0.5 \times 10^6$  células/mL, independientemente de la MDI utilizada. Aquí pueden estar sucediendo dos eventos simultáneamente. Primero, se está viendo un cultivo celular, al que le es difícil recuperarse después de la infección viral, también observado por Carpentier y col. (2001); y como segundo punto, al igual que lo sucedido en la línea celular High five, puede ser consecuencia de las condiciones del medio de cultivo después de varios días de crecimiento celular (ver discusión sección V.4).

Se observaron cambios en la viabilidad celular de los cultivos (figura 11). Las cinéticas iniciadas a una concentración celular de  $0.5 \times 10^6$  células/mL, tienen una viabilidad mayor al 80% a las 48 hpi, mientras que el cultivo control al mismo tiempo tiene una viabilidad del 97%. A partir de las 48 hpi, las viabilidades disminuyen inmediatamente hasta llegar alrededor del 30% a cualquier MDI al término de la cinética.

A  $1.5 \times 10^6$  células/mL a las 120 hpi existe una clara diferencia entre las viabilidades a la MDI de 0.1 (70 %) y las MDI de 1 y 10 en donde se alcanza una viabilidad del 10%. A  $4.4 \times 10^6$  células/mL a las 120 hpi, a diferencia de lo observado para

la línea celular High five, las viabilidades obtenidas fueron de 70, 50 y 40% para las MDI de 0.1, 1 y 10 ufp/cel, respectivamente.

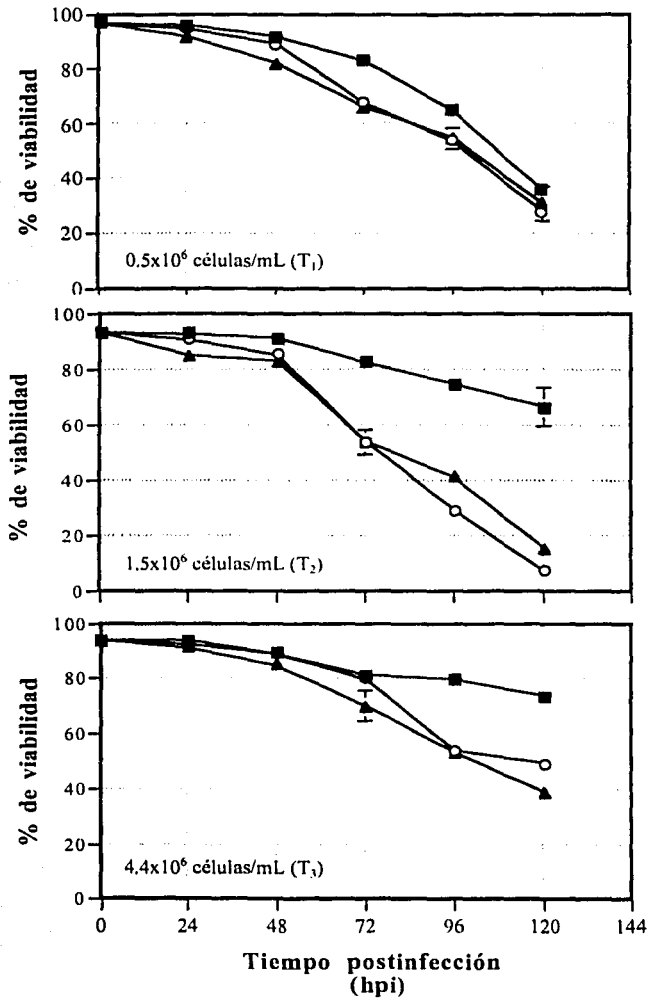


Figura 11. Viabilidad de células Sf9 durante las cinéticas de infección.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las viabilidades de los cultivos infectados a las diferentes multiplicidades de infección son comparables con las reportadas por Wong (1996), bajo el mismo tiempo de postinfección, relacionando esta caída de la viabilidad en cultivos infectados con la pérdida de la integridad de la membrana consecuencia de la replicación viral durante el proceso de infección. Sin embargo se debe considerar que no toda la muerte celular puede ser adjudicada a la infección si no también a la muerte con características necrótico-apoptóticas observada en células de insecto (Meneses *et al.*, 2001).

**Comparación de la población viable de los cultivos infectados de las líneas celulares High five y Sf9** . La expansión celular presentada por las dos líneas celulares refleja resultados interesantes principalmente al comparar los valores obtenidos en cultivos a  $T_1$ . Las expansiones celulares alcanzadas por High five son dos veces mayores que las obtenidas por Sf9. Como se discutió anteriormente, esta diferencia puede ser consecuencia de una adecuada infección viral en células Sf9, mientras que para células High five podría estarse manifestándose lo contrario.

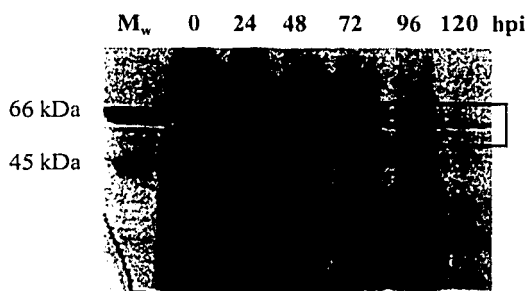
Analizando las tendencias de viabilidad de estas líneas celulares, aquéllas correspondientes a la línea celular Sf9 son ligeramente menores que las observadas en la línea celular High five, lo cual pudiera indicar que la línea celular Sf9 es más susceptible a la infección por el baculovirus. Al comparar estos resultados con lo reportado en la bibliografía encontramos que son un poco contradictorios. Mientras que Wu y col. (1993) sustentan que ambas líneas celulares son igualmente susceptibles al virus  $\beta$ gal-AcMNPV al evaluar los parámetros de la cinética de muerte celular, Wickman y col. (1992b) indican lo contrario. Ellos comparan las constantes de las velocidades de infección ( $k_i$ ) de estas líneas celulares demostrando que las células High five se infectan 10 veces más rápido que las células Sf9. Obtuvieron el porcentaje de virus unido a la superficie celular después de una hora de incubación, siendo éste 3.6% superior en células High five. Células High five tienen 6000 sitios de unión al baculovirus por célula, mientras que células Sf21 (clon de Sf9) tienen 3100 sitios por célula (Wang *et al.*, 1997).

Por los argumentos anteriores se esperaría que la viabilidad de células High five se viera más afectada que la de células Sf9 como consecuencia de la infección. Si se toma en cuenta la diferencia en tiempos para alcanzar el TDI de los cultivos por cada línea

celular (siendo mayores para células High five), los resultados indican que las condiciones del medio de cultivo juegan un papel clave incidiendo en la viabilidad del cultivo (ver sección V.4). Por esta razón es difícil diferenciar únicamente en base a este parámetro entre células muertas como consecuencia de la infección viral y células muertas por un proceso necrótico-apoptótico.

### V. 3. Caracterización de la producción de la proteína recombinante.

*Caracterización de la producción de la proteína recombinante en células High five.* En la figura 12 se muestra el gel de proteína para esta línea celular. En el primer carril se encuentran los marcadores de peso molecular de 66 y 45 kDa. En los siguientes siete carriles se encuentran las muestras de proteína correspondientes a la cinética de producción del tiempo 0 hasta las 120 hpi, observándose que la expresión de la proteína recombinante es a partir de las 48 hpi. Sólo se detectó expresión de la proteína recombinante en cultivos infectados a  $T_1$  y  $T_2$ . En la tabla 5 se muestra la concentración de proteína máxima por mL y el rendimiento por  $10^6$  de células viables.



**Figura 12a. Geles para la detección de proteína.** Se muestran el gel correspondiente a las proteínas sintetizadas por células High five, incluyendo la proteína recombinante a un  $T_1$  y a una MDI de 0.1 ufp/cel.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Comparación de la concentración de proteína y rendimiento por  $10^6$  células viables en células High five.

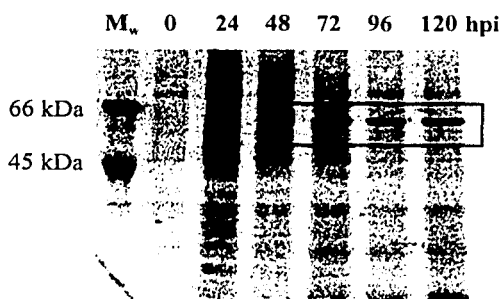
TDI ( $10^6$ células/mL)	MDI (ufp/cel)	Proteína ( $\mu$ g/mL)	$Y_{p/x}$ ( $\mu$ g/ $1 \times 10^6$ cel)
0.3 (T <sub>1</sub> )	0.1	16.4	9.8
	1.0	15.7	19.8
	10.0	20.4	29.5
1.5 (T <sub>2</sub> )	0.1	46.0	15.9
	1.0	44.3	19.2
	10	49.6	23.7
3 (T <sub>3</sub> )	0.1	0	0
	1.0	0	0
	10	0	0

Al analizar los resultados obtenidos se observa que la concentración de proteína máxima alcanzada por esta línea celular a  $0.3 \times 10^6$  células/mL (T<sub>1</sub>) se obtuvo infectando a una MDI de 10, mientras que a  $1.5 \times 10^6$  células/mL (T<sub>2</sub>) no hay diferencia entre las MDI. La concentración de proteína a T<sub>2</sub> es aproximadamente dos veces superior que la detectada a T<sub>1</sub>, lo cual era de esperarse, pues hay una mayor concentración celular por el mismo volumen del medio de cultivo. A T<sub>3</sub> no detectamos proteína recombinante. Los resultados indican que hay una concentración celular límite más allá de la cual no hay expresión de proteína recombinante. Con estos resultados no fue posible conocer dicha concentración, sin embargo debe ser superior a T<sub>2</sub>.

Los valores obtenidos del rendimiento de proteína por  $10^6$  células, para la misma línea celular a T<sub>1</sub> son bastante diferentes para cada MDI. El menor rendimiento de proteína se obtuvo a una MDI de 0.1 ufp/cel. Resultado que indica, que el proceso de infección fue poco eficiente repercutiendo en la caída del rendimiento al compararse con las demás MDI al mismo TDI. El máximo rendimiento a este TDI fue a la MDI 10, y a la MDI de 1, el valor obtenido es 1.5 veces menor, aún cuando los valores de expansión celular son muy parecidos entre ellos. A T<sub>2</sub>, los valores disminuyen 1.5 veces con respecto al valor máximo obtenido a una MDI de 10 con respecto a T<sub>1</sub>. Por lo tanto, aún cuando a MDI menores de 10 hubo mayor expansión, los rendimientos máximos se alcanzaron a la MDI de 10. Lo que nos lleva a pensar que el proceso de infección a la MDI de 10, fue eficiente y sincrónico en donde la mayoría de las células son infectadas, obteniéndose el mejor rendimiento de proteína recombinante.



**Caracterización de la producción de la proteína recombinante en células Sf9.** La proteína recombinante es detectada a partir de las 72 hpi (figura 12b). Sólo se detectó expresión de proteína recombinante en cultivos infectados a  $T_1$  y  $T_2$  de ambas líneas celulares. La concentración máxima de proteína obtenida por esta línea celular a  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) fue a una MDI de 0.1, mientras que a  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) la máxima concentración de proteína fue a una MDI de 1. A diferencia del incremento en la concentración de proteína recombinante observada en la línea celular High five al aumentar el TDI, en esta línea celular no hay diferencia significativa entre los TDI y MDI en donde si hubo expresión de proteína recombinante, obteniéndose concentraciones similares.



**Figura 12b. Geles para la detección de proteína.** Se muestran el gel correspondiente a las proteínas sintetizadas por células Sf9, incluyendo la proteína recombinante a un  $T_1$  y a una MDI de 0.1 uf $\mu$ /cel.

El máximo rendimiento de producto sobre biomasa obtenido fue a  $T_1$  (tabla 6), observándose un ligero aumento al aumentar la MDI. A  $T_2$ , los valores disminuyen entre 3 y 5 veces comparado con  $T_1$ . En esta línea celular la disminución en el rendimiento específico es más drástica que la experimentada por la línea celular High five, sin embargo es similar entre las MDI al mismo TDI.

**Comparación de la producción de proteína recombinante obtenida en los cultivos infectados de las líneas celulares High five y Sf9.** La concentración de proteína en las cinéticas presenta dos tendencias importantes a concentraciones celulares menores a  $T_3$ :

en células High five aumentó la concentración al aumentar el TDI a las diferentes MDI, mientras que en células Sf9 pareciera ser independiente de ambos parámetros.

**Tabla 6. Comparación de la concentración de proteína y rendimiento por 10<sup>6</sup> células viables en células Sf9**

TDI (10 <sup>6</sup> células/mL)	MDI (ufp/cel)	Proteína (µg/mL)	Y <sub>ps</sub> (µg/1x10 <sup>6</sup> cel)
	0.1	16.5	16.9
0.5 (T <sub>1</sub> )	1.0	12.7	17.6
	10	12.2	19.7
	0.1	12.3	3.0
1.5 (T <sub>2</sub> )	1.0	18.8	5.7
	10	13.9	4.7
	0.1	0	0
4.4 (T <sub>3</sub> )	1.0	0	0
	10	0	0

La expresión de la proteína recombinante se abatió completamente al infectar al final de la fase exponencial (T<sub>3</sub>) en ambas líneas celulares. En la bibliografía se reporta una disminución del rendimiento al aumentar la concentración celular al momento de infectar, tal es el caso de Chan (1998) quien utilizando el medio Sf900 II observó que el rendimiento disminuyó cuando las células son infectadas a concentraciones de 3-4x10<sup>6</sup> células/mL comparadas con infecciones a concentraciones de 2-3x10<sup>6</sup> células/mL sin que exista reemplazamiento de medio de cultivo. Existen reportes que indican que la disminución de la producción al aumentar el tiempo de infección está relacionada con el consumo de la fuente de carbono (Bédard *et al.*, 1994), producción de metabolitos tóxicos para las células (Tom *et al.*, 1995), limitación de oxígeno (Wong *et al.*, 1996) e incluso regulación de la fisiología celular por factores de crecimiento autócrinos (Doverskog *et al.*, 2000).

Una característica importante de este sistema de expresión es que los rendimientos específicos disminuyen al incrementar la densidad celular en el momento de la infección (Caron *et al.*, 1990; Lindsay y Betenbaugh, 1992; Licari y Bailey, 1992; Power *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1996; Taticek *et al.*, 1997; Bédard *et al.*, 1994; Radford *et al.*, 1997; Reuveny *et al.*, 1993). Se ha reportado que el TDI es un parámetro importante para obtener altos rendimientos de proteínas recombinantes, cuando es seleccionado a lo largo de la fase exponencial a densidades celulares de 1-5x10<sup>6</sup> células/mL (Neutra *et al.*, 1992).



Sin embargo los rendimientos obtenidos en nuestros cultivos indican que el TDI óptimo es  $T_1$  para ambas líneas celulares, valores por debajo de las densidades celulares reportadas.

La caída del rendimiento en las últimas fases del crecimiento de cultivos infectados ha sido explicada por Reuveny y col. (1993a), como el producto de una alteración en los factores fisiológicos o ambientales, tales como la capacidad del virus para infectar a la población celular o la capacidad de producción de proteína recombinante dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Por otro lado, la limitación de nutrientes o la acumulación de los productos de desecho, afectan la infección celular, así como la síntesis de la proteína recombinante. Más adelante se discutirá lo que sucedió con los sustratos consumidos y metabolitos generados durante la producción de la proteína recombinante, lo cual justifica el comportamiento observado a  $T_3$  ( $3-4.4 \times 10^6$  células/mL).

***Velocidad específica de producción de proteína recombinante en las líneas celulares de insecto.***

***Velocidad específica de producción de proteína recombinante en células High five.*** El comportamiento de este parámetro para la línea celular High five (figura 13) es variable a los diferentes TDI. A  $0.3 \times 10^6$  células/mL no hay diferencia en la velocidad de producción de la proteína recombinante a las diferentes MDI (figura 8).

A  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) la máxima velocidad de producción de proteína recombinante fue obtenida a una MDI de 10, mientras que a las MDI de 0.1 y 1 no hay diferencia entre los valores obtenidos. La velocidad obtenida a la MDI 10 es 2.4 veces superior que a MDI de 0.1 y 1, lo que podría estar indicando que a la MDI de 10, toda la población celular fue infectada inicialmente a diferencia de lo que está sucediendo a las otras dos MDI. A la concentración de  $3 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ), la velocidad específica de producción de proteína fue cero. La ventaja de trabajar con MDI bajas y TDI correspondientes a la etapa temprana de la fase exponencial, es que se pueden llevar a cabo infecciones de tipo secundario con un abasto viral menor (importante en cultivos a gran escala) y con la posibilidad de incrementar los rendimientos específicos. Por otro

lado, puede ser una desventaja para TDI altos, ya que la infección está limitada por la concentración celular máxima alcanzada en cultivos sin infectar, la forma de cultivo, nutrientes, así como la presencia de metabolitos tóxicos para el cultivo.

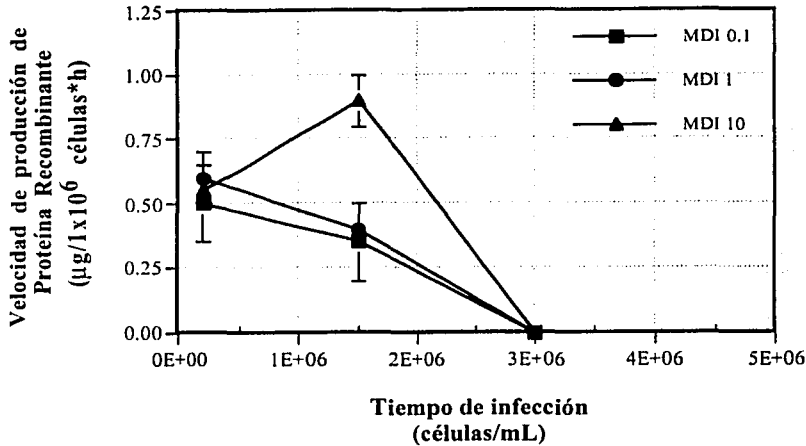
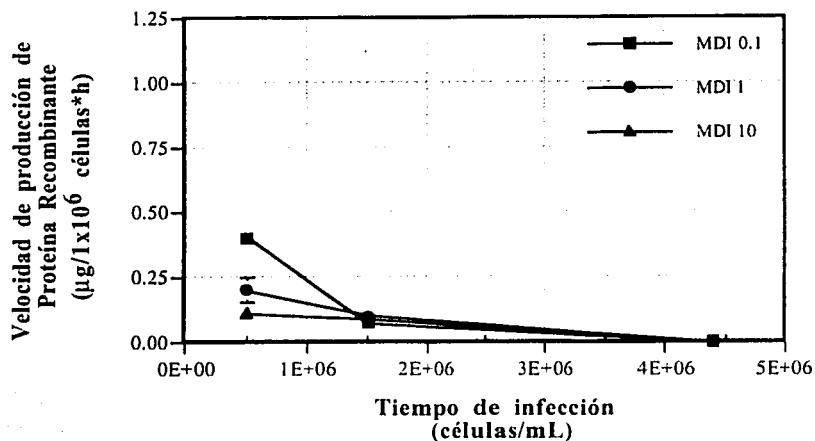


Figura 13. Velocidad específica de generación de proteína en células High five.

Las velocidades específicas de producción de proteína a  $T_1$  y  $T_2$  a MDI de 0.1 y 1, tienen valores muy próximos, lo que indica que en esta línea celular en particular no hay diferencia en la velocidad de producción si infectamos a TDI de  $0.3 \times 10^6$  células/mL y  $1.5 \times 10^6$  células/mL, bajo las MDI aquí utilizadas. En términos prácticos, lo que se busca es producir más al menor costo, por lo que conviene infectar a bajos TDI y bajas MDI.

*Velocidades específicas de producción de proteína recombinante en células Sf9.* El comportamiento de este parámetro para la línea celular Sf9 (figura 14), demuestra que la velocidad específica de producción de proteína disminuye al aumentar el TDI. A  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) hay una marcada diferencia entre las diferentes MDI, alcanzando el valor máximo a una MDI de 0.1 y el valor mínimo a la MDI de 10. Sin embargo los rendimientos de proteína con respecto a biomasa son mayores a la MDI de 10 y menores a una MDI de 0.1, lo que nos está indicando que la velocidad de producción no es un

parámetro a considerar cuando lo que interese sea la optimización de la producción de proteína recombinante.



**Figura 14. Velocidad específica de generación de proteína en células Sf9.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

A  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) la velocidad específica de producción de proteína resultó independiente de la MDI. Al utilizar TDI ( $4.4 \times 10^6$  células/mL) más cercanos a la fase estacionaria del cultivo, la velocidad específica irá disminuyendo hasta que posiblemente las condiciones del cultivo celular y del medio de cultivo sean el factor limitante. La velocidad específica de producción de la línea celular High five es más del doble a cualquier TDI y MDI que en células Sf9 bajo nuestras condiciones de cultivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### V. 4. Tendencia de los nutrientes clave: glucosa y glutamina.

Se siguió el comportamiento de dos nutrientes fundamentales para las líneas de insecto: glucosa y glutamina. Estos sustratos son utilizados por el cultivo para la generación y el mantenimiento de biomasa, y para la generación de producto. Por tal motivo es importante registrar sus consumos y analizar posteriormente de manera global el rendimiento de los nutrientes en función de la biomasa y proteína recombinante generada.

##### V. 4. 1. Tendencia de la glucosa remanente.

**Glucosa remanente en cultivos infectados de células High five.** La glucosa consumida en los cultivos infectados de la línea celular High five se presenta en la figura 15. A  $0.3 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) y a una MDI de 0.1 hay mayor consumo de glucosa debido a que a esta MDI existe mayor expansión celular que a las MDI de 1 y 10. El consumo a estas dos MDI es casi el mismo, aún cuando la expansión celular a la MDI de 1 es mayor que la alcanzada por las células infectadas a una MDI de 10, lo que estaría indicando que aún cuando las células no están consumiendo glucosa para su crecimiento sí la están utilizando para su mantenimiento y producción de proteína recombinante.

A  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ), la glucosa se consume totalmente a las 96 hpi a una MDI de 0.1, tiempo en el que el cultivo sigue manteniendo una viabilidad del 90% cayendo 24 horas después hasta un 60% como consecuencia posiblemente del agotamiento de la fuente de carbono y también debido a que el cultivo se encuentra en las últimas etapas del proceso de infección. Mientras que al final de la cinética a una MDI de 1 y 10, la concentración de glucosa remanente es de 10 y 11 mM respectivamente, mientras que la viabilidad de los cultivos se encuentra alrededor del 60%. Lo que indicaría que la caída de la viabilidad a este tiempo de infección no depende del agotamiento de la glucosa en el medio de cultivo sino de que las células se encuentran en las últimas etapas del proceso de infección.

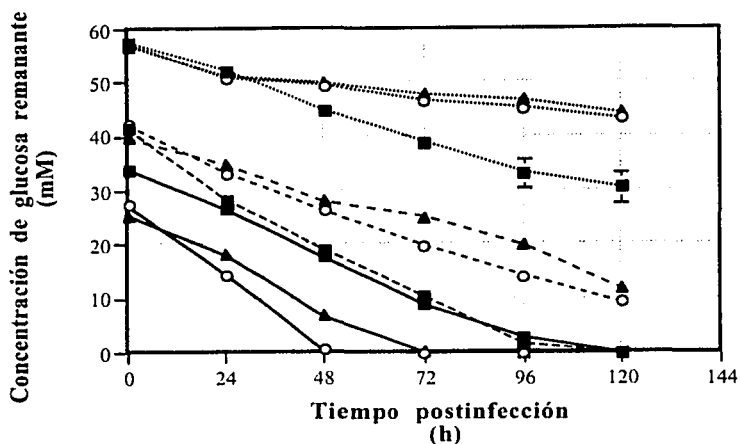


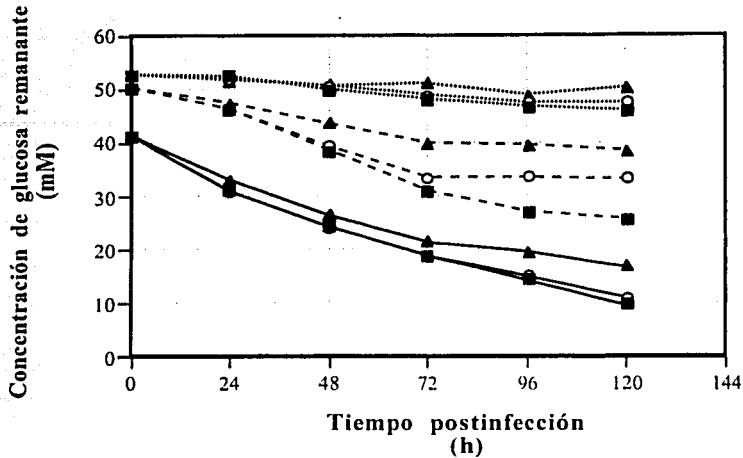
Figura 15. Cinéticas de consumo de glucosa en cultivos infectados de células High five. Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada. — T<sub>1</sub> - - - T<sub>2</sub> — T<sub>3</sub> ■ 0.1 ○ 1 ▲ 10

A  $3 \times 10^6$  células/mL (T<sub>3</sub>), hay una clara diferencia en las tendencias de los consumos de glucosa a las diferentes MDI. La concentración de glucosa al inicio de la cinética a la MDI de 0.1 es muy cercana a las concentraciones iniciales de glucosa a T<sub>2</sub>, sin embargo el cultivo a T<sub>3</sub> creció por 6 días antes de ser infectado con el baculovirus recombinante, mientras que los cultivos a T<sub>2</sub> crecieron por 5 días antes de ser infectados.

El comportamiento de la glucosa remanente varió para cada tratamiento, dependiendo directamente de la MDI utilizada. Evidentemente las cinéticas infectadas a MDI de 0.1 presentan mayor consumo con respecto a las otras MDI (con la única excepción de T<sub>3</sub>), consumo que indicaría que a ésta MDI las células tienen la capacidad de expandirse más. Más adelante discutiremos qué está sucediendo con las velocidades específicas de consumo y rendimientos.

*Glucosa remanente en cultivos infectados de células Sf9.* La concentración de glucosa remanente para los cultivos en células Sf9 se presenta en la figura 16. En éste gráfico se muestran tres tendencias perfectamente diferenciadas para cada TDI. El consumo a

$0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ), a diferencia de lo observado en células High five, es relativamente menor. Sin embargo, a éste TDI los consumos son muy similares entre las MDI, disminuyendo ligeramente al aumentar la MDI.



**Figura 16. Cinéticas de consumo de glucosa en cultivos infectados de células Sf9.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada. ———  $T_1$  - - - -  $T_2$  ———  $T_3$  ■ 0.1 ○ 1 ▲ 10

A  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) y a  $4.4 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ) a diferencia de lo observado en células High five no hay agotamiento de glucosa al final de la cinética, y la concentración de glucosa remanente aumenta de la menor MDI a la mayor.

**Comparación de la glucosa remanente en cultivos infectados de las líneas celulares de insecto.** La glucosa remanente en cultivos de células Sf9 se encuentra a concentraciones más altas que en cultivos de células High five. Al comparar las concentraciones celulares máximas alcanzadas por cada línea observamos lo siguiente: A un  $T_1$  encontramos que las concentraciones celulares máximas entre las líneas celulares son de 1 a 1.7 veces mayores en células Sf9 con respecto a células High five. Esto muestra que el



metabolismo de las líneas celulares es diferente, tal y como fue sugerido por Rhiel y col., (1997). La diferencia de la concentración celular utilizada en el inóculo para cada línea celular, ocasiona que el tiempo requerido para alcanzar los diferentes TDI varíe, obligando a los cultivos a un  $T_2$  y  $T_3$  de High five a partir de concentraciones de glucosa iniciales mucho menores que las prevalecientes en los cultivos de Sf9 para los mismos TDI.

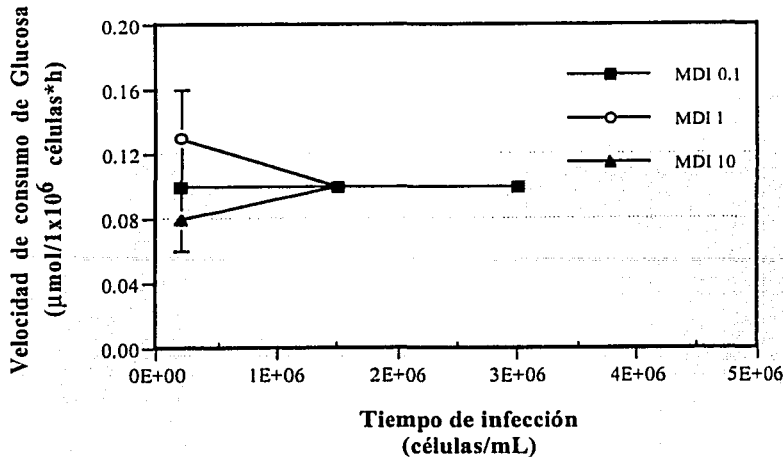
La glucosa consumida, como lo sugiere Wang y col., (1993b), podría haber sido utilizada para la obtención de productos virales (DNA, RNA, proteína total, incluyendo la proteína recombinante), ya que no se dió un incremento considerable en la concentración celular viable; adicionalmente, la glucosa debió proporcionar la energía necesaria a las células, vía glicólisis y ciclo de Krebs, para su mantenimiento (Bédard *et al.*, 1993).

***Velocidad específica de consumo de glucosa en las líneas celulares de insecto.***

***Velocidad específica de consumo de glucosa de la línea celular High five.*** En la línea celular High five, no existe diferencia entre las velocidades específicas de consumo de glucosa a ninguno de los TDI y MDI (figura 17), ya que las barras de error obtenidas de las réplicas de los experimentos a  $0.3 \times 10^6$  células/mL se sobrelapan.

Si bien no hay un incremento en éste parámetro para los cultivos infectados con respecto al control ( $0.1 \mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células\*h), como lo observado por Taticek y Shuler (1997), las células mantuvieron una velocidad de consumo constante. Comparando los valores de las velocidades específicas de producción de proteína, los aquí obtenidos son dos veces menores que los reportados por Rhiel y col. (1997) ( $0.266 \mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células\*h).

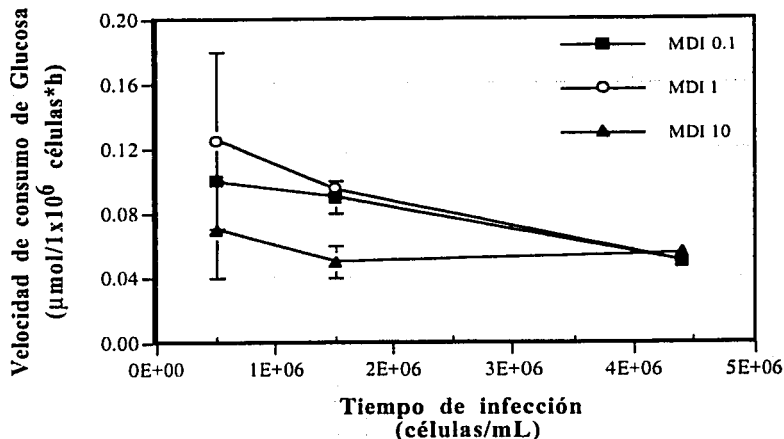
***Velocidad específica de consumo de glucosa de la línea celular Sf9.*** Las velocidades específicas de consumo de glucosa para la línea celular Sf9 (figura 18) se mantienen relativamente constantes al aumentar el TDI a las diferentes MDI. A  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ), el comportamiento es el mismo que el observado en los cultivos de células High five, las barras de error entre los cultivos, indican que no hay diferencia entre las MDI.



**Figura 17. Velocidades específicas de consumo de glucosa en la línea celular High five.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

Comparando los valores obtenidos con los del cultivo control ( $0.065 \mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células\*h), la velocidad de los cultivos infectados se incrementó 1.5 veces. Estos valores se encontraron dentro de los reportados en la bibliografía ( $0.05$ - $0.122 \mu\text{mol}/1 \times 10^6$  células\* h, Rhiel et al., 1997; Wang et al., 1993b; Reuveny, et al., 1992).

**Comparación de la velocidad específica de consumo de glucosa de las líneas celulares de insecto.** Haciendo una comparación de las velocidades específicas de consumo entre las líneas celulares utilizadas, se obtiene que los valores entre éstas son los mismos para el T<sub>1</sub> a las diferentes MDI debido a que las barras de error de los valores son traslapables. Aún cuando en células High five los valores a  $1.5 \times 10^6$  células/mL y  $3 \times 10^6$  células/mL permanecen constantes, los valores calculados para las células Sf9 se encuentran por debajo de los de las células High five a las diferentes MDI, concordando con lo reportado en la bibliografía.



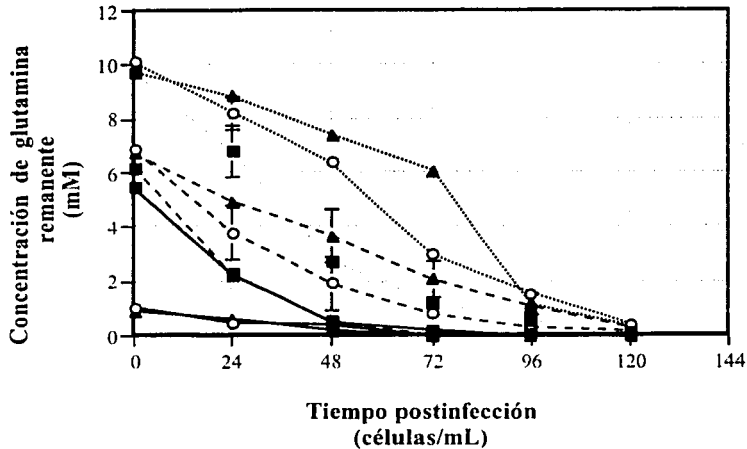
**Figura 18. Velocidades específicas de consumo de glucosa en la línea celular Sf9.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

#### V. 4. 2. Tendencia de la glutamina remanente.

**Glutamina remanente en cultivos de la línea celular High five.** La concentración de glutamina a lo largo de las cinéticas disminuye, agotándose al final de éstas a cualquier TDI, observándose únicamente como diferencia los tiempos de postinfección al cual se consume completamente (figura 19). Dicho evento refleja que mientras mayor sea la concentración celular viable, mayor será el consumo de dicho metabolito. Las células utilizan glutamina para su mantenimiento celular y para la generación de productos virales incluyendo a la proteína recombinante.

**Glutamina remanente en la línea celular Sf9.** Con lo que respecta a la concentración de glutamina remanente en la línea celular Sf9 (figura 20), ésta es mayor que la registrada

para la línea celular High five al final de las cinéticas, obteniéndose tendencias muy similares a las obtenidas con el consumo de glucosa.

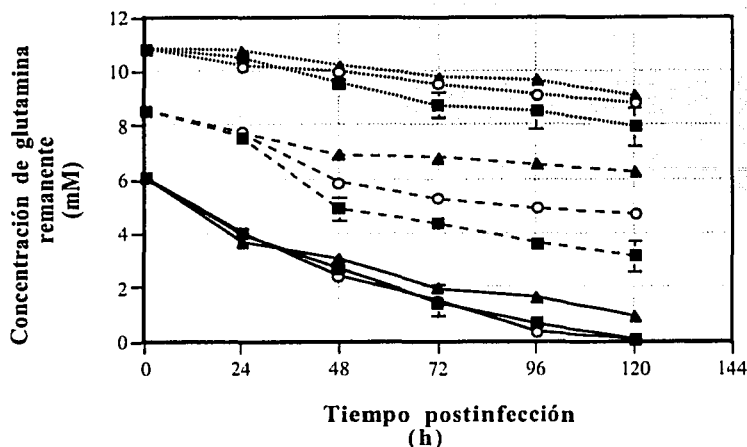


**Figura 19. Cinéticas de consumo de glutamina en cultivos infectados de células High five.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada. — T<sub>1</sub> - - - T<sub>2</sub> — T<sub>3</sub> ■ 0.1 ○ 1 ▲ 10

El consumo de glutamina a  $0.5 \times 10^6$  células/mL (T<sub>1</sub>) y  $1.5 \times 10^6$  células/mL (T<sub>2</sub>) es muy poco sin que llegue a agotarse el metabolito. A  $4.4 \times 10^6$  células/mL (T<sub>3</sub>), la glutamina se agota completamente a las 120 hpi únicamente a las MDI 0.1 y 1. Los datos reflejan una disminución en el consumo del nutriente al ser comparado con los consumos de la línea celular High five, aún cuando el porcentaje de viabilidad de la población celular en células Sf9 es mayor que el de células High five a la misma MDI.

*Comparación de la glutamina remanente de las líneas celulares de insecto.* Comparando las tendencias de glutamina remanente entre las líneas celulares, éstas muestran que células High five la consumen más rápidamente que las células Sf9, efecto observado también por Rhiel y col., (1997) al cultivar estas líneas celulares en medio

Sf900 II. Sin embargo, esta aseveración será justificada al analizar los valores de velocidades específicas de consumo.

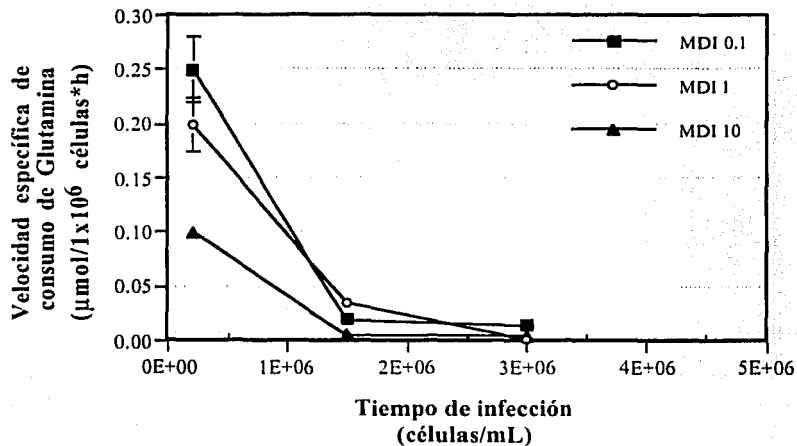


**Figura 20. Cinéticas de consumo de glutamina en cultivos infectados de células Sf9.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada. — T<sub>1</sub> - - - T<sub>2</sub> ..... T<sub>3</sub> ■ 0.1 ○ 1 ▲ 10

**Amonio generado en cultivos de la línea celular High five.** Se determinó la concentración de amonio en ambas líneas celulares, sin embargo sólo fue detectado en cultivos de células High five. A T<sub>1</sub> el amonio en el sistema se genera durante el transcurso de la cinética (4 mM, datos no mostrados), como consecuencia de la desaminación de la glutamina. Al inicio de las cinéticas a T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> las concentraciones de amonio en el sistema son de 2 y 5 mM, respectivamente, aumentando al término de la cinética hasta 8 mM en el T<sub>3</sub>, mientras que a T<sub>2</sub> es de 6 mM. Öhman y col., (1995), al estudiar el metabolismo de cultivos celulares de insecto, observan que bajo limitaciones de glucosa existe un incremento en la generación de amonio debido al aumento en el consumo de glutamina (figura 1a).

*Velocidad específica de consumo de glutamina en las líneas celulares de insecto.*

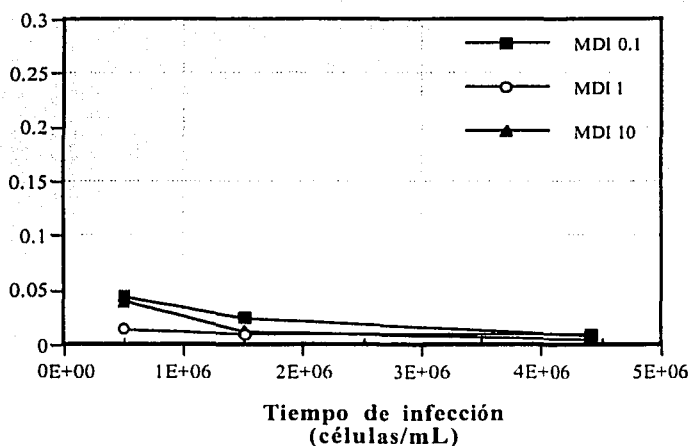
**Velocidad específica de consumo de glutamina en células High five.** En células High five, se observó que la velocidad específica de consumo de glutamina (figura 21) fue mayor al menor TDI, disminuyendo al aumentar dicho parámetro con valores muy próximos entre las MDI a los dos últimos TDI. Esto pareciera indicar que la velocidad de consumo de glutamina depende en este caso en particular, de la etapa de la fase exponencial a la que se lleva a cabo la infección viral. Comparando los valores obtenidos con el cultivo control ( $0.03 \mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ ), las células infectadas a  $0.3 \times 10^6 \text{ células/mL}$  ( $T_1$ ) consumen glutamina de 5 a 10 veces más rápido, mientras que los cultivos a los otros TDI, presentan velocidades muy similares a las del cultivo control.



**Figura 21. Velocidades específicas de consumo de glutamina en la línea celular High five.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

**Velocidad específica de consumo de glutamina en células Sf9.** Las velocidades específicas de consumo de glutamina para la línea celular Sf9 (figura 22) disminuyen al

aumentar el TDI. Los valores máximos obtenidos a  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) y  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ) coinciden con lo reportados por Rhiel y col., (1997), Reuveny, y col., (1993a), Scott, y col., (1992), así como el obtenido por nuestro cultivo control. Sin embargo, las velocidades obtenidas para los cultivos a  $4.4 \times 10^6$  células/mL ( $T_3$ ) son más bajas que las observadas en el cultivo control. Esto indicaría que aún cuando la glutamina no se encuentra en condiciones limitantes para el crecimiento del cultivo, ésta línea celular no la está aprovechando tal y como lo hacen las células High five, lo que estaría indicando que seguramente su metabolismo no depende directamente del consumo de este aminoácido.



**Figura 22. Velocidades específicas de consumo de glutamina en la línea celular Sf9.** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

### V. 5. Generación de lactato

El lactato es producto principalmente del metabolismo incompleto de la glucosa bajo un inadecuado abastecimiento de oxígeno en el cultivo. En el trabajo realizado por Rhiel y col., (1997) se reporta que en cultivos infectados en un bioreactor de 3 L la

generación de lactato es hasta concentraciones de 43 y 28 mM en células High five y Sf9, respectivamente. Los autores evaluaron únicamente la velocidad específica de generación de lactato para la línea celular High five, siendo de  $0.072 \mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ . Bajo estas condiciones los autores concluyeron que no hay limitaciones de oxígeno en el sistema y tampoco encontraron inhibición en la producción de la proteína recombinante al generarse concentraciones tan altas de lactato.

De la misma manera, cuantificamos la concentración de lactato de los cultivos infectados de las dos líneas celulares. Las concentraciones de lactato generadas en el sistema son muy bajas en células High five (9 mM, concentración máxima), mientras que en células Sf9 los niveles de lactato estuvieron próximos a los niveles mínimos de detección. En la discusión de los cultivos no infectados explicamos que la causa de la no detección de este compuesto se debe a la presencia de la enzima piruvato carboxilasa. Se procedió a calcular las velocidades específicas de generación de lactato para la línea celular High five (figura 23) como puede observarse, la velocidad de generación de lactato disminuye al aumentar el TDI y al aumentar la MDI.

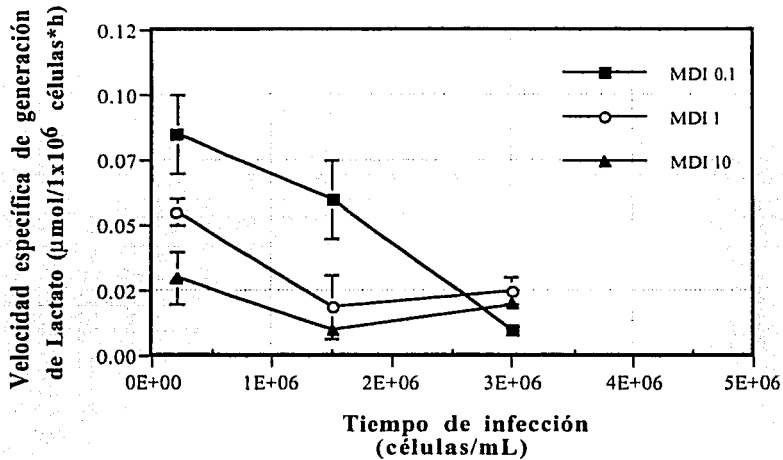


Figura 23. Velocidades específicas de generación de lactato en la línea celular High five.

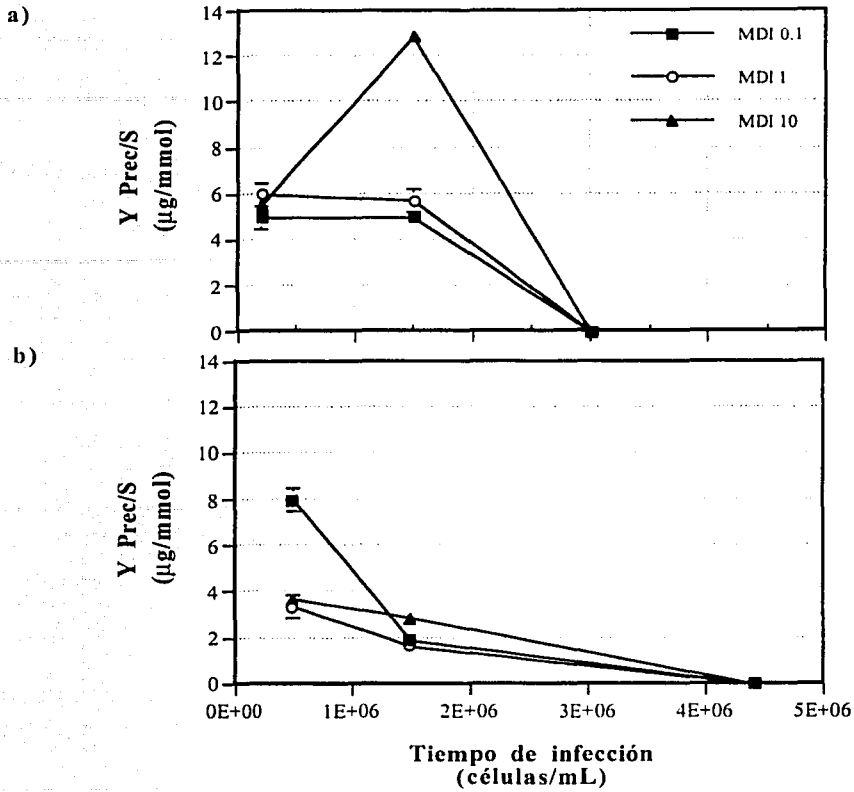


Está ampliamente reportado que en los cultivos infectados aumenta el consumo de oxígeno y por lo tanto, se esperaría un incremento en la concentración de lactato y de su velocidad específica de generación en los sistemas donde no hay buena transferencia de oxígeno. En el cultivo control la velocidad específica de consumo de lactato es de  $0.03 \mu\text{mol}/1 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}$ , que al compararlo con los resultados obtenidos para las cinéticas de células infectadas se obtienen valores similares, y en algunos casos ligeramente mayores, pero dentro de los valores reportados por Rhiel y col., (1997). Esto indica que en nuestro sistema no existió limitación de oxígeno.

#### **V. 6. Determinación del rendimiento de la proteína recombinante con respecto a los sustratos clave: glucosa y glutamina de las líneas celulares de insecto.**

Después de analizar las tendencias de los sustratos claves en el metabolismo de las líneas celulares utilizadas, nos llegamos a convencer que no era fácil diferenciar entre la proteína recombinante y biomasa producida a partir de un único nutrimento por lo que para obtener valores más representativos se utilizó un promedio de los consumos de glucosa y glutamina.

***Determinación del rendimiento de la proteína recombinante con respecto al sustrato promedio en células High five y Sf9.*** Las tendencias de éstos parámetros tienen un comportamiento típico para cada línea celular. En células High five se observó que mientras no exista limitación de nutrimentos en el cultivo ( $T_1$ , figura 15), no existe diferencia entre los rendimientos obtenidos a las diferentes MDI (figura 24a). Los rendimientos a una MDI de 0.1 y 1 se mantienen constantes a un TDI de  $1.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_2$ ), pero a una MDI de 10 existe un incremento en el rendimiento hasta de 2 veces, condición a la cual se obtiene la mayor concentración de proteína. En lo que corresponde a las células Sf9, el rendimiento obtenido a una MDI de 0.1 a un TDI de  $0.5 \times 10^6$  células/mL ( $T_1$ ) es 2 veces mayor que a las MDI de 1 y 10 al mismo TDI. Los rendimientos disminuyen considerablemente al aumentar el TDI (figura 24b).



**Figura 24. Rendimiento de proteína recombinante con respecto al sustrato. Células High five (a). Células Sf9 (b).** Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

*Comparación de los rendimientos de la proteína recombinante con respecto al sustrato en células High five y Sf9.* Aún cuando las células High five consumen ambos nutrientes en mayor proporción que células Sf9, las diferencias de los rendimientos obtenidos entre las líneas celulares no son relevantes. A T<sub>3</sub>, no detectamos expresión de la proteína recombinante en ninguna de las líneas celulares. Hay dos justificaciones

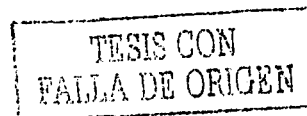
posibles. La primera podría ser que las concentraciones de los dos nutrimentos son limitantes para la producción de la proteína recombinante, siendo sólo suficientes para cubrir los requerimientos de mantenimiento celular. La otra justificación que tal vez sea la más factible es que a TDI altos las condiciones fisiológicas del cultivo no son adecuadas para la producción de la proteína recombinante.

**V. 7. Determinación del rendimiento de la generación de biomasa con respecto al sustrato en las líneas celulares de insecto.**

*Determinación del rendimiento de la generación de biomasa con respecto al sustrato en células High five.* Analizando los rendimientos de biomasa con respecto a los nutrimentos glucosa y glutamina (figura 25a), pareciera ser que el flujo de sustrato es utilizado indistintamente a bajos TDI (T<sub>1</sub>), aumentando ligeramente a un T<sub>2</sub>. Mientras que cuando el cultivo es infectado a una MDI igual o mayor a 1 existe un incremento, siempre y cuando se encuentre al final de la fase exponencial y no exista expresión de la proteína recombinante el consumo de nutrimentos estará dirigido hacia el mantenimiento del cultivo celular.

*Determinación del rendimiento de la generación de biomasa con respecto al sustrato en células Sf9.* Los rendimientos evaluados parecieran indicar que no existe diferencia de los mismos entre las MDI a los TDI de  $0.5 \times 10^6$  (T<sub>1</sub>) y  $1.5 \times 10^6$  células/mL (T<sub>2</sub>, figura 25b). Sin embargo sí existe diferencia de estos valores al compararse entre los TDI T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>. Resultados que parecieran indicar que la biomasa generada depende fuertemente del nutrimento a un T<sub>2</sub> y que aún cuando ya no hay generación de biomasa a un T<sub>3</sub>, el nutrimento es necesario para el mantenimiento del cultivo celular.

*Comparación del rendimiento de la generación de biomasa con respecto al sustrato en las líneas celulares de insecto.* Los rendimientos evaluados para la línea celular High five son menores que los obtenidos para la línea celular Sf9, aún cuando se observó que células High five consumen ambos nutrimentos más que Sf9. Estos rendimientos indican



por un lado que células Sf9 son metabólicamente más eficientes que las células High five como fue discutido en la sección V.1. Por otro lado, células a altos TDI en donde no expresan proteína recombinante utilizan preferencialmente los esqueletos de carbono consumidos para el mantenimiento de la población celular.

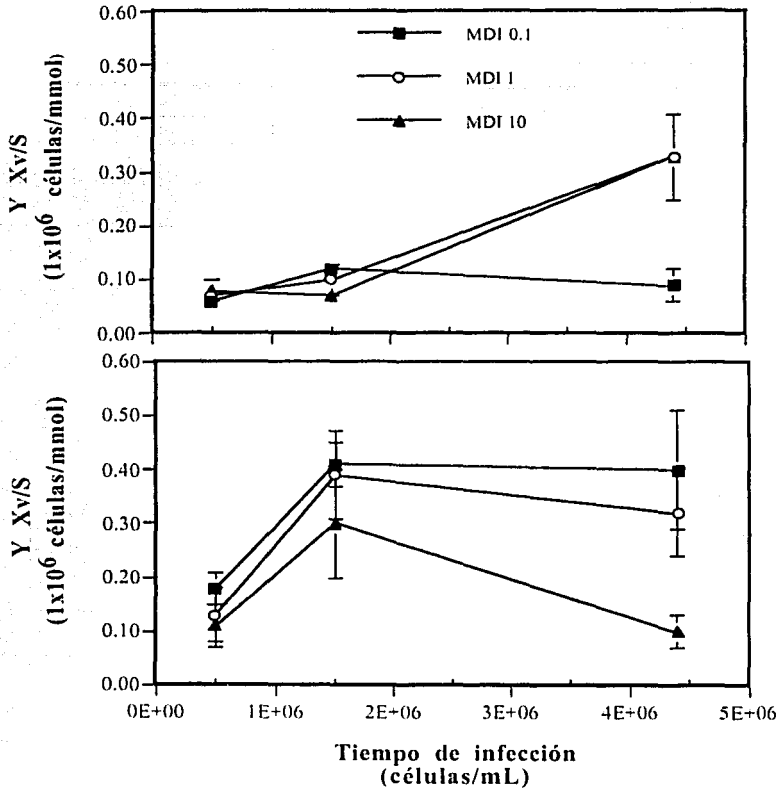


Figura 25. Rendimiento de la biomasa generada con respecto al sustrato. Células High five (a). Células Sf9 (b). Todos los datos tienen barras de error pero algunos son tan pequeños que quedan sobrelapados con la viñeta utilizada.

- En términos de la expansión celular, células Sf9 son infectadas más eficientemente a bajos TDI que células High five. Al aumentar el TDI, la capacidad de expansión de la población celular viable fue reducida como consecuencia no sólo de la infección viral a las diferentes MDI, si no también de las condiciones del medio después de varios días de cultivo.
- La expresión de la proteína recombinante dependió de la línea celular utilizada. Células High five bajo las condiciones experimentales utilizadas, produjeron proteína recombinante 24 hpi antes que células Sf9.
- En células High five la producción de la proteína recombinante es dependiente del TDI utilizado, pero no de la MDI ya que los mejores rendimientos se obtuvieron a las mayores MDI.
- En células Sf9 la expresión de la proteína recombinante es independiente del TDI y de la MDI utilizadas. La expresión de la proteína recombinante se abatió completamente al TDI más alto, indicando que hay una concentración celular límite para la expresión de la proteína recombinante.
- El aprovechamiento de los nutrientes clave fue diferente para cada línea celular. Los rendimientos de biomasa con respecto a los nutrientes indicaron que a TDI bajos, ambas líneas celulares utilizaron de la misma manera los nutrientes consumidos independientemente de la MDI utilizada.
- Al aumentar el TDI, células Sf9 se caracterizaron por una eficiencia metabólica que no se observó en células High five hasta los TDI mayores, en donde los nutrientes fueron claves para el mantenimiento del cultivo celular.
- A estos tiempos de infección se observó que células Sf9 tienen una dependencia directa de la MDI, mientras que células High five los requerimientos de dichos nutrientes son mayores a la MDI intermedia y alta.

- En lo que respecta a la producción de proteína recombinante, células High five utilizó los nutrientes consumidos más eficientemente que células Sf9 para la producción de proteína recombinante.

Se queda una puerta abierta del por qué la falta de detección de la proteína recombinante a los TDI más altos. Este problema ha sido detectado desde los inicios de la utilización del sistema para la expresión de proteínas recombinantes, asignándolo únicamente a las condiciones del medio de cultivo sin alcanzar una respuesta satisfactoria. Nosotros sostenemos fuertemente, que el problema real de esto, es el estado fisiológico del cultivo. Si bien es cierto que al sustituir el medio de cultivo por medio fresco, se recupera la expresión de la proteína recombinante, los rendimientos obtenidos ni siquiera son comparables con nuestros rendimientos a los TDI donde si detectamos dicha proteína. Por lo que sería de mucha ayuda realizar pruebas más específicas que ayuden a analizar el estado fisiológico del cultivo antes y después de la infección.

Quedan claras las diferencias metabólicas existentes entre las líneas celulares, sin embargo una buena parte de la información existente se basa en la especulación, y poco es lo sustentado experimentalmente específicamente en líneas celulares de insecto. El estudiar de lleno el metabolismo celular ayudaría a conocer y predecir muchos de los eventos suscitados al trabajar con este sistema de expresión con la finalidad primordial de optimizar la producción de proteína recombinante.

Aún después de trabajar alrededor de 15 años con este sistema de expresión no se ha hecho todo. Hoy en día, su uso está dirigido hacia la terapia génica, como un vector de expresión y todo indica que el sistema seguirá siendo utilizado por muchos años más.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Agathos, S. N. 1996. Insect cell bioreactors. Biotechnol. Adv. 9: 51-68.

Arróniz, R. I. 2003. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto constante en la producción de la lactadherina recombinante expresada en el sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Bathia, R., Jesionowski, G., Ferrance, J., y Atai, M. M. 1997. Insect cell physiology. Cytotechnol. 24: 1-9.

Bebbington, C. R., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D., y Yarranton, G. T. 1992. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as amplifiable selectable marker. BioTechnol. 10: 169-175.

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

Bédard, C., Perret, S., y Kamen, A. 1997. Fed-batch culture of Sf9 cells supports  $3 \times 10^7$  cell per mL and improves baculovirus-expressed recombinant proteins yields. Biotechnol. Lett. 19: 629-632.

Blissard, G. W., y Rohrmann, G. F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. of Entomol. 35: 127-155.

Bonarius, H. P. J., Özemre, A., Timmerarends, B., Skrabal, P., Tramper, J., Schmid, G., Heinzle, E. 2001. Metabolic-Flux Analysis of Continuously Cultured Hybridoma Cells Using  $^{13}\text{C}_2$  Mass Spectrometry in Combination with  $^{13}\text{C}$ -Lactate Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Metabolite Balancing. Biotechnol. Bioeng. 74: 528-538.

Boyce, F. M., y Bucher, N. L. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 2348-2352.

Cala, S. E. 2000. GRP94 hyperglycosylation and phosphorylation in Sf21 cells. Bioch. Biophys. Acta. 1496: 296-310.

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



- Carpentier, E., Lebesgue, D., Kamen, A. A., Hogue, M., Bouvier, M., y Durocher, Y. 2001. Increased production of active Human  $\beta_2$ -Adrenergic/  $G_{\alpha s}$  fusion Receptor in Sf-9 cells using nutrient limiting conditions. Protein Express. Purif. 23: 66-74.
- Chalmers, J. J., y Bavarian, F. 1991. Microscopic visualisation of insect cell-bubble interactions II: the bubble film and the bubble rupture. Biotechnol. Prog. 7: 140-150.
- Chan, L. C., Greenfield, P. F., y Reid, S. 1998. Optimising fed-batch production of recombinant protein using the baculovirus expression vector system. Biotechnol. Bioeng. 59: 178-188.
- Chazenbalk, G. D., y Rapoport, B. 1995. Expression of the extracellular domain of the Thyrotropin Receptor in the baculovirus system using a promoter active earlier than the polyhedrin promoter. The J. of Biol. Chem. 270: 1543-1549.
- Chen, F-T. A., y Evangelista, R. A. 1998. Profiling glycoprotein N-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis. Electroph. 19: 2639-2644.
- Clements, A. N. y Grace, T. D. C. 1967. The utilization of sugars by insect cells in culture. J. of Insect Physiol. 13: 1327-1332.
- Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., y Kost, T. A. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 127-132.
- Cosgrove, L., Lovrecz, G. O., Verkuylen, A., Cavaleri, L., Black, L. A., Bentley, J. D., Howlett, G. J., Gray, P. P., Ward, C. W., y McKern, N. M. 1995. Purification and properties of Insulin Receptor Ectodomain from large-scale mammalian cell culture. Prot. Express. Purif. 6: 789-798.
- Das, T., Johns, P. W., Goffin, V., Kelly, P., Kelder, B., Kopchick, J., Buxton, K., y Mukerji, P. 2000. High-level expression of biologically Active Human Prolactin from recombinant baculovirus in insect cells. Prot. Express. Purif. 20: 265-273.
- Davis, T. R., Trotter, K. M., Granados, R. R., Wood, H. A. 1992. Baculovirus expression of Alkaline Phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. Biotechnol. 10: 148-150.
- Davis, T. R., Wickham, T. J., Mckenna, K. A., Granados, R. R., Shuler, M. L., y Wood, H. A. 1993a. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29A: 388-390.
- Doverskog, M., Han, L., y Häggström, L. 1998. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. Cytotechnol. 26: 91-102.

Doverskog, M., Bertram, E., Ljunggren, J., Öhman, L., Sennerstam, R., y Haggstrom, L. 2000. Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells: Modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. Biotechnol. Prog. 16: 837-846.

Drews, M., Paalme, T., y Vilu, R. 1995. The growth and nutrient utilization of insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. J Biotechnol. 40: 187-198.

Elias, C. B., Zeiser, A., Bedard, C., y Kamen, A. A. 2000. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of  $5.2 \times 10^7$  cells per mL and production of beta-galactosidase at high cell density by fed batch culture. Biotechnol. Bioeng. 56: 32-44.

Elias, C. B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., y Kamen, A. A. 2003. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. Biotechnol. Prog. 19: 90-97.

Ferrance, J., Goel, A., y Atai M. 1993. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. Biotechnol. Bioeng. 42: 697-707.

Fertig, G., Kloppinger, M. y Miltenburger, H. G. 1990. Cell cycle kinetics of insect cell cultures compared with mammalian cell cultures. Exp. Cell. Res. 189: 208-212.

Freshney, R. I. 1983. Introduction to basic principles, in *Animal Cell Culture*. (Masters J. R. W., ed.), Oxford University Press, Oxford, New York, p. 3.

Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B., y Kocher, H. P. 1996. Review: Eukaryotic expression systems: A comparison. Prot. Express. and Purif. 8: 271-282.

Ghosh, S., Parvez, M. K., Banerjee, K., Sarin, S. K., y Hasnain, S. E. 2002. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: An emerging strategy. Mol. Therapy. 6: 5-11.

González, M. 2000. Efecto de las variables de cultivo sobre la producción de las proteínas recombinantes VP7 y VP4 de rotavirus en el sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gooijer, C. D., Lier, F. L. J., End, E. J., Vlak, J. M., Trammer, J. 1989. A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures. Appl. Microb. Biotechnol. 30: 497-501.

Grace, T. D. C., y Brzozowski, H. W. 1966. Analysis of the amino acids and sugar in an insect cell culture medium during cell growth. J. of Insect Physiol. 12: 625-633.

Graf, H., y Schugerl, K. 1991. Influence of the reciprocating movement on the performance of a membrane aeration system in insect cell cultures. Biotechnol. Tech. 5: 91-94.

Granados, R. R. 1980. Infectivity and mode of action of baculovirus. Biotechnol. Bioeng. 23: 1377-1405.

Grossmann, M., Wong, R., Teh, N. G., Tropea, J. E., East-Palmer, J., Weintraub, B. D., y SZkudlinski, M. W. 1997. Expression of biologically active Human Thyrotropin (hTSH) in a baculovirus system: Effect of insect cell glycosylation on hTSH activity *in vitro* and *in vivo*. Endocrinol. 138: 92-100.

Handa, A., Emery, A. N., y Spier, R. E. 1987. On the evaluation of gas-liquid interfacial effects on hybridoma viability in bubble column bioreactors. Develop. Biol. Stand. 66: 241-252.

Handa-Corrigan, A. 1989. Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanism of cell damage by bubbles. Enz. Microb. Technol. 11: 230-235.

Hassell, T., Gleave, S., y Butler, M. 1991. Growth inhibition in animal cell culture: The effect of lactate and ammonia. Appl. Biochem. Biotechnol. 30: 29-41.

Hensler, W., Singh, V., y Agathos, S. N. 1994. Sf9 insect cell growth and  $\beta$ -galactosidase production in serum-free media. Ann. N. Y. Acad. Sci. 745: 149-168.

Hink, W. F., Strauss, E. M., y Ramoska, W. A. 1977. Propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture: methods for infecting cells. J Invert. Path. 30: 185-191.

Hofmann, C., Sanding, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., y Strauss, M. 1995. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 10099-10103.

Horiuchi, T., Marumoto, Y., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M., Kondo, A., y Maeda, S. 1987. High-level expression of the Human- $\alpha$ -interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 51: 1573-1580.

Huang, L., y Riggin R. M. 2000. Analysis of nonderivatized neutral and sialylated oligosaccharides by Electrospray Mass Spectrometry. Anal. Chem. 72: 3539-3546.

- Jarvis, D. L., y Summers, M. D. 1989. Glycosylation and secretion of human Tissue Plasminogen Activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. Mol. Cel. Biol. 9: 214-223.
- Johnson, R., Schmiel, D., y Iatrou, K. 1993. Transfer vector for maximal expression of passenger genes in the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) expression system. Biotechnol. Bioeng.
- Kamen, A. A., Tom, R. L., Caron, A. W., Chavarie, C., y Kamen, J. 1991. Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 38: 619-628.
- Kellems, R. E. 1991. Gene amplification in mammalian cells: Strategies for protein production. Curr. Opinon. Biotechnol. 2: 723-729.
- Kim, S., Kim S. II., Ha, K-S., y Leem, S-H. 2000. An improved methos for quantitative sugar analysis of glycoproteins. Experim. Mol. Med. 32: 141-145.
- King, G., Kuzio, J., Daugulis, A., Faulkner, P., Allen, B., Wu, J., y Goosen, M. 1991. Assessment of virus production and chloramphenicol acetyl transferase expression by insect cells in serum-free and serum-supplemented media using a temperature-sensitive baculovirus. Biotechnol. Bioeng. 38: 1091-1099.
- Kioukia, N., Al-Rubeai, Zhang, Z., Emery, A. N., Nienow, A. W., y Thomas, C. R. 1995a. A study of uninfected and baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells in T and spinner flask. Biotechnol. Lett. 17: 7-12.
- Kioukia, N., Nienow, A. W., Emery, A. M., y Al-Rubeai, M. 1995b. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. J Biotechnol. 38: 243-251.
- Kioukia, N., Nienow, A. W., Al-Rubeai, M., y Emery, N. 1996. Influence of agitation and sparging on the growth rate and infection of insect cells in bioreactors and a comparison with hybridoma culture. Biotechnol. Prog. 12: 779-785.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M.M. 1993. Principles of Biochemistry. Ed. Neal Valerie, Editorial Worth Publishers, 2a. edition, New York.
- Licari, P. y 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. y Bailey, J. E. 1992. Modeling the populations dynamics of baculovirus-infected insect cells: optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. Biotechnol. Bioeng. 39: 432-441.

- Lindberg, I., Shaw, E., Finley, J., Leone, D., y Deiniger, P. 1991. Posttranslational modifications of Rat Proenkephalin overexpressed in chinese hamster ovary cells. Endocrinol. 128: 1849-1856.
- Lindsay, D. A., y Betenbaugh, M. J. 1992. Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells. Biotechnol. Bioeng. 39: 614-618.
- Luckow, V. A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. Recombinant DNA Tech. And Appl. (Prokop, A., Bajpai, R., y Ho, C., eds) Mc. Graw-Hill, Inc. New York, pp. 97-152.
- Luckow, V. A. y Summers, M. D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. Bio/Technol. 6: 47-55.
- Luan, Y. T., Mutharasan, R., Magee, W. E. 1987. Strategies to extend longevity of hybridomas in cultures and promote yield od monoclonal antibodies. Biotechnol. Lett. 9: 691-696.
- Lynn, D. E., y Hink, W. F. 1978. Alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus. J Inv. Pathol. 32: 1-5.
- Maiorella B., Inlow, D., y Harano D. 1988. Large scale insect cell culture for recombinant protein production. Bio/Technol. 6: 1406-1409.
- Mathews, C. K., y van Holde, K. E. 1999. Bioquímica. Editorial Mc Graw Hill, 2a. edición. Madrid, España.
- Matsuura, Y; Posee, R. D., y Bishop, D. H. L. 1986. Expression of the S-coded genes of lymphocytic chorimeningitis arenavirus using baculovirus vector. J. Gen. Virol. 67: 1515-1529.
- McQueen, A., y Bailey J. E. 1990. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. Biotechnol. Bioeng. 35: 1067-1077.
- Meij, P., Vervoort, M. B., Meijer, C. J., Bloemena, E., Middeldorp, J. M. 2000. Production monitoring and purification of EBV encoded latent membrane protein 1 expressed and secreted by recombinant baculovirus infected insect cells. J Virol. Methods. 90: 193-204.
- Mendonça, R. Z., Palomares, L. A., y Ramírez, O. T. 1999. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. J Biotechnol. 72: 61-75.
- Meneses, A. 2001. El potencial óxido-reducción: Implicaciones y efectos en el cultivo de células de eucariotes superiores. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Meneses, A., Mendoca, R., Merchant, H., Covarrubias, L., y Ramires, O. T. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. Biotechnol. Bioeng. 72: 441-456.

Michaels, J. D., Nowak, J. E., Mallik, A. K., Koczo, K., Wasan, D. Y., y Papoutsakis, E. T. 1995. Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. Biotechnol. Bioeng. 47: 407-419.

Miltnerburger, H. G., y David, P. 1980. Mass production of insect cells in suspension. Develop. Biol. Stand. 46: 183-186.

Misenheimer, T. M., Huwiler, K. G., Annis, D. S., y Mosher, D. F. 2000. Physical characterization of the procollagen module of human thrombospondin 1 expressed in insect cells. J Biol. Chem. 275: 40938-45.

Mizzrahi, A. 1984. Oxygen in human lymphoblastoid cell line cultures and effect of polymers in agitated and aerated cultures. Develop. Biol. Stand. 55: 93-102.

Murhammer, D. W. 1991. Review and patents and literature. The use of insect cell culture for recombinant protein synthesis: Engineering aspects. App. Biochem. and Biotechnol. 31: 283-309.

Murhammer, D. W., y Goochee, C. F. 1988. Scale up of insect cell cultures: Protective effects of pluronic F-68. Bio/Technol. 6: 1411-1418.

Murhammer, D. W., y Goochee, C. F. 1990. Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection. Biotechnol. Prog. 6: 391-397.

Nagata, T., Ishikawa, S., Shimokawa, E., Kamikawa, M., Kikuma, R., Muneta, Y., Yokomizo, Y., Nakamura, M., y Takehara, K. 2002. High level expression and purification of bioactive bovine interleukin-18 using a baculovirus system. Veter. Immunopath. 6666: 1-8.

Neutra, R., Levi, B., y Shoham, Y. 1992. Optimization of protein-production by the baculovirus expression vector system in shake flasks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 74-78.

Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., y Barnett, J. 1993. Fed-batch culture of insect cells: Method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. J. Biotechnol. 31: 205-217.

Öhman, L., Ljunggren, J., y Haggstrom, L. 1995. Introduction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 1-8.

O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A. 1994. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. Oxford University Pres, luc.

Page, M. J., y Sydenham, M. A. 1991. High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in chinese hamster ovary cells. BioTechnol. 9: 64-68.

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

Palomares, L. A., y Ramírez, O. T. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. Cytotechnol. 22: 225-237.

Palomares L.A., y Ramírez O. T. 1998. Insect cell culture: Recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production. Advances in Bioprocess Engineering II: p. 25-52.

Power, J. F., Reid, S., Radford, K. M., Greenfield, P. F., y Nielsen, L. K. 1994. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture. Biotechnol. Bioeng. 44: 710-719.

Radford, K. M., Reid, S., y Greenfield, P. F. 1997. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. Biotechnol. Bioeng. 56: 32-44.

Ramírez, O. T., y Mutharasan, R. 1990. Cell cycle and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridomas cultures. Biotechnol. Bioeng. 36: 839-848.

Ramírez, O. T., y Mutharasan, R. 1992. Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism. Biotechnol. Prog. 8: 40-50.

Rankl, N. B., Rice, J. W., Gurganus, T. M., Barbee, J. L., y Burns, D. J. 1994. The production of an active Protein Kinase C- $\delta$  in insect cells is greatly enhanced by the use of the basic protein promoter. Protein Express. Purif. 5: 346-356.

Reuveny, S., Kemp, C. W., Eppstein, L., y Shiloach, J. 1992. Carbohydrate metabolism in insect cell culture during cell growth and recombinant protein production. Ann. N. Y. Acad. Sci. 665: 230-237.

Reuveny, S., Kim, Y. J., Kemp, C. W., y Shiloach, J. 1993a. Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures. Biotechnol. Bioeng. 42: 235-239.

Reuveny, S., Kim, Y. J., Kemp, C. W., y Shiloach, J. 1993b. Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 619-623.

- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C. M., y Murhammer D. W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five™) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 Insect Cell Line Metabolism in Suspension Cultures. Biotechnol. Bioeng. 55: 909-920.
- Saarinen, M. A., Troutner, K. A., Gladden, S. G., Mitchell-Logean, K. M., Murhammer, D. W. 1999. Recombinant protein synthesis in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 insect cell aggregates. Biotechnol. Bioeng. 63: 612-617.
- Sanderson, C. S., Barford, J. P., Barton, G. W., Wong, T. K. K., y Reid, S. 1999. A structured, dynamic model for animal cell culture: application to baculovirus/insect cell systems. Biochem. Engin. J. 3: 219-229.
- Serrato, J. A. 2002. Estudio de escalamiento descendente del proceso de producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Scott, R. I., Blanchard, J. H., y Ferguson C. H. 1992. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cells. Enzyme Microb. Technol. 14: 798-804.
- Shoji, I., Aizaki, H., Tani, T. S., Ishii, K., Chiba, T., Saito, I., Miyamura, T., y Matsuura, Y. 1997. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. J. Gen. Virol. 78: 2657-2664.
- Smith, G. E. y Summer, M. D. 1978. Analysis of the baculovirus genome with restriction endonucleasas. Virology 89: 517-527.
- Smith, G. E., Summers, M. D., Fraser, M. J. 1983a. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. J. Virol. 46: 584-593.
- Smith, G. E., Summers, M. D., Fraser, M. J. 1983b. Production of Human Beta Interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cel. Biol. 3: 2156-2165.
- Stavroulakis, D., Kalogerakis, N., Behie, L., Latrou, K. 1991. Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension vector. Biotechnol. Bioeng. 38: 116-126.
- Stryer, L. 1995. Biochemistry. 4a. edición. N. Y.: WH Freeman y Co.
- Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., y Matsuura, Y. 2001. Characterization of cell-surface determinants important of baculovirus infection. Virology 279: 343-353.



Taticek, R. A. y Shuler, M. L. 1997. Effect of elevated oxygen and glutamine levels on forcing protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. Biotechnol. Bioeng. 54: 142-152.

Taticek, R. A., Choi, C., Phan, S-E., Palomares, L. A., y Shuler, M. L. 2001. Comparison of Growth and Recombinant Protein Expression in Two Different Insect Cell Lines in Attached and Suspension Culture. Biotechnol. Prog. 17: 676-684.

Tom, R. L., Debanne, M. T., Bédard, C., Caron, A. W., Massie, B., y Kamen, A. A. 1995. Improved yields of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor produced using the baculovirus expression system by medium replacement following infection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 53-58.

Tramper, J., Williams, J. B., y Joustra, D. 1986. Shear sensitivity of insect cells in suspension. Enz. Microb. Technol. 8: 33-36.

Tremblay, B. G., Meija, R. N., y MacKenzie, E. R. 1992. The NADP-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase is not expressed in *Spodoptera frugiperda* cells. J Biol. Chem. 267: 8281-8285.

Trinh, K., García-Briones, M., Hink, F., y Chalmers, J. J. 1994. Quantification of damage to suspended insect cell as a result of bubble rupture. Biotechnol. Bioeng. 43: 37-45.

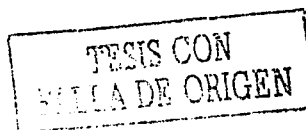
van Lier, F. L., van der Meijs, W. C., Grobber, N. G., Olie, R. A., Vlak, J. M., y Tramper, J. 1992. Continuous beta-galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. J Biotechnol. 22: 291-298.

Verostek, M. F., Lubowski, C., y Trimble, R. B. 2000. Selective organic precipitation/extraction of released N-glycans following large-scale enzymatic deglycosylation of glycoproteins. Anal. Biochem. 278: 111-122.

Volkman, L. E., Blissard, G. W., Friesen, P., Keddie, B. A., Possee, R., y Theilmann, D. A. 1995. Family Baculoviridae. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., y Summers, M. D., eds) Archives of Virology. Supplement 10, pp. 104-113.

Volkman, L. E., y Goldsmith, P. A. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology. 143: 185-195.

Wagner, R., Geyer, H., Geyer, R., y Klenk, H-D. 1996. N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza Virus Hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. J. Virol. 70: 4103-4109.



- Wang, M. Y., Vakharia, B., y Bentley, W. E. 1993a. Expression of epoxide hydrolase in insect cells: a focus on the infected cell. Biotechnol. Bioeng. 42: 240-247.
- Wang, M. Y., Vakharia, V., y Bentley, W. E. 1993b. Effects of oxygen/glucose/glutamine feeding on insect baculovirus protein expression: A study on epoxide hydrolase production. Biotechnol. Prog. 9: 355-361.
- Wang, M.-Y., y Bentley, W. E. 1994. Continuous insect cell (Sf9) culture with aeration through sparging. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 317-323.
- Wang, P., Hammer, D. A., y Granados, R. R. 1997. Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. J. Gen. Virol. 78: 3081-3089.
- Wenger, R. H., Moreau, H., y Nielsen, P. J. 1994. A comparison of different promoter, enhancer and cell type combinations in transient transfections. Anal. Biochem. 221: 416-418.
- Whitford, W. G. y Mertz, L. M. 1998. Multiplicity of baculovirus infection and recombinant proteins production in Sf-9 cells. Focus. 18: 75-76.
- Wickman, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., y Wood H. A. 1992a. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. Biotechnol. Prog. 8: 391-396.
- Wickman, T. J., Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R., y Wood, H. A. 1992b. Equilibrium and kinetic analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines. J. General Virol. 73: 3185-3194.
- Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl, G., y Hauser, H. 1988. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure. Gene. 73: 419-426.
- Wong, K. T. K., Peter, C. H., Greenfield, P. F., Reid, S., y Nielsen, L. K. 1996. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept. Biotechnol. Bioeng. 49: 659-666.
- Wood, H. A., Johnston, B., y Burand, J. P. 1982. Inhibitions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in high density *Trichoplusia ni* cell cultures. Virol. 119: 245-254.
- Wu, J., King, G., Daugulis, A. J., Faulkner, P., Bone, D. H., y Goosen, M. F. A. 1989. Engineering aspects of insect cell suspension culture: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 249-255.

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

Wu, S., Dale, B. E., y Liao, J. C. 1993. Kinetic Characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell cultures. Biotechnol. Bioeng. 41: 104-110.

Wu, J., Ruan, Q., y Lam, Y. P. 1997. Effects of surface-active medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage. Enzyme Microb. Technol. 21: 341-348.

Yamaji, H., Tagai, S-I., y Fukuda, H. 1999. Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement. J Bioscience Bioeng. 5: 636-641.

Yang, J.-D., Gecik, P., Collins, A., Czarnecki, S., Hsu, H.-H., Lasdum, A., Sundaram, R., Muthukumar, G., y Silberklang, M. 1996. Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. Biotechnol. Bioeng. 52: 696-706.

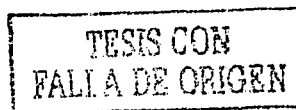
Yusuf, C. 2000. Animal-cell damage in sparged bioreactors. Trends in Biotechnol. 18: 420-432.

Zhang, J., Kalogerakis, N., Behie, L. A., y Iatrou, K. 1993. A two-stage bioreactor system for the production of recombinant proteins using a genetically engineered baculovirus/insect cell system. Biotechnol. Bioeng. 42: 357-366.

Zhang, J., Kalogerakis, N., Behie, L. A., e Iatrou, K. 1994a. Optimum infection conditions for recombinant proteins production in insect cell (Bm5) suspension culture. Biotechnol. Prog. 10: 636-643.

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

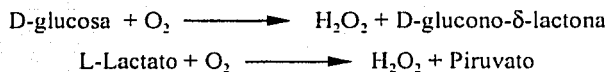
Zheng, Y. Z., Greenfield, P. F., y Reid, S. 1999. Optimized production of recombinant bluetongue core-like particles produced by the baculovirus expression system. Biotechnol. Bioeng. 65: 600-604.



### Cuantificación de metabolitos en el medio de cultivo

La **glucosa** y el **glutamato** son medidos en el YSI simultáneamente. Las enzimas glucosa oxidasa y L-lactato oxidasa son inmovilizadas entre dos membranas, acetato de celulosa y policarbonato. Generalizando, el sustrato es oxidado y entra a la primera membrana donde se encuentra la enzima, produciendo peróxido de hidrógeno, el cuál pasa a través de la membrana de acetato de celulosa al electrodo de platino, donde el peróxido de hidrógeno es oxidado. La corriente resultante es proporcional a la concentración del sustrato.

Reacción con la enzima inmovilizada:



Reacción en el ánodo de platino:

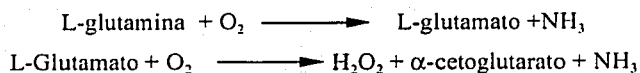


Nota: El flujo de electrones es proporcional a la concentración del peróxido de hidrógeno y a la concentración del sustrato.

La **glutamina** y el **glutamato** son medidos simultáneamente. Cuando la muestra es inyectada en el equipo, se difunde hacia la membrana de la glutamina, que contiene dos enzimas, la glutaminasa y la glutamato oxidasa. La glutamina es desaminada a glutamato y amonio. En presencia de glutamato oxidasa, el glutamato es oxidado a peróxido de hidrógeno,  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio. El peróxido de hidrógeno es detectado amperométricamente en la superficie del electrodo de platino. El flujo de corriente del electrodo es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y a

la concentración de glutamato. El glutamato en la muestra es oxidado en ambas membranas (de glutamina y glutamato), produciendo peróxido de hidrógeno,  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio. El selector del equipo calcula la concentración de glutamina restándole, a la respuesta de la glutamina el valor de respuesta del glutamato. De esta manera, ambos compuestos son medidos simultáneamente.

Reacción con la enzima inmovilizada:



Reacción en el ánodo de platino:



La especificidad del equipo depende de las membranas utilizadas. Cada membrana contiene 3 películas. La primera película (policarbonato poroso), limita la difusión del sustrato al interior de la segunda capa donde se encuentra la enzima inmovilizada, previniendo que la reacción sea limitada. La tercera película (acetato de celulosa) permite que sólo moléculas pequeñas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lleguen al electrodo, eliminando muchos compuestos electroquímicamente activos que pudieran interferir con la medición.

### **Montaje de las técnicas para el análisis de carbohidratos por electroforesis capilar.**

Con el interés de analizar la posible glicosilación de la proteína recombinante se montaron las metodologías para el análisis de los carbohidratos en electroforesis capilar. Se trabajó con la fetuina bovina como glicoproteína de control interno. A continuación se describirá la metodología utilizada para la purificación de la proteína recombinante, la preparación de los glicanos para su análisis en la electroforesis capilar y los resultados obtenidos.

***Purificación de la proteína recombinante modelo.*** Para realizar el análisis de glicanos se seleccionaron las muestras de proteína expresada a las 120 horas de postinfección, tiempo en donde se produjo en la mayoría de las cinéticas la concentración máxima de proteína recombinante. Cada muestra fue corrida en geles de poliacrilamida al 10%. La banda correspondiente a la proteína recombinante fue cortada en pedazos muy finos, que fueron colocados en un sistema de electroelución, utilizando un buffer 50 mM bicarbonato de amonio y 1% SDS. Se utilizó una corriente de 10 mA por cada tubo, durante 5 hrs. Cada muestra fue recuperada en tubos eppendorf y concentrada en un equipo savant modelo SC110A Speed Vac Plus. Una vez concentrada la muestra fue resuspendida en 200  $\mu$ L de agua milli-Q y se cuantificó por densitometría.

***Preparación de la proteína control para el análisis de glicanos en el equipo de Electroforesis Capilar.*** Para montar las técnicas de análisis en el equipo de electroforesis capilar y corroborar los resultados obtenidos se procesó una proteína estándar, la fetuina bovina. Su patrón de N-glicosilación fue analizado y reportado por Chen y Evangelista (1998). Esta glicoproteína tiene un peso molecular de 40 kDa y 3 sitios de N-glicosilación, con residuos de galactosa, manosa, fucosa, N-Acetilglucosamina y N-Acetilgalactosamina en su composición (Kim *et al.*, 2000).

Se procesaron muestras con cantidades de 200, 100 y 50  $\mu\text{g}$  de fetuina bovina obtenida de SIGMA y 50  $\mu\text{g}$  de proteína procesada de la misma manera que fueron procesadas las muestras de la proteína recombinante. Las muestras de proteína fueron sometidas al tratamiento que se describe a continuación:

1. La muestra de proteína concentrada fue resuspendida en 45  $\mu\text{L}$  de buffer desnaturalizante (Fosfato de sodio 50 mM, SDS 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%), y calentada a 99°C por 5 min.
2. Se le adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de 7.5% NP-40.
3. Las muestras fueron tratadas con 1U de PNGasa F e incubadas a 37°C por 15 h. La PNGasa F utilizada, es una enzima obtenida a partir de *Chryseobacterium meningosepticum* la cual hidroliza específicamente los enlaces N-glicosídicos existentes entre un residuo de Asp y el primer residuo del carbohidrato que generalmente es N-acetilglucosamina siempre y cuando no se encuentre fucosilado en la posición 1-3.
4. Se adicionaron 3 volúmenes de etanol frío, se mantuvieron las muestras por 10 min en hielo y se centrifugaron por 10 min a la máxima velocidad de una centrifuga de mesa.
5. Se recuperó el sobrenadante y se concentró para procesar los carbohidratos.
6. Se procedió a realizar la derivatización de los carbohidratos: los carbohidratos son sometidos a una reacción de amidación reductiva con cianoborohidruro de sodio en 1M Tetrahidrofurano a 55°C por 2 h en donde los azúcares son marcados con un fluoróforo en su extremo reductor. El fluoróforo utilizado es el 8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato (APTS). La estequiometría del marcaje corresponde a una molécula del fluoróforo por cada molécula de carbohidrato. Este fluoróforo emite a una  $\lambda_{\text{max}}$  de 488 nm y absorbe a una  $\lambda_{\text{max}}$  de 512 nm utilizando un láser de argón.
7. Se prepararon 5  $\mu\text{L}$  de la muestra en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  con agua milli-Q.
8. Esta preparación fue sometida al análisis en el equipo de P/ACE MDQ electroforesis capilar (Beckman) equipado con un detector laser de fluorescencia inducida. Esta técnica electroforética basa su principio de separación de analitos en base a su carga en un tubo capilar muy estrecho. La separación fue realizada utilizando un capilar N-CHO con una segunda membrana de polivinil alcohol. El capilar tiene un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , 40 cm de longitud del capilar a la ventana del detector y 50 cm de longitud total, utilizando un buffer de acetatos pH 4.5, conteniendo oxido de polietileno. La muestras fueron

introducidas al capilar por una presión de inyección de 0.5 psi por 10 s. La electroforesis fue realizada a un voltaje de 20 kV por 20 min, el cual hace migrar los analitos a través del capilar, circulando a su vez a través de una ventana del detector donde la información es colectada y almacenada por un sistema de adquisición de datos.

**Preparación de las muestras problema para el análisis de glicanos.** Se procesaron 50  $\mu$ g de las muestras de la proteína recombinante eluidas. Las muestras de proteína fueron sometidas al tratamiento descrito anteriormente.

**Resultados.** La fetuina bovina tiene un peso molecular de 40 kDa, presenta 6 sitios de glicosilación de los cuales 3 son sitios de O-glicosilación y 3 sitios de N-glicosilación (Verostek, *et al.*, 2000). Después de ser sometida al tratamiento con la PNGasa F, se observó claramente la diferencia de migración entre las muestras procesadas (figura A1).



**Figura A1. Fetuina bovina sometida al tratamiento sin/con PNGasa F**

Huang y Rigglin (2000) analizaron esta glicoproteína (proveniente de Sigma) por espectrometría de masas con electro-spray. Ellos sugieren que del 14-30% de los N-residuos se encuentran como especies biantenarias y que del 5-14% son especies triantenarias tetrasialidadas con pesos moleculares promedios encontrados entre 1-2.26 kDa/glicano (tabla A1).

A partir de esta información y al utilizar en los ensayos proteína de la misma marca comercial, podemos asumir que la diferencia de migración observada corresponde a un peso molecular de 9 kDa aproximadamente considerando que la proteína tiene 3 sitios de N-glicosilación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Tabla A1. Resumen de las estructuras de los N-glicanos encontrados en la Fetuina Bovina obtenida por HPLC/MS (Huang y Rigglin, 2000).**

Peso molecular (kDa)	Estructura del oligosacárido propuesto
1.096	(NeuAc)0(Hex)3(HexNAc)3
1.39	(NeuAc)1(Hex)3(HexNAc)3
1.60	(NeuAc)3(Hex)2(HexNAc)2
1.75	(NeuAc)1(Hex)4(HexNAc)4
2.04	(NeuAc)2(Hex)4(HexNAc)4
2.26	(NeuAc)4(Hex)3(HexNAc)3
2.92	(NeuAc)5(Hex)4(HexNAc)4

Hex: Manosa, galactosa, N-Acetilgalactosa.

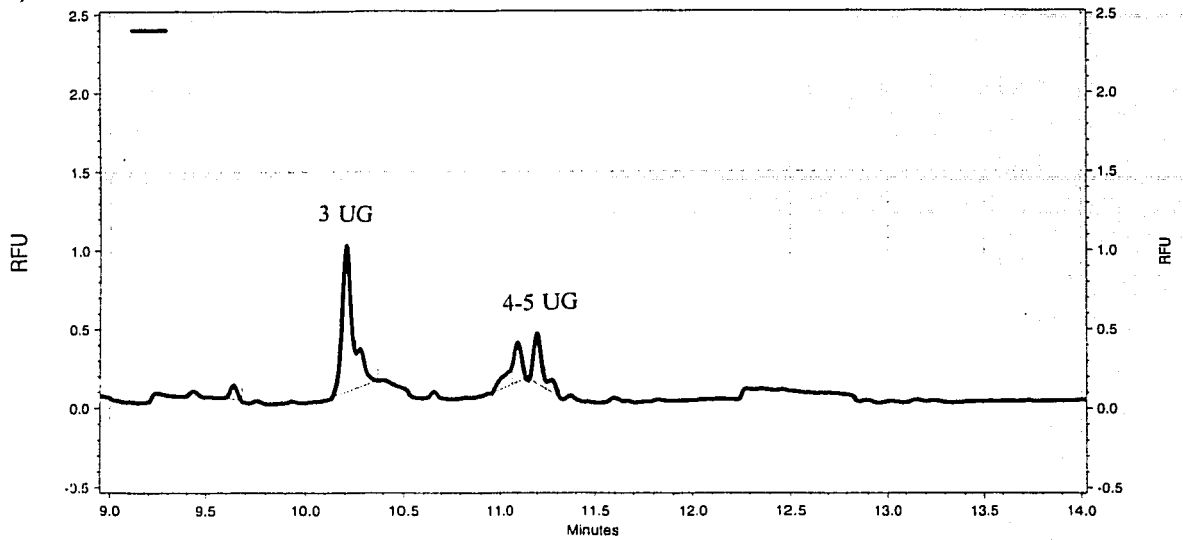
### *Establecimiento de controles.*

Para corroborar los resultados generados en el equipo de electroforesis capilar se utilizó como comparación, el patrón de glicosilación de la fetuina bovina obtenido por Chen y Evangelista (1998). Ellos determinaron que los glicanos encontrados en esta proteína corresponden a 3, 4 y 5 unidades de glucosa (UG). Al realizar el análisis en nuestro equipo, se obtuvo el electroferograma mostrado en la figura A2a. En el que la señal de los carbohidratos registrada proviene de 200 µg de proteína desglicosilada. Este patrón es muy similar al reportado, y de acuerdo a la escalera de glucosa (figura A2d), los picos corresponden de igual manera a 3, 4 y 5 UG.

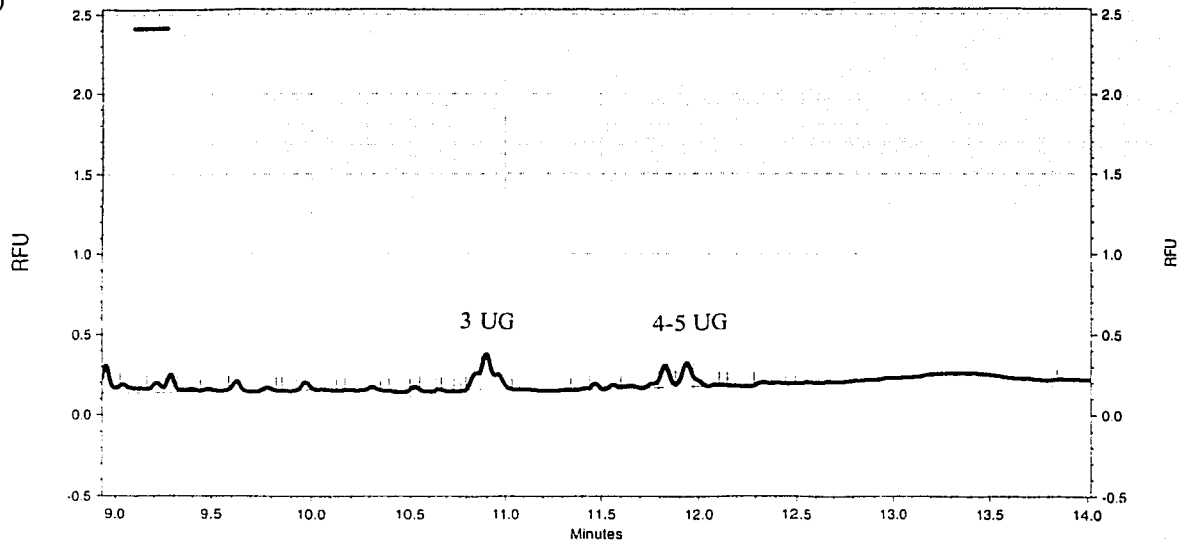
Se procedió a procesar concentraciones de proteína menores (100 y 50 µg). De los electroferogramas obtenidos (figuras A2b y A2c) observamos que la señal disminuye al procesar menor cantidad de proteína, señal que puede confundirse con el ruido emitido por el equipo. El problema principal con el que nos estábamos enfrentando, eran los 50 µg de proteína recombinante recuperada después de la purificación. Lo que implicaba que la señal detectada en el equipo de los carbohidratos provenientes de la proteína recombinante sería muy pequeña y fácilmente traslapada con el ruido del equipo.

Figura A2. Electroferogramas de los carbohidratos correspondientes a la fetuina bovina. Procesamiento de a) 200  $\mu$ g, b) 100  $\mu$ g, c) 50  $\mu$ g y d) escalera de glucosa.

a)

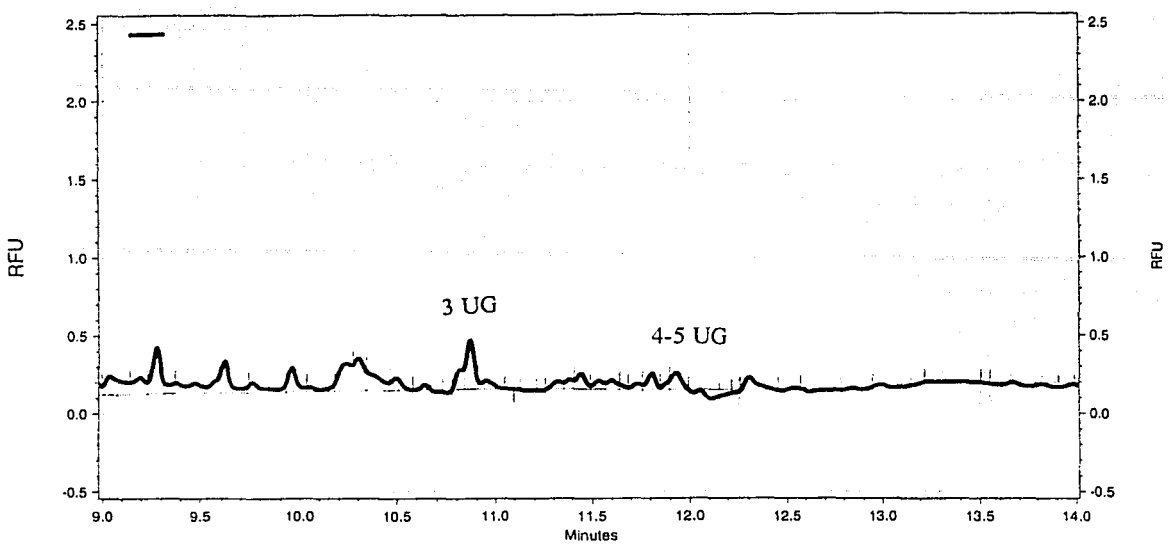


b)



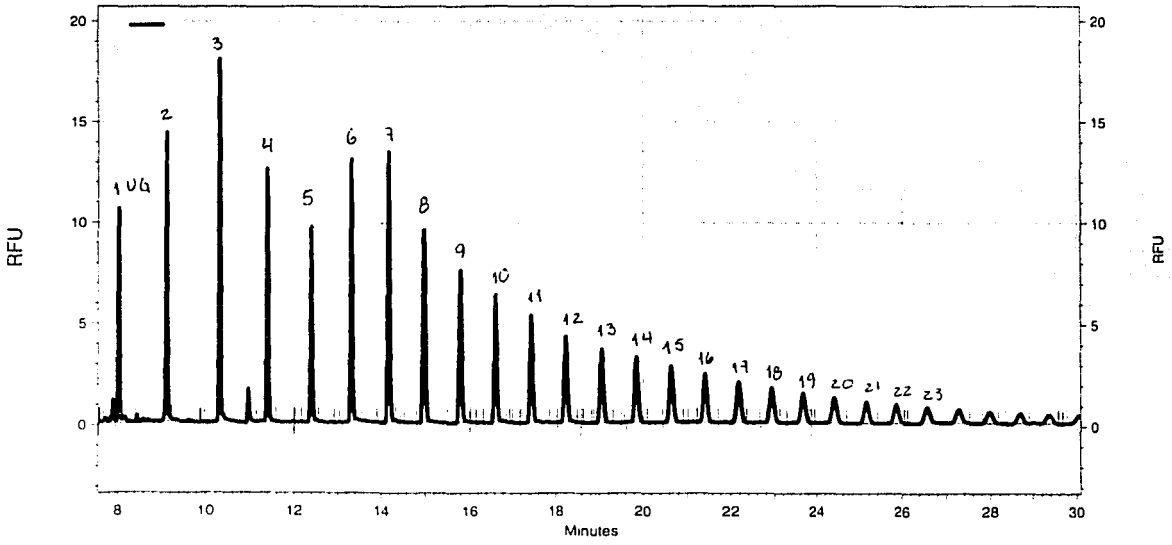
TESIS CON  
VALOR DE ORIGEN

c)



d)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

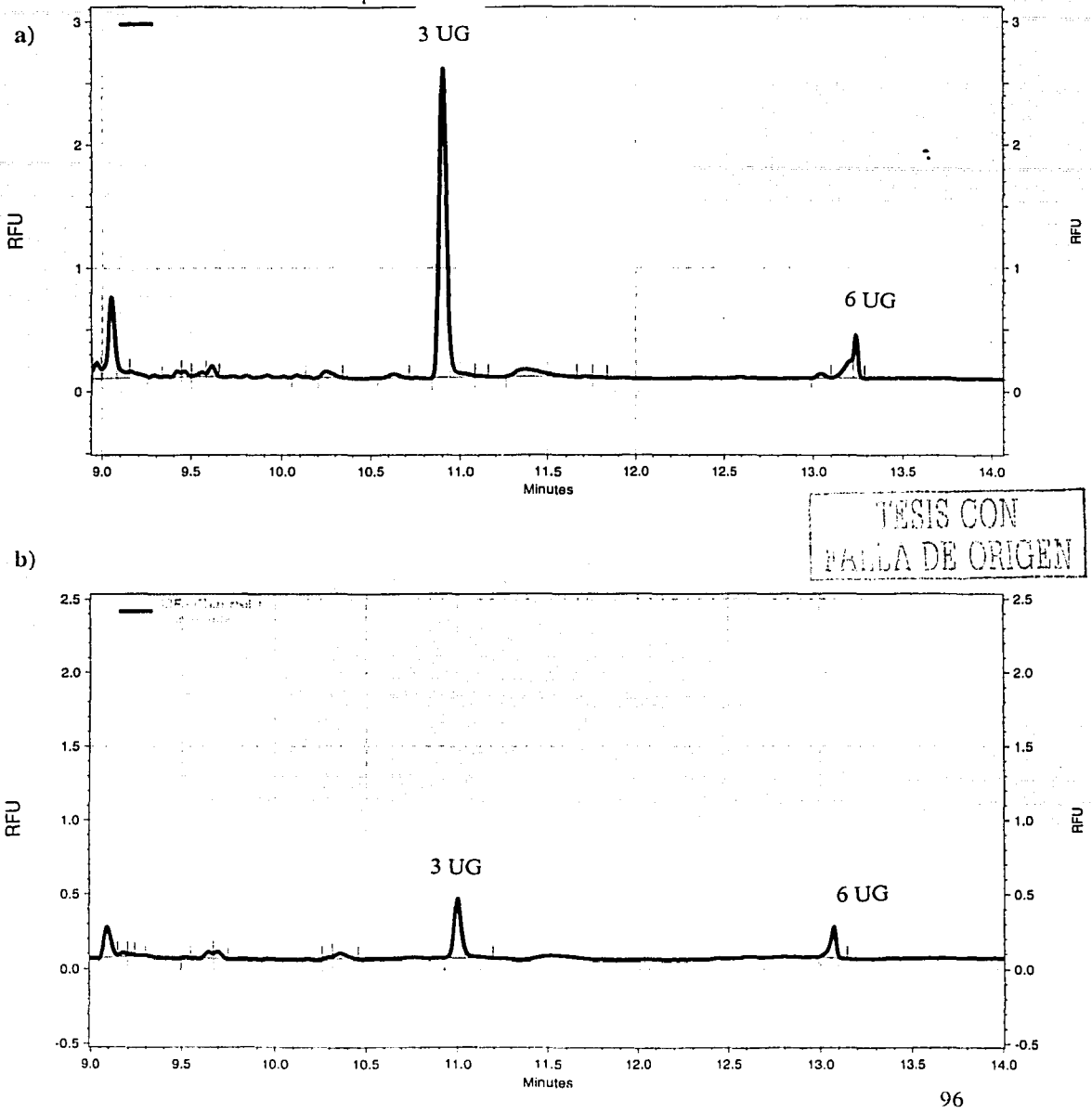
Teniendo claro este problema, se propuso realizar un control más en donde la fetuina bovina fue procesada de la misma manera que la proteína recombinante (se corrieron geles de acrilamida y se eluyó la proteína). Finalmente se procesaron 50 µg de proteína, y se sometió al análisis. En el electroferograma correspondiente (figura A3a), se pierde por completo la señal correspondiente a los glicanos que corresponden a las 4-5 UG y aparece un nuevo pico a los 13 min de retención que corresponde a 6 UG.

Al parecer estábamos detectando una interferencia de los residuos de acrilamida en las muestras de proteína eluida, por lo que se procedió a realizar un tercer control, en donde la muestra procesada correspondía únicamente a los residuos del buffer procedente de la elución de acrilamida polimerizada. En el electroferograma obtenido (figura A3b), podemos observar 2 picos que corresponden a los mismos tiempos (11 y 13 min) del control anterior. Los controles realizados para el análisis de glicanos en el equipo de electroforesis capilar dejaron claro dos cosas: en las condiciones descritas en este trabajo, los carbohidratos correspondientes a 50 µg de proteína son insuficientes para ser analizados y el procedimiento seleccionado para la purificación de la proteína recombinante da una señal que puede ser sustraída fácilmente, pero elimina por completo la señal correspondiente al glicano a analizar.

#### *Caracterización del patrón de glicanos a los diferentes TDI y MDI.*

*Análisis de las muestras sometidas a la desglicosilación con la PNGasa F.* Como se mencionó ya en la metodología, únicamente las muestras de proteína provenientes del tiempo 120 hpi fueron sometidas al tratamiento con la PNGasa F. Posteriormente estas muestras fueron analizadas en geles de acrilamida para observar la diferencia de migración existente entre la proteína sometida al tratamiento con y sin PNGasa F. En la figura A-4, se muestran los geles correspondientes a las proteínas provenientes de las dos líneas celulares a las diferentes condiciones de infección. La diferencia de migración existente en las muestras es muy pequeña, lo que pareciera indicar que la proteína no está glicosilada. Sin embargo se sabe que la PNGasa F no es específica para cortar si el sitio de corte está fucosilado en posición 1-3, lo cual podría ser una posibilidad al no detectar diferencia de migración entre las muestras procesadas.

Figura A3. Electroferogramas de la proteína control procesada igual que las condiciones de purificación de la proteína recombinante. a) los carbohidratos correspondientes a la fetuina bovina eluida, procesando 50 µg y b) buffer procedente de la elución con acrilamida polimerizada.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

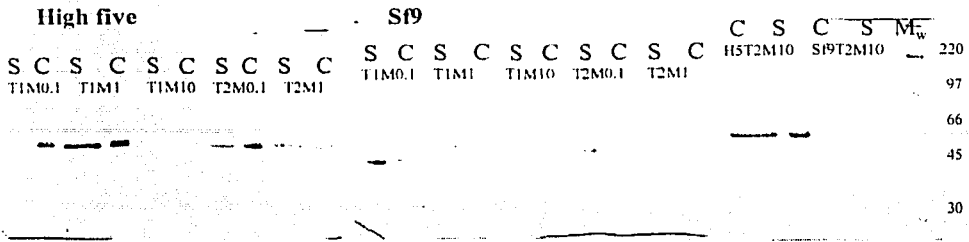


Figura A4. Proteína recombinante sometida al tratamiento para el análisis de glicanos. Sin (S)/con (C) PNGasa F

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN