

Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Laboratorio de Virología

Laboratorio de Fermentaciones

Diseño, modelado y
optimización de un
proceso integrado de
producción de un doble
insecticida biológico
viral-bacteriano.

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Gabriela Micheloud

Director: Dr. Juan Claus

Co-Director: Dr. Gustavo Pérez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral y en particular a la FBCB, por permitirme realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones y por brindarme el apoyo académico necesario para llevar a cabo mi formación doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), mi más sincero reconocimiento, porque mediante la beca de postgrado recibida, pude dedicarme de manera exclusiva al desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Juan Claus, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio de Virología, por brindarme apoyo y confianza, por las correcciones.

Al Dr. Gustavo Pérez, por haber aceptado formar parte de este grupo de trabajo, por el apoyo y por el aliento, por su valiosa colaboración desde el comienzo y hasta el final.

A los Dres. Sergio Guerrero y Alberto Iglesias, por haberme permitido utilizar los equipamientos de sus respectivos laboratorios para el desarrollo de algunas de las experiencias que se detallan en este manuscrito.

Al Dr. Alejandro Beccaria, o simplemente *el Ale*, por su activa participación en este trabajo, por compartir su inmensa sabiduría conmigo y sobretodo por brindarme lo más valioso e impagable, su amistad.

A Verónica, mi compañera en el laboratorio de Viro, por sus consejos, por enseñarme las mañas y los secretos de las *caprichosas* células de insecto y de nuestro *caballito de batalla*, AgMNPV.

A Vani, Vane y Luci, por haberme acompañado durante todos estos años no sólo en lo profesional, sino también en lo personal. Por los mates, las comidas, sus consejos, sus anécdotas. Por estar en cada momento que las necesité, por su ayuda a cambio de nada.

A mis queridos amigos de los laboratorios de Bioquímica Microbiana y Enzimología Molecular: Ana D., Ana E., Belu, Carlitos, Caro, Ceci, Dieguito, Erica, Gastón, Lisi, Luci, Matías A., Matías C., Matías H., Matías M., Mabel, Mechi, Sergio, Vane y Vani por los imborrables momentos compartidos que incluyen rondas de mates, degustaciones de comestibles y bebestibles, discusiones (de todo tipo), por alegrarme el día en los momentos más complicados, porque hicieron estos años más fáciles.

A Johana, que colaboró con algunos de los ensayos que forman parte de este trabajo y se animó a ser mi primer pasante.

A Ana, Cacho, Laura, Vani y Vivi por haber compartido a diario, durante todos estos años, los kilómetros que separan el trabajo de casa.

A los amigos que me regaló el cursado de la carrera Licenciatura en Biotecnología, Bety, Dieguito, Feloncho, Guille, Pepo, Sonia y Vicky, por hacerme saber que están conmigo aunque han transcurrido varios años desde que nos recibimos.

A Blanqui, Dalma, Angie, Cami, Bayito, Chichi y Tito, por haberme acompañado en la lectura de *papers*, procesamiento de datos, y la redacción de esta tesis. Por mostrar siempre sus mejores caras sin importar cual fuera mi estado de ánimo.

A mi gran familia política, por acompañarme en esta etapa de mi vida, por hacerme sentir una más de la familia, aun si haber cumplido con la formalidades, jeje!

A mi papá, por su apoyo, su trabajo, su esmero y su ayuda que permitieron que pudiera realizar una carrera universitaria.

A la memoria de mi querida nona, a quien le debo muchísimo de lo que soy como persona, por haberme querido, cuidado y criado

A mi mamá, por su ejemplo, su compañerismo, por alentarme a cumplir mis objetivos, por enseñarme el valor de las cosas y el valor agregado que tiene el haberlas conseguido a expensas de esmeros y sacrificios.

A Leo, por comprender mis estados de ánimo, aguantarme y acompañarme en cada una de mis decisiones. Por haber elegido compartir sus días junto a mí y experimentar juntos en la construcción de un hogar y una familia.

A Maitena, porque gran parte de este manuscrito lo escribimos juntas; por el tiempo que nos he robado en su corta vida, por su valentía, por aferrarse a la vida con una fuerza extraordinaria, por enseñarme lo que realmente es importante y haberme regalado el mejor oficio que voy a tener en toda mi vida.

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

El siguiente trabajo fue publicado en el *Journal of Virological Methods*, exhibiendo los resultados del capítulo 2 de los resultados de este manuscrito:

“Production of occlusion bodies of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line: influence of infection parameters and statistical optimization”(2009) Micheloud, G.A., Gioria, V.V., Pérez, G.A. y Claus, J.D. *Journal of Virological Methods* **162**:258-266.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS FUERON PRESENTADOS EN LAS SIGUIENTES REUNIONES CIENTÍFICAS:

- XII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Título: “Producción de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios de cultivos”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Perez, G.; Beccaria, A.; Claus, J. Curitiba (Brasil), Setiembre de 2004.

- III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas. Título: “Desarrollo de la Tecnología de Producción de un Bioinsecticida combinado”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Pérez, G.; Beccaria, A.; Claus, J. Santa Fe, junio de 2005.

- SAIB 2006. Título: “High Productivity of an Insecticide Virus in Cell Cultures Infected at Low Cell Density and Low MOI”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Beccaria, A.; Pérez, G.; Claus, J. Rosario, Noviembre de 2006.

- SAIB 2007. Título: “Scale up of a low MOI process for the production of an insecticide baculovirus in cell cultures”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Beccaria, A.; Pérez, G.; Claus, J. Mar del Plata, Noviembre de 2007.

- Segundo Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico. Título: “Efectos de la variación de los parámetros de infección sobre el rendimiento celular específico y la productividad de poliedros del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en un medio libre de suero y de bajo costo”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Beccaria, A.; Pérez, G.; Claus, J. Colonia (Uruguay), Setiembre de 2008.

- Segundo Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico. Título: “Co-production of microbial insecticides of bacterial and viral origin”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Beccaria, A.; Pérez, G.; Claus, J. Colonia (Uruguay), Setiembre de 2008.

- XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Título: “Identificación de nutrientes que permiten intensificar los rendimientos de esporos y cristales entomotóxicos en cultivos alimentados de *Bacillus thuringiensis*”. Monteserín, J.; Micheloud, G.; Gioria, V.; Pérez, G.; Beccaria, A.; Claus, J. Rosario, Octubre de 2008.

- XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Título: “Co-producción de bioinsecticidas en procesos fermentativos”. Micheloud, G.; Gioria, V.; Beccaria, A.; Pérez, G.; Claus, J. Rosario, 9, 10 y 11 de Octubre de 2008.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 4 |
| I. INTRODUCCIÓN | 6 |
| I.1. MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS..... | 7 |
| I.2. AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO | 8 |
| I.3. INSECTOS LEPIDÓPTEROS (FAMILIA: <i>NOCTUIDAE</i>) | 8 |
| I.3.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> | 9 |
| I.3.2. SU IMPORTANCIA COMO PLAGA | 9 |
| I.3.3. CONTROL DE LA ISOCA DE LAS LEGUMINOSAS | 10 |
| I.4. LOS BACULOVIRUS..... | 13 |
| I.4.1. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA..... | 13 |
| I.4.2. CICLO DE INFECCIÓN | 16 |
| I.4.3. SU UTILIZACIÓN COMO BIOINSECTICIDAS..... | 18 |
| I.4.4. PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS INSECTICIDAS | 21 |
| I.4.4.1. <i>In vivo</i> | 21 |
| I.4.4.2. <i>In vitro</i> | 22 |
| I.5. LOS CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTOS APLICADOS A LA PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS INSECTICIDAS | 25 |
| I.5.1. LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS..... | 25 |
| I.5.1.1. <i>La línea celular UFL-AG-286</i> | 25 |
| I.5.2. FACTORES QUE CONDICIONAN LA PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTOS | 26 |
| I.5.2.1. <i>Procesos en lote (batch)</i> | 26 |
| I.5.2.2. <i>Metodologías alternativas: lote alimentado (fed-batch) y perfusión</i> | 31 |
| I.6. <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> | 32 |
| I.6.1. CARACTERÍSTICAS | 32 |
| I.6.2. MECANISMO DE ACCIÓN | 34 |
| I.6.3. SU UTILIZACIÓN COMO BIOINSECTICIDA..... | 35 |
| I.6.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> | 37 |
| I.7. CO-PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDAS | 40 |
| I.8. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE TESIS | 41 |
| II. OBJETIVOS..... | 44 |
| II.1. GENERAL | 45 |
| II.2. ESPECÍFICOS | 45 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 46 |
| III.1. LÍNEA CELULAR | 47 |
| III.1.1. RECuentos celulares | 47 |
| III.2. VIRUS | 47 |
| III.2.1. PREPARACIÓN DE STOCK DE AGMNPV | 47 |
| III.2.2. CUANTIFICACIÓN VIRAL | 48 |
| III.2.2.1. <i>Titulación de virus brotado de AgMNPV</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| III.2.2.2. <i>Cuantificación de poliedros de AgMNPV</i> | 48 |
| III.3. CEPA BACTERIANA..... | 49 |
| III.3.1. CUANTIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS BACTERIANAS..... | 49 |
| III.4. MEDIOS DE CULTIVO..... | 49 |
| III.4.1. UNL-10..... | 49 |
| III.4.2. UNL-5..... | 51 |
| III.5. CUANTIFICACIÓN DE NUTRIENTES Y METABOLITOS..... | 52 |
| III.5.1. DOSAJE DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA..... | 52 |
| III.5.2. DOSAJE DE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO..... | 52 |
| III.6. SISTEMAS Y CONDICIONES DE CULTIVO..... | 52 |
| III.6.1. CÉLULAS DE INSECTO..... | 52 |
| III.6.1.1 <i>Cultivos con células de insecto adheridas</i> | 52 |
| III.6.1.2 <i>Cultivos de células en suspensión</i> | 53 |
| III.6.2. <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> | 60 |
| III.7. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO..... | 60 |
| III.8. DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE RENDIMIENTO Y DE LAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE NUTRIENTES Y PRODUCTOS..... | 61 |
| III.8.1. COEFICIENTES DE RENDIMIENTO..... | 61 |
| III.8.2. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO..... | 61 |
| III.9. DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 62 |
| III.10. EXTRACCIÓN ALCALINA DE PROTEÍNAS..... | 63 |
| III.11. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA..... | 64 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 65 |
| IV.1. CAPÍTULO 1..... | 66 |
| IV.1.1. INTRODUCCIÓN..... | 67 |
| IV.1.2. RESULTADOS..... | 69 |
| IV.1.2.1 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN EN LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN SOBRE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN FRASCOS AGITADOS CON AIREACIÓN SUPERFICIAL..... | 69 |
| IV.1.2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN EN LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS EN FRASCOS AGITADOS CON AIREACIÓN SUPERFICIAL..... | 71 |
| IV.1.2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN EN LAS CONDICIONES OPERATIVAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE VIRUS EN CULTIVOS AGITADOS CON AIREACIÓN SUPERFICIAL..... | 76 |
| IV.1.3. DISCUSIÓN..... | 79 |
| IV.2. CAPÍTULO 2..... | 82 |
| IV.2.1. INTRODUCCIÓN..... | 83 |
| IV.2.2. RESULTADOS..... | 85 |
| IV.2.2.1. INFECCIONES CON ALTOS VALORES DE MOI (INFECCIONES SINCRÓNICAS)..... | 85 |
| IV.2.2.2. INFECCIONES CON BAJOS VALORES DE MOI (INFECCIONES ASINCRÓNICAS)..... | 89 |
| IV.2.2.3. MODELADO Y OPTIMIZACIÓN ESTADÍSTICA DE LA PRODUCCIÓN DEL AGMNPV..... | 94 |
| IV.2.3. DISCUSIÓN..... | 97 |

| | |
|---|------------|
| IV.3. CAPÍTULO 3 | 102 |
| IV.3.1. INTRODUCCIÓN | 103 |
| IV.3.2. RESULTADOS | 106 |
| IV.3.2.1. CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR SAUFL-AG-286 EN BIO-REACTORES | 106 |
| IV.3.2.2. INFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR SAUFL-AG-286 EN BIO-REACTORES | 111 |
| IV.3.3. DISCUSIÓN | 118 |
| IV.4. CAPÍTULO 4 | 125 |
| IV.4.1. INTRODUCCIÓN | 126 |
| IV.4.2. RESULTADOS | 129 |
| IV.4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE BTK EN UN MEDIO ESTÁNDAR | 129 |
| IV.4.2.2. CULTIVO DE BTK EN REACTORES. | 131 |
| IV.4.2.3. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE BTK SOBRE CULTIVOS INFECTADOS DE LA LÍNEA UFL-AG-286. | 135 |
| IV.4.2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DIVERSOS FORMULADOS SOBRE LARVAS NEONATAS DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i>. | 139 |
| IV.4.2.5. PRODUCCIÓN DEL CO-PRODUCTO BIOINSECTICIDA A MAYOR ESCALA | 143 |
| IV.4.3. DISCUSIÓN | 147 |
| V. CONCLUSIONES | 154 |
| VI. RESUMEN | 158 |
| VII. ABSTRACT | 163 |
| VIII. REFERENCIAS | 167 |

Abreviaturas

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

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

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

BmNPV: Virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori*.

Bt: *Bacillus thuringiensis*.

Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Btk: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

BV: viriones brotados.

Cel.: células.

CL₅₀: Concentración letal media.

CpGV: Virus de la granulosis de *Cydia pomonella*

Cry: Cuerpo paraspórico.

CTS: Caldo tripteína soja.

CuniNPV: Virus de la poliedrosis nuclear de *Culex nigripalpus*.

CV: células vegetativas.

DICC₅₀: Dosis infectiva para cultivos celulares 50%.

Esp: Esporos.

FP: Fenotipo productor de pocos poliedros.

GV: *Granulovirus*.

HaSNPV: Virus de la poliedrosis nuclear simple de *Helicoverpa armígera*.

ICD: Densidad celular de infección.

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

k_La: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

MDCV: Máxima densidad de células viables.

MIP: Manejo integrado de plagas.

MOI: multiplicidad de infección.

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

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

NPV: *Nucleopolyhedrovirus*.

OB: cuerpos de oclusión.

ODV: viriones derivados de los cuerpos de oclusión.

OV: viriones ocluidos.

PBS: *Buffer* salino de fosfatos.

PDIs: Partículas defectivas interferentes.

Pol: poliedros.

R_{OB}: Rendimiento volumétrico de poliedros.

RE_{OB}: Rendimiento específico de poliedros.

saUFL-AG-286: Línea celular de *Anticarsia gemmatalis* adaptada a suspensión.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SFB: Suero fetal bovino.

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

STR: reactor tanque agitado.

TL₅₀: Tiempo letal 50%.

U_{fp}: unidades formadoras de placas.

Símbolos

μ : velocidad específica de crecimiento.

q_s : velocidad específica de consumo de glucosa.

~Introducción~

I.1. Manejo integrado de plagas

Desde finales de la Segunda Guerra Mundial, el control de poblaciones de insectos plaga se realiza mediante la aplicación de insecticidas químicos. Si bien estos productos alcanzaron éxito comercial para el control de plagas de interés agrícola, su utilización no está exenta de problemas, ya que la mayoría son de amplio espectro, algunos no son biodegradables, y otros tienen elevada persistencia en el medio ambiente. El uso indiscriminado de estos compuestos ha perturbado el equilibrio de las comunidades de insectos y, como consecuencia, algunos fitófagos inicialmente sin interés económico adquirieron cierto nivel de densidad poblacional alcanzando así el umbral de daño económico. Por otro lado, el uso continuo de los insecticidas químicos sobre las poblaciones de plagas ejerció una fuerte presión de selección favoreciendo a los individuos más resistentes. Como consecuencia, se incrementaron las dosis y el número de aplicaciones necesarias para su control. Ello condujo a la acumulación de residuos químicos hasta niveles perjudiciales en el medio ambiente y en los distintos eslabones de las cadenas tróficas.

Es dentro de este contexto que surge el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP fue conceptualmente introducido por Smith y Allen en 1954 (Murhammer, 1996), y surge en respuesta al uso intensivo de insecticidas de síntesis química como única práctica de control de plagas en sistemas agrícolas. Esta nueva visión sobre la sanidad de los cultivos permite diferenciar claramente dos conceptos: mientras que tradicionalmente el “*control*” de plagas persigue “eliminar” al agente de daño, el “*manejo*” busca sostener sus poblaciones por debajo de un determinado nivel de impacto (Villacide y Corley, 2007). El objetivo no es desterrar el uso de insecticidas químicos, sino reducir su empleo complementándolo con otras estrategias de control. Entre las tácticas que involucra el MIP se incluyen el control químico, las prácticas culturales y el control biológico de plagas. Este último se relaciona con el uso de los enemigos naturales: predadores, parásitos, parasitoides y patógenos. Entre estos últimos se encuentran distintas especies de bacterias, virus, hongos, protozoos y nematodos. En particular, para que un patógeno sea efectivo como agente de control microbiano de plagas, debe reunir algunas características deseables, entre las que se encuentran una elevada virulencia, la inocuidad para otras formas de vida (incluidos insectos benéficos, vertebrados y plantas), acción rápida, larga permanencia a campo, producción fácil y económica y una vida de anaquel considerable (Ibarra y del Rincón Castro, 2001).

Los baculovirus (virus patógenos de insectos), junto con la bacteria esporulada *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos, representan los tres grupos de entomopatógenos que mayor atención han recibido para su desarrollo como agentes bioinsecticidas.

I.2. Agentes de control biológico

El control biológico se define como un proceso a través del cual se disminuye la densidad de un insecto plaga mediante el empleo de otros organismos (insectos predadores, parasitoides, bacterias, hongos, nematodos y virus). Los bioinsecticidas microbianos utilizan como principios activos:

a- Bacterias: dentro de las bacterias entomopatógenas se encuentra un elevado número de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), empleadas desde 1958 para el control de plagas agrícolas y forestales. Desde esa fecha, sólo en los Estados Unidos, se registraron más de 180 bioinsecticidas a base de Bt (Becker, 1997; Crecchio y Stotzky, 2001; Siegel, 2001).

b- Hongos: se han identificado aproximadamente 750 especies de hongos con características entomopatógenas. Sin embargo, sólo diez de ellos han sido utilizados para el control de insectos plagas (Szewczyk y col., 2006).

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

d- Virus: quince familias de virus han sido identificadas como capaces de infectar insectos. Sin embargo, sólo los miembros de la familia *Baculoviridae* son considerados potenciales bioinsecticidas. Hasta la fecha, el programa más exitoso de empleo de un baculovirus para el control de un insecto plaga es el desarrollado en Brasil, donde anualmente se tratan, con el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), cuatro millones de hectáreas de cultivos de soja con el fin de controlar la isoca de las leguminosas (Moscardi y Santos, 2005).

I.3. Insectos lepidópteros (Familia: *Noctuidae*)

Los lepidópteros son un orden de insectos que agrupan mariposas y polillas. La familia *Noctuidae*, ubicada dentro del orden Lepidoptera, abarca un total de 20.000 especies que se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros.

Su desarrollo es holometábolo: del huevo sale una larva u oruga que se transformará en pupa y ésta dará lugar al adulto. La larva, a diferencia del adulto, presenta un aparato bucal de tipo masticador; la mayoría de las larvas son fitófagas (Del Ponte, 1958).

Las larvas pueden alimentarse de cualquier cultivo herbáceo y ocasionan grandes pérdidas económicas al sector agrícola. Entre los lepidópteros de mayor importancia encontramos a *Anticarsia gemmatalis*, *Spodóptera frugiperda*, *Helicoverpa armígera*, *Lymantria dispar*, *Rachiplusia nu*, *Heliothis zea*, *Epinotia aporema*, entre otras.

En este trabajo se hará referencia a *Anticarsia gemmatalis*, debido a que el baculovirus utilizado es específico para este insecto.

I.3.1. Características de *Anticarsia gemmatalis*

La isoca de las leguminosas, *Anticarsia gemmatalis*, es un insecto nativo de las zonas tropicales y subtropicales del continente americano. Fue hallada por primera vez en Florida, Estados Unidos, en el año 1903 (Hinds y Osterberger, 1931). En la Argentina, los brotes más importantes de esta plaga se registran en los cultivos de soja de las zonas noroeste y noreste. Las mayores infestaciones se han producido en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Iannone, 2007), coincidentemente con la mayor área sembrada de soja, su planta predilecta.

Los huevos son depositados en forma aislada, principalmente en el envés de las hojas. Las orugas, que llegan a medir entre 35 y 40 mm de longitud, se presentan en dos formas: una de color verde intenso y la otra de color oscuro a negro con una serie de líneas blancas longitudinales (Figura I.1.A y I.1.B).

Los adultos son mariposas de hábitos nocturnos de color marrón a azulado oscuro (Figura I.1.C). Al poseer gran capacidad de vuelo migran desde las áreas tropicales y subtropicales a las templadas durante el verano. Las larvas y pupas invernantes, provenientes de las infestaciones producidas en los meses de marzo y abril, mueren durante el invierno como consecuencia de la baja tolerancia al frío.

I.3.2. Su importancia como plaga

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

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



Figura 1.1: A y B: Variedades de larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Fuente: <http://www.viarural.com.ar/>.
C: Ejemplar adulto de *Anticarsia gemmatalis*. Fuente: <http://www.ipmimages.org/>.

I.3.3. Control de la isoca de las leguminosas

La isoca de las leguminosas es la especie más importante del complejo de defoliadores que ataca los cultivos de soja. El daño provocado por esta plaga puede ser muy alto, llegando a reducir hasta un 40% el rendimiento del cultivo si no se aplica un control eficiente. Actualmente, para el control de *Anticarsia gemmatalis* se usan insecticidas químicos de amplio espectro a base de piretroides y organofosforados (Aragón, 2007). Además, debido a la protección que brindan estos insecticidas para otras plagas, como el “barrenador de los brotes”, se utilizan en dosis mayores a las necesarias para el control de las orugas defoliadoras.

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

Como se mencionó anteriormente, el manejo integrado de plagas puede incluir el uso de insecticidas biológicos. AgMNPV es un patógeno que presenta elevada virulencia hacia las larvas de *Anticarsia gemmatalis*, insecto que por sus hábitos defoliadores presenta una alta exposición al virus. Sin embargo, está comprobado que estos insectos en la edad adulta, en general, no son infectados por AgMNPV. Los virus actúan en los primeros estadios de la fase larval, que son los más susceptibles a la infección. *Anticarsia gemmatalis* disminuye la susceptibilidad hacia el virus hasta en un 50% a partir del cuarto estadio. Por lo tanto, la mejor

fase para la aplicación de AgMNPV es en larvas de los primeros tres estadios, es decir, cuando éstas son menores a 1,5 cm.

El control de la isoca de las leguminosas con AgMNPV favorece el establecimiento y el incremento de la entomofauna benéfica asociada al cultivo de soja. Esta población comprende alrededor de veinte organismos, entre depredadores, parasitoides y entomopatógenos. Este fenómeno se debe fundamentalmente a que AgMNPV no tiene ningún efecto negativo sobre estas especies benéficas. Otra ventaja que presenta AgMNPV es que no necesita de un equipo especial de aplicación, ya que se puede utilizar el mismo con el que se aplican los insecticidas convencionales. Sin embargo, se debe tener especial cuidado con el agua que se utiliza como vehículo. La misma no debe contener cloro debido a que esta sustancia inactiva el virus. Una de las principales desventajas que presenta el uso de AgMNPV, y que ha condicionado su empleo como bioinsecticida, es el largo período de tiempo entre la infección y la muerte de la larva (7 – 10 días). Durante ese período la plaga continúa alimentándose y, en consecuencia, desfoliando el cultivo.

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

Tabla I.1: Insecticidas químicos aplicados a los cultivos de soja. Fuente: <http://www.viarural.com.ar/>

| Principio Activo | Especies que controla | Dosis (cm ³ /ha) | Principio Activo | Especies que controla | Dosis (cm ³ /ha) |
|---------------------------------------|--|--|---|--|-----------------------------|
| Gamma Cialotrina 15% | Isoca medidora - Oruga militar tardía - Oruga de las leguminosas - Barrenador del brote Chinche Verde | 13 a 30 | Clorpirifos A 48% | Isoca de la alfalfa | 400 a 500 |
| Ciflutrina 5% | Isoca bolillera - Isoca medidora - Oruga de las leguminosas - Oruga militar tardía | 100 a 150 | | Oruga de las leguminosas | 650 a 800 |
| Beta Ciflutrina 5% | Isoca medidora - Oruga de las leguminosas | 35 a 50 | | Gata peluda norteamericana - Gusanos cortadores - Oruga cuarteadora - Oruguita verde | 800 a 900 |
| | Oruga militar tardía | 50 a 70 | | Isoca medidora | 900 a 1200 |
| Cipermetrina 25% | Isoca medidora | 60 a 100 | | Barrenador del brote | 1000 a 1300 |
| | Oruga militar tardía - Oruguita verde | 80 a 100 | | Isoca bolillera | 1800 a 2000 |
| | Barrenador del brote | 100 + 600-750 cm ³ de Clorpirifos | Lambdacialotrina 5% | Oruga de las leguminosas | 35 |
| | Isoca bolillera | Terrestre 120 a 160 | Endosulfan 35% | Oruga de las leguminosas | 600 |
| Aéreo 160 a 200 | | Isoca de la alfalfa | | 700 | |
| Deltametrina 0.8% + Endosulfan 32% | Oruga de las leguminosas | 250 a 300 | Clorpirifos 50% + Cipermetrina 5% | Gusanos cortadores - Oruga militar tardía - Oruga de las leguminosas - Barrenador del brote – Chinche | 350 a 750 |

I.4. Los baculovirus

I.4.1. Estructura y morfología

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

Sobre la base de criterios morfológicos, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), distingue dos géneros dentro de la familia *Baculoviridae*, los *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (ICTVdB Management, 2006). Los baculovirus clasificados entre los NPVs se caracterizan por ensamblar, en el núcleo celular, cuerpos de oclusión con forma de poliedros, los cuales contienen en su interior varios viriones ocluidos. Dentro del género se reconocen dos grupos, I y II, en el primero de los cuales ha sido clasificado el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). Por otro lado, los virus clasificados entre los GVs se distinguen por producir cuerpos de oclusión ovoides, que contienen en su interior un solo virión. En este caso, los gránulos son de localización citoplasmática.

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

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

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

c) Gammabaculovirus: Los virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion lecontei* (NeleNPV) y de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion sertifer* (NeseNPV) constituirían este

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

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

En la familia *Baculoviridae*, la estructura de la nucleocápside viral está constituida, por un lado, por una cápside cilíndrica tapada en ambos extremos, cuyo diámetro se encuentra comprendido entre 30 y 60 nm, y su longitud entre 250 y 300 nm, siendo ésta proporcional al tamaño del genoma. Su modelo estructural consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que configuran la forma cilíndrica. Todos los anillos están formados por un número constante de sub-unidades proteicas y, entre un anillo y el siguiente, existe una separación de aproximadamente 4,5 nm (Federici, 1986; Fraser, 1986). La proteína principal de la cápside es la proteína VP39 (Blissard y col., 1989). Otros componentes de la cápside son la proteína básica P6,9 (Funk y col., 1997), la proteína P24 (Gombart y col., 1989), la proteína P80 (Müller y col., 1990) y la fosfoproteína PP78/83 (Ayes y col., 1994), además de otros componentes minoritarios, pero funcionalmente relevantes.

En el interior de la cápside viral, asociado estrechamente a la proteína P6,9, se encuentra el DNA genómico super enrollado y condensado. El tamaño del mismo puede oscilar entre 90 y 230 Kpb, y está organizado en una única molécula circular de DNA de doble cadena (Federici, 1986; Caballero y col., 2001; ICTVdB Management, 2006). En relación a la organización y contenido génico de los genomas de baculovirus, los que han sido secuenciados hasta el presente contienen entre 140 y 180 marcos abiertos de lectura. Estos marcos de lectura se pueden encontrar en cualquiera de las dos orientaciones posibles, separados por secuencias intergénicas cortas, solapándose con frecuencia la señal de finalización de la traducción con la señal de poliadenilación del transcripto (Ayes y col.,

1994), mientras que, por otro lado, también los elementos promotores pueden solaparse sobre la secuencia codificante de otro marco abierto de lectura (Passarelli y Miller, 1993).

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

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

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

Hacia el final de su ciclo de replicación, las células infectadas por baculovirus sintetizan grandes cantidades de poliedrina o granulina. Estas proteínas, codificadas en el genoma viral, cristalizan formando los cuerpos de oclusión (OB), con forma de gránulo o de poliedro irregular, que encierran uno o más viriones ocluidos, respectivamente. El tamaño de los cuerpos de oclusión varía entre 0,13 – 15 μm , son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos, y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o la liofilización. Todas estas características le confieren capacidad de persistencia en el medio ambiente. Por otra parte, los OBs son solubles en condiciones alcalinas como las que se encuentran en los intestinos de algunos insectos (pH 9-11). Esta propiedad facilita la liberación de los viriones de los OBs, los cuales comienzan la infección en el insecto huésped (Federici, 1986).

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

Los BV contienen una sola nucleocápside por virión. Ellos son los agentes infecciosos responsables de diseminar la infección entre los órganos y tejidos de la cavidad hemocélica del huésped, como así también de iniciar el ciclo de infección en los cultivos celulares. La

forma de penetración de los BV en la célula huésped está relacionada con el origen y la composición proteica de su envoltura. La glicoproteína GP64, presente en la envoltura de AcMNPV, aparece concentrada en uno de los extremos del virión dando lugar a una estructura en forma de espiga, a la cual se denomina “peplómero”. Esta estructura le confiere especificidad tisular al virión y es la que está involucrada en su entrada a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptores. En conclusión, la glicoproteína GP64 es esencial para la propagación de AcMNPV de célula a célula (Jarvis y García, 1994; Caballero y col., 2001; Pearson y col., 2001).

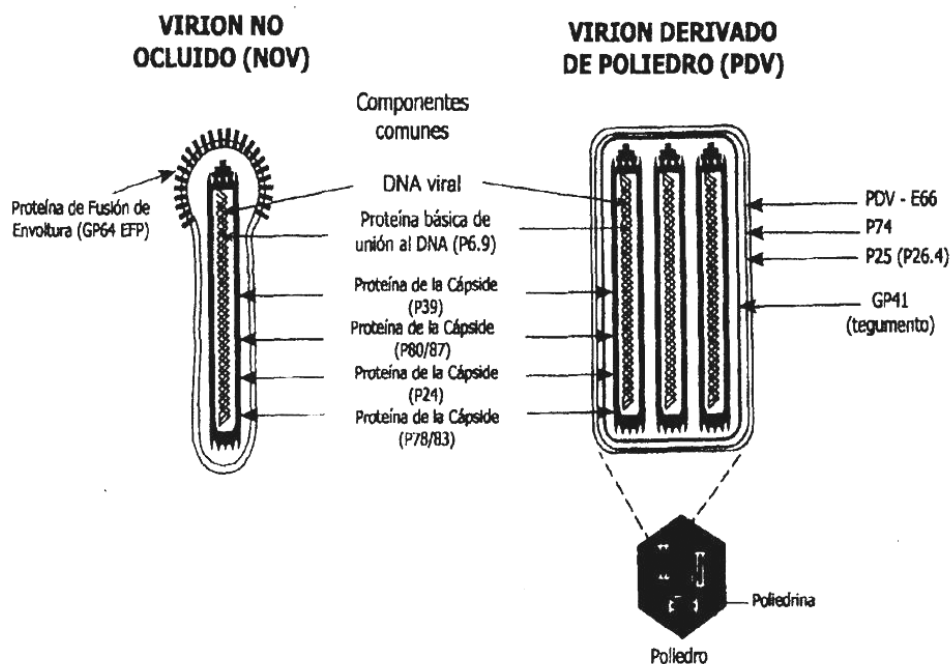


Figura I.2: Estructura de los fenotipos virales del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) (VII report ICTV, 2000).

I.4.2. Ciclo de infección

La replicación de AcMNPV ha sido ampliamente estudiada en larvas de *Trichoplusia ni* y cultivo de células de *Spodoptera frugiperda* y sirve como modelo para la replicación de NPV y GV en Lepidópteros (Granados y Williams, 1986). El ciclo biológico de NPV se encuentra esquematizado en la figura I.3.

Las larvas son infectadas cuando ingieren los OBs presentes como contaminantes en el alimento (1,2). A causa de la alta alcalinidad presente en el intestino del insecto ($\text{pH} > 9,5$), y con la participación de proteasas alcalinas, se produce la hidrólisis de la poliedrina o granulina (3), principal proteína constituyente de los OBs (Adams y McClintock, 1991). Una vez liberados, los ODVs deben atravesar la membrana peritrófica del intestino. Superada esta primera barrera, los OVos se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las

microvellosidades de las células del intestino medio (4) (Horton y Burand, 1993). Luego de la fusión, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo (Chalton y Volkman, 1993), inyectando el DNA a través de los poros nucleares (Granados y Williams, 1986). El núcleo se hipertrofia, observándose la formación de un estroma virogénico en la región central del núcleo (Granados y Williams, 1986), y se inicia la expresión y replicación del ADN. Las nuevas nucleocápsides pasan a través de la membrana nuclear adquiriendo una envoltura de dicha membrana; se alinean con la membrana plasmática en la base de la célula para finalmente emerger traspasando esta membrana como viriones brotados (BV). De ahí que, éstos últimos, presenten una envoltura de composición similar a la membrana plasmática de la célula huésped, pero modificada por la presencia de proteínas virales. Concluida la etapa de la infección primaria, comienza la diseminación de los BVs hacia las células de otros tejidos, para comenzar la etapa correspondiente a la infección secundaria (hemocitos, matriz traqueal, epidermis, cuerpo graso, tejidos muscular, nervioso, reproductivo, glandular y células pericardiales) (5). Si bien no está del todo esclarecido cuál es la principal vía de diseminación de la infección, está comprobado que los hemocitos y las células traqueales cumplen un rol muy importante en este proceso (Engelhard y col., 1994). A diferencia de la vía de penetración de los OV's en las células del epitelio intestinal, que se produce por fusión de membranas, los BVs, producto de la infección primaria, penetran a las células mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptores. Durante el proceso de infección secundaria se produce una abundante progenie de OV's. Los mismos quedan confinados en el núcleo celular, atrapados en una matriz de la proteína, formando así los OBs. Avanzada la infección, el insecto muere, en promedio a los 7 días post-infección, produciéndose finalmente la lisis del tegumento y la liberación de los OBs, que dan origen a un nuevo ciclo de infección (Sciocco, 2001).

La infección por baculovirus frecuentemente altera el comportamiento del hospedante. Las larvas infectadas a menudo tienden a moverse hacia la punta de la planta o de las hojas, donde finalmente mueren.

En cultivo de células, el ciclo de infección comienza por la unión de los BVs a la superficie celular. Los BVs entran a la célula por endocitosis mediada por receptor y se fusionan con la membrana del endosoma, liberando las nucleocápsides al citosol. Las nucleocápsides son transportadas al núcleo y son liberadas para replicarse. Las nucleocápsides nuevamente formadas son transportadas a la membrana celular desde donde abandonan las células por brotación.

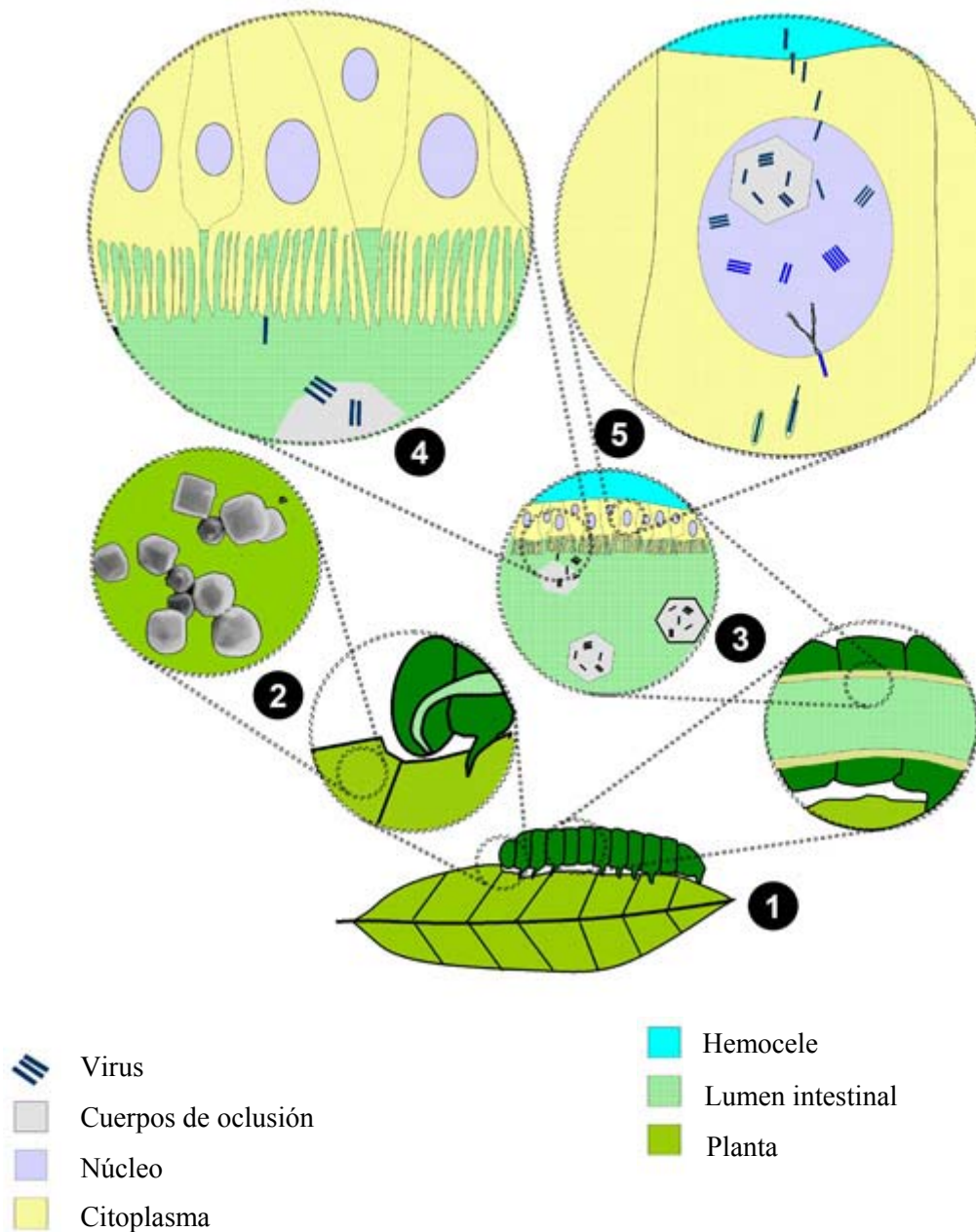


Figura I.3: Esquematización del ciclo biológico de un NPV. Fuente: <http://www.sylvar.ca/images/npv.jpg>

I.4.3. Su utilización como bioinsecticidas.

Existen antecedentes acerca de la utilización de los baculovirus como bioinsecticidas que se remontan al año 1892 (Benz, 1986); sin embargo, no fue hasta mediados del siglo pasado que se demostró formalmente su utilidad en el control de plagas. En los treinta años siguientes se llevaron a cabo diversos estudios a campo, culminando en 1975 con el registro del primer baculovirus insecticida. Así, el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa zea*

fue registrado en la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos bajo el nombre de Elcar[®] (Benz, 1986). Más de 40 baculovirus, entre los que se incluyen NPVs y GVs, han sido utilizados como bioinsecticidas en distintos países del mundo sin producir efectos adversos sobre organismos distintos a los de su blanco de acción. Como ejemplos se pueden citar el uso de el CpGV empleado en varios países para combatir los gusanos que atacan los cultivos de manzana, peras y nueces; y el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera*, empleado en China anualmente sobre más de cien mil hectáreas para proteger los cultivos de algodón, tabaco y plantas de tomate (Palomares y col. 2005).

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

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

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

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

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

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

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

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

I.4.4. Producción de baculovirus insecticidas

I.4.4.1. *In vivo*

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

1- El insecto huésped: en general, las colonias de insectos de los laboratorios se generan a partir de individuos colectados en el campo, aunque hoy es posible mantener colonias de lepidópteros en condiciones de cautividad. La producción de OBs por mg de larva está comprendida entre 1×10^6 y 1×10^8 en las infecciones con virus de la poliedrosis nuclear de insectos lepidópteros. La máxima producción de poliedros ocurre en los tejidos más ricos en nutrientes y metabólicamente activos (cuerpo graso, epidermis, matriz traqueal) entre los 5 y 10 días post-infección. Sin embargo, es aconsejable colectar las larvas cuando presentan estado de flacidez (5-6 días post-inoculación), antes de que se produzca la licuefacción de los tejidos. El almacenamiento del material colectado se realiza a -20° C.

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

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

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

Inicialmente, el único método de producción *in vivo* de AgMNPV en Brasil, era en parcelas de cultivos de soja, a través de la aplicación del virus en una zona con elevada infestación de isocas. Hacia fines de los años noventa se destinaban aproximadamente 30.000 hectáreas de cultivos a la producción de AgMNPV. Las larvas de *Anticarsia gemmatilis*, muertas por acción de este virus, eran colectadas y conservadas en cámaras de frío hasta el momento de su procesamiento y formulación (Cherry y Williams, 2001). Sin embargo, en el año 1999 la producción de AgMNPV no fue suficiente para tratar los cultivos de soja debido a la creciente demanda de este bioinsecticida. A fin de superar este inconveniente, en noviembre de 2004, la Estación Experimental Agropecuaria del estado de Parana (Brasil) inauguró una “bio-fábrica” de gran escala. La misma tiene una capacidad de producción de AgMNPV suficiente para el tratamiento de 1,3 a 1,5 millones de hectáreas de cultivos de soja. Actualmente, EMBRAPA Soja, Londrina, construyó una planta piloto con la finalidad, por una parte, de mejorar los procesos de producción de AgMNPV en los laboratorios; y por otra parte, para entrenar mano de obra especializada en la producción del virus (Szewczyk y col., 2006).

1.4.4.2. *In vitro*

Es posible también producir baculovirus insecticidas mediante propagación en cultivos celulares. La producción a gran escala de baculovirus en cultivos de células de insectos

presenta una serie de ventajas potenciales respecto a los métodos de producción *in vivo*, como el mejoramiento de la relación beneficio-costos a medida que se incrementa la escala de producción, el desarrollo de procesos mejor controlados que la propagación en larvas, y la posibilidad de obtener virus libre de contaminación con otros microorganismos o con productos alergénicos tales como proteínas de insecto o cutículas (Weiss y Vaughn, 1986). Sin embargo, a pesar de estas ventajas potenciales, no se ha podido establecer aún ningún proceso que reúna, al mismo tiempo, factibilidad técnica y económica. A este respecto se debe considerar que un insecticida formulado sobre la base de baculovirus debe ser necesariamente un producto de bajo costo, ya que su ámbito de competencia económica es el del conjunto de los insecticidas, incluidos los de síntesis química de muy bajo costo. Este marco impone fuertes condicionamientos sobre las características de los procesos a desarrollar, que deben ser altamente productivos y de muy bajo costo (Murhammer, 1996; Rhodes, 1996). Las principales condiciones que deben satisfacerse para establecer un proceso factible, técnica y económicamente, de producción de baculovirus insecticidas *in vitro* son:

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

Quizás porque el mayor interés por el desarrollo de procesos de producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares ha estado radicado en la industria (Gong y col., 1997), más que en los ambientes académicos, existe muy poca información publicada acerca de estos procesos (Murhammer, 1996), aunque por otro lado se ha generado gran cantidad de información acerca de los procesos de producción de proteínas recombinantes en el sistema baculovirus – células de insecto (Palomares y col., 2005). Luego de los trabajos iniciales de Vaughn (1976) y Weiss y col. (1981; 1982), quienes produjeron poliedros de baculovirus en cultivos celulares en botellas “roller”, y de Hink y col. (1977) y Hink y Strauss (1980), que lo hicieron en cultivos en suspensión agitada, la mayor parte de las publicaciones han quedado limitadas a la producción de unos pocos grupos trabajando en Australia (Chakraborty y col., 1995; 1999; Lua y Reid, 2000; 2003; Lua y col., 2002; Pedrini y col., 2005; 2006), Europa (Miltenburger y col., 1984; Miltenburger, 1985; Kloppinger y col., 1990; van Lier y col., 1990; 1992; 1994; Kool y col., 1991; 1993a; 1993b; Fertig y col., 1993; Martijn y col.,

2000).y Sudamérica (Claus y col., 1993; Visnovsky y Claus, 1994; Claus y col., 1997; Visnovsky y col., 2003; Batista y col., 2005; Rodas y col., 2005; Gioria y col., 2006). Del análisis de esta información se desprende que los principales problemas a resolver para alcanzar la factibilidad técnica y económica son la baja productividad celular, o la falta de conocimiento de las condiciones que permitan optimizar esa productividad, la carencia de medios de cultivo de bajo costo y capaces de sostener altos rendimientos virales, la falta de experiencia en el escalamiento de procesos en reactores, y la falta de estabilidad de los genomas virales cuando los baculovirus son sometidos a repetidos pasajes en cultivos celulares.

Existen algunos antecedentes acerca de la replicación de AgMNPV en distintas líneas de células de insectos heterólogas (Lynn y Oberlander, 1983; Sieburth y Maruniak, 1988a; Claus y col., 1993; Visnovsky y Claus, 1994; Batista y col., 2005; Rodas y col., 2005), pero los rendimientos virales alcanzados, principalmente de poliedros, no resultaron compatibles con el establecimiento de un proceso de producción factible. Por otro lado, también se ha ensayado la multiplicación del mismo en algunas líneas homólogas (Sieburth y Maruniak, 1988b; Grasela y McIntosh, 1998). Entre éstas, la línea celular UFL-AG-286, establecida por Sieburth y Maruniak en 1986, es la que presenta niveles de sensibilidad y permisividad a la replicación de AgMNPV que la tornan como candidata para desarrollar un proceso de producción *in vitro* de AgMNPV (Castro y col., 1997; Pombo y col., 1998; Sieburth y Maruniak, 1988a). Posteriormente, Gioria y col. (2006), caracterizaron las propiedades tecnológicas del cultivo de esta línea celular, adaptándola a cultivos en suspensión agitados, dilucidando parte de sus características metabólicas. Además, estudiaron la permisividad de la misma a la infección con AgMNPV. La posibilidad de establecer cultivos en suspensión, fue una condición necesaria para proponer el desarrollo de un proceso de producción escalable para un baculovirus insecticida de bajo costo. En el año 2008, Gioria determinó la aptitud de esta línea celular para proliferar en un medio libre de suero de bajo costo. Sin embargo, se desconocían aún las condiciones óptimas de cultivo en suspensión de las células en este nuevo medio, como así también los parámetros de infección óptimos para obtener altos rendimientos del fenotipo insecticida de este baculovirus.

I.5. Los cultivos de células de insectos aplicados a la producción de baculovirus insecticidas

I.5.1. Líneas celulares establecidas

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

I.5.1.1. La línea celular UFL-AG-286

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

Luego del establecimiento de la línea celular UFL-AG-286, Sieburth y Maruniak procedieron a la caracterización de la misma. Así se determinó que un cultivo estático tenía que tener un inóculo celular inicial mínimo de 2×10^5 células viables.ml⁻¹, que la temperatura

óptima de proliferación celular era 27° C y que el tiempo de duplicación estaba comprendido entre 142 horas y 161 horas, dependiendo del inóculo celular inicial (3×10^5 células viables. ml^{-1} y 2×10^5 células viables. ml^{-1} , respectivamente). Si se comparan estos resultados con los informados para otras líneas celulares de insectos caracterizadas hasta ese momento, se puede observar que son similares a los hallados para una línea celular de *Blatella germanica* (120 horas), pero mayores a los reportados para la línea celular IPLB-Sf-21 (26 y 30 horas) (Sieburth y Maruniak, 1988b).

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

I.5.2. Factores que condicionan la producción de baculovirus en cultivos de células de insectos

I.5.2.1. Procesos en lote (*batch*)

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

I.5.2.1.1. Concentración de nutrientes (glucosa, glutamina, otros aminoácidos)

a) Concentración de glucosa: el agotamiento de este nutriente en cultivos de células de insectos ha sido relacionado, por un lado, con la finalización de la fase de crecimiento exponencial en cultivos “batch”; por otro lado, con la caída de la viabilidad celular. Estas observaciones hicieron suponer que la glucosa en un medio de cultivo actúa como un nutriente limitante de la proliferación celular (Kamen y col., 1991; Hild y col. 1992; Bédard y col., 1993; Drews y col., 1995). Al parecer, este hidrato de carbono también actuaría como un

limitante de la producción de proteínas recombinantes (Yamaji y col. 1999). Posiblemente este hecho se deba a la caída de la viabilidad celular observada en los cultivos luego del agotamiento de glucosa.

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

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

I.5.2.1.2. Concentración de catabolitos (amonio, lactato)

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

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

I.5.2.1.3. Densidad celular al momento de la infección (ICD)

La capacidad de obtener cultivos de elevadas densidades celulares ha sido considerada, con frecuencia, un requisito para el desarrollo de procesos económicamente factibles para la producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares. Sin embargo, existen distintos antecedentes que refieren acerca de un descenso en la productividad de virus o proteína recombinante en los cultivos que son infectados a alta densidad celular, cuando alcanzaron la fase de crecimiento exponencial tardía o estacionaria. Este fenómeno fue observado, entre otros, por *Stockdale* y *Gardiner* al infectar con AcMNPV cultivos de la línea celular IPLB-Sf-21 (*Stockdale* y *Gardiner*, 1977); por *Reuveny* y col. (1993), y también por *Lee* y *Park* (1995), al emplear la línea celular Sf-9 para la producción de la enzima β -galactosidasa a través de la infección con un AcMNPV recombinante; por *Visnovsky* y *Claus* (1994) al trabajar con la línea celular IPLB-Sf-21 infectada con AgMNPV; y por *Taticek* y col. (2001) al infectar las líneas celulares IPLB-Sf-21 y Tn 5B-1-4 con un virus recombinante de AcMNPV. El descenso de la producción de virus o proteínas recombinantes en cultivos celulares en lote de alta densidad podría deberse a distintas causas, entre ellas la disminución de la concentración de los nutrientes esenciales, la acumulación de metabolitos tóxicos o el aporte insuficiente de oxígeno (*Lee* y *Park*, 1995; *Yamaji* y col. 1999). Con el objeto de superar estos inconvenientes, distintos grupos de investigación plantearon diversas estrategias de trabajo. Por ejemplo, *Lee* y *Park* observaron que la producción de la enzima β -galactosidasa aumentaba cuando se adicionaba glutamina al medio de cultivo. Este resultado fue obtenido al

trabajar con la línea celular Sf-9 en el medio de cultivo Grace suplementado con suero e infectado en la fase tardía de crecimiento (Lee y Park, 1995). Otros investigadores informaron que el descenso en la producción de proteínas recombinantes en cultivos infectados de células Sf-9 fue revertido al reemplazar parte del medio de cultivo envejecido por medio de cultivo fresco al tiempo de infección (Bédard y col., 1994; Radford y col. 1997). Estos ejemplos ilustran acerca de la importancia de la calidad del medio en el cual se encuentran en cultivo las células, en el momento en que son infectadas y multiplican un baculovirus o producen una proteína recombinante.

I.5.2.1.4. Multiplicidad de infección

La multiplicidad de infección (MOI) y el tiempo de infección son factores que afectan en forma directa la producción de virus y de proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos. Por lo general, se han utilizado bajas MOI ($0,0001-1 \text{ ufp.célula}^{-1}$) para infectar cultivos en la fase temprana del ciclo de proliferación celular. Luego de la infección viral, se pueden distinguir dos poblaciones celulares en estos cultivos: las células no infectadas y las células infectadas. En tanto estas últimas dejarían de proliferar, las células no infectadas continúan multiplicándose, si existe disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, por lo menos hasta que resulten infectadas por los BVs generados en la población de células infectadas originalmente. Ahora, esta segunda generación de células resulta infectada en condiciones diferentes a la primera, diferencias que pueden condicionar la capacidad de producción de virus o proteína recombinante. El empleo de bajas multiplicidades de infección presenta la ventaja, por un lado, de disminuir el requerimiento de inóculo viral, una de las materias primas de mayor costo en los procesos de producción de virus; por otro lado, reduce la probabilidad de generar partículas defectivas interferentes (PDIs). Sin embargo, también presenta una serie de desventajas, particularmente importantes en los procesos de producción de proteínas recombinantes, como la exposición prolongada a la acción de las proteasas celulares (Palomares y Ramírez, 1998), y la necesidad de alimentar el cultivo con nutrientes agotados, si la proliferación de las células no infectadas originalmente produce un incremento significativo de la densidad celular.

Por otro lado, las MOI más altas ($5-500 \text{ ufp.célula}^{-1}$) se utilizaron para infectar cultivos celulares en la fase de crecimiento exponencial tardía o estacionaria. La combinación de una alta MOI y un tiempo de infección tardío acarrea como desventajas el aumento de la cantidad de inóculo viral requerido para la infección, además de favorecer la producción de PDIs. Además, se debe tener en cuenta que, como se describió previamente, la producción

específica de virus y proteínas recombinantes desciende cuando los cultivos celulares son infectados a alta densidad celular. Para superar esta última limitación, puede ser necesario recurrir a estrategias de cultivo alternativas, como el “lote alimentado” o la perfusión, cuando no directamente al recambio de medio (Bédard y col., 1994; Palomares y Ramírez, 1998; Radford y col. 1997; Tsao y col., 1996).

I.5.2.1.5. Calidad del inóculo viral

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

Los FPs se han relacionado con mutaciones que ocurren a nivel de la región 25K (nt 48513 – 49155) del genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV). Katsuma y col. (1999) determinaron que mutaciones en esta región de BmNPV trajeron como consecuencia un descenso en la producción de poliedros. Estos investigadores observaron, además, que cuando infectaban larvas de *Bombyx mori* con poliedros mutantes, la licuefacción de los tejidos también era afectada. Otro grupo de investigadores refirió que en cultivos de la línea celular Sf-21 infectados con FP de AcMNPV se observa incremento en la producción de BVs, caída en la cantidad de poliedros, descenso en la producción de ODVs, alteración en las membranas intranucleares, declive en la producción de transcriptos de *polh* y una modificación en el transporte de la poliedrina en el núcleo (Braunagel y col. 1999). Por

último, Lua y col. observaron que al cabo de seis pasajes sucesivos en cultivos celulares del virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), se obtenía un 100% de FP. El análisis del genoma de las FP evidenció mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones en la región 25K (Lua y col., 2002).

I.5.2.2. Metodologías alternativas: lote alimentado (*fed-batch*) y perfusión

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

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

I.6. *Bacillus thuringiensis*

I.6.1. Características

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria esporígena, Gram positiva, aeróbica, cuyo hábitat más común es el suelo, aunque también ha sido aislada de la superficie de las plantas, cadáveres de insectos y los granos almacenados (Schnepf y col.,1998; Maagd y col., 2001). Es, además, portadora natural de una variedad de proteínas cristalinas insecticidas que se encuentran codificadas en plásmidos. La aparición de estas proteínas en el cultivo ocurre tardíamente, concomitantemente con la fase de esporulación. Esto se debe a que los genes que las codifican, denominados *cry*, son transcritos por formas de RNA polimerasa específicas de la esporulación (Aronson, 2002). Estas proteínas Cry o δ -endotoxinas están incorporadas en grandes inclusiones cristalinas llamadas “cristales paraspóricos” y pueden representar hasta un 25% del peso seco de los esporangios (Razo Flores y col., 1997; Schnepf y col., 1998). Cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (Sauka y Benintende, 2008). Los principales grupos de genes *cry* que codifican para estas proteínas tóxicas son los siguientes: *cry1* específico para lepidópteros, *cry2* específico para lepidópteros y dípteros, *cry3* específico para coleópteros, *cry4* con especificidad para dípteros y *cry5* específico para lepidópteros y coleópteros (Fernández-Larrea, O., 2002).

Los cristales pueden presentar distintas morfologías y se pueden clasificar en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes. Se logró en muchos casos establecer asociaciones entre la morfología del cristal, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular de éstas y su espectro de actividad insecticida (Tabla I.2) (Sauka y Benintende, 2008).

Tabla I.2: Asociaciones entre los principales tipos de cristales de Bt, proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida.

| Tipo de cristal | Grupo | Peso molecular (kDa) | Toxicidad |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Bipiramidal | Cry1 | 130 | Lepidópteros |
| Cúbico | Cry2 | 65 | Lepidópteros y Dípteros |
| Cuadrado aplanado | Cry3 | 72 | Coleópteros |
| Esférico | Cry4A, Cry4B, Cry10 y Cry11 | 135, 128, 78, 72 | Dípteros |

Además, de las proteínas Cry, *Bacillus thuringiensis* posee otros factores de virulencia. Algunos de ellos, como fosfolipasas, enterotoxinas, β -exotoxinas y quitinasas no tienen

especificidad por el orden de insectos que afectan y se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los distintos serovares de Bt. Otros factores, tales como las proteínas Cyt, sí presentan especificidad. Otro caso de factores de virulencia que tienen especificidad por el orden de insectos son las proteínas insecticidas vegetativas, llamadas Vip. Éstas se secretan al medio durante el crecimiento vegetativo de la bacteria, no se relacionan con las proteínas Cry y no forman inclusiones cristalinas. Se cree que las proteínas Vip comparten algunas etapas en el modo de acción con las Cry, pero utilizan distintos receptores. (Sauka y Benintende, 2008).

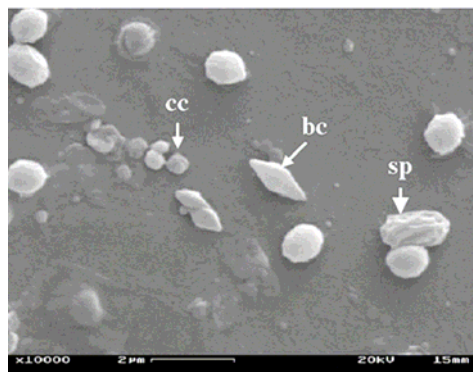


Figura I.4: Imagen de microscopio electrónico de barrido de esporos y cristales de la cepa HD-1 de Btk. bc, cristal bipiramidal; cc, cristal cúbico; sp, espora. Fuente: Gomes Monnerat, y col., 2007.

El *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Btk) es, por excelencia, la cepa utilizada para el control de insectos lepidópteros que actúan como plagas agrícolas y forestales. Esta cepa fue aislada originalmente por Dulmage en 1970 (Sauka y Benintende, 2008). La misma produce un cristal bipiramidal, que incluye las proteínas Cry 1 Aa, Cry 1 Ab, Cry 1Ac, Cry 2 Aa y Cry 2 Ab (Schnepf y col., 1998; Sauka y Benintende, 2008). Algunos autores, plantean la capacidad de esta cepa de producir cristales cúbicos asociados a la presencia de la toxina Cry 2 (Gomes Monnerat y col., 2007). En la figura I.4 se observa una microfotografía de los esporos y cristales de esta cepa tomada a través de un microscopio electrónico de barrido, en la misma, se puede apreciar la presencia de cristales bipiramidales y cúbicos. Cry 1 es una protoxina de 130 kDa de peso molecular, que es capaz de producir un fragmento activo N-terminal de 65 kDa contra insectos lepidópteros (Crickmore y col., 1998; Kwa y col., 1998); por su parte el peso de la protoxina Cry 2 es de aproximadamente 70 kDa y el peso de la toxina activa se aproxima también a 65 kDa (Rukmini y col., 2000). Particularmente la subclase 2A de Cry 2 se ha reportado como una toxina activa para lepidópteros y dípteros (Rukmini y col., 2000; Sauka y Benintende, 2008). Además, de esta cepa se pudo purificar

otro factor de virulencia, la proteína Vip 3Aa (Milne y col., 2008). Esta proteína contribuye en la actividad insecticida de la cepa HD-1 sobre algunas especies de lepidópteros, no evidenciando ningún tipo de acción, sobre otras.

I.6.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción involucra la solubilización del cristal en el intestino del insecto, el procesamiento proteolítico de la protoxina por proteasas intestinales, la unión de la toxina Cry a receptores celulares intestinales y su inserción en la membrana apical para crear canales iónicos o poros (Schnepf y col., 1998). Cuando los cristales son ingeridos por las larvas de insectos susceptibles, se disuelven en el medio fuertemente alcalino del estómago, liberando las proteínas cristalinas en forma de protoxina (Maagd y col., 1999) Posteriormente, la proteína es parcialmente hidrolizada por proteasas específicas del mismo tracto digestivo. De esta manera es activada, y bajo su forma monomérica atraviesa la membrana peritrófica y se une de forma univalente a la caderina en la cara apical de la membrana epitelial (Schnepf y col., 1998; Bravo y col., 2004; Sauka y Benintende, 2008). Luego, se inicia una cascada de señalización dependiente del ión magnesio, que sería responsable de la muerte celular. Además, se estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula, reclutando un número mayor de receptores de toxinas que amplifica la señal inicial. Por otro lado, se propone que la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina. Este clivaje induce el ensamblaje de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario, que podría ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a aminopeptidasa N facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, lo cual provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Schnepf y col., 1998, Bravo y col., 2004; Soberón y col., 2007; Sauka y Benintende, 2008). De esta manera, se impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva, provocando la muerte del insecto. El modo de acción de Bt se encuentra esquematizado en la figura I.5. Algunos autores postulan que la muerte puede favorecerse por la germinación de los esporos del bacilo (Grochulski y col., 1995; Schnepf, E., 1995; Rukmini y col., 2000; Guihard y col., 2001; Regis y col., 2001; Aronson, 2002). Otros investigadores postulan, además, la importancia de bacterias entéricas que son parte de la microbiota normal del insecto, contribuyendo a la acción de Bt en algunas larvas de lepidópteros (Broderick y col., 2009).

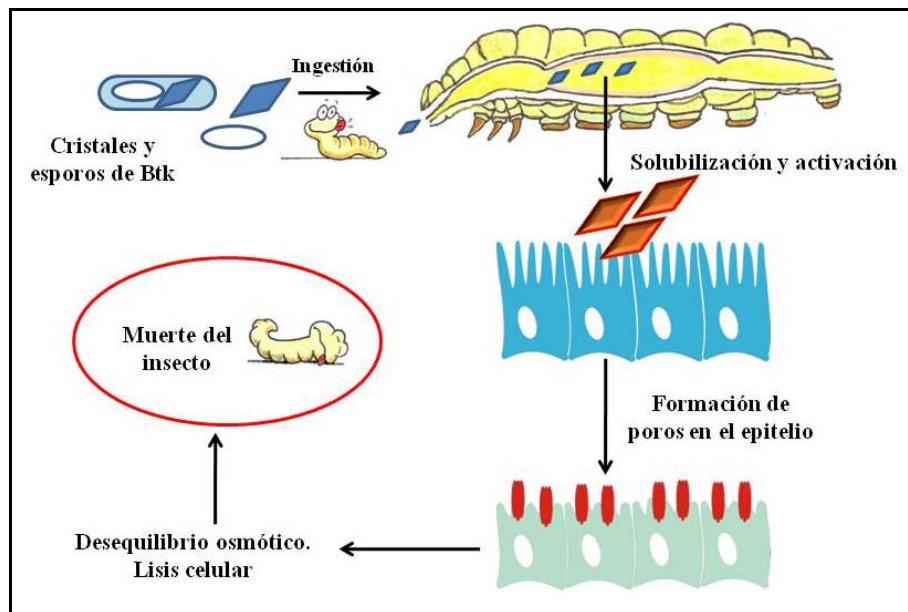


Figura I.5: Modo de acción de Btk sobre insectos lepidópteros

I.6.3. Su utilización como bioinsecticida

Las bacterias entomopatógenas son empleadas desde 1958 para el control de plagas agrícolas y forestales. Desde esa fecha, sólo en los Estados Unidos de América, se han registrado más de 180 productos comerciales que contienen Bt viables (Becker, 1997; Crecchio y Stotzky, 2001; Siegel, 2001).

Los bioinsecticidas basados en Bt representan el 90-95% del volumen de insecticidas biológicos producidos anualmente, y son empleados como parte del sistema integrado del manejo de plagas. El mercado mundial de formulaciones basadas en Bt supera los 300 millones de dólares anuales, cifra que representa tan sólo el 1% del mercado de los insecticidas (Udayasuriyan y col., 1996; Gohar y Perchat, 2001; Zouari y col., 2002).

En la tabla I.3 se observa una extensa lista de productos a base de Bt disponibles en el mercado, utilizados sólo para el control de lepidópteros.

La producción mundial anual de bioinsecticidas basados en Bt se estima que es próxima a las 13000 toneladas, teniendo en su haber China y algunos países desarrollados por lo menos la mitad del total. Se espera que en la presente década el crecimiento del mercado de bioinsecticidas sea de un 10-15% en contra de un 2% de los insecticidas químicos. Esto se deberá fundamentalmente al incremento del uso de Bt para el control de insectos en agricultura orgánica, forestal y control de enfermedades transmitidas por mosquitos (Rowe y Margaritis, 2004).

Tabla I.3: Productos Bt disponibles comercialmente para el control de Lepidópteros

| Nombre comercial | Productor | Subsp de Bt/ Cepa |
|-------------------------|-----------------------|---|
| Bactospeine | Abbott | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Biobit | Abbott | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Dipel | Abbott | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Florbac | Abbott | aizawai |
| Foray | Abbott | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| XenTari | Abbott | aizawai |
| Cordalene | Agrichem | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| BMP 123 | Becker | <i>kurstaki</i> / HD-263 |
| Biobest-Bt | Biobest | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Bacticide | Cequisa | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Worm Wipper | Cape Fear Chemicals | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Collapse | Calliope | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Baturad | Cequisa | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Condor | Ecogen | <i>kurstaki</i> / EG2348 |
| Crymax | Ecogen | <i>kurstaki</i> / EG7841 |
| Cutlass | Ecogen | <i>kurstaki</i> / EG2371 |
| Lepinox | Ecogen | <i>kurstaki</i> / EG7826 |
| Raven | Ecogen | <i>kurstaki</i> / EG2424 |
| Ecotech Bio | Ecogen/ AgrEvo | <i>kurstaki</i> / EG2371 |
| Ecotech Pro | Ecogen/ AgrEvo | <i>kurstaki</i> / EG2348 |
| Jackpot | Ecogen/ Intrachem | <i>kurstaki</i> / EG2424 |
| Rapax | Ecogen/ Intrachem | <i>kurstaki</i> / EG2348 |
| Forwarbit | Forward International | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Bio-Worm Killer | Green Light Co | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Bactospeine Koppert | Koppert | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Guardjet | Mycogen/ Kubota | <i>kurstaki</i> / Cry1 Ac |
| Maatch | Mycogen | <i>kurstaki</i> /Cry1 Ac & aizawai /Cry1 C |

| | | |
|--------------|------------------|---------------------------|
| M/C | Mycogen | <i>aizawai</i> /Cry1 C |
| M-Peril | Mycogen | <i>kurstaki</i> / Cry1 Ac |
| MVP | Mycogen | <i>kurstaki</i> / Cry1 Ac |
| Bactec BT 16 | Plato Industries | <i>kurstaki</i> / EG2348 |
| Bactec BT 32 | Plato Industries | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Insectobiol | Samabiol | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Bactosid K | Sanex | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Soilserv BT | Soil Serv Inc | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Agrobac | Tecomag | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Able | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / M-200 |
| Agree | Thermo Trilogy | <i>aizawai</i> / GC-91 |
| Costar | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / SA-12 |
| Delfin | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / SA-11 |
| Design | Thermo Trilogy | <i>aizawai</i> / GC-91 |
| Javelin | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / SA-11 |
| Thuricide | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Turex | Thermo Trilogy | <i>aizawai</i> / GC-91 |
| Vault | Thermo Trilogy | <i>kurstaki</i> / SA-11 |
| Larvo-Bt | Troy Biosciences | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Troy-Bt | Troy Biosciences | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Ringer BT | Verdant Inc | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| Safer BT | Verdant Inc | <i>kurstaki</i> / HD-1 |
| BT 320 | Wilbur Ellis Inc | <i>kurstaki</i> / HD-1 |

Fuente: Flexner y Belnavis, 1998.

I.6.4. Características de la producción de *Bacillus thuringiensis*

La producción industrial de esta bacteria entomopatógena se lleva a cabo por cultivo en bio-reactores, en medios que contienen carbohidratos, fuentes proteicas y extracto de levadura. En estos procesos convencionales de producción, el costo de la materia prima varía entre el 35 y el 59% del costo total, dependiendo de la capacidad de la planta de producción (Lachhab y col., 2001; Tirado Montiel y col., 2001). De esta forma, la selección de un medio

de cultivo, como materia prima, es crítica para la producción económicamente competitiva de este biopesticida.

Esta bacteria entomopatógena es capaz de utilizar diferentes fuentes de carbono. En la mayoría de los casos aquellos carbohidratos que le permiten obtener altas velocidades de crecimiento, tales como glucosa o maltosa, no le permiten alcanzar altas concentraciones del complejo espora-cristal. Otros carbohidratos simples, como lactosa o sacarosa, son metabolizados más lentamente y poseen mejores rendimientos de aquel complejo (Içgen y col., 2002; Nickerson y col., 1974). Por otra parte, se sabe que la glucosa ejerce un efecto regulador importante en la síntesis del cristal, encontrándose diferencias en la composición proteica de las inclusiones, lo que se manifiesta en cambios en la forma y tamaño de las mismas (Chang y col., 2001; Içgen y col., 2002). La metabolización de este sustrato se realiza principalmente mediante la ruta de la glicólisis y el ciclo de Krebs, de donde se obtiene la mayor cantidad de energía para la esporulación y síntesis del cristal. Es por esto que se han definido algunos medios en los que a la glucosa, se le suman intermediarios de aquel ciclo, tales como α -cetoglutarato, aspartato o citrato (Nickerson y col., 1974).

La fuente de nitrógeno más utilizada en medios químicamente definidos para la producción de Bt es el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se ha encontrado que la producción de cristales está influenciada principalmente por la concentración de esta fuente (Içgen y col., 2002a). Sin embargo, esta fuente por si sola no es capaz de promover altas velocidades de crecimiento, para lo cual se recurre a fuentes orgánicas de nitrógeno, tales como los extractos de levadura, urea, peptona, etc. (Rady y el-Deen, 1991; Içgen y col., 2002a).

La utilización de sustratos complejos en medios químicamente indefinidos es otra alternativa para la producción de Bt. Estos sustratos pueden ser utilizados debido a que Bt produce y secreta amilasas y proteasas, enzimas que le permiten utilizar fuentes complejas de carbono y nitrógeno (Scherrer y col., 1973; Salama y col., 1983; Kuppusamy y Balaraman, 1990; Mummigatti y Raghunathan, 1990; Fernández-Larrea, 2002; Zouari y col., 2002; Prakabaram y Balaraman, 2006). Dentro de las fuentes de carbono encontramos almidones, melazas y dextrinas. Entre las fuentes de nitrógeno, se describe el empleo de los siguientes sustratos industriales: harinas de soja, maíz, trigo y pescado; líquido de maceración de maíz; hidrolizado de caseína y extracto de levadura.

Las toxinas bacterianas pueden considerarse metabolitos secundarios y como tales, su síntesis puede ser inhibida o incrementada por oligoelementos, temperatura, pH y potencial redox. Entre los elementos trazas requeridos por Bt encontramos Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cu^{2+} y PO_4^{3-} (Yang y Wang, 1998; Içgen y col., 2002b; Özkan y col., 2003). Algunos de ellos

favorecen la proliferación de Bt, mientras que otros contribuyen con la producción de proteínas entomotóxicas. Por esta razón, para una correcta optimización nutricional por parte de la bacteria, sería importante estudiar separadamente las fases de desarrollo: vegetativa, esporulación y lisis.

Una alternativa económica para la producción de esta bacteria es la utilización de materiales de descarte, tales como subproductos de molinería y efluentes municipales (Adams y col., 1999-2002; Lachhab y col., 2001; Tirado Montiel y col., 2001; Vidyarthi y col., 2002; Zouari y Jaoua, 1999; Zouari y col., 2002). Éstos contienen no sólo fuentes de carbono y energía, utilizables por la bacteria, sino que además poseen los minerales necesarios para la producción del cristal. Otra fuente económica de sales minerales utilizada para la propagación de este microorganismo es la utilización de agua de mar (Ghribi y col., 2007). La utilización de efluentes o residuos para la producción de este agente entomopatógeno produce un doble impacto ambiental favorable, ya que transforma materiales de desecho, con impacto ambiental negativo, en un producto con un efecto ambientalmente positivo.

Además del medio de cultivo, existen otros parámetros que deben considerarse al momento de definir la producción a gran escala. Uno de ellos es el suministro de oxígeno. Se sabe que una adecuada aireación favorece el desarrollo, esporulación y producción de cristal, y que la carencia de este nutriente disminuye notablemente el proceso de diferenciación celular y por ende los rendimientos del producto. Por otra parte, el elevado suministro de aire en los medios de cultivos líquidos, ricos en proteínas, pueden generar altos volúmenes de espuma (Razo Flores y col., 1997; Yang y Wang, 1998; Fernández-Larrea, 2002; Rowe y col., 2003). Este aspecto es un detalle no siempre contemplado en el escalamiento y requiere del uso de antiespumantes u otras estrategias para evitar la formación de espuma.

Los sistemas más utilizados para la producción industrial del bacilo son los de cultivo sumergido, ya que permiten un mejor control y manejo de las condiciones operativas, tales como temperatura, pH y tensión de oxígeno disuelto, entre otros. Estos sistemas de producción se valen de grandes fermentadores y se ha reportado la utilización de reactores del tipo tanque agitado (Razo Flores y col., 1997; Prabakaram y Balaraman, 2006), así como también reactores *airlift* (Huang y col., 2001). También se ha evaluado la posibilidad de realizar fermentaciones en sustrato sólido para la producción de bacilo (Adams y col., 2002; Hongzhang y col., 2002; Vimala Devi, y col., 2005). Los principales inconvenientes que presentan estos sistemas están relacionados a la transferencia de oxígeno, la prevención de la contaminación y el costo y complejidad del escalamiento (Fernández-Larrea, 2002).

I.7. Co-producción de bioinsecticidas

Entre las desventajas comerciales más importantes de los bioinsecticidas, en general, se encuentra su estrecho rango de acción. Esta característica, por otro lado ambientalmente relevante, generalmente provoca rechazo por parte del productor agrícola, que pretende que la aplicación de un producto permita controlar la mayor cantidad de plagas que perjudican a sus cultivos. La utilización conjunta de más de un insecticida biológico seguramente contribuiría a superar esta limitación, pero a costa de un detrimento en el resultado económico de la acción de control. En cambio, un co-producto, integrado por más de un insecticida microbiano, producidos en un único proceso fermentativo, y que exhiba un rango de acción extendido respecto a cada uno de los mono-productos, podría permitir ampliar el rango de control de plagas sin implicar un aumento significativo de los costos de producción.

La aplicación de co-productos insecticidas de origen microbiano podría presentar, además, efectos benéficos adicionales: cuando un organismo blanco resulte susceptible a más de un insecticida integrante de un co-producto, su utilización podría permitir un más efectivo control de la emergencia de la resistencia a cada insecticida, y en este mismo supuesto, eventualmente también una reducción de las dosis necesarias para alcanzar un nivel de control efectivo, si es que los insecticidas que integran el co-producto ejercen efectos aditivos o sinérgicos. Estrategias similares, utilizando combinaciones de antivirales o antibióticos, se han revelado exitosas en el tratamiento de infecciones humanas por el virus VIH (Barreiro y Soriano, 2005; Barreiro y col., 2006; Azanza y col., 2008) y *Mycobacterium tuberculosis* (Rodríguez Díaz y col., 2003), respectivamente. En relación a la aplicación de combinaciones de insecticidas microbianos, Marzban y col. (2009) determinaron efectos aditivos y sinérgicos al tratar larvas de *Helicoverpa armígera* con diversas combinaciones de Cry 1Ac y poliedros del virus de la poliedrosis citoplasmática de este insecto, mientras que Ma y col. (2008), determinaron efecto aditivo para algunas de las combinaciones ensayadas de proteína Cry 1Ac y conidios de *Beauveria bassiana* sobre *Ostrinia furnacalis*.

Más específicamente en relación a los insecticidas de origen viral, una de las desventajas previamente comentadas consiste en su mecanismo de acción lento, en comparación con los insecticidas de síntesis química, o aún con las toxinas bacterianas. Chang y colaboradores (2003), generaron un baculovirus recombinante que produce cuerpos de oclusión en donde se expresa la proteína tóxica Cry 1Ac de Bt. De esta manera, lograron reducir el tiempo de acción y la patogenicidad al compararlo con el virus nativo. Si bien los resultados son prometedores, se recurre a la utilización de organismos modificados

genéticamente, los cuáles no tienen una amplia y fácil aceptación en la sociedad. La co-producción de dos insecticidas sin recurrir a la modificación genética probablemente se vería afectado por un menor nivel de cuestionamiento social. Por otro lado, la producción de Bt, o de otro insecticida microbiano, como co-producto fermentativo de un insecticida viral, permitirá mejorar la economía del proceso de producción *in vitro*, independientemente si ambos mono-productos serán aplicados en forma aislada o combinada.

Existen en la literatura trabajos sobre co-procesos fermentativos, entre los cuáles se encuentran estrategias de fermentación que permite el aprovechamiento efectivo de mezclas de hidratos de carbono, mediante el uso de dos cepas de *Escherichia coli* modificadas genéticamente, lo que le otorga la propiedad de consumir uno u otro carbohidrato, respectivamente (Eiteman y col. 2008). Por su parte Parajó y col. (1997), co-produjeron carotenoides y xilitol mediante la fermentación de un medio de cultivo que contiene xilosa por parte de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Otra referencia sobre el tema es descripta por Lin y col. (2004), quiénes analizaron la estrategia de alimentar cultivos de levaduras para co-producir dos moléculas intracelulares con aplicaciones médicas tales como, S-adenosil metionina y glutatión.

Un pre-requisito para llevar a cabo la co-producción es la compatibilidad entre los co-productos, es decir que la presencia de uno de ellos no afecte la integridad del otro y viceversa. Es nuestro trabajo se tratará de dilucidar si el desarrollo de la bacteria *Bacillus thuringiensis* no ocasiona daños sobre el fenotipo insecticida de AgMNPV producido previamente.

I.8. Justificación del tema de tesis

En la actualidad, un sustento importante de la economía argentina se encuentra en la producción de soja. Esta oleaginosa es la más difundida en el país y junto con sus derivados se ha convertido en el principal producto de exportación argentino. Este importante aumento de la producción se ha logrado no sólo con incrementos en la superficie sembrada, sino también con elevados rendimientos que se encuentran entre los más altos del mundo.

Después del algodón, la soja es el cultivo que sufre los mayores ataques de plagas, principalmente de insectos. Por esta razón, es el cultivo que requiere más insecticidas para su protección, respecto a otros cereales y oleaginosas. El uso indiscriminado de insecticidas químicos perjudica el bienestar ambiental, pudiendo tener consecuencias negativas inclusive sobre el hombre. El MIP surgió intentando dar solución a este problema, proponiendo minimizar el uso de químicos y combinarlo con modificaciones en las prácticas culturales y el

uso de insecticidas de origen biológico, entre los que se encuentran los baculovirus y las bacterias entomopatógenas productoras de toxinas.

Existen muchos factores que limitan la comercialización de los bioinsecticidas y de los baculovirus en particular. Las principales características que se señalan como posibles desventajas son su elevada especificidad (representa una desventaja para su aceptación y comercialización debido a que los usuarios prefieren eliminar varias plagas aplicando el mismo producto), el tiempo que demoran en matar a sus huéspedes, su baja persistencia en campo y el elevado costo de producción. Para mejorar alguna de estas propiedades se han encarado proyectos de modificación genética (Tomalsky y Müller, 1991.). Se ha demostrado recientemente que un baculovirus modificado genéticamente para expresar una delta endotoxina de Bt posee una aptitud insecticida mejorada respecto al virus silvestre (Chang y col., 2003). Sin embargo, por tratarse de un producto genéticamente modificado, está sometido a numerosas regulaciones y restricciones.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de desarrollar un proceso que permita producir, en un único proceso fermentativo, dos insecticidas microbianos, el baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* y la toxina entomotóxica de Bt. Este proceso podría generar un producto con las mismas cualidades insecticidas que un organismo recombinante, pero de origen natural y basado en dos organismos de inocuidad ambiental comprobada. El proceso propuesto consta de dos etapas: en la primera se multiplica AgMNPV en células saUFLAg-286 bajo condiciones óptimas de cultivo e infección; luego, el mismo cultivo infectado, conteniendo los poliedros de AgMNPV, se inocula con Bt. Finalmente, el cultivo contendrá una mezcla de poliedros de AgMNPV y esporos, esporangios y cristales paraspóricos de Bt. Posteriormente, se evaluarán las posibilidades de escalado de este proceso dual en reactores, y se evaluará la actividad biológica del co-producto.

~Objetivos~

II.1. General

Desarrollar procesos fermentativos integrados para la producción de insecticidas biológicos mixtos, viral-bacterianos, para el control de plagas agrícolas.

II.2. Específicos

✓ Estudiar la influencia de las condiciones operativas, velocidad de agitación y volumen de llenado, sobre la capacidad de transferencia de oxígeno y sobre los parámetros de crecimiento de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-10.

✓ Investigar los efectos de la variación de la ICD y la MOI sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos en suspensión de la línea celular UFL-AG-286.

✓ Evaluar el escalado de la producción de OBs de AgMNPV en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en un medio de bajo costo y libre de suero, utilizando dos reactores de configuración estándar.

✓ Estudiar la cinética de cultivo, esporulación y producción de cristales entomotóxicos de Btk en diferentes medios de cultivos

✓ Evaluar la factibilidad del escalamiento del proceso de co-producción en dos tipos de reactores.

~**Materiales y Métodos**~

III.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular de insectos saUFL-AG-286 (Gioria y col., 2006). La misma es una subpoblación de la línea celular UFL-AG-286 (Sieburth y Maruniak, 1988b), establecida a partir de embriones de *Anticarsia gemmatalis*, la cual fue seleccionada por su habilidad para crecer en cultivos en suspensión agitados, principalmente en la forma de células aisladas. La línea celular se mantuvo en cultivos en suspensión en botellas de vidrio de 125mL con tapas de baquelita en el medio de cultivo UNL-10, y en monocapa en frascos de 25 cm² de superficie utilizando los medios de cultivo UNL-10 y UNL-5.

III.1.1. Recuentos celulares

Se realizó una dilución conveniente de la suspensión celular a cuantificar, empleando una solución de buffer salino de fosfatos (PBS) y 10% de una solución de Azul de Trypan al 0,4 %. Se homogeneizó suavemente y se cargaron ambas hemicámaras de una cámara de recuento globular de Neubauer. El recuento celular se realizó por observación en un microscopio Olympus® modelo CK2 con un aumento 10X de objetivo y 10X de ocular. Se cuantificó el número de células totales y viables en los cuatro cuadrados de los extremos del retículo de ambas hemicámaras. Las células que excluyeron el colorante se consideraron viables.

III.2. Virus

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

III.2.1. Preparación de stock de AgMNPV

Los stocks virales se obtuvieron a partir de la infección con AgMNPV de cultivos estáticos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-5 + 10% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos, de densidad 2×10^5 células viables.ml⁻¹, se infectaron a una multiplicidad de infección de 0,05 DICC_{50%}.célula⁻¹. Durante la primera hora de incubación a 27° C, los cultivos se agitaron suavemente cada 15 minutos para lograr una adecuada homogenización del inóculo viral. Los cultivos infectados se observaron diariamente y se cosecharon cuando el efecto citopático alcanzó aproximadamente al 90% de las células. Cada cultivo se trasvasó a un tubo cónico de plástico de 15 ml de capacidad y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5

minutos. La centrifugación se realizó a 4° C en una centrífuga marca Beckman Coulter® modelo Allegra 2IR. Finalmente, alícuotas de 100 µl de los sobrenadantes se fraccionaron en tubos plástico de 1,5 mL y se conservaron a -80° C.

III.2.2. Cuantificación viral

III.2.2.1. Titulación de virus brotado de AgMNPV

El título de virus brotado se determinó a través de una técnica de dilución límite y punto final. En primer lugar, a una alícuota del sobrenadante de un cultivo infectado, previamente centrifugado, se le realizaron una serie de diluciones decimales (10^0 - 10^{-9}). Como solución diluyente, se empleó el medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB. Posteriormente, se sembraron 50 µl de una suspensión celular (4×10^5 células viables. ml^{-1}) en cada pocillo de una placa de cultivos celulares de 96 orificios. A continuación se dispensaron, por quintuplicado, 50 µl por pocillo de cada dilución de la muestra a titular. El control se realizó sembrando por quintuplicado 50 µl de la suspensión celular y 50 µl del medio de cultivo UNL-5 + 10% SFB. Las placas se incubaron a 27° C durante 7 días. Un pocillo fue considerado positivo cuando se observaba en el microscopio óptico al menos una célula con presencia de poliedros. Al cabo de los 7 días de incubación, los pocillos negativos y dudosos se replicaron. Así, en una placa de cultivo nueva se sembraron tantos pocillos con 50 µl de suspensión celular como pocillos a replicar. Inmediatamente, se les adicionó 50 µl del sobrenadante proveniente del pocillo negativo o dudoso. Este nuevo cultivo en placa se incubó durante 7 días adicionales a 28°C.

Para calcular el título viral por el método desarrollado por Reed y Muench (Reed y Muench, 1938) se confeccionó una tabla de respuestas (+) y (-) para cada una de las diluciones. Posteriormente, se calculó para cada dilución la frecuencia acumulada para las respuestas positivas y negativas. Por último, se determinaron los porcentajes de respuestas positivas que surgieron del cociente entre la frecuencia acumulada positiva y las frecuencias acumuladas totales. Como punto final, se consideró la dilución que produce un 50% de respuestas positivas que, para el caso de cultivos celulares, se denomina dosis infectiva para cultivo celular 50% (DICC₅₀). Los títulos virales se expresaron en DICC₅₀ . mL^{-1} .

III.2.2.2. Cuantificación de poliedros de AgMNPV

Para cuantificar la cantidad de poliedros producidos en un cultivo celular, se separó una alícuota de la suspensión celular y se centrifugó en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de

SDS 0,1%. Las muestras se conservaron a 4° C hasta el momento de su procesamiento. Los recuentos de poliedros se realizaron en el cuadrado central de una cámara de Neubauer que tiene una superficie de 1 mm² y se encuentra dividido en 25 cuadrados medianos, cada uno de los cuales se encuentra sub-dividido en 16 cuadrados pequeños. Se cuantificaron los poliedros presentes en 5 de los cuadrados medianos (Σ) (los 4 de los extremos y el central). Los rendimientos volumétricos y específicos de poliedros se determinaron aplicando las siguientes fórmulas:

- Rendimiento volumétrico de poliedros (R_{OB}) (poliedros.ml⁻¹) = $\Sigma * 5 * 10.000$
- Rendimiento específico de poliedros (RE_{OB}) (poliedros.célula⁻¹) = $\Sigma * 5 * 10000 * (\text{células viables.ml}^{-1})^{-1}$.

III.3. Cepa bacteriana

Se empleó la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, gentilmente cedida por la Dra. Graciela Benintende del IMYZA (INTA Castelar). El mantenimiento de la cepa se realizó mediante repiques periódicos. Para esto, se inocularon tubos estría de medio agar nutritivo (Britania, Argentina) y se incubaron a 30°C. Luego de 7 días, se tomaron alícuotas de estos cultivos y se los sometió a un control microscópico. Aquellos cultivos que presentaron las estructuras características de la cepa empleada, se conservaron a 4°C hasta 3 meses, lapso a partir del cual se procedió a un nuevo repique.

III.3.1. Cuantificación de las diferentes estructuras bacterianas.

Las células vegetativas, esporangios y esporos, se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer y objetivo de 40X, realizando a cada muestra una dilución conveniente.

III.4. Medios de cultivo

III.4.1. UNL-10

| Nutrientes | Concentración (g/L) |
|-------------------|----------------------------|
| L-alanina | 0,1139 |
| L-arginina | 0,0611 |
| Acido L-aspártico | 0,0389 |
| L-asparagina | 0,2722 |
| Acido L-glutámico | 0,0667 |

| | |
|------------------------------------|--------|
| L-glutamina | 2,7333 |
| L-glicina | 0,0722 |
| Clorhidrato de L-histidina | 0,3756 |
| L-iso-leucina | 0,0055 |
| L-leucina | 0,0194 |
| Clorhidrato de L-lisina | 0,0694 |
| L-metionina | 0,1666 |
| L-prolina | 0,0389 |
| L-fenilalanina | 0,0167 |
| L-serina | 0,1999 |
| L-treonina | 0,0194 |
| L-valina | 0,0111 |
| L-cisteína | 0,0024 |
| L-tirosina | 0,0055 |
| L-triptofano | 0,0111 |
| Clorhidrato de tiamina | 0,0004 |
| Pantotenato de calcio | 0,0023 |
| Clorhidrato de piridoxina | 0,0004 |
| Acido p-aminobenzoico | 0,0004 |
| Acido fólico | 0,0004 |
| Acido nicotínico | 0,0004 |
| i-inositol | 0,0004 |
| Cianocobalamina | 0,0004 |
| Riboflavina | 0,0004 |
| Biotina | 0,0002 |
| Acido fumárico | 0,0024 |
| Acido α ceto-glutárico | 0,0167 |
| Acido L (-) málico | 0,0300 |
| Cloruro de potasio | 3,2200 |
| Cloruro de calcio di-hidratado | 1,4400 |
| Cloruro de magnesio hexa-hidratado | 2,5556 |
| Sulfato de magnesio | 1,5200 |
| Fosfato di-ácido de sodio | 0,9600 |

| | |
|---|--------|
| Carbonato ácido de sodio | 0,3889 |
| L-tirosina | 0,0122 |
| Cloruro de colina | 0,0222 |
| Glucosa | 7,7778 |
| Extracto de levadura | 3,0000 |
| Hidrolizado enzimático de caseína N-Z-Case Plus | 3,0000 |
| Caldo triptosa fosfato | 1,0000 |

Micronutrientes

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

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

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

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

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

167 µl de cloruro de zinc (2 mg/L).

Los componentes de este medio de cultivo fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MI, USA).

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

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

Al momento de su utilización se suplementó con 15 mL de una microemulsión de aceite comercial de aceite de soja. La microemulsión lipídica se preparó por medio de agitación de componentes acuosos y lipídicos. El componente acuoso está definido por un emulsificante en agua (Pluronic F-68 al 10%), mientras que el componente lipídico por aceite de soja (Sojola®, AGD SRL, General Deheza, Argentina).

III.4.2. UNL-5

El medio UNL-5 consta de los mismos componentes que el medio UNL-10 a excepción del extracto de levadura. Éste se reemplazó por 1 g/L de ultrafiltrado de extracto de levadura (Sigma®). Al momento de su uso, este medio se suplementó con un 10% de suero fetal bovino provisto por Bioser®.

III.5. Cuantificación de nutrientes y metabolitos

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

III.5.1. Dosaje de la concentración de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó empleando un equipo enzimático provisto por Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). Este método se basa en la oxidación enzimática de la glucosa, por parte de la glucosa oxidasa, a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último, en presencia de peroxidasa, produce la copulación oxidativa del fenol con el reactivo 4-amino fenazona, formando un compuesto coloreado proporcional a la concentración de glucosa, que se cuantificó espectrofotométricamente a 505 nm en un espectrofotómetro marca Beckman[®] modelo DU 530.

III.5.2. Dosaje de la concentración de amonio

Para la cuantificación del amonio se utilizó un equipo comercial provisto por Laboratorio Wiener (Rosario, Argentina), basado en la reacción de Berthelot, donde el amonio, en presencia de fenol e hipoclorito de sodio, produce un compuesto coloreado (azul de indofenol) que es cuantificado espectrofotométricamente a 540 nm en un espectrofotómetro marca Beckman[®] modelo DU 530.

III.6. Sistemas y condiciones de cultivo

III.6.1. Células de insecto

III.6.1.1 Cultivos con células de insecto adheridas

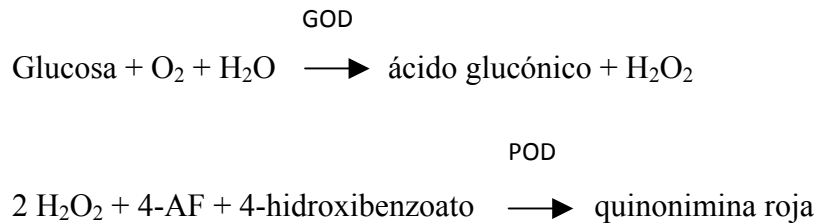
La línea celular saUFL-AG-286 se cultivó en monocapa en frascos de 25 cm² de superficie, utilizando distintos medios de cultivo. Cada botella, con 5 ml de cultivo, se incubó a 27° C en una estufa de cultivo marca Precytec[®]. El inóculo celular consistió en 0,5 mL proveniente de un cultivo en monocapa que alcanzó el 80-90% de confluencia celular.

III.6.1.2. Cultivos de células en suspensión

III.6.1.2.1. Cultivos en frascos agitados

Estos cultivos en suspensión se realizaron en frascos de vidrio cilíndricos de 125 mL (Altura: 96,45 mm; Diámetro: 49,15 mm) y fueron mantenidos a 27°C. Los mismos se agitaron a diferentes velocidades, y con diferentes volúmenes de cultivo, sobre un agitador orbital con regulación de temperatura (Forma Scientific®, modelo 4520), en el medio libre de suero UNL-10. Estos cultivos fueron iniciados a una densidad celular de 3×10^5 células viables.mL⁻¹. Estos frascos se caracterizaron desde el punto de vista de su capacidad para transferir el oxígeno, determinando el k_{La} de los mismos, mediante la técnica que se detalla a continuación.

Para determinar el valor de este coeficiente en las botellas cilíndricas, empleando diferentes volúmenes de trabajo y velocidades de agitación, las concentraciones de oxígeno disuelto se evaluaron en forma indirecta, utilizando el método enzimático de la glucosa oxidasa, en donde se involucran las siguientes reacciones:



GOD: glucosa oxidasa

POD: peroxidasa

El valor de la absorbancia medida a 505 nm es directamente proporcional a la concentración de oxígeno disuelto (Rainer, 1990; Duetz y Witholt, 2004).

Para cada volumen y velocidad de agitación se utilizó una serie de botellas conteniendo una solución de glucosa de 35 g.L⁻¹. Para expulsar la totalidad del oxígeno disuelto antes de la medición, se hizo fluir una corriente de nitrógeno gaseoso durante tres minutos. Una vez concluido este lapso de tiempo, se agregó 1 mL de reactivo de trabajo. La reacción en las botellas se detuvo a diferentes tiempos con el agregado de 50 uL de una solución de KOH (10N).

El valor de la concentración de oxígeno disuelto, en equilibrio con la fase gaseosa, para una dada temperatura, puede calcularse según Pirt (1975), mediante la ecuación III.1:

$$C^* = 14,16 - 0,3943 \cdot T + 0,007714 T^2 - 0,0000646 \cdot T^3 \quad (\text{III.1})$$

En la ecuación III.1, C^* representa la concentración de oxígeno disuelto a saturación, en ppm, y T representa la temperatura, en grados centígrados.

La determinación del valor del $k_L a$ se determinó mediante la representación gráfica de la ecuación III.2:

$$\ln \frac{C^* - C_t}{C^* - C_0} = k_L a \cdot t \quad (\text{III.2})$$

En la ecuación III.2, C^* corresponde a la concentración de oxígeno disuelto a saturación, en las condiciones de la determinación, C_0 es el valor inicial de la concentración de oxígeno disuelto, correspondiente al momento de iniciar la serie de mediciones (tiempo 0) y C_t es el valor de dicha concentración para cada tiempo (t).

Los valores de $k_L a$ determinados para este sistema se analizarán en el capítulo 1 del apartado Resultados y Discusión del presente manuscrito.

III.6.1.2.2. Cultivos en bio-reactores

✓ Reactor tanque agitado (STR)

Se empleó un bio-reactor tanque agitado cilíndrico, de 2 L de capacidad nominal, con base plana de 102,7 mm de diámetro y 220 mm de alto (LH Fermentation, EEUU). El bio-reactor se equipó con dos turbinas *Rushton*, de 6 paletas, de 49 mm de diámetro. El sistema de aireación consistió de un burbujeador de un único orificio, en donde el flujo de gas ingresó a una velocidad de 80 mL.min⁻¹. El aire, proveniente de un compresor a diafragma, se esterilizó por filtración en línea, mediante un filtro absoluto de 0,22 μm de tamaño de poro. Posterior al paso por el filtro, y previo al ingreso al reactor, el flujo de aire se humidificó mediante burbujeo en una columna de agua estéril. El monitoreo de la concentración de oxígeno disuelto se realizó empleando un electrodo amperométrico, específico para oxígeno (Ingold, Suecia). La temperatura en el interior del reactor se reguló a 27 °C, mediante circulación continua de agua termostaticada a través de un dispositivo anular interno. El sistema se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y posteriormente se cargó mediante presión positiva con 800 mL de medio UNL-10 en condiciones de esterilidad. La velocidad de agitación fue de 250 rpm y la concentración de oxígeno disuelto se reguló al 50% de saturación de forma automática. Los distintos cultivos se inocularon con una densidad celular inicial de 3x10⁵ células.mL⁻¹. Diariamente, se realizaron determinaciones del consumo global de oxígeno del reactor, lo que se realizó concomitantemente con la toma de muestra. Para tal fin, se procedió a suspender la aireación y se determinó la evolución de la concentración de oxígeno durante un tiempo, hasta alcanzar una concentración de este analito de 3 ppm, en este

punto se reinició inmediatamente la aireación. El valor de consumo global de oxígeno se obtuvo luego de linealizar la curva obtenida al graficar el decaimiento de la concentración de oxígeno en función del tiempo. Este parámetro se determinó a partir de la pendiente de la mencionada gráfica. Además, la variación de la concentración de oxígeno disuelto durante el período en que se suspendió la aireación, se supuso proporcional a la concentración de células viables presentes en el cultivo, siendo su expresión representada en la ecuación III.3:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = q_{O_2} \cdot X \quad \text{(III.3)}$$

En la ecuación III.3, C_{O_2} representa la concentración de oxígeno disuelto, q_{O_2} la velocidad específica celular de consumo de oxígeno y X la concentración de células viables.

Por otro lado y con el objetivo de contribuir a la caracterización del bio-reactor tanque agitado, se procedió a determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}). Se empleó el método dinámico de gaseado. Éste consiste en inyectar un flujo de aire constante, determinando la concentración de oxígeno disuelto en el bio-reactor, durante un lapso adecuado. En cada momento, esta concentración se determinó empleando un electrodo amperométrico específico para oxígeno. El bio-reactor se cargó con 800 mL de agua desionizada y se trabajó a temperatura ambiente. Previo a las determinaciones se procedió a calibrar al electrodo. Esto se realizó entre dos valores de concentración de oxígeno disuelto: 0% y 100%. Para lograr el primer punto, se purgó todo el oxígeno disuelto del sistema, mediante un flujo de nitrógeno gaseoso. El segundo de los puntos se obtuvo luego de saturar el sistema acuoso en oxígeno disuelto, mediante un flujo de aire. En cada caso, luego de que el sistema alcanzara el equilibrio, se ajustó manualmente el valor de la lectura potenciométrica en el valor teórico de concentración. Así, de la representación gráfica de $Ln [(C^*-C_t / C^*-C_0)]$ en función del tiempo para cada velocidad de agitación, fue posible determinar el valor del k_{La} , que corresponde al valor de la pendiente de la recta obtenida y ajustada mediante regresión lineal. Los valores de k_{La} determinados se reúnen en la tabla III.1. Como se puede ver, el incremento en la velocidad de agitación provocó una menor resistencia para la transferencia de oxígeno del sistema, lo que se evidenció a través del incremento del coeficiente k_{La} . El valor de este coeficiente determinado a 200 rpm ($5,364 \text{ h}^{-1}$), resultó ser un 95% y un 87 % superior a las determinaciones efectuadas a 50 y 100 rpm, respectivamente. Finalmente, el k_{La} determinado a 250 rpm ($6,822 \text{ h}^{-1}$), superó en un 27,5 % al determinado a 200 rpm.

Tabla III.1: Valores del coeficiente k_{La} (h^{-1}), en función de la velocidad de agitación del sistema (rpm). Las determinaciones se realizaron en el STR, conteniendo 800mL de agua desionizada, utilizando el método dinámico de gaseado.

| Velocidad de agitación (rpm) | k_{La} (h^{-1}) |
|------------------------------|-----------------------|
| 50 | 2,749±0,002 |
| 100 | 2,861±0,003 |
| 200 | 5,364±0,011 |
| 250 | 6,822±0,020 |

Además, se determinó el tiempo de mezclado del reactor tanque agitado, cargado con agua desionizada, a temperatura ambiente. Para ello se registró el tiempo que demoró en estabilizarse la lectura de la sonda de pH (Scott, modelo S22200), luego del agregado de un pulso de 100 μ L de HCl 1M. Las determinaciones se realizaron por duplicado, descartando la totalidad del contenido del bio-reactor cada vez. El tiempo de mezclado se calculó como el promedio de las diferentes series realizadas para cada velocidad de agitación. Además de la agitación originada por los impulsores, existió una contribución al mezclado por parte del flujo de aireación, el cuál fue de 80 $mL \cdot min^{-1}$ en todas las determinaciones. La metodología utilizada para la determinación, es similar a la utilizada por Visnovsky en el año 2005 (Visnovsky, 2005), sólo que en lugar de utilizar una solución salina se utilizó una solución de HCl. Como se observa en la tabla III.2, el tiempo de mezclado requerido por el sistema luego del agregado de un pulso de ácido, descendió a medida que se fue incrementando la velocidad de las turbinas *Rushton* (Tabla III.2). Si bien las diferencias no resultaron significativas desde el punto de vista estadístico para las diferentes velocidades de agitación ensayadas, éstas resultaron estadísticamente diferentes al tiempo requerido para mezclar el sistema cuando la agitación mediante las turbinas fue nula y sólo consistió en el ingreso de flujo de aire mediante el *sparger* a una velocidad de 80 $mL \cdot min^{-1}$. El tiempo de mezclado bajo estas condiciones fue de $27,75 \pm 0,35$ segundos. Por otro lado, cuando se incrementó cinco veces la velocidad de agitación (de 50 a 250 rpm) la diferencia en este parámetro resultó significativa, requiriendo un tiempo 44% menor.

Tabla III.2: Valores del tiempo de mezclado (s), en función de la velocidad de agitación (rpm), en el STR conteniendo 800mL de agua desionizada. Las determinaciones se realizaron por duplicado, descartando la totalidad del contenido del reactor cada vez.

| Velocidad de Agitación (rpm) | Tiempo de mezclado (s) |
|------------------------------|------------------------|
| 0 | 27,75±0,35 |
| 50 | 9,00±1,41 |
| 100 | 8,25±1,77 |
| 150 | 8,25±0,35 |
| 200 | 6,00±1,41 |
| 250 | 5,00±0,71 |

Otra alternativa que se evaluó para realizar la caracterización del reactor fue la capacidad de suspensión de trazadores. Este es un parámetro que también es necesario utilizar para caracterizar un reactor, ya que su determinación mostrará las zonas “estancas” que existen en el sistema. Con esta finalidad, el reactor tanque agitado se cargó con agua desionizada y con un número conocido de trazadores de poliestireno, considerándose que los mismos se comportan de la misma forma que lo haría una célula en un cultivo en suspensión. Una vez iniciada la agitación, y transcurrido un tiempo determinado, con la ayuda de una cámara digital se registró fotográficamente a los trazadores que se resuspendieron. Se realizaron triplicados para cada velocidad de agitación utilizada. La capacidad del reactor a diferentes velocidades de agitación se calculó como el porcentaje promedio de trazadores suspendidos en el seno del líquido. El porcentaje de trazadores en suspensión en función de la velocidad de agitación puede apreciarse en la figura III.1. La máxima suspensión que se logra en este sistema es a partir de la velocidad de agitación 150 rpm (entre un 30 y un 50%), el incremento a mayores velocidades no generó una suspensión significativamente mayor. Esto se debe a las características del fondo del vaso y al tipo de turbina que se utiliza, que por tratarse de un fondo plano y una turbina de tipo *Rushton* se generan varias zonas estancas en donde los trazadores se depositan sin lograr que se resuspendan. Al adaptarle a este vaso un fondo cóncavo y utilizar una turbina de paletas inclinadas, la máxima suspensión se alcanzó a partir de las 100 rpm y el porcentaje de trazadores en suspensión máximo estuvo alrededor del 65% (datos no mostrados).

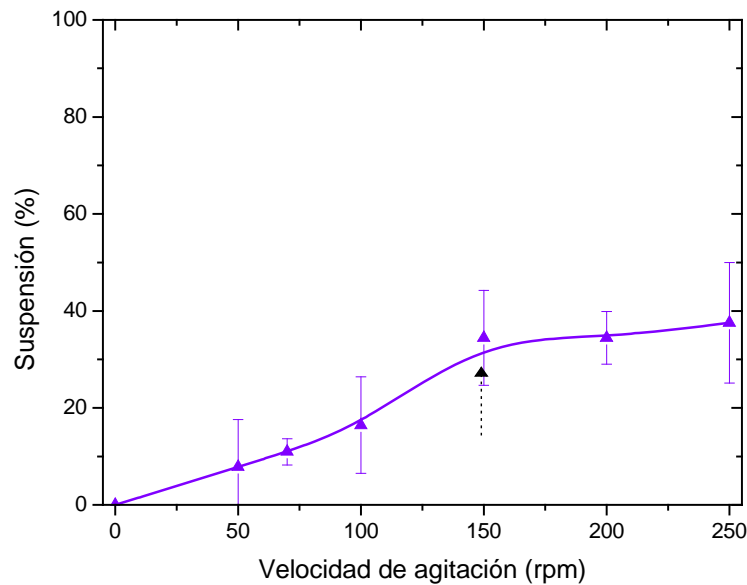


Figura III.1: Porcentaje de trazadores en suspensión, en función de la velocidad de agitación del sistema (rpm). El ensayo se realizó por triplicado en el STR conteniendo 800mL de agua desionizada. La flecha indica el punto a partir del cual se obtuvo el porcentaje máximo de trazadores suspendidos.

✓ *Airlift*

Se utilizó un reactor de tipo *airlift*, cilíndrico y concéntrico, construido en vidrio, de circulación interna, y que incluye 3 promotores de flujo helicoidal. Las dimensiones del reactor son: 553 mm de altura y 40 mm de diámetro para el cilindro exterior, y de 411 mm de altura y 23 mm de diámetro para el cilindro interior. El fondo es semiesférico y la separación entre éste y el cilindro interior es de 7 mm. La aireación se realizó a través de un burbujeador de un único orificio, ubicado en el fondo del cilindro interno. El volumen de trabajo fue de 380 mL y el medio ensayado fue UNL-10. El bio-reactor se instaló dentro de un baño termostatzado, a los efectos de mantener constante la temperatura de cultivo (27 °C). El flujo de aireación fue de 50 mL.min⁻¹ y se controló mediante un rotámetro. El aire, proveniente de un compresor a diafragma, se esterilizó por filtración en línea, mediante un filtro absoluto de 0,22 µm de tamaño de poro. Posterior al paso por el filtro, y previo al ingreso al reactor, el flujo de aire se humidificó mediante burbujeo en una columna de agua estéril. El sistema se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos y posteriormente se cargó mediante presión positiva en condiciones de esterilidad.

Para esta configuración de reactor, también se procedió a realizar su caracterización, mediante la determinación de la velocidad del líquido. La velocidad del líquido es un

parámetro importante a tener en cuenta cuando se analizan las variables involucradas en el diseño de un reactor *airlift*. Los reactores *airlift* más eficientemente diseñados tienen una velocidad del líquido mayor como una consecuencia de una fuerza de conducción mayor originada entre el *riser* y el *downcomer*. Para determinar la velocidad de circulación del líquido en el reactor *airlift*, el mismo se cargó con 380 mL de agua desionizada y se trabajó a temperatura ambiente. La metodología utilizada para realizar esta determinación fue la descrita por Visnovsky y col. (2003) y consistió en introducir un trazador dentro del bio-reactor e iniciar la aireación. El trazador consistió en una pieza pequeña de cartulina negra que una vez humedecida supone un comportamiento similar al del líquido. Se registraron diez ciclos del trazador para cada velocidad de aireación evaluada. Un ciclo se consideró el tiempo que demoró el trazador en recorrer una distancia conocida dentro del bio-reactor. La velocidad del líquido se calculó como el promedio de los tiempos de circulación del trazador para recorrer un ciclo completo del reactor. Este parámetro fue determinado para el reactor utilizado en este trabajo, para diferentes flujos de aireación, lo que determina a su vez diferentes velocidades superficiales del gas (Figura III.2). La velocidad superficial del gas se define como el caudal de gas que pasa a través de una determinada área en un instante de tiempo. Se pudo observar que la velocidad del líquido incrementó con el aumento de la velocidad superficial del gas. La velocidad del líquido obtenida al aumentar 6 veces la velocidad del gas resultó ser 2,85 veces superior.

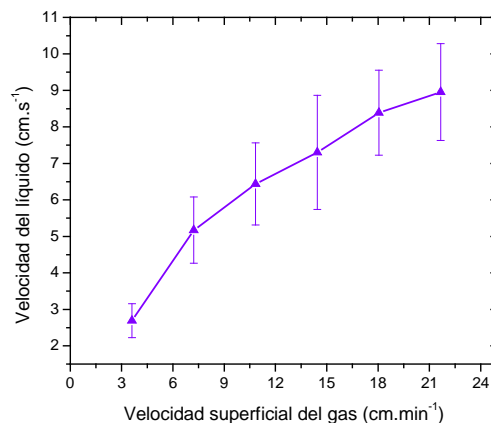


Figura III.2: Velocidad del líquido vs. la velocidad superficial del gas utilizada en el reactor *airlift*.

Visnovsky en el año 2005 determinó el tiempo de mezclado y el k_{La} de un reactor *airlift* de características similares al empleado en este trabajo. El tiempo de mezclado requerido para

homogeneizar el sistema mediante una velocidad superficial del gas de $0,091 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ resultó de 60 segundos luego de introducir un pulso de una solución saturada de ClNa.

III.6.2. *Bacillus thuringiensis*

III.6.2.1. Cultivos en frascos erlenmeyers

La cepa bacteriana se cultivó en frascos *erlenmeyers* conteniendo 30 mL de medio de cultivo. Los mismos se inocularon con esporos de Btk a una densidad inicial de 5×10^6 esporos. mL^{-1} y se cultivaron a 30°C sobre un agitador orbital a 200 rpm (Forma Scientific®, modelo 4516). Sobre los mismos se realizaron tomas de muestras, en las que se determinaron las concentraciones de las diferentes estructuras bacterianas, glucosa y amonio.

III.6.2.2. Cultivos en bio-reactores

Se utilizaron los dos reactores que se describieron para el cultivo de células de insecto. La temperatura de incubación de los cultivos fue de 30°C . En el STR, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo de manera automática por encima del 40% de saturación. Ambos reactores se inocularon con una densidad inicial de esporos de Btk de 5×10^6 esporos. mL^{-1} . A diario se realizaron tomas de muestras, sobre las cuáles se determinaron las concentraciones de las estructuras bacterianas, glucosa y amonio. En el STR se determinaron, además, los consumos global y específico de oxígeno. La formación de espuma se controló con el agregado de simeticona 30000 ppm.

III.7. Determinación de los parámetros cinéticos de cultivo.

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

$$dC_i = \mu \cdot C_i \cdot dt \quad (\text{III.4})$$

$$\frac{dC_i}{dt} = \mu \cdot C_i \quad (\text{III.5})$$

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

Si μ es una constante y se integra la expresión (III.5), resulta:

$$\ln C_i = \ln C_{i_0} + \mu \cdot t \quad (\text{III.6})$$

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

Relacionada con la velocidad específica de multiplicación surge la definición de tiempo de duplicación. Este parámetro mide el tiempo necesario para que la masa celular se duplique cuando la velocidad específica de crecimiento es μ . Por lo tanto, haciendo $C_i = 2C_{i_0}$ y reemplazando en (III.6):

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

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

III.8. Determinación de los coeficientes de rendimiento y de las velocidades específicas de consumo y producción de nutrientes y productos

III.8.1. Coeficientes de rendimiento

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

$$Y_{Ci/s} = \frac{dC_i}{ds} \quad (\text{III.7})$$

Para un cultivo del tipo *batch*, en la zona de crecimiento celular exponencial, el coeficiente de rendimiento (III.7) puede calcularse utilizando la siguiente expresión:

$$Y_{Ci/s} = \frac{C_i - C_{i_0}}{s_0 - s}$$

donde C_i y C_{i_0} representan la variación de la densidad celular y, s y s_0 , la variación de la concentración del nutriente.

De la misma manera, se definen los coeficientes de rendimiento para los productos del metabolismo celular.

III.8.2. Velocidad específica de consumo

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

$$\frac{ds}{dt} = q_s \cdot x$$

donde q_s es un coeficiente conocido con el nombre de velocidad específica de consumo. Bajo condiciones de validez de la ley de multiplicación exponencial, q_s se puede considerar constante y reemplazando x por $x_0 \cdot e^{\mu t}$:

$$ds = q_s \cdot x_0 \cdot e^{\mu t}$$

$$s - s_0 = q_s \cdot x_0 \cdot (e^{\mu t} - 1)$$

$$q_s = \frac{(s_0 - s) \cdot \mu}{(x_0 - x_0 \cdot e^{\mu t})}$$

$$q_s = \frac{(s_0 - s) \cdot \mu}{(x_0 - x)}$$

Reemplazando μ por $(\ln x - \ln x_0) / t$:

$$q_s = \frac{(s_0 - s) \cdot (\ln x - \ln x_0)}{(x_0 - x) \cdot t}$$

fórmula a partir de la cuál se pueden calcular los valores de velocidad específica de consumo de nutrientes conociendo las concentraciones de sustrato y las densidades celulares en un cultivo en lote.

III.9. Diseños experimentales y análisis de resultados

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

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

$$N = n^k$$

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

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

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

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

III.10. Extracción alcalina de proteínas

El método utilizado para la extracción de proteínas, fue similar al método descrito por Lee y col. en el año 2000 para la extracción de proteínas bioinsecticidas. En este caso, se realizaron extracciones de cultivos de células infectadas con AgMNPV, cultivos de *Bacillus thuringiensis* y cultivos polixénicos, en donde cultivos de células infectadas con baculovirus fueron posteriormente inoculados con esporas del bacilo. Luego del tiempo conveniente para la producción en cada cultivo, se procedió a cosechar los mismos. Para esto, los cultivos fueron íntegramente transferidos a tubos cónicos estériles. Éstos fueron posteriormente centrifugados durante 10 minutos a 5.400 x g. Finalizada esta operación, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en PBS de pH 7, en un volumen equivalente al del sobrenadante. Esta suspensión se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El *pellet* obtenido luego de la centrifugación fue procesado de igual manera, empleando una nueva fracción de PBS de pH 7. Posteriormente, el *pellet* se resuspendió en 5 mL de una solución de Na₂CO₃ 50 mM- EDTA 1 mM, pH 10. Luego de incubar durante una hora a 37°C, se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. El sobrenadante y el *pellet* resuspendido en el mismo volumen de SDS fueron empleados para sembrar un gel de poliacrilamida y realizar una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Para esto se

preparó un gel al 12 % en donde se sembraron 25 μ l de cada muestra, previamente diluida con *buffer* de muestra. La intensidad de corriente empleada en este ensayo fue constante e igual a 25 mA.

III.11. Cuantificación de la actividad biológica

Para la preparación de las muestras ya cuantificadas en lo que respecta al número de poliedros y/o esporos, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga. Posteriormente, el *pellet* celular se resuspendió en medio de cultivo fresco. A continuación, se llevó a cabo la lisis celular a través del empleo de un equipo de sonicación marca Vibra-Cell[®] modelo VC 600 (1 pulso de potencia 4 durante 60", con 50% de silencio). Inmediatamente, se centrifugó la muestra en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto, se resuspendió el *pellet* en medio de cultivo fresco y se conservó a 4°C hasta el momento de la determinación de la actividad.

La evaluación de la actividad biológica se llevó a cabo en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola con sede en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la localidad de Castelar, Buenos Aires, Argentina, por gentileza de la Dra. Graciela Benintende, siguiendo un procedimiento descrito previamente (Sauka y col., 2007). Para esta evaluación se utilizaron larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*. La infección se llevó a cabo siguiendo el método de incorporación en la dieta, utilizando placas de 24 pocillos y 6 diluciones de la muestra a ensayar más un control con agua destilada. Una larva neonata fue colocada en cada pocillo. Se realizaron tres réplicas realizadas en días diferentes para cada muestra. La mortalidad se registró luego de 5 días a 29 °C y un fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad). Los resultados de mortalidad final se analizaron por Probits (Finney, 1971), y en base a los requerimientos estadísticos (Ibarra and Federici, 1987), se determinó la concentración letal media (CL₅₀).

~Resultados y Discusión~

~Capítulo 1~

IV.1.1. Introducción

La principal aplicación biotecnológica de los cultivos de células de insectos es la producción de baculovirus y de proteínas recombinantes expresadas en baculovirus modificados. Diversos sistemas de cultivo en suspensión han sido utilizados para la propagación de células de insectos, desde los simples “spinner flasks” en pequeña escala (Wong y col., 1996), hasta reactores de tanque agitado (Wong y col., 1996; Mitchell-Logean y Murhammer, 1997; Mc Kenna y col., 1997; Maranga y col., 2004) y *airlift* (Visnovsky y col., 2003).

Los sistemas de cultivo en frascos con agitación orbital y aireación superficial, por su simplicidad y economía, y por la posibilidad de trabajar, a diferente escala, con múltiples unidades al mismo tiempo, pueden resultar una opción interesante en las fases iniciales del desarrollo de un proceso, cuando es necesario evaluar múltiples variables. Estos sistemas se desarrollaron principalmente para el cultivo de bacterias y hongos, existiendo una gran cantidad de información disponible sobre los parámetros que influyen sobre el comportamiento de esos cultivos. En este sentido, la maximización de la capacidad de transferencia de oxígeno es un criterio de extrema importancia para optimizar el crecimiento de los cultivos bacterianos y fúngicos, considerando la baja solubilidad del oxígeno en los medios acuosos.

Si bien se han descrito también algunas aplicaciones de los sistemas de agitación orbital en el cultivo de células animales, tanto de mamíferos (Muller y col., 2005) como de insectos (Rodas y col., 2005), existe muy poca información publicada acerca de la influencia de los parámetros operacionales sobre el desempeño de los cultivos y sobre su capacidad de producción cuando las células animales son cultivadas en este tipo de dispositivos. Una alternativa para establecer valores óptimos de los parámetros operativos podría ser la extrapolación de la información existente sobre el cultivo de células procariontas y eucariontas inferiores. Sin embargo, las diferencias estructurales y funcionales entre bacterias y hongos, por un lado, y células animales, por otro, limitan la validez de tal extrapolación.

Las células animales, en general, y las de insecto, en particular, difieren de bacterias y hongos por su fragilidad mecánica, producto de la carencia de una pared celular (Aloi y Cherry, 1996; Palomares y Ramirez, 1998; O'Connor y col., 2002). Este es un aspecto crítico a considerar cuando las células de insecto serán utilizadas en un proceso de producción, ya que el sometimiento a condiciones operacionales que imponen estrés mecánico puede resultar en la alteración de la fisiología celular y, consecuentemente, en la limitación de su capacidad

de producción. Por otro lado, las células de insecto presentan requerimientos de oxígeno relativamente elevados, que en caso de no resultar satisfechos también pueden impactar sobre la fisiología celular (Annathur y col., 2003; Mitchell-Logean y Murhammer, 1997). El desarrollo de procesos técnicamente factibles y económicamente rentables para la producción de baculovirus, o proteínas recombinantes, en cultivos de células de insecto requiere que éstas presenten un estado fisiológico adecuado para afrontar las demandas de la replicación viral. Por lo tanto, resulta imperativo determinar cuáles son los valores de los parámetros operacionales que, en cultivos realizados en frascos con agitación orbital, permiten obtener niveles de transferencia de oxígeno compatibles con los requerimientos celulares, sin que la afectación mecánica de las células deteriore su fisiología y su capacidad de producción viral. La satisfacción simultánea de estas dos condiciones puede requerir de soluciones de compromiso.

En cultivos en frascos con agitación orbital y aireación superficial, dado un determinado recipiente y un determinado radio de órbita, la velocidad de agitación y el volumen de llenado del frasco de cultivo son las dos condiciones operativas cuya variación puede afectar la capacidad de transferencia de oxígeno y la fisiología celular. Mientras que la capacidad de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida puede establecerse a través del parámetro k_La , el efecto de la variación de las condiciones operativas sobre la fisiología puede determinarse a través de los parámetros de crecimiento del cultivo, como la duración de la fase *lag*, la velocidad específica de proliferación en la fase exponencial y la densidad celular máxima.

El objetivo de la primera parte de esta tesis fue establecer la influencia de las condiciones operativas, velocidad de agitación y volumen de llenado, sobre la capacidad de transferencia de oxígeno y sobre los parámetros de crecimiento de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-10. Además, se evaluó la influencia de la variación de los parámetros operativos sobre la producción de cuerpos de occlusión del virus AgMNPV en cultivos infectados de células saUFL-AG-286.

IV.1.2. Resultados

IV.1.2.1 Estudio del efecto de la variación en las condiciones de operación sobre la transferencia de oxígeno en frascos agitados con aireación superficial.

Se estudió el efecto de la variación en las condiciones de operación sobre la capacidad de transferencia de oxígeno, determinada a través del parámetro k_{La} , siguiendo un diseño experimental factorial completo, con dos factores a tres niveles cada uno, tal como se presenta en la tabla IV.1.1.

Tabla IV.1.1: Diseño experimental y respuesta de k_{La} en un ensayo factorial completo de dos factores (velocidad de agitación y volumen de llenado) a tres niveles.

| Ensayo | Velocidad de agitación (rpm) | | Volumen de llenado (mL) | | k_{La} (h^{-1}) |
|--------|------------------------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|
| 1 | +1 ^b | 120 | +1 | 14 | 11,52±2,52 ^a |
| 2 | +1 | 120 | -1 | 10 | 18,72±1,80 |
| 3 | +1 | 120 | 0 | 12 | 13,32±2,16 |
| 4 | -1 | 80 | +1 | 14 | 12,60±0,72 |
| 5 | -1 | 80 | -1 | 10 | 21,96±1,44 |
| 6 | -1 | 80 | 0 | 12 | 15,12±0,72 |
| 7 | 0 | 100 | +1 | 14 | 10,80±1,44 |
| 8 | 0 | 100 | -1 | 10 | 19,80±1,80 |
| 9 | 0 | 100 | 0 | 12 | 16,56±1,80 |

^aLos datos representan el promedio \pm SD de dos experimentos independientes. ^bValor codificado de las variables.

En la figura IV.1.1 se puede observar que el k_{La} disminuye a medida que aumenta el volumen de llenado de los frascos de cultivo. Para los frascos conteniendo 10 mL de volumen de llenado, el valor promedio de k_{La} fue de 20,16 h^{-1} , descendió a un promedio de 15 h^{-1} en los frascos con 12 mL, y se redujo aún a 11,64 h^{-1} en los frascos conteniendo un volumen de 14 mL. El análisis de la variancia (tabla IV.1.2) pone en evidencia que el volumen de llenado ejerce una influencia estadísticamente significativa sobre la capacidad de transferencia de oxígeno. Por otro lado, en la misma figura IV.1.1 se puede apreciar que la variación en la velocidad de agitación no produjo cambios importantes en el valor del parámetro k_{La} ,

observación que se ratifica a través del análisis de la variancia, que demuestra que no existe influencia estadísticamente significativa dentro del rango de valores de velocidad de agitación evaluados en este ensayo.

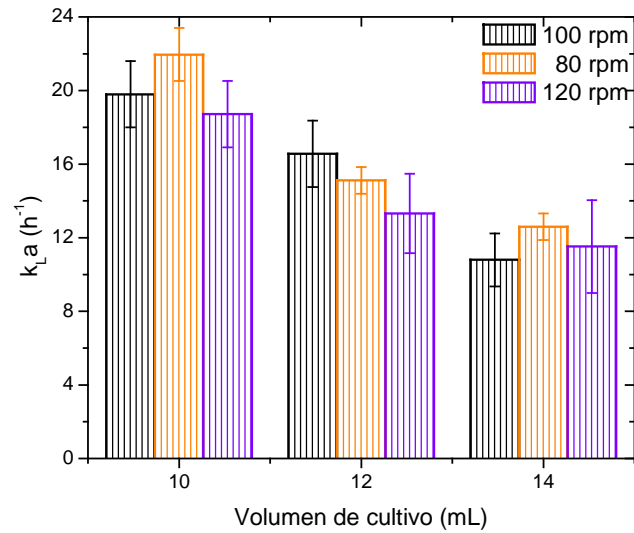


Figura IV.1.1: Relación entre el k_{La} y el volumen de llenado, a diferentes velocidades de agitación en frascos cilíndricos agitados. Los frascos se llenaron con el volumen correspondiente de solución glucosada y fueron agitados a diferente velocidad. El oxígeno disuelto se expulsó mediante una corriente de nitrógeno. Posteriormente, se adicionó un mililitro del reactivo de trabajo compuesto por una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona y buffer fosfatos pH 7 con hidroxibenzoatos, preparado según lo indicado por el fabricante (Wiener lab. ®). La reacción se cortó a diferentes tiempos con el agregado de KOH. Inmediatamente se procedió a llevar a cabo la lectura de la absorbancia a 505 nm. El coeficiente k_{La} se determinó de la pendiente resultante al graficar $Ln \frac{C^* - C_t}{C^* - C_0} = k_{La} \cdot t$.

Tabla IV.1.2: Análisis de los efectos principales y los efectos originados por la interacción de los factores velocidad de agitación y volumen de llenado sobre el parámetro k_{La} en frascos cilíndricos agitados con aireación superficial.

| Factor | Coefficiente de regresión | Desviación estándar | Valor t | Valor p |
|--|---------------------------|---------------------|-----------|-----------|
| Velocidad de agitación (80 – 120) | - 0,048 | 0,032 | - 1,52 | 0,1891 |
| Volumen de llenado (10 – 14) | - 1,708 | 0,257 | -6,64 | 0,0012* |
| Velocidad de agitación (80 – 120) x Volumen de llenado (10 – 14) | 0,0135 | 0,019 | 0,70 | 0,5127 |

* Efecto significativo.

IV.1.2.2. Estudio del efecto de la variación en las condiciones de operación sobre la proliferación celular en cultivos en frascos agitados con aireación superficial.

Con el objetivo de investigar el efecto de la variación en las condiciones operativas sobre la proliferación celular en cultivos de células saUFL-AG-286 en frascos cilíndricos con agitación orbital y aireación superficial, y encontrar la combinación óptima de velocidad de agitación y volumen de trabajo, se realizó un conjunto de experimentos en el cual los frascos se inocularon con células provenientes de cultivos precursores, en cantidad suficiente para determinar una densidad celular inicial de aproximadamente 3×10^5 células viables.mL⁻¹, en medio UNL-10. El volumen de llenado y la velocidad de agitación en los distintos cultivos fueron establecidos de acuerdo al diseño presentado en la tabla IV.1.3. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

Tabla IV.1.3: Diseño experimental y respuestas de velocidad específica de proliferación (μ) y densidad máxima de células viables (MDCV) en un ensayo factorial completo de dos factores (velocidad de agitación y volumen de llenado) a tres niveles.

| Ensayo | Velocidad de agitación (rpm) | Volumen de llenado (mL) | μ (x10 ⁻³ h ⁻¹) | MDCV (x10 ⁶ células.mL ⁻¹) | | |
|--------|------------------------------|-------------------------|--|---|-------------------------|-----------|
| 1 | +1 ^b | 120 | +1 | 14 | 15,52±0,85 ^a | 1,59±0,16 |
| 2 | +1 | 120 | -1 | 10 | 15,57±0,99 | 1,96±0,23 |
| 3 | +1 | 120 | 0 | 12 | 16,48±1,25 | 1,75±0,11 |
| 4 | -1 | 80 | +1 | 14 | 16,80±0,74 | 1,59±0,16 |
| 5 | -1 | 80 | -1 | 10 | 18,93±0,71 | 1,96±0,23 |
| 6 | -1 | 80 | 0 | 12 | 19,49±0,40 | 1,75±0,11 |
| 7 | 0 | 100 | +1 | 14 | 23,25±0,61 | 1,69±0,16 |
| 8 | 0 | 100 | -1 | 10 | 23,56±0,92 | 2,34±0,25 |
| 9 | 0 | 100 | 0 | 12 | 22,73±0,52 | 2,46±0,11 |

^aLos datos representan el promedio ± SD de dos experimentos independientes. ^bValor codificado de las variables.

Como se puede observar en la figura IV.1.2, el comportamiento de los cultivos resultó sensible a las modificaciones del volumen de trabajo y la velocidad de agitación. Los cultivos realizados a 100 rpm empezaron a proliferar más rápidamente, mientras que en los cultivos agitados a 80 y 120 rpm se observó una fase de crecimiento lento durante las primeras 48

horas de cultivo. Se aprecia también que en los cultivos agitados a 100 rpm la pendiente de las curvas de crecimiento en la fase exponencial fue mayor, determinando una velocidad específica de multiplicación celular más elevada que en los cultivos realizados a mayor o menor velocidad de agitación (Tabla IV.1.3). En lo que respecta a la evolución de la viabilidad, en los cultivos agitados a 80 rpm se observó una marcada reducción a partir de las 114 hs., exceptuando el cultivo realizado con 12 mL. Por otro lado, mientras que en los cultivos agitados a 100 rpm la viabilidad comenzó a decaer luego de las 128 horas, cuando la velocidad de agitación se incrementó hasta 120 rpm no se apreció caída de la viabilidad por el término de la duración del experimento, excepto el cultivo realizado con un volumen de 12 mL.

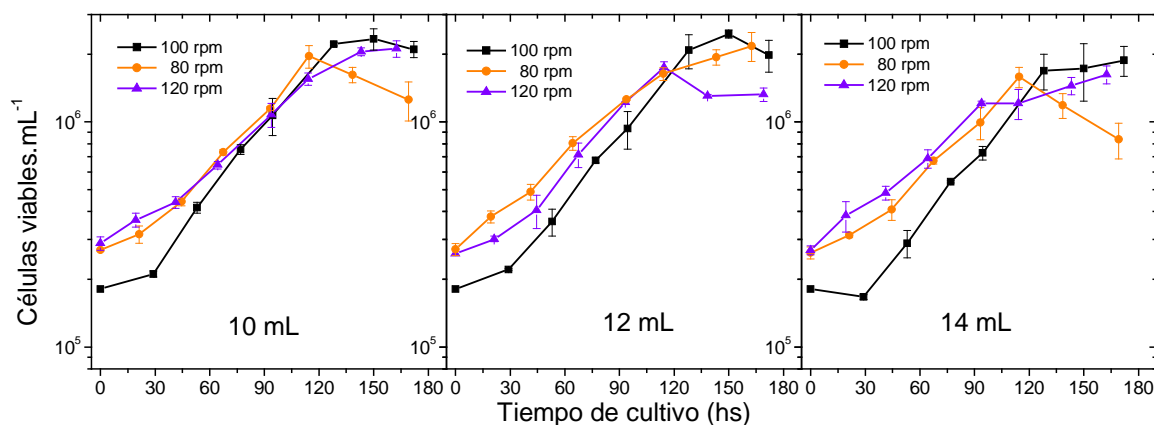


Figura IV.1.2: Cinética de proliferación celular de la línea saUFL-AG-286 en cultivos realizados a diferentes velocidades de agitación y volúmenes de trabajo. Cada punto corresponde al promedio de dos cultivos independientes \pm su desviación estándar. Los cultivos tuvieron una densidad inicial de 3×10^5 células viables. mL^{-1} y se incubaron a 27°C a las diferentes velocidades de agitación.

En la figura IV.1.3 se puede observar como la velocidad específica de proliferación fue afectada por la velocidad de agitación: para los tres volúmenes de llenado que fueron ensayados, el valor máximo de la velocidad específica de crecimiento del cultivo se alcanzó con una velocidad de agitación de 100 rpm. La reducción de la velocidad de agitación a 80 rpm se tradujo en una reducción promedio de la velocidad específica de proliferación de 20,58%, mientras que el incremento de la agitación a 120 rpm produjo una reducción promedio de la velocidad de proliferación de 31,58%. Por otro lado, en la misma figura se puede observar que la variación en el volumen de llenado de las botellas no produjo modificaciones significativas de la velocidad específica de proliferación, a excepción del

cultivo realizado a 80 rpm con 14 mL de cultivo, que si difirió de manera significativa de sus pares realizados con 10 y 12 mL.

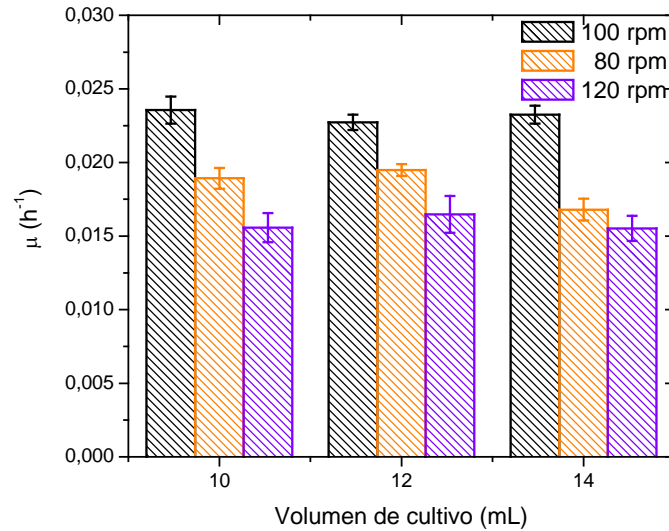


Figura IV.1.3: Relación entre la velocidad específica de proliferación celular y el volumen de trabajo a diferentes velocidades de agitación. Los cultivos tuvieron una densidad inicial de 3×10^5 células viables.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C a las diferentes velocidades de agitación.

El análisis por regresión lineal múltiple permite obtener un modelo de segundo orden estadísticamente significativo (tabla IV.1.4) que relaciona la velocidad específica de proliferación (VP) con los parámetros operativos, velocidad de agitación (VA) y volumen de llenado (V), de acuerdo a la ecuación IV.1.1:

$$VP = -0,12541 + 2,80442 \times 10^{-3} VA + 2,20292 \times 10^{-3} V - 1,50667 \times 10^{-5} VA^2 - 1,51667 \times 10^{-4} V^2 + 1,21875 \times 10^{-5} (V)(VA) \quad (IV.1.1)$$

Tabla IV.1.4: ANOVA del modelo aplicado para la velocidad específica de proliferación celular (VP)^a como función de la velocidad de agitación (VA) y el volumen de llenado (V).

| Origen de la variación | DF ^b | Suma de Cuadrados | Cuadrado Medio | Valor F | Valor p |
|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|---------|---------|
| Modelo | 5 | $8,49 \times 10^{-5}$ | $1,70 \times 10^{-5}$ | 24,60 | 0,0122 |
| Residual | 3 | $2,071 \times 10^{-6}$ | $1,00 \times 10^{-6}$ | | |
| Total | 8 | $8,69 \times 10^{-5}$ | | | |

^a $r^2 = 0.9762$; r^2 ajustado = 0.9365; ^b Grado de libertad

El modelo permite predecir que la velocidad específica máxima, dentro del rango de valores de velocidad de agitación y volumen de llenado que abarcó este estudio, se alcanzará en cultivos agitados a 96,39 rpm, con un volumen de 11,81 mL, y será igual a $0,0246 \text{ h}^{-1}$.

La densidad máxima de células viables resultó menos sensible que la velocidad específica de proliferación a las variaciones de la velocidad de agitación, aunque se observó una tendencia a alcanzar densidades más altas en los cultivos agitados a 100 rpm (Figura IV.1.4). En cambio, como se puede apreciar en la misma figura, resultó afectada de manera más significativa por los cambios en el volumen de llenado de los frascos. El aumento de volumen produjo una reducción en la densidad celular máxima, desde un promedio de $2,09 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ en cultivos de 10 mL, hasta $1,62 \times 10^6 \text{ células.mL}^{-1}$ en cultivos de 14 mL (22,5%), mientras que en 12 mL la reducción promedio resultó del 4,8% respecto al cultivo en 10 mL.

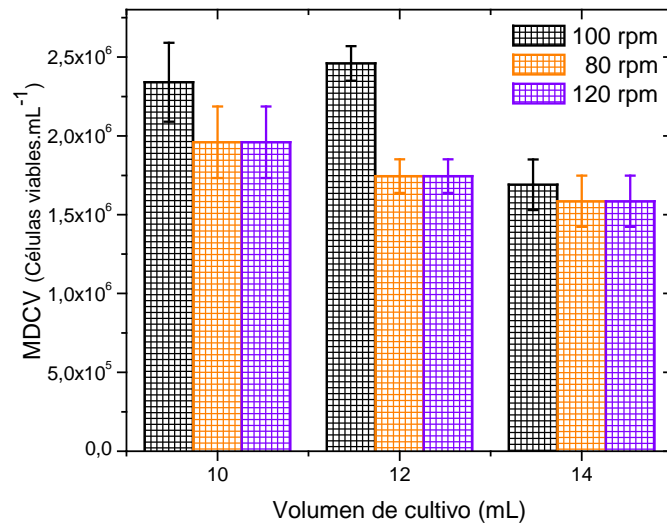


Figura IV.1.4: Relación entre la MDCV y el volumen de trabajo a diferentes velocidades de agitación. Los cultivos tuvieron una densidad inicial de $3 \times 10^5 \text{ células viables.mL}^{-1}$ y se incubaron a 27°C a las diferentes velocidades de agitación.

Tabla IV.1.5: ANOVA del modelo aplicado para la densidad máxima de células viables (MDCV)^a como función de la velocidad de agitación (VA) y el volumen de llenado (V).

| Origen de la variación | GL ^b | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor <i>F</i> | Valor <i>p</i> |
|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 5 | 6,71x10 ¹¹ | 1,34x10 ¹¹ | 3,24 | 0,1810 |
| Residual | 3 | 1,24x10 ¹¹ | 4,14x10 ¹⁰ | | |
| Total | 8 | 7,957x10 ¹¹ | | | |

^a $r^2 = 0.8438$; r^2 ajustado = 0.5834; ^b Grado de libertad

El análisis por regresión lineal múltiple (tabla IV.1.5) revela una interacción, que no alcanza significación estadística, entre la MDCV obtenida en cultivos en agitación orbital, con la velocidad de agitación y el volumen de llenado de los frascos.

Al evaluar la relación existente entre el k_{La} y los parámetros de cultivo μ y MDCV (Figura IV.1.5), se puede observar que aquellas condiciones de operación que generaron valores de k_{La} más bajos tendieron a asociarse con valores de densidad celular máxima más reducidos. Así es que, en condiciones de operación que resultaron en valores de k_{La} inferiores a 15 h^{-1} , el valor promedio de densidad celular máxima alcanzado en los cultivos realizados en dichas condiciones de operación fue de $1,65 \times 10^6$ células viables.mL⁻¹, mientras que en las condiciones de operación que resultaron en valores de k_{La} superiores, el promedio de los valores alcanzados de densidad celular máxima fue de $2,09 \times 10^6$ células viables.mL⁻¹, resultando la diferencia entre los dos grupos estadísticamente significativa ($p = 0,0039$). En cambio, no se verificó correlación significativa entre el k_{La} y la velocidad específica de proliferación, si bien se observó una ligera tendencia a que los menores valores de este último parámetro correspondieran a condiciones de operación que determinan menores valores de k_{La} .

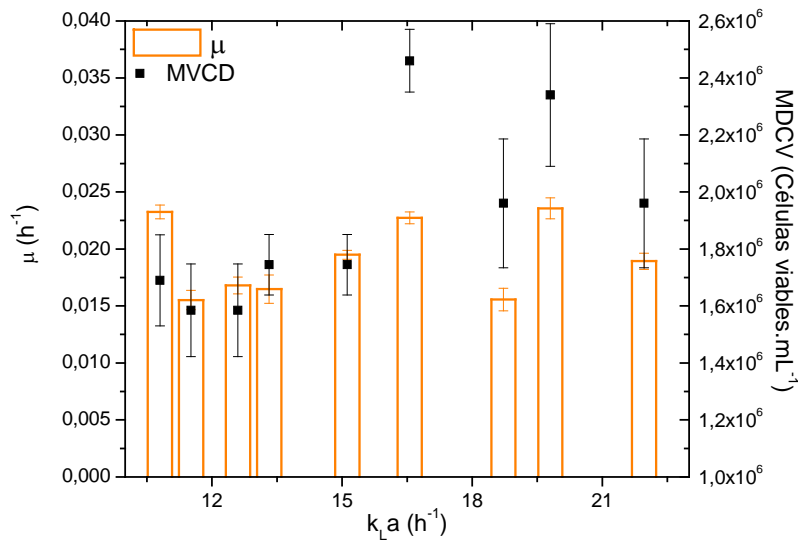


Figura IV.1.5: Valores de μ y MDCV en función de $k_L a$ de los frascos agitados con los diferentes volúmenes de llenado y velocidades de agitación.

IV.1.2.3. Estudio del efecto de la variación en las condiciones operativas sobre la producción de virus en cultivos agitados con aireación superficial

Una vez determinado de que manera la variación de los parámetros operativos afectó a los parámetros de proliferación de cultivos de células saUFL-AG-286 en medio UNL-10 en agitación orbital, se estudió la influencia de la variación de la velocidad de agitación y el volumen de llenado sobre la producción de cuerpos ocusión de AgMNPV en cultivos infectados. Para esto se realizaron cultivos que fueron infectados bajo tres combinaciones diferentes de condiciones operativas, en uno de los casos en aquellas que determinan un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular (agitación a 100 rpm y 12 mL de volumen de llenado), y en dos combinaciones sub-óptimas, como se muestra en la tabla IV.1.6. Los tres cultivos se infectaron a una ICD de 3×10^5 células.mL $^{-1}$ y una MOI de 0,5 DICC $_{50}$.célula $^{-1}$.

En la figura IV.1.6 se puede observar que la variación de las condiciones operativas también determinó cambios en el comportamiento de los cultivos infectados. Cuando los frascos fueron completados con un volumen mayor (14 mL), y agitados a la menor velocidad (80 rpm), el nivel de proliferación celular post-infección resultó mínimo. Por otro lado, el aumento de la velocidad de agitación a 150 rpm determinó un incremento precoz, y acelerado, de la mortalidad celular, que aumentó rápidamente luego de las 48 hs. post-infección,

mientras que en los otros dos cultivos, agitados a 100 rpm, el descenso de la viabilidad resultó más lento y tardío.

Tabla IV.1.6: Condiciones operativas y rendimientos de cuerpos de oclusión en cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en agitador orbital.

| Ensayo | Velocidad de agitación (rpm) | Volumen de trabajo (mL) | R _{OB} (poliedros.mL ⁻¹) | RE _{OB} (poliedros.célula ⁻¹) | Productividad (poliedros.mL ⁻¹ .h ⁻¹) |
|--------|------------------------------|-------------------------|---|--|--|
| 1 | 80 | 14 | 1,31x10 ⁸ | 379 | 1,05x10 ⁶ |
| 2 | 150 | 12 | 7,67x10 ⁷ | 185 | 7,80x10 ⁵ |
| 3 | 100 | 12 | 2,27x10 ⁸ | 429 | 1,76x10 ⁶ |

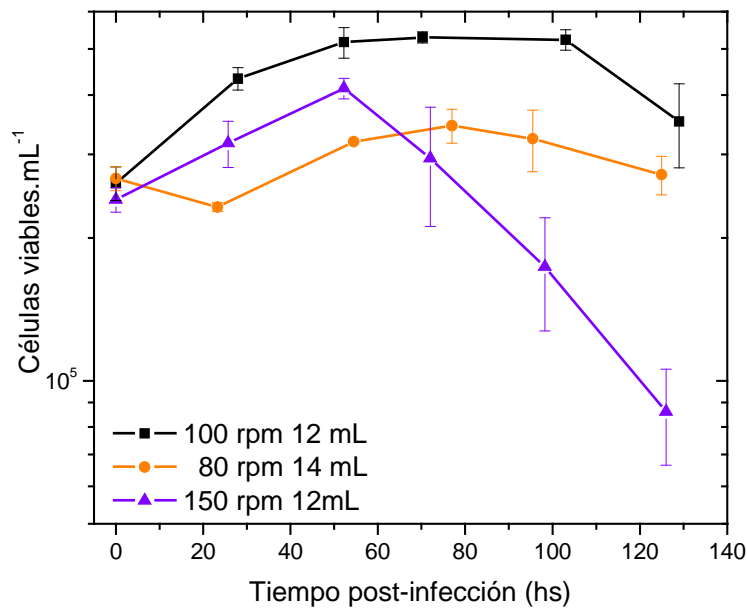


Figura IV.1.6: Evolución de la concentración de células viables en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-10 infectados con el AgMNPV bajo diferentes condiciones de cultivo. Los cultivos con una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹, se infectaron a una MOI de 0,5 DIC₅₀.célula⁻¹ y fueron incubados a 27°C en un agitador orbital a la velocidad de agitación indicada por el diseño.

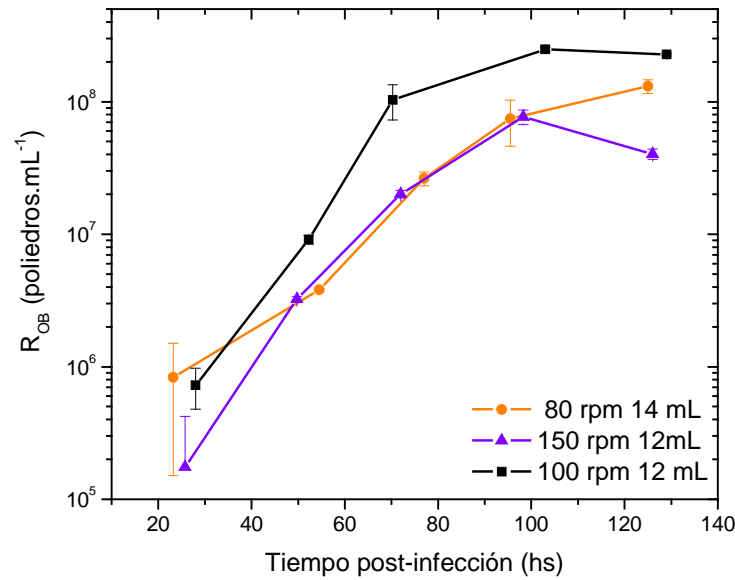


Figura IV.1.7: Cinética de producción de poliedros de AgMNPV bajo diferentes condiciones de cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-10. Los cultivos con una ICD de 3×10^5 células viables.mL⁻¹, se infectaron a una MOI de 0,5 DIC₅₀.célula⁻¹ y fueron incubados a 27°C en un agitador orbital a la velocidad de agitación indicada por el diseño.

En la figura IV.1.7 se presenta la evolución de la concentración de cuerpos de oclusión en función del tiempo post-infección. La velocidad de aparición de poliedros fue mayor para los cultivos realizados a 100 rpm con 12 mL de medio, alcanzándose el pico de incremento a los tres días post-infección, mientras que el máximo rendimiento volumétrico de cuerpos de oclusión se alcanzó un día después. La cinética de acumulación en las otras dos combinaciones de condiciones operativas fue similar, pero con una menor velocidad, de tal manera que los rendimientos máximos resultaron también menores. El rendimiento volumétrico de poliedros en los cultivos realizados en condiciones óptimas fue 1,73 y 2,96 veces superior a su equivalente en los cultivos que se llevaron a cabo a 80 rpm y 14 mL, y 150 rpm y 12 mL respectivamente.

IV.1.3. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las condiciones operativas, velocidad de agitación y volumen de llenado, influyen sobre el comportamiento de cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-10, tanto si están infectados como si no lo están.

En un sistema de cultivo de células en suspensión, el nivel de mezclado debe ser suficiente para mantener las células en suspensión, y proveer una concentración uniforme y suficiente de nutrientes disponibles para el consumo celular (Chalmers, 1996). Por otro lado, el nivel de mezclado determina la existencia de fuerzas hidrodinámicas en el seno del cultivo, que eventualmente podrían afectar la integridad estructural y/o la funcionalidad celulares. En un cultivo en frascos con agitación orbital y aireación superficial, el nivel de mezclado depende principalmente de la velocidad de agitación, por lo cual la respuesta del cultivo frente a las modificaciones de esta velocidad pondrá de manifiesto, en realidad, el impacto del nivel de mezclado. En el sistema estudiado en este trabajo se ha demostrado que existe un nivel de la velocidad de proliferación (100 rpm) que determina un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular. Es posible que a tal velocidad de agitación se alcance un nivel óptimo de compromiso entre la satisfacción de la necesidad de un abastecimiento uniforme y suficiente de nutrientes para sostener el proceso de proliferación celular, y la existencia de fuerzas hidrodinámicas que pueden interferir con la división celular. La disminución de la velocidad de agitación a 80 rpm podría, por un lado, determinar una limitación en el influjo de nutrientes limitantes de la velocidad de proliferación. Por otro lado, es conocido que el estrés mecánico provoca alteraciones del citoesqueleto, y que de esa manera ejerce influencia sobre distintos procesos celulares, incluida la división (Wang y col., 1993). El aumento de la velocidad de agitación, por encima del valor crítico de 100 rpm, podría determinar un nivel de estrés incompatible con una organización del citoesqueleto que permita la más eficiente y rápida concreción del proceso de división celular.

Los valores del parámetro k_{La} , que estima la capacidad de transferencia de oxígeno interfacial (gas – líquido), determinados en este estudio se encuentran en el mismo orden que aquellos determinados por Rodas y col. (2005) en frascos de tipo Schott en agitación orbital. Al igual que en dicho trabajo, en los experimentos realizados en este estudio el k_{La} se redujo con los incrementos del volumen de llenado de los frascos. Por otro lado, el incremento del volumen se correlacionó claramente con una reducción de la densidad celular máxima. Estos datos, en conjunto, permiten inferir que en este sistema, como en otros sistemas de cultivo con

aireación superficial en frascos agitados, el oxígeno actuaría como un nutriente limitante, en forma estequiométrica, de la proliferación celular. El oxígeno tiene una muy baja solubilidad en medios acuosos, y lo que se consume en el seno de un cultivo debe reponerse continuamente por transferencia interfacial. Como esta transferencia es constante, y la demanda global de oxígeno crece a medida que se incrementa la densidad del cultivo, se alcanza un límite a partir del cual el abastecimiento resulta insuficiente para afrontar el incremento en el número de células, y por lo tanto la proliferación se interrumpe. Cuanto mayor es el volumen de cultivo contenido en un frasco, mayor será la cantidad total de células, y por lo tanto menor será el límite de densidad celular que es posible soportar sin interrumpir la proliferación celular. A esto debe sumarse, además, que a medida que aumenta el volumen de llenado, la cantidad de oxígeno que se transfiere a través de una superficie interfacial de área constante debe distribuirse en un volumen mayor, contribuyendo a la limitación global.

Por otro lado, debe observarse que, para un mismo volumen de llenado, los cultivos agitados a 100 rpm tendieron a alcanzar mayores densidades celulares que los que fueron realizados a 80 o 120 rpm. Una observación similar fue realizada por Kioukia y col. (1995), en cultivos de células Sf9 en frascos con agitación pendular, en los cuales alcanzaron densidades celulares más elevadas a 120 rpm que a velocidades de agitación superiores o inferiores, para un mismo volumen de cultivo. Este comportamiento podría ser consecuencia de una utilización más eficiente del oxígeno en aquellas condiciones de cultivo que permiten que las células expresen un mejor estado fisiológico, como sucede en los cultivos agitados a 100 rpm, cuando se los compara con aquellos agitados a menor o mayor velocidad.

El análisis de la información obtenida en este trabajo permitió predecir que la combinación de condiciones operativas mediante las cuales es posible alcanzar un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular corresponde, aproximadamente, a un volumen de llenado de 12 mL y una velocidad de agitación de 100 rpm. Este valor óptimo de la velocidad específica de proliferación, $0,02273 \pm 0,00052 \text{ h}^{-1}$, es similar al determinado por Gioria (2008) para la misma línea celular en cultivos con agitación pendular ($0,024 \text{ h}^{-1}$ en el medio TC-100 suplementado con suero y $0,026 \text{ h}^{-1}$ en el medio libre de suero UNL-8). Además, se encuentra en el orden de las que se determinaron en cultivos en suspensión de otras líneas de células de lepidópteros, como las líneas Sf-9, Sf-21, Tn-5 y TN-368 en distintos sistemas de cultivo (Hink, 1970; Vaughn y col. 1977; Rhiel y col., 1997). Esto demuestra que los cultivos en agitadores orbitales, una vez establecida la combinación óptima

de condiciones operativas, permiten obtener resultados similares a los alcanzados en otros sistemas de cultivo para células en suspensión.

La producción de cuerpos de oclusión del baculovirus de *Anticarsia gemmatalis*, en cultivos de células saUFL-AG-286 en suspensión con agitación orbital, también mostró ser sensible a los cambios en las condiciones operativas. De las tres combinaciones ensayadas en este estudio, aquella que resultó óptima en relación a la velocidad específica de proliferación en cultivos no infectados, fue también la que permitió alcanzar los niveles más elevados de producción viral. Un resultado similar se obtuvo en cultivos de células Sf9 cultivadas en frascos *spinner* e infectados con un baculovirus recombinante (Kioukia y col., 1995). De las otras dos condiciones ensayadas en este trabajo, los rendimientos más bajos se produjeron cuando la velocidad de agitación se incrementó 50% respecto al valor óptimo, incrementando por lo tanto el nivel de estrés mecánico, en cultivos en los que se observó una acelerada y precoz reducción de la viabilidad. Por otro lado, el efecto de reducción de la producción viral, y la caída de la viabilidad, resultaron menos marcados en cultivos en los cuales se redujo la velocidad de agitación y se incrementó el volumen de llenado, condición en la cual, de acuerdo al análisis realizado en los párrafos anteriores, se verifica una combinación de restricción de transferencia de oxígeno y mezclado insuficiente. Por lo tanto, si bien resulta necesario ajustarse a una combinación óptima de condiciones operativas para alcanzar los niveles más elevados de rendimiento viral, y cualquier cambio en estas condiciones óptimas determinará una reducción de la producción, el sistema parece ser más susceptible a los cambios que incrementan el estrés mecánico que a la restricción de oxígeno o al mezclado insuficiente, al menos dentro del rango de variación de condiciones operativas que fue abarcado en este estudio.

Para concluir, en el presente estudio se determinó que el comportamiento de los cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en frascos con agitación orbital en un medio libre de suero, tanto cuando no están infectados como cuando lo están, son sensibles a las variaciones de las condiciones operativas, la velocidad de agitación y el volumen de llenado. Se determinó la combinación óptima de condiciones que determina el máximo valor de la velocidad específica de proliferación, y se demostró que estas condiciones son también las que permitieron obtener los rendimientos más elevados de cuerpos de oclusión del virus AgMNPV. Los resultados obtenidos permiten establecer un sistema experimental optimizado, simple y económico, para avanzar en el desarrollo de procesos de producción de virus entomopatógenos en cultivos de células de insecto en suspensión.

~Capítulo 2~

IV.2.1. Introducción

Una de las principales plagas en los cultivos de soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), es eficientemente controlada con OBs del baculovirus insecticida *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (Carner y Turnipseed, 1977; Moscardi, 1999). Este insecticida es corrientemente producido en larvas infectadas del insecto blanco, en parcelas de cultivos de soja o en bio-fábricas (Szewczyk y col., 2006). Esta tecnología es robusta y económicamente competitiva cuando se la compara con el control químico, pero la demanda creciente de este bioinsecticida y las limitaciones para realizar el escalado de su producción han estimulado interés en el desarrollo de procesos alternativos basados en la propagación viral en cultivos de células de insecto (Rodas y col., 2005). Varios trabajos han descrito la producción de OBs de AgMNPV en cultivos celulares (Batista y col., 2005; Castro y col., 1997; Castro y col., 2006; Claus y col., 1993; Gioria y col., 2006; Grasela and McIntosh, 1998; Rodas y col., 2005; Visnovsky and Claus, 1994), pero las condiciones de producción y los rendimientos resultaron ser incompatibles con el desarrollo de una producción económicamente factible. Uno de los requisitos principales para lograr este objetivo es la selección de una estrategia optimizada para infectar cultivos celulares. Para tal fin, es necesario establecer primero un sistema experimental que permita llevar a cabo, de manera económica, la cantidad de experimentos requeridos para estudiar el efecto de las distintas variables que pueden afectar significativamente el rendimiento viral, y encontrar la combinación de valores óptimos de dichas variables significativas. La estrategia de producción de baculovirus en un cultivo batch de células de insecto es principalmente determinada por la selección de la ICD y la MOI. La MOI es definida como el número de unidades infecciosas por célula que son agregadas al cultivo al momento de la infección. La fracción de la población celular inicialmente infectada y la cinética de evolución de un cultivo infectado están directamente relacionadas a la MOI. Por otro lado, en un cultivo en lote de células de insecto infectado con baculovirus, la selección de la ICD determina la composición del medio de cultivo al tiempo de infección, como así también el estado fisiológico de la biomasa celular. Estos dos factores, ICD y MOI, interactúan entre ellos y pueden ser fácilmente manipulados para optimizar los rendimientos de virus (Licari and Bailey, 1992). Aunque la influencia de la ICD y la MOI ha sido bien establecida para una variedad de sistemas células de insecto-baculovirus destinados a la producción de proteínas recombinantes o cuerpos de oclusión virales, la combinación óptima de ambos parámetros debe ser establecido para cada sistema porque depende de las características de la línea celular de

insecto y de la capacidad nutricional del medio de cultivo a ser empleado en un determinado proceso de producción de un baculovirus o un producto recombinante (Wong y col., 1996; Yang y col., 1996).

La línea celular UFL-AG-286 ha mostrado ser altamente susceptible y permisiva a la infección con AgMNPV (Castro y col. 1997; Lynn, 2003; Sieburth and Maruniak, 1988b). Una subpoblación de la línea celular UFL-AG-286, capaz de crecer en cultivos en suspensión agitado ha sido aislada y caracterizada (Gioria y col., 2006). Una característica importante de estas células es que son productoras de amonio, un subproducto del metabolismo celular que puede afectar la replicación viral. Se ha desarrollado un nuevo medio libre de suero de bajo costo específicamente diseñado para la línea celular UFL-AG-286 (Gioria, 2008), pero la combinación óptima de la ICD y la MOI para la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos en suspensión de esta línea celular no ha sido establecida.

En este capítulo se investigaron los efectos de la variación de la ICD y la MOI sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos en suspensión de la línea celular UFL-AG-286. Para tal fin, se realizaron dos set de experimentos siguiendo un diseño factorial completo con punto central con el objetivo de comparar la evolución de cultivos infectados en dos rangos diferentes de multiplicidades de infección y densidades celulares iniciales. Los resultados obtenidos demuestran la importancia de una adecuada selección de los parámetros de infección para obtener altos rendimientos virales, y permiten obtener información acerca de los factores que limitan la producción de cuerpos de oclusión de AgMNPV en los cultivos libres de suero y en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286.

IV.2.2. Resultados

IV.2.2.1. Infecciones con altos valores de MOI (infecciones sincrónicas)

Los cultivos de células de insecto infectados con baculovirus usualmente expresan sus capacidades máximas de producción viral cuando la infección tiene lugar durante la fase temprana a intermedia de crecimiento exponencial. Por tal razón, para evaluar el potencial de producción de cuerpos de oclusión de AgMNPV en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en un medio libre de suero y, al mismo tiempo, determinar la influencia de los parámetros de infección ICD y MOI sobre el rendimiento viral, un diseño factorial completo (2^2) con un punto central fue llevado a cabo dentro de un rango de ICDs de 2 a 8×10^5 células.mL⁻¹ y un rango de MOI entre 5 y 15 DICC₅₀.célula⁻¹. El rango de valores de MOI se seleccionó para alcanzar un nivel de probabilidad de infección celular simultánea mayor que el 99% (infección sincrónica). Cada infección se realizó por duplicado. Un conjunto de cultivos en suspensión de la línea saUFL-AG-286 fue infectado con *stock* de AgMNPV a diferentes MOIs y tiempos de cultivo (para alcanzar las ICDs deseadas), de acuerdo al diseño experimental que se presenta en la Tabla IV.2.1. Esta tabla también presenta las respuestas determinadas para cada combinación de parámetros de infección. La evolución de los cultivos infectados se siguió hasta los cinco días post-infección; el recuento de células totales, viables y OBs fue determinado diariamente, así como también la concentración de amonio.

En la figura IV.2.1 puede observarse que los cultivos infectados con AgMNPV interrumpen su proliferación casi completamente después de la infección. Un control no infectado continuó proliferando hasta una densidad celular máxima de $2,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (dato no mostrado). La proliferación después de la infección fue afectada por los parámetros de infección: ésta fue nula en los cultivos que se infectaron con el valor más alto de MOI y el valor más bajo de ICD, mientras que los cultivos infectados con el valor más bajo de MOI y el más alto de ICD proliferó hasta una densidad celular máxima de células viables 26% mayor que la ICD. En esta figura, se puede observar la presencia de tres patrones diferentes de evolución en el tiempo. Cada patrón corresponde a una de los tres valores de ICD usada en este diseño: el valor más alto de ICD corresponde a la mayor MDCV alcanzada. El análisis de los coeficientes de regresión, mostrados en la Tabla IV.2.2.A., permite concluir que la MDCV fue significativamente afectada por ambos parámetros, y que la interacción entre ambos factores fue también estadísticamente significativa.

Tabla IV.2.1: Diseño experimental y respuestas observadas en el ensayo factorial completo con un punto central diseñado para estudiar las condiciones de infección (ICD y MOI), sobre las respuestas MDCV, R_{OB} y RE_{OB} en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectada sincrónicamente con el AgMNPV en un medio libre de suero.

| Ensayo | Factor | | | | Respuestas ^a | | |
|--------|---------------------------------------|----|--------------------------------|-----------------|--|---|---------------------------------------|
| | MOI ($DICC_{50} \cdot cel^{-1}$) | | ICD ($cel \cdot mL^{-1}$) | | MDCV ^b ($cel \cdot mL^{-1}$) | R_{OB} ($OBs \cdot mL^{-1}$) | RE_{OB} ($OBs \cdot cel^{-1}$) |
| 1 | -1 ^c | 5 | -1 | 2×10^5 | $2,49 \times 10^5 \pm 7,78 \times 10^3$ | $1,4 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^7$ | 562 ± 57 |
| 2 | +1 | 15 | +1 | 8×10^5 | $8,08 \times 10^5 \pm 6,51 \times 10^4$ | $3,28 \times 10^8 \pm 1,63 \times 10^7$ | 407 ± 53 |
| 3 | -1 | 5 | -1 | 8×10^5 | $1,12 \times 10^6 \pm 7,78 \times 10^4$ | $1,81 \times 10^8 \pm 9,89 \times 10^7$ | 160 ± 78 |
| 4 | +1 | 15 | +1 | 2×10^5 | $2,24 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^2$ | $1,22 \times 10^8 \pm 6,36 \times 10^6$ | 541 ± 30 |
| 5 | 0 | 10 | 0 | 5×10^5 | $6,02 \times 10^5 \pm 8,98 \times 10^4$ | $3,34 \times 10^8 \pm 7,78 \times 10^6$ | 561 ± 96 |

^aLos datos representan el promedio \pm SD de dos experimentos independientes. ^bDensidad máxima de células viables. ^cValor codificado de las variables.

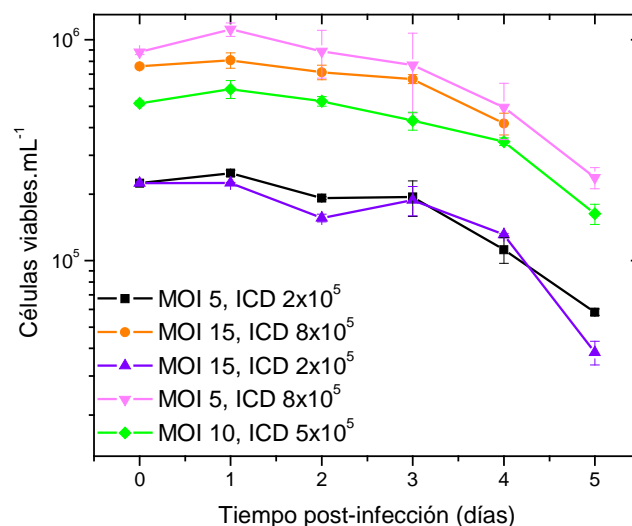


Figura IV.2.1: Evolución de la concentración de células viables durante la infección con AgMNPV de la línea saUFL-AG-286 en un medio libre de suero. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10 a 27°C, agitados a 100 rpm y fueron infectados sincrónicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.1.

Tabla IV.2.2: Análisis de los efectos principales y los efectos originados por la interacción de los factores MOI e ICD sobre las respuestas MDCV (A), R_{OB} (B), RE_{OB} (C) correspondientes al diseño factorial en el cual la línea celular saUFL-AG-286 se infectó sincrónicamente con AgMNPV.

| Factor | Coefficiente de regresión | Desviación estándar | Valor <i>t</i> | Valor <i>p</i> |
|--|---------------------------|----------------------|----------------|----------------|
| (A) ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) | 3,67x10 ⁵ | 1,81x10 ⁴ | 20,34 | < 0,0001* |
| MOI (5, 15) | - 7,8x10 ⁴ | 1,81x10 ⁴ | -4,32 | 0,0050* |
| ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) x MOI (5, 15) | -6,6x10 ⁴ | 1,81x10 ⁴ | -3,66 | 0,0106* |
| (B) ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) | 6,34x10 ⁷ | 2,99x10 ⁷ | 2,12 | 0,0785 |
| MOI (5, 15) | 3,21x10 ⁷ | 2,99x10 ⁷ | 1,07 | 0,3242 |
| ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) x MOI (5, 15) | 4,11x10 ⁷ | 2,99x10 ⁷ | 1,37 | 0,2184 |
| (C) ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) | -127,38 | 34,90 | -3,65 | 0,0107* |
| MOI (5, 15) | 56,88 | 34,90 | 1,63 | 0,1543 |
| ICD (2x10 ⁵ , 8x10 ⁵) x MOI (5, 15) | 67,38 | 34,90 | 1,93 | 0,1017 |

* Factores significativos (*p* < 0,05)

La magnitud de la acumulación de amonio en los sobrenadantes de cultivos infectados fue también afectada por los parámetros de infección (Figura IV.2.2). La concentración de amonio alcanzó un valor máximo de 12,60 mM en los cultivos infectados con la menor de las MOIs y la mayor ICD, mientras que la concentración alcanzada en los cultivos infectados al valor más alto de MOI y al valor más bajo de ICD resultó ser 6,79 mM.

La evolución de la producción de OBs como función del tiempo post-infección se observa en la figura IV.2.3. El pico de producción de OBs se verificó, en cada cultivo infectado, al segundo día post-infección. La velocidad inicial de acumulación de OBs fue más rápida en los cultivos infectados a mayor ICD. Los rendimientos máximos se alcanzaron entre

los días tres y cinco post-infección, y un valor promedio máximo de $3,3 \times 10^8$ OBs.mL⁻¹ se alcanzó en los cultivos correspondientes al punto central del diseño experimental, es decir aquellos infectados a una MOI de 10 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 5×10^5 células.mL⁻¹. El análisis de los coeficientes de regresión mostró que ninguno de los factores tuvo efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento de OBs (Tabla IV.2.2.B).

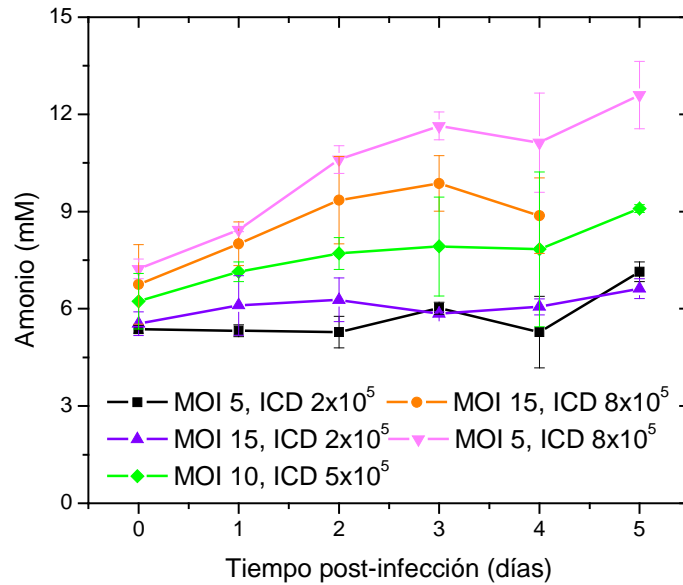


Figura IV.2.2: Cinética de la acumulación de amonio en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10 a 27°C y 100 rpm y fueron infectados sincronicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.1.

Por otro lado, cuando se analiza la influencia de la MOI y la ICD sobre el RE_{OB}, se puede observar que las células de los cultivos infectados con la menor ICD produjeron un promedio de 551 OBs.célula⁻¹, mientras que las células de los cultivos infectados con la mayor ICD produjeron, en promedio, 283 OBs.célula⁻¹. El análisis de los coeficientes de regresión confirmó que la ICD ejerció una influencia estadísticamente significativa sobre la producción específica de OBs, mientras que las variaciones en la MOI no tuvieron un efecto significativo sobre el RE_{OB}, como tampoco la interacción entre ambos factores (Tabla IV.2.2.C).

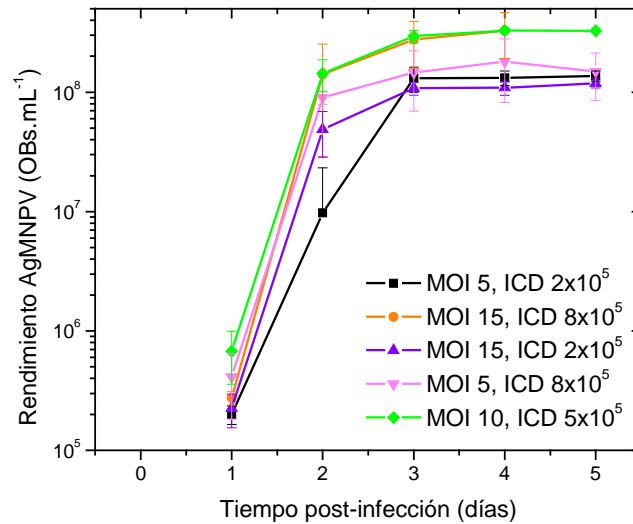


Figura IV.2.3: Cinética de la producción de OBs en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectada con AgMNPV. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10, a 27°C y 100 rpm, y fueron infectados sincronicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.1.

IV.2.2.2. Infecciones con bajos valores de MOI (infecciones asincrónicas)

El diseño previo permitió revelar la producción potencial de OBs de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286 en un medio libre de suero, como lo es el medio UNL-10. Sin embargo, las condiciones empleadas en dicho experimento no son útiles para establecer un proceso industrial, ya que la infección con elevados valores de MOI demanda una gran cantidad de *stock* viral, uno de los suministros más costosos en el proceso de producción de baculovirus en cultivos celulares.

Por tal motivo, se decidió evaluar la respuesta del sistema a la infección con AgMNPV a valores más bajo de MOI (infección asincrónica). Teniendo en cuenta que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño experimental previo, las células saUFL-AG-286 en el medio libre de suero reducen su capacidad específica de producción de OBs a medida que incrementa la ICD, y considerando que en cultivos infectados a baja MOI es previsible alcanzar mayores niveles de proliferación post-infección, se seleccionó para el nuevo diseño un rango de ICDs más baja que en el ensayo previo. Se evaluó un diseño factorial completo 2² con un punto central, dentro de un rango de ICDs entre 1,5 y 4,5 x 10⁵ células.mL⁻¹ y un rango de MOIs entre 0,1 y 1 DICC₅₀.célula⁻¹, de acuerdo al diseño presentado en la tabla IV.2.3, dónde se muestran además las respuestas de MDCV, R_{OB} y RE_{OB}.

Tabla IV.2.3: Diseño experimental y repuestas observadas en el ensayo factorial completo con un punto central diseñado para estudiar las condiciones de infección (ICD y MOI), sobre las repuestas MDCV, R_{OB} y RE_{OB} en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectada asincrónicamente con AgMNPV en un medio libre de suero.

| Ensayo | Factor | | | | Respuestas ^a | | |
|--------|---|------|--------------------------------|---------------------|--|--|--|
| | MOI (DICC ₅₀ .cel ⁻¹) | | ICD (cel.mL ⁻¹) | | MDCV ^b (cel.mL ⁻¹) | R _{OB} (OBs.mL ⁻¹) | RE _{OB} (OBs.cel ⁻¹) |
| 1 | -1 ^c | 0,1 | -1 | 1,5x10 ⁵ | 4,45x10 ⁵ ± 2,12x10 ⁴ | 2,86x10 ⁸ ± 7,28x10 ⁷ | 639 ± 134 |
| 2 | +1 | 1 | +1 | 4,5x10 ⁵ | 7,56x10 ⁵ ± 2,12x10 ⁵ | 2,41x10 ⁸ ± 3,82x10 ⁷ | 539 ± 146 |
| 3 | -1 | 0,1 | +1 | 4,5x10 ⁵ | 1,26x10 ⁶ ± 3,11x10 ⁵ | 6,17x10 ⁷ ± 4,69x10 ⁷ | 54 ± 49 |
| 4 | +1 | 1 | -1 | 1,5x10 ⁵ | 2,60x10 ⁵ ± 1,34x10 ⁴ | 1,83x10 ⁸ ± 1,91x10 ⁷ | 705 ± 109 |
| 5 | 0 | 0,55 | 0 | 3x10 ⁵ | 5,73x10 ⁵ ± 2,16x10 ⁵ | 2,94x10 ⁸ ± 7,80x10 ⁷ | 524 ± 61 |

^aLos datos representan el promedio ± SD de dos experimentos independientes. ^bDensidad máxima de células viables. ^cValor codificado de las variables.

La figura IV.2.4 muestra que todos los cultivos proliferaron después de la infección, pero en esta ocasión no es posible observar patrones comunes de evolución entre los diferentes cultivos. Como era de esperar, el porcentaje de proliferación después de la infección fue mayor que el observado en el diseño previo, variando entre 26 y 203 % con respecto a las ICDs. Los niveles más altos de proliferación se alcanzaron en los cultivos infectados con las MOIs menores, con un promedio de 188 %, mientras que en los cultivos infectados con los valores más elevados de MOI, la proliferación promedio fue de 71 %. La densidad de células viables máxima fue afectada tanto por las variaciones de MOI como por las de ICD. Mientras, que el incremento de la ICD determinó incrementos en la MDCV, el efecto de la MOI fue el opuesto. El análisis estadístico mostró que ambos parámetros tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la MDCV, y que la interacción entre ambos factores no resultó significativa (Tabla IV.2.4.A).

Tabla IV.2.4: Análisis de los efectos principales y los efectos originados por la interacción de los factores MOI e ICD sobre las respuestas MDCV (A), R_{OB} (B), RE_{OB} (C) correspondientes al diseño factorial en el cuál la línea celular saUFL-AG-286 se infectó asincrónicamente con AgMNPV.

| Factor | Coefficiente de regresión | Desviación estándar | Valor <i>t</i> | Valor <i>p</i> |
|--|---------------------------|----------------------|----------------|----------------|
| (A) ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) | 3,37x10 ⁵ | 7,26x10 ⁴ | 5,12 | 0,0022* |
| MOI (0,1; 1) | - 1,91x10 ⁵ | 6,57x10 ⁴ | -2,64 | 0,0387* |
| ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) x MOI (0,1 ; 1) | -8,86x10 ⁴ | 7,26x10 ⁴ | -1,22 | 0,2680 |
| (B) ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) | -4,84x10 ⁷ | 2,86x10 ⁷ | -1,87 | 0,1112 |
| MOI (0,1 ; 1) | 2,02x10 ⁷ | 2,59x10 ⁷ | 0,71 | 0,5062 |
| ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) x MOI (0,1 ; 1) | 7,94x10 ⁷ | 2,86x10 ⁷ | 2,77 | 0,0323* |
| (C) ICD ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) | -240,19 | 41,95 | -6,32 | 0,0007* |
| MOI (0,1 ; 1) | 93,33 | 38,00 | 2,22 | 0,0678 |
| ICD (1,5x10 ⁵ ; 4,5x10 ⁵) x MOI (0,1; 1) | 64,44 | 41,95 | 1,54 | 0,1754 |

* Factores significativos ($p < 0,05$)

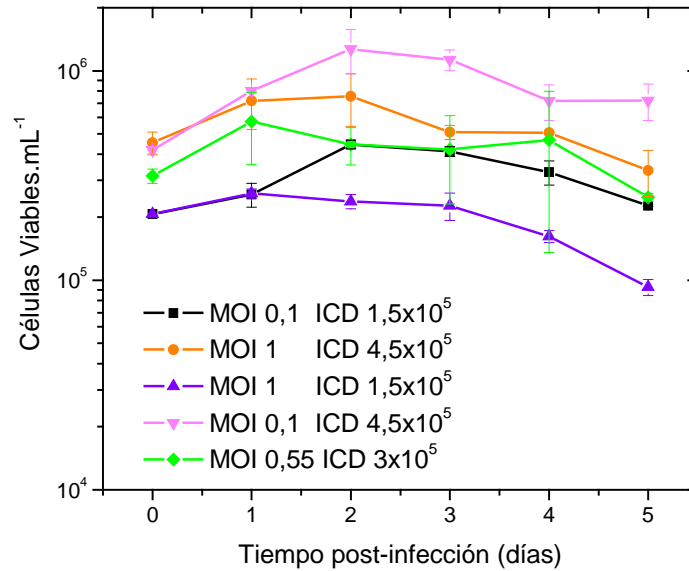


Figura IV.2.4: Evolución de las células viables durante la infección con AgMNPV de la línea saUFL-AG-286 en un medio libre de suero. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10, a 27°C y 100 rpm, y fueron infectados asincrónicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.3.

El incremento en el nivel de proliferación de estos cultivos fue acompañado por un incremento en la acumulación de amonio en los sobrenadantes de cultivos infectados (Figura IV.2.5). La cantidad de amonio acumulado se relacionó con la densidad celular inicial: los cultivos que fueron infectados al mayor valor de ICD tendieron a acumular concentraciones de amonio más altas (promedio de 14,74 mM), que aquellos que fueron infectados a valores menores (promedio de 7,70 mM). La velocidad inicial de acumulación de OBs en este ensayo fue menor que en los cultivos infectados a alta MOI, especialmente en aquellos cultivos infectados a una MOI de 0,1 (Figura IV.2.6). Los rendimientos máximos se alcanzaron entre los días cinco y seis post-infección. Los valores promedios de R_{OB} variaron entre $6,17 \times 10^7$ OBs.mL⁻¹, en cultivos infectados con una MOI de 0,1 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de $4,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹, y $2,94 \times 10^8$ OBs.mL⁻¹, en cultivos correspondientes al punto central del diseño (MOI: 0,55 DICC₅₀.célula⁻¹, ICD: 3×10^5 células.mL⁻¹). Tal como ocurrió en el primer diseño experimental, no se observó efecto significativo por parte de la MOI y la ICD sobre la R_{OB} , aunque se reveló una interacción significativa entre ambos parámetros de infección (Tabla IV.2.4.B). El RE_{OB} también decreció con el incremento de la ICD: mientras que las células de cultivos infectados a una ICD de $1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ produjeron en promedio 672 OBs.cel⁻¹,

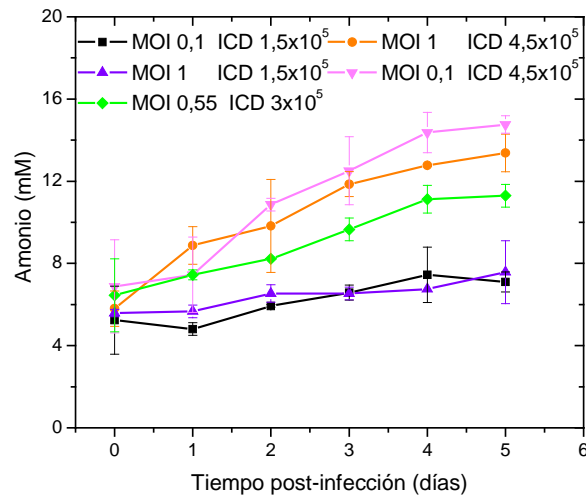


Figura IV.2.5: Cinética de la acumulación de amonio en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en un medio libre de suero. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10, a 27°C y 100 rpm, y fueron infectados asincrónicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.3.

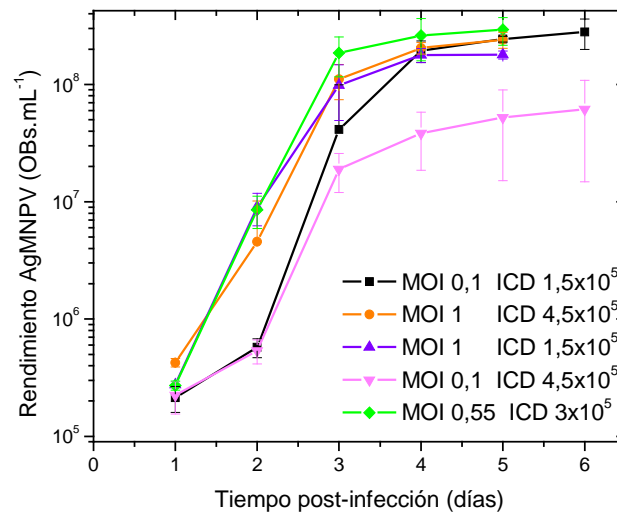


Figura IV.2.6: Cinética de la producción de OBs en cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en un medio libre de suero. Los cultivos se desarrollaron en frascos de 125 mL conteniendo 12 mL del medio libre de suero UNL-10, a 27°C y 100 rpm, y fueron infectados asincrónicamente con diferentes combinaciones de ICD y MOI, siguiendo el diseño experimental mostrado en la tabla IV.2.3.

aquellos cultivos infectados a una ICD de $4,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ produjeron en promedio 297 OBs.célula⁻¹. Por otro lado, el incremento en la MOI se asoció con un leve incremento en RE_{OB}. El análisis de los coeficientes de regresión mostró que la ICD tuvo una incidencia significativa sobre el RE_{OB}, mientras que la influencia de la MOI no evidenció significación estadística (Tabla IV.2.4.C).

IV.2.2.3. Modelado y optimización estadística de la producción del AgMNPV

Dada la similitud en el comportamiento de la MDCV con respecto a la influencia de los parámetros de infección en cultivos infectados sincrónica y asincrónicamente, se evaluó la posibilidad de representar la influencia de la MOI y la ICD sobre la MDVC a través de la regresión lineal múltiple de todos los datos obtenidos en ambos diseños factoriales completos. De esta manera, se obtuvo un modelo estadísticamente significativo (Tabla IV.2.5), representado por la siguiente ecuación que hace posible estimar el valor de la MDCV como función de los valores asignados a los parámetros MOI e ICD.

$$\text{MDCV} = 2,04 \times 10^5 - 2,24 \times 10^4 \text{MOI} + 1,27 \text{ICD} \quad (\text{IV.2.1})$$

Tabla IV.2.5: ANOVA del modelo aplicado para MDCV^a como función de MOI e ICD de acuerdo a los datos obtenidos en los experimentos en los cuales, los cultivos de células saUFL-AG-286 fueron infectados con AgMNPV sincrónica o asincrónicamente en el medio libre de suero UNL-10.

| Origen de la variación | DF ^b | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor <i>F</i> | Valor <i>p</i> |
|------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 2 | $1,53 \times 10^{12}$ | $7,67 \times 10^{11}$ | 49,114 | < 0,0001 |
| Residual | 17 | $2,50 \times 10^{11}$ | $1,56 \times 10^{10}$ | | |
| Lack of fit | 7 | $1,49 \times 10^{11}$ | $2,13 \times 10^{10}$ | 1,904 | 0,1815 |
| Error Pure | 10 | $1,01 \times 10^{11}$ | $1,12 \times 10^{10}$ | | |
| Total | 19 | $1,78 \times 10^{12}$ | | | |

^a $r^2 = 0,86$; r^2 ajustado = 0,84; ^b Grados de libertad

MDCV podría constituir un elemento unificador para representar la variación de R_{OB} y RE_{OB}. Confirmando esta presunción, cuando la RE_{OB} es representada contra la MDCV, los patrones de respuesta obtenidos en ambos ensayos factoriales son casi coincidentes (Figura IV.2.7.A). Esta figura permite observar que la capacidad celular para producir OBs fue reducida linealmente con el incremento de la MDCV. Por otro lado, cuando R_{OB} es representado como función de la MDCV (Figura IV.7.B), puede notarse que los patrones obtenidos en ambos factoriales son también coincidentes. Los rendimientos más altos de OBs

tendieron a concentrarse en aquellos cultivos cuyas MDCV alcanzaron valores de entre 4 y 8×10^5 células.mL⁻¹. Un rendimiento promedio de $3,05 \times 10^8$ OBs.mL⁻¹ se alcanzó en estos cultivos, mientras que en los cultivos con valores de MDCV fuera del rango referido anteriormente, se alcanzó un rendimiento promedio de $1,43 \times 10^8$ OBs.mL⁻¹. La relación entre el R_{OB} y la MDCV puede ser ajustado a través de un modelo polinomial de tercer orden, el cual hace posible estimar el valor de R_{OB} a través de la siguiente ecuación de regresión:

$$R_{OB} = -2,42 \times 10^8 + 2,12 \times 10^3 MDCV - 2,42 \times 10^{-3} MDCV^2 + 7,57 \times 10^{-10} MDCV^3 \quad (IV.2.2)$$

El test de Fisher rindió una alta significación para la regresión (Tabla IV.2.6).

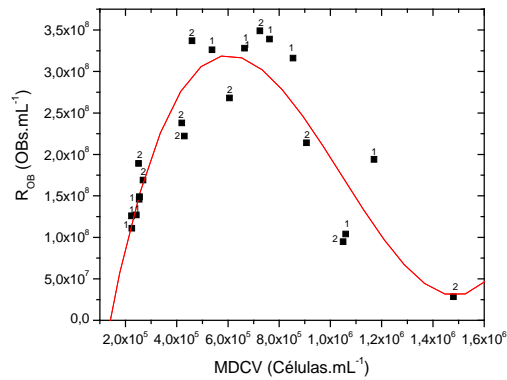
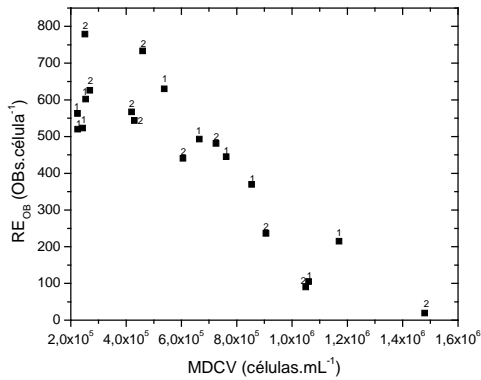


Figura IV.2.7.A: RE_{OB} vs. MDCV obtenidos en cultivos en suspensión de la línea saUFL-AG-286 infectadas con AgMNPV con diferentes combinaciones de MOI e ICD en el medio libre de suero. (1) Datos correspondientes a los experimentos en que los cultivos fueron infectados sincrónicamente. (2) Datos correspondientes a los experimentos en que los cultivos fueron infectados asincrónicamente.

Figura IV.2.7.B: R_{OB} vs. MDCV obtenidos en cultivos en suspensión de la línea saUFL-AG-286 infectadas con AgMNPV con diferentes combinaciones de MOI e ICD en el medio libre de suero. (1) Datos correspondientes a los experimentos en que los cultivos fueron infectados sincrónicamente. (2) Datos correspondientes a los experimentos en que los cultivos fueron infectados asincrónicamente.

A partir de las ecuaciones (IV.2.1) y (IV.2.2), se obtiene la ecuación (IV.2.3), que permite estimar el rendimiento de OBs de AgMNPV en función de los valores asignados a los parámetros MOI e ICD.

$$R_{OB} = 9.54 \times 10^7 - 2.76 \times 10^7 \times MOI + 1.56 \times 10^3 \times ICD - 1.11 \times 10^2 \times MOI \times ICD - 9.85 \times 10^5 \times MOI^2 - 3.15 \times 10^{-3} \times ICD^2 + 1.46 \times MOI^2 \times ICD - 8.25 \times 10^{-5} \times MOI \times ICD^2 - 8.63 \times 10^3 \times MOI^3 + 1.54 \times 10^{-9} \times ICD^3 \quad (IV.2.3)$$

Tabla IV.2.6: ANOVA del modelo aplicado para R_{OB}^a como función de MDCV de acuerdo a los datos obtenidos en los experimentos en los cuáles las células saUFL-AG-286 fueron infectadas sincrónica y asincrónicamente con AgMNPV en el medio libre de suero UNL-10.

| Origen de la variación | DF ^b | Suma de cuadrados | Cuadrados medio | Valor <i>F</i> | Valor <i>p</i> |
|------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 3 | 1,36x10 ¹⁷ | 4,52x10 ¹⁶ | 15,287 | < 0,0001 |
| Residual | 16 | 4,74x10 ¹⁶ | 2,96x10 ¹⁵ | | |
| Total | 19 | 1,83x10 ¹⁷ | | | |

^a $r^2 = 0.74$; r^2 ajustado = 0.69; ^b Grado de libertad

Con el objetivo de validar el modelo, y al mismo tiempo verificar la reproducibilidad de los rendimientos de OBs en diferentes lotes de medio libre de suero, las infecciones se llevaron a cabo usando dos combinaciones diferentes de ICD y MOI, como se muestra en la tabla IV.2.7, realizándose cada experimento por duplicado. En la misma tabla se presentan los rendimientos de OBs de AgMNPV y los valores predichos de acuerdo al modelo. Como se puede observar, los rendimientos alcanzados bajo ambas condiciones experimentales son muy similares a los estimados por el modelo. Los resultados de estos experimentos de validación demostraron la utilidad del modelo para establecer una combinación de parámetros de infección que permita maximizar el rendimiento de OBs de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286 infectadas en diferentes lotes de medio de cultivo libre de suero.

Tabla IV.2.7: Validación del modelo. Dos diferentes combinaciones de MOI e ICD se ensayaron por duplicado, en cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en el medio libre de suero UNL-10.

| ICD (cel.mL ⁻¹) | MOI (DICC ₅₀ .cel ⁻¹) | R_{OB}^a (OBs.mL ⁻¹) | R_{OB} predicha ^b (OBs.mL ⁻¹) |
|--------------------------------|---|--|---|
| 4,50x10 ⁵ | 10 | 2,29x10 ⁸ ±4,17x10 ⁷ | 3,23x10 ⁸ |
| 2,51x10 ⁵ | 0,5 | 3,20x10 ⁸ ±1,70x10 ⁷ | 3,20x10 ⁸ |

^a Representa el promedio ± desviación estándar de dos experimentos independientes.

^b Valor calculado de acuerdo a la ecuación (IV.2.3).

IV.2.3. Discusión

Los resultados de este estudio demostraron que los cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en un nuevo medio de cultivo libre de suero pueden producir altos rendimientos de OBs de AgMNPV. Los rendimientos de OBs obtenidos en estos experimentos, llevados a cabo bajo diferentes condiciones de infección, fueron mayores que los alcanzados anteriormente para el mismo virus. Claus y col. (1993), en cultivos estáticos de la línea celular IPLB-Sf-21, obtuvieron rendimientos de hasta $3,15 \times 10^7$ OBs.mL⁻¹ empleando el medio de cultivo TC-100, conteniendo suero o emulsión de yema de huevo. Visnovsky y Claus (1994), en cultivos en suspensión de la misma línea celular en un medio conteniendo suero alcanzaron un rendimiento máximo de 2×10^7 OBs.mL⁻¹. Grasela y McIntosh (1998), ensayaron la replicación de AgMNPV en cultivos estáticos de siete líneas celulares diferentes, en diferentes medios conteniendo suero, produciendo OBs en sólo dos de ellas con un rendimiento máximo de $7,5 \times 10^6$ OBs.mL⁻¹ en la línea BCIRL-HV-AM1. Batista y col. (2005), en cultivos en suspensión de la línea celular Sf9 en diferentes medios de cultivo, obtuvieron rendimientos de $1,80 \times 10^7$ OBs.mL⁻¹. Rodas y col. (2005), por otro lado, alcanzaron rendimientos máximos de 2×10^8 OBs.mL⁻¹ en cultivos de la línea celular Sf9 en el medio comercial libre de suero Sf900 II. Gioria y col. (2006), empleando cultivos en suspensión de la línea saUFL-AG-286, pero en el medio de cultivo TC-100 conteniendo suero, alcanzó un rendimiento máximo de $5,8 \times 10^7$ OBs.mL⁻¹. El rendimiento máximo de OBs alcanzado en este trabajo fue al menos 60% mayor que el máximo rendimiento obtenido previamente para el mismo virus en cultivos de células. Además, el rendimiento de OBs de AgMNPV alcanzado en este estudio es comparable a los obtenidos durante la producción de OBs de otros baculovirus en cultivos de células de insecto (Chakraborty y col., 1999; McKenna y col., 1997; Lua y Reid, 2000; Lua y Reid, 2003; Pedrini y col., 2006).

Los altos rendimientos que se alcanzaron en muchas de las condiciones que fueron testeadas en este trabajo son producto de una muy alta capacidad individual de las células infectadas para producir OBs. En el 90 % de los experimentos realizados en este trabajo, el rendimiento específico de OBs estuvo por encima de 100 OBs por célula, con un valor máximo superior a 700 OBs por célula. Esta alta capacidad específica para producir OBs de AgMNPV parece ser una característica propia de la línea celular saUFL-AG-286 en lo que concierne a la replicación de este virus, ya que en otros trabajos publicados, los cuales fueron realizados en cultivos en suspensión de otras líneas celulares, los rendimientos específicos de OBs fueron consistentemente más bajos que los alcanzados en estos experimentos (Batista y

col., 2005; Rodas y col., 2005; Visnovsky y Claus, 1994). La alta capacidad de la línea celular UFL-AG-286, predecesor de la línea celular saUFL-AG-286, para replicar el AgMNPV ha sido documentado previamente (Castro y col., 1997; Lynn, 2003).

Otro factor a tener en cuenta para explicar los altos rendimientos de OBs obtenidos, es el medio de cultivo. La infección con AgMNPV de la misma línea celular saUFL-AG-286 en el medio TC-100 conteniendo suero permitió alcanzar un rendimiento específico de 64 OBs por célula (Gioria y col., 2006), menos que la mitad del promedio alcanzado en este trabajo bajo condiciones similares de infección. En suma, se puede concluir que el alto rendimiento específico de OBs de AgMNPV en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 sería una consecuencia de la aptitud intrínseca de las células para replicar un virus al cuál ellas son naturalmente susceptibles y permisivas, y de un medio de cultivo apto para sostener la replicación viral y la producción de OBs.

El análisis estadístico muestra que el rendimiento específico de OBs fue influenciado estadísticamente sólo por la ICD y que no fue afectado por las variaciones de la MOI (Tablas IV.2.2.C y IV.2.4.C). El incremento de la ICD se asoció con la reducción del rendimiento específico de OBs. El efecto ICD sobre el rendimiento específico puede explicarse por su influencia estadísticamente significativa sobre la MDCV (Tablas IV.2.2.A y IV.2.4.A), y también por la relación lineal entre el incremento de la MDCV y la reducción de RE_{OB} que puede observarse en la figura IV.2.7.A. Este fenómeno es similar al bien conocido “efecto densidad celular”, el cuál limita la replicación del virus (Wood y col., 1982), y la producción de proteínas recombinantes (Taticek y Shuler, 1997; Wong y col., 1996; Yang y col., 1996), en el sistema células de insecto-baculovirus, cuando los cultivos celulares son infectados con una alta densidad celular. Varias razones, incluyendo la depleción de nutrientes (Bédard y col., 1994; Elías y col., 2000), acumulación de metabolitos tóxicos (Taticek y Shuler, 1997), factores autócrinos y distribución del ciclo celular (Braunagel y col., 1998; Doverskog y col., 2000; Calles y col., 2006), han sido propuestas para explicar el “efecto densidad celular”, pero las causas permanecen sin ser identificadas. Una limitación nutricional no parece ser una explicación razonable para la continua declinación del RE_{OB} del AgMNPV con el incremento de la MDCV de cultivos de células saUFL-AG-286, si se considera que el efecto se intensifica desde muy bajas densidades celulares, cuando es prácticamente imposible que exista carencia de algún nutriente relevante para la replicación viral y la producción de OBs. Una explicación alternativa es que este efecto podría ser causado por la acumulación de productos metabólicos tóxicos para células animales, tales como lactato y amonio, los cuáles podrían interferir con la replicación viral. Los cultivos de células saUFL-AG-286 no acumulan lactato pero, en su

lugar, excretan amonio (Gioria y col., 2006). Este último es un inhibidor de la replicación de baculovirus y la expresión de proteínas recombinantes (Taticek y Shuler, 1997). La figura IV.2.8 muestra como el incremento de la concentración de amonio en cultivos de células se correlaciona con la reducción del rendimiento específico de poliedros. Esto constituye un fuerte argumento a favor del rol de amonio como un inhibidor de la producción de OBs de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286. Sin embargo experimentos adicionales serían necesarios para determinar si la reducción de la capacidad celular de producir OBs es una consecuencia del incremento en la concentración de amonio.

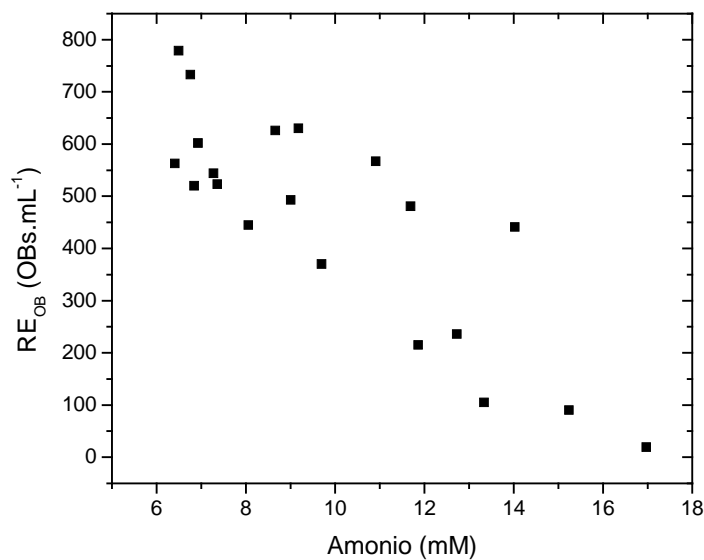


Figura IV.2.8: RE_{OB} vs. la concentración de amonio acumulado en los sobrenadantes de cultivos de la línea saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV con diferentes combinaciones de MOI e ICD en un medio libre de suero.

A pesar de la reducción continua del RE_{OB} de AgMNPV asociado al incremento de la máxima densidad celular en cultivos de células saUFL-AG-286, el rendimiento volumétrico decayó sólo en cultivos con una densidad celular máxima superior a 8×10^5 células.mL⁻¹, y también incrementó su concentración conforme al aumento de la MDCV, cuando ésta se encontró en el rango entre $2,5$ y 4×10^5 células.mL⁻¹, como se muestra en la figura IV.2.7.B. Este comportamiento puede explicarse por el balance entre el incremento en el número de células productoras de OBs y la reducción de su capacidad de producción individual. Cuando la MDCV alcanza valores entre 4 y 8×10^5 células.mL⁻¹, el incremento en el número de células productoras se equilibra con la reducción del rendimiento específico, y el rendimiento volumétrico permanece casi constante en su máximo valor. Con el objetivo de alcanzar

rendimientos volumétricos de OBs máximos, es necesario seleccionar condiciones de infección, las cuáles permitan que el cultivo de células saUFL-AG-286 infectado con AgMNPV alcance un valor de MDCV que se encuentre dentro del rango de valores que se menciona con anterioridad, ya que valores de MDCV mayores o menores determinarían un rendimiento volumétrico sub-óptimo.

Por medio de la relación encontrada entre el rendimiento volumétrico y la MDCV, por un lado, y entre ésta última con la MOI y la ICD por otro, fue posible obtener una ecuación que relaciona el rendimiento volumétrico con los parámetros de infección. Es importante remarcar que la MDCV permite introducir un parámetro unificador para el análisis del comportamiento de este sistema de infección por baculovirus, que es independiente del rango de trabajo de las condiciones de infección. Además, permite predecir el rendimiento de OBs en un proceso de producción bajo cualquier combinación de los parámetros de infección. Si bien, el concepto de introducir MDCV como un elemento unificador podría generalizarse al modelado empírico de cualquier sistema de producción de OBs, o de proteínas recombinantes, en cultivo de células de insecto (Wong y col., 1996), el modelo específico aquí desarrollado sólo puede ser aplicado a la producción de OBs de AgMNPV en cultivos suspensión de células saUFL-AG-286 en el nuevo medio libre de suero que se utilizó en este trabajo.

Una consecuencia importante que deriva de los resultados obtenidos en este trabajo, y se refleja en el modelo, es que diferentes combinaciones de los parámetros de infección MOI e ICD puede determinar la misma MDCV, y en consecuencia, el mismo rendimiento volumétrico de OBs. Cualquier combinación de estos parámetros que permitan alcanzar una MDCV dentro del rango de 4 y 8×10^5 células.mL⁻¹, permitirá obtener un rendimiento de OBs máximo, lo cuál fue demostrado en los experimentos que validan el modelo. Otra consecuencia importante es que es posible alcanzar máximos rendimientos de OBs por infección temprana de los cultivos a una baja MOI. Los cultivos infectados bajo estas condiciones minimizan el consumo de *stock* viral necesario para comenzar la infección. Se demostró en este trabajo que es posible reducir el consumo del *stock* viral en un 97%, seleccionando la combinación de la MOI y la ICD, sin afectar el rendimiento volumétrico final de poliedros. En un proceso de producción a mayor escala de un baculovirus insecticida, la preparación de la cantidad de viriones brotados necesaria para infectar el reactor de producción, requiere una secuencia de etapas sucesivas de amplificación viral, desde el *stock* hasta la inoculación del reactor, en un proceso paralelo a la amplificación del cultivo celular, con un impacto significativo sobre la economía global del proceso (Rhodes, 1996). Además, la estabilidad genética del virus puede ser comprometida a través de sucesivas rondas de

amplificación, afectando finalmente tanto el rendimiento del proceso como la calidad del producto (Krell, 1996; Lua y col., 2002; Soares de Rezende y col., 2009). Por esta razón, la reducción de la cantidad de virus requerido para iniciar el proceso de infección impacta positivamente, tanto sobre la factibilidad económica del proceso como sobre la calidad del producto.

Para concluir, en el presente capítulo se demostró que la infección de cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 con AgMNPV en un medio de bajo costo, libre de suero, permite obtener rendimientos de OBs superiores a 3×10^8 OBs.mL⁻¹. El análisis de la influencia de los parámetros de infección mostró que la capacidad específica de producción de OBs y el rendimiento volumétrico dependieron principalmente de la MDCV, y que ésta última depende de la selección de la ICD y la MOI. A partir de los análisis de regresión de los resultados obtenidos, se obtuvo un modelo empírico, el cuál resultó útil para establecer la combinación de los parámetros de infección que permiten obtener un rendimiento máximo de OBs con el menor consumo de *stock* viral. Estos resultados podrían contribuir al desarrollo de un proceso factible, técnica y económicamente, para producir insecticidas virales en cultivos celulares de insectos lepidópteros.

~Capítulo 3~

IV.3.1. Introducción

La factibilidad económica de la producción de baculovirus insecticidas en cultivos celulares depende del desarrollo de procesos que permitan obtener elevadas productividades de cuerpos de oclusión, usando un medio de bajo costo, en reactores robustos, escalables y bien caracterizados, aplicando estrategias operacionales optimizadas. El desarrollo del sistema de expresión basado en la infección de células de insectos con baculovirus ha impulsado la realización de una gran cantidad de estudios destinados a evaluar la aplicación de distintos tipos de reactores y diferentes estrategias de operación a la producción de proteínas recombinantes en ese sistema de expresión (Jäger, 1996; Hu y col., 2003; Lu y col., 2005; Lecina y col., 2006; Negrete y col., 2007; Carinhas y col., 2010). Si bien la información obtenida en esos estudios puede ser aplicada al desarrollo de procesos de producción de poliedros insecticidas, existen algunas limitaciones en la extrapolación que resulta necesario especificar. Una de estas limitaciones, tal vez la más importante desde un punto de vista económico, es que la magnitud de la escala requerida para la producción de un insecticida, por definición un *commoditie*, no permite adoptar determinadas configuraciones de reactor (Hu y col., 2003; Lu y col., 2005; Negrete y col., 2007; Weber y col., 2002) o estrategias de operación (Jäger, 1996), aplicables a la producción en menor escala de *specialities* de alto valor unitario, como las proteínas recombinantes. Siguiendo la misma línea de análisis, el hipotético establecimiento en la industria de agrobiológicos de un proceso de producción de un insecticida viral en cultivos celulares podría resultar más factible si dicho proceso hace uso de las capacidades fermentativas ya instaladas. En este sentido, la tecnología de fermentación más impuesta en la industria productora de agrobiológicos es el clásico reactor tipo tanque agitado, provisto con turbinas de paletas planas tipo *Rushton*, aireado por burbujeo, y adaptado a la propagación de cultivos bacterianos y fúngicos operados en lote. Alternativamente, por el bajo nivel relativo de inversión de capital requerido y por su probada adaptabilidad al cultivo de células frágiles a gran escala, los reactores de tipo *airlift* podrían resultar también atractivos para la producción industrial de baculovirus insecticidas.

Las características estructurales de las células de insecto son un fuerte condicionante para el desarrollo de estrategias de escalamiento de sus cultivos. La carencia de pared celular y su tamaño relativamente grande tornan a las células de insecto extremadamente frágiles cuando son expuestas al estrés derivado de la agitación mecánica (Wu, 1995). Por otro lado, la energía disipada localmente por la ruptura de burbujas es un importante factor determinante

de daño sobre la membrana plasmática, y por lo tanto también de la lisis celular (Wu, 1995; Chisti, 2000). Además, si bien la demanda específica de oxígeno de las líneas celulares de insecto es similar a la de las células de mamíferos (Son y col., 2005), la demanda global es usualmente más elevada debido a que, bajo condiciones similares, las concentraciones celulares máximas son típicamente más altas en cultivos de células de insecto que en cultivos de células de mamíferos (Palomares y Ramírez, 1998). La interacción de estas tres características implica un serio problema a resolver en el escalamiento de estos cultivos, ya que los procedimientos disponibles para asegurar una adecuada transferencia de masa y un suministro suficiente de oxígeno pueden dañar la integridad celular (Aloi y Cherry, 1996; Mitchell-Logean y Murhammer, 1997). La operación de volúmenes apenas superiores a las decenas de mililitros hace necesaria, por un lado, la implementación de dispositivos mecánicos o neumáticos que permitan efectuar un eficiente mezclado y una adecuada transferencia de masa, estableciendo un ambiente espacialmente homogéneo, y por otro lado torna insuficiente la oxigenación por mera transferencia desde la superficie, exigiendo la implementación de estrategias de transferencia de oxígeno en profundidad, ya sea por burbujeo, los más simples y difundidos, o mediante mecanismos libres de burbujas (Schneider y col., 1995), aunque éstos últimos, hasta el momento, están muy limitados en sus posibilidades de escalamiento. Por esta razón, el principal objetivo en el diseño e ingeniería de un bio-reactor para un proceso que haga uso de cultivos de células de insecto es mantener los niveles de estrés generados en el equipo dentro del rango permitido para el proceso biológico, mientras son reducidas al mismo tiempo las limitaciones para la transferencia de masa (Visnovsky y col., 2003).

Los antecedentes sobre el tema descriptos en la literatura demuestran la factibilidad del cultivo de algunas líneas de células de insectos lepidópteros en reactores de tipo tanque agitado, aireados por burbujeo. Por ejemplo, Mitchell-Logean y Murhammer (1997) describieron el uso de un STR de 3 L, conteniendo una turbina de tipo hélice marina para el cultivo de las líneas celulares Sf-9 y High Five. Maranga y col. (2004), por otro lado, escalaron el cultivo de la línea celular Sf 21 en dos STRs de diferente volumen con turbinas del tipo *Rushton*. Los parámetros obtenidos en los reactores de 2 y 25 L alcanzaron valores similares a los obtenidos en los cultivos realizados a menor escala en frascos agitados. Por su parte, Wong y col. (1996), Maranga y col. (2004), Meghrouy y col. (2005), y Negrete y col. (2007), utilizaron este tipo de reactor para la producción de distintos productos recombinantes

en cultivos de células derivadas de *Spodoptera frugiperda*, demostrando en todos los casos que el escalado fue eficiente en lo que respecta al rendimiento del producto de interés.

En cambio, las referencias publicadas en relación a la utilización de reactores de tipo *airlift* para el cultivo de células de lepidópteros, y su aplicación a la producción de baculovirus o proteínas recombinantes, son mucho más escasas, a pesar que la utilización de reactores *airlift* presenta grandes ventajas en comparación a los reactores tanque, ya que poseen una mejor transferencia de masa y la fuerza de circulación del líquido no es provista por un único punto focal de energía, lo que hace que al *shear* generado sea más homogéneo. Maiorella y col. (1988) utilizaron un reactor *airlift* para escalar la producción de GM-CSF en cultivos de células Sf-9 en un medio libre de suero, adicionado de Pluronic F-68. Kumar y col. (1995) utilizaron un reactor de este tipo, con un volumen de 14 litros, para producir fosfatasa alcalina recombinante en cultivos de la línea celular BTI-TN-5B1-4. Por otro lado, Visnovsky y col. (2003) evaluaron la utilización de reactores *airlift* concéntricos de diferente diseño para la propagación de la línea celular Sf-21 en un medio de cultivo suplementado con suero.

La línea celular UFL-AG-286 fue establecida originalmente en forma de cultivos adherentes estacionarios (Sieburth y Maruniak, 1988a). Mediante selección de células que tendían a proliferar aisladas en suspensión, se pudieron establecer cultivos agitados de la sub-línea saUFL-AG-286 en *spinner-flasks* con 50 mL de volumen de trabajo, con aireación superficial, en un medio suplementado con suero, en los cuales se pudo replicar al virus AgMNPV (Gioria y col., 2006). Sin embargo, aún es desconocido el potencial de esta línea celular para ser cultivada en las condiciones de estrés que imperan en bio-reactores, como así también su aptitud para replicar AgMNPV y producir poliedros insecticidas en esas condiciones. El objetivo de este capítulo fue evaluar la factibilidad del escalado de cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en reactores, como así también evaluar la posibilidad de alcanzar rendimientos industrialmente relevantes de cuerpos de oclusión del virus AgMNPV en cultivos libres de suero, de bajo costo, de la misma línea celular. Para esto se caracterizaron dos reactores de configuración estándar, y posteriormente se estudiaron la proliferación celular y la replicación viral en cada uno de los sistemas utilizados.

IV.3.2. Resultados

IV.3.2.1. Cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 en bio-reactores

Con el objetivo de estudiar las posibilidades de escalar el cultivo de esta línea celular se emplearon los dos reactores caracterizados precedentemente. Los volúmenes operativos fueron 800 y 380 mL para el reactor tanque agitado y el *airlift*, respectivamente. Se llevaron a cabo, como control, cultivos en frascos agitados empleando 12 mL de medio UNL-10. En la figura IV.3.1 se puede observar la evolución de las células totales y viables. Tanto para el STR como para el frasco agitado, durante las primeras 48 horas de cultivo, se observó una etapa durante la cual, las células proliferaron a una velocidad específica menor, mientras que en el reactor *airlift* esta fase *lag* no se produjo y las células, una vez en el reactor, iniciaron la proliferación exponencial a la máxima velocidad de duplicación. Con respecto a las densidades celulares, se puede observar que en el reactor con agitación neumática se alcanzó la concentración de células más elevada, 31% y 41% superior a las densidades alcanzadas en el frasco agitado y el STR, respectivamente. La viabilidad celular fue superior al 90% durante todo el cultivo en el *airlift*, mientras que en el frasco y el STR la viabilidad estuvo entre el 82 y el 93%.

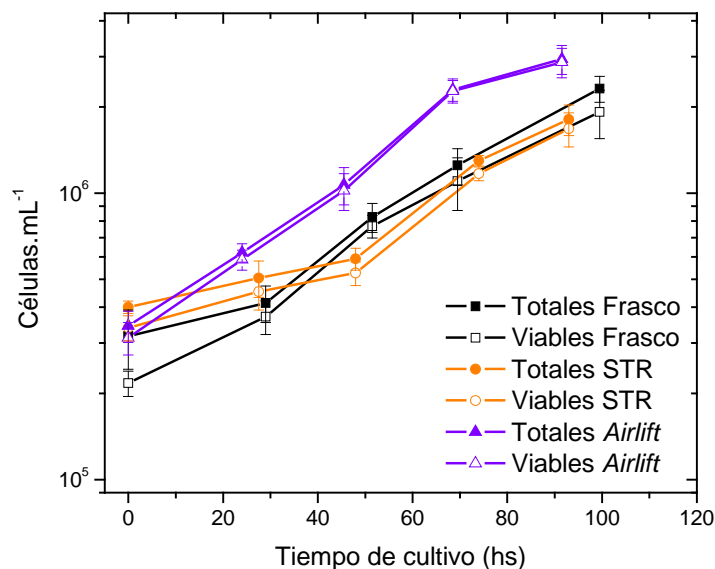


Figura IV.3.1: Proliferación de la línea celular saUFL-AG-286 en diferentes sistemas de cultivos utilizando el medio UNL-10. Se partió de una densidad celular de 3×10^5 células viables.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

En el caso del STR, dada su configuración, fue posible evaluar el consumo de oxígeno durante el cultivo. La demanda global durante el cultivo se grafica en la figura IV.3.2, pudiéndose observar que el incremento en el requerimiento de oxígeno acompañó la proliferación celular. El consumo específico de oxígeno tuvo un pico máximo de $3,17 \times 10^{-8} \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cel}^{-1}$ a las 48 horas de cultivo. En los días posteriores a este máximo, el consumo específico de oxígeno se redujo aproximadamente un 32 % (Figura IV.3.3).

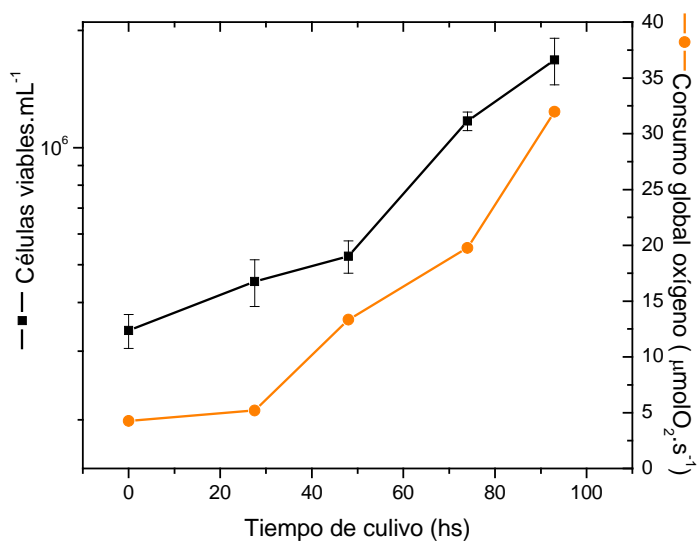


Figura IV.3.2: Evolución de la concentración de células viables de la línea celular saUFL-AG-286 y su demanda global de oxígeno en función del tiempo de cultivo en el STR en el medio UNL-10 a 27°C. La densidad celular inicial fue de 3×10^5 células $\cdot \text{mL}^{-1}$.

Con el objetivo de caracterizar el perfil nutricional y metabólico de los cultivos de células saUFL-AG-286 en bio-reactores, se determinó la concentración de glucosa en los sobrenadantes de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de cultivo. Como se puede observar en la figura IV.3.4, en los tres cultivos se verificó consumo del carbohidrato, aunque en ninguno de los casos se agotó. La velocidad de consumo específico de glucosa evolucionó de manera diferente en los tres sistemas durante los primeros dos días de cultivo, pero a partir del tercer día el comportamiento resultó similar (Figura IV.3.5). Por otro lado, cuando se analiza el rendimiento celular en función del consumo de glucosa en la fase de crecimiento exponencial de los cultivos, se observa que el menor rendimiento se obtuvo en el cultivo en el

frasco agitado, mientras que la mayor cantidad de células por mmol de glucosa consumida se alcanzó en el reactor *airlift* (Figura IV.3.6).

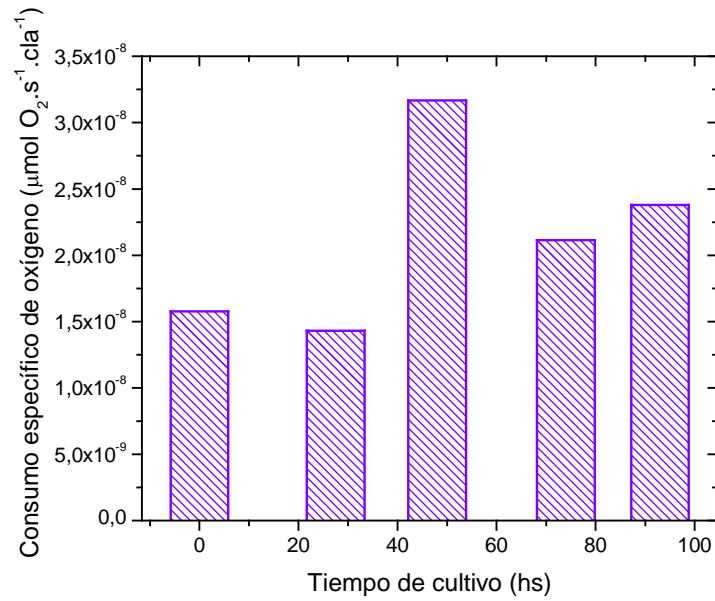


Figura IV.3.3: Consumo específico de oxígeno de la línea celular saUFL-AG-286 en cultivo en suspensión realizado en el STR conteniendo 800mL del medio UNL-10. La densidad celular inicial fue de 3×10^5 células.mL⁻¹, y se incubó a 27°C.

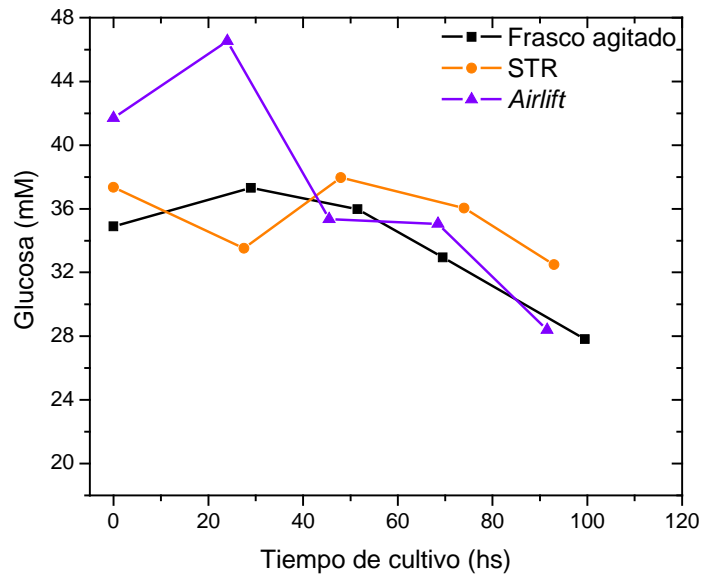


Figura IV.3.4: Evolución de la concentración de glucosa en los diferentes sistemas de cultivo de la línea saUFL-AG-286 en el medio UNL-10. Los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 3×10^5 células.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

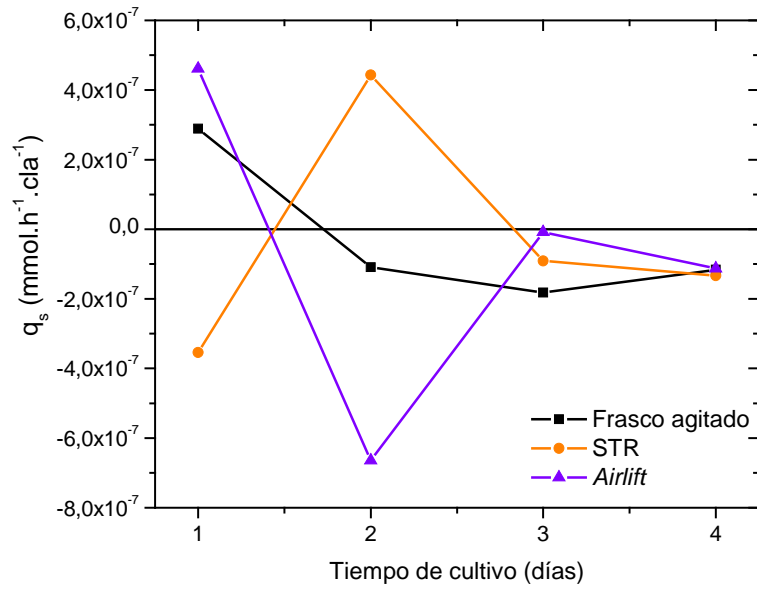


Figura IV.3.5: Velocidades específicas de consumo de glucosa de la línea celular saUFL-Ag-286 (q_s), en los diferentes sistemas de cultivos en el medio UNL-10. Los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 3×10^5 células.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

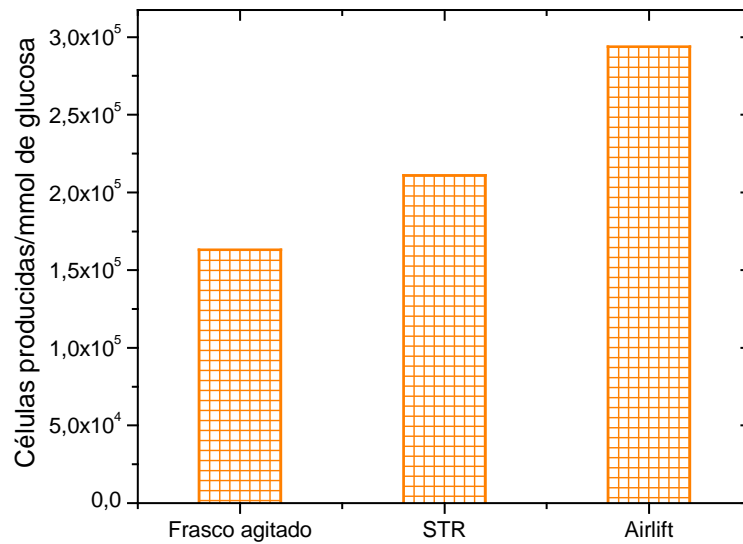


Figura IV.3.6: Rendimiento celular por mmol de glucosa consumido en cultivos agitados de la línea celular saUFL-AG-286 realizados en diferentes sistemas de cultivo en el medio UNL-10. Los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 3×10^5 células.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

En los sobrenadantes de las muestras tomadas diariamente se evaluó también la acumulación de amonio. La concentración de amonio fue aumentando en los tres cultivos, aunque con distintas velocidades. En la figura IV.3.7 se puede observar, además, que la concentración final de este metabolito se mantuvo entre 6 y 7 mM para los tres sistemas.

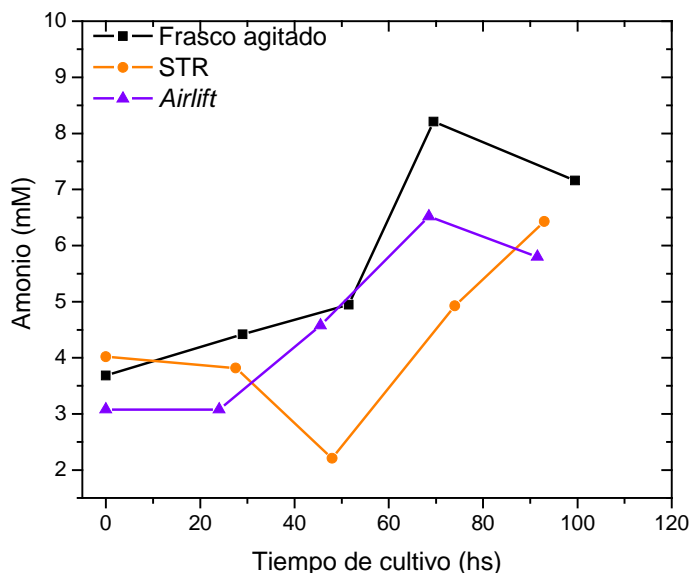


Figura IV.3.7 Evolución de la concentración de amonio en cultivos agitados de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio UNL-10. Los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 3×10^5 células.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

En la tabla IV.3.1 se presentan los parámetros que caracterizaron a los tres sistemas de cultivo. En la misma se observa que la mayor velocidad específica de crecimiento se alcanzó en el reactor *airlift*, y por lo tanto el menor tiempo de duplicación, siendo este parámetro un 10 y un 18 % menor que en el STR y en el frasco agitado, respectivamente. A pesar de alcanzar un tiempo de duplicación menor, la MDCV alcanzada en el reactor tanque agitado resultó menor que en el frasco de 12 mL. La MDCV del *airlift* resultó 1,7 y 1,5 veces mayor que las alcanzadas en el STR y en el frasco agitado, respectivamente. En este reactor, el rendimiento de células en función de los milimoles de glucosa consumido fue también superior. Por su parte, la producción de amonio por célula fue, en promedio, 37,4% más elevada en los cultivos en frasco agitado y STR, en comparación con el cultivo en el reactor *airlift*.

Tabla IV.3.1: Parámetros obtenidos en los cultivos de la línea saUFL-AG-286 realizados en diferentes sistemas en el medio UNL-10. Los cultivos tuvieron una densidad celular inicial de 3×10^5 células.mL⁻¹ y se incubaron a 27°C.

| Parámetro | Frasco agitado | STR | Airlift |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| μ (h ⁻¹) | 0,02411 | 0,02610 | 0,02862 |
| Tiempo de duplicación (h) | 28,70 | 26,55 | 24,21 |
| MDCV (cel. viables.mL ⁻¹) | $1,92 \times 10^6$ | $1,68 \times 10^6$ | $2,87 \times 10^6$ |
| Cel. producidas/mmol de glucosa | $1,63 \times 10^5$ | $2,11 \times 10^5$ | $2,94 \times 10^5$ |
| mmol Amonio/cel. | $3,54 \times 10^{-9}$ | $3,55 \times 10^{-9}$ | $2,22 \times 10^{-9}$ |

IV.3.2.2. Infección de la línea celular saUFL-AG-286 en bio-reactores

Luego de estudiar las características particulares del cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en los diferentes sistemas, se procedió a analizar la infección de la misma con el baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* en los dos reactores y en el frasco agitado. La infección se realizó a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y a una ICD de 3×10^5 células.mL⁻¹, condiciones que fueron seleccionadas de acuerdo a los experimentos de optimización para cultivos en frascos agitados que fueron referidos en el capítulo 2 del apartado *Resultados y Discusión*. Para seguir la evolución de los cultivos se tomaron muestras diariamente, en las cuales se determinó la densidad celular (células totales y células viables), y las concentraciones de glucosa y amonio en los sobrenadantes. Además, se determinó la evolución de la producción de poliedros virales y el título de viriones brotados en función del tiempo post-infección.

Como se observa en la figura IV.3.10, los cultivos celulares no detuvieron su proliferación luego de la infección, con excepción del reactor *airlift* que mantuvo la densidad celular aproximadamente constante. Luego de las 70 horas post-infección, en los tres sistemas decayó abruptamente la concentración de células viables. El cultivo control, realizado en frasco agitado a 100 rpm en un agitador orbital, proliferó hasta una densidad celular máxima 24% y 61 % superior a las alcanzadas en el reactor tanque agitado y en el reactor *airlift*, respectivamente.

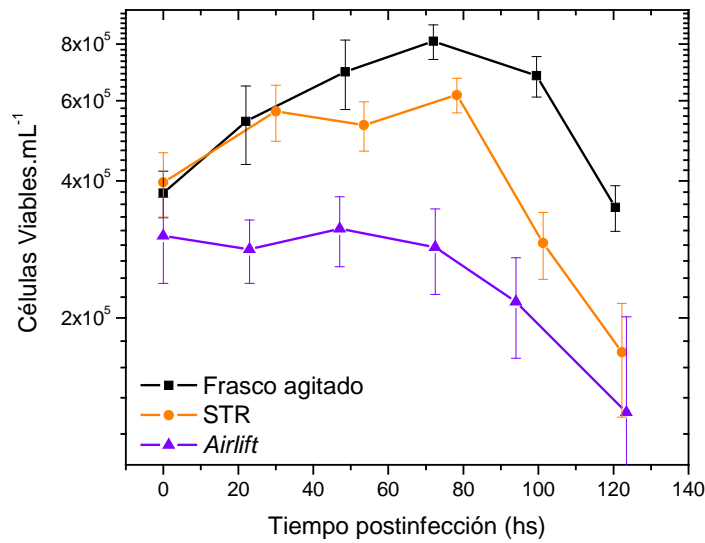


Figura IV.3.10: Proliferación celular de los cultivos de la línea saUFL-AG-286 en el medio UNL-10, infectados con AgMNPV en diferentes sistemas de cultivo. Los cultivos se incubaron a 27°C y se infectaron con una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

Como era de espera debido al nivel de proliferación post-infección, el mayor consumo de glucosa se verificó en el cultivo infectado en frasco agitado, mientras que en el *airlift* no se detectó consumo de carbohidrato (Figura IV.3.11).

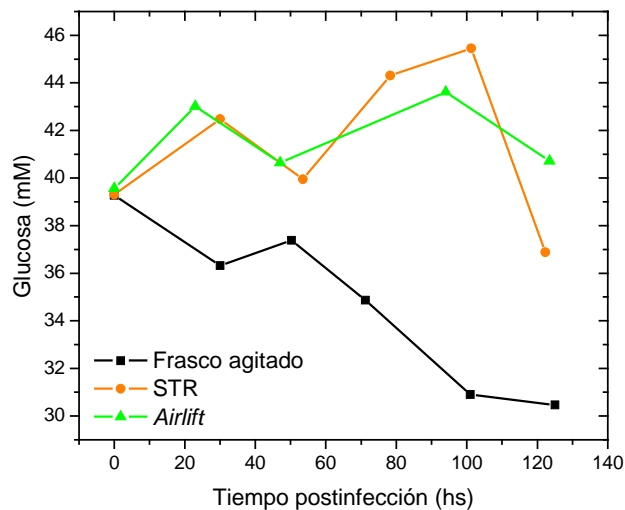


Figura IV.3.11: Evolución de la concentración de glucosa en los diferentes sistemas de cultivo de células saUFL-AG- 286 infectados con AgMNPV. Los cultivos se incubaron a 27°C y se infectaron con una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

En la figura IV.3.12 se observa que, en el cultivo realizado a pequeña escala, la glucosa fue consumida a una velocidad casi constante durante el desarrollo de la infección, sin que se observaran variaciones importantes. En cambio, se apreciaron oscilaciones notables de la velocidad específica de consumo de glucosa en los cultivos realizados en ambos reactores, principalmente en el reactor *airlift*. Considerando que la densidad celular en este reactor permaneció constante en el valor inicial, estas oscilaciones en la velocidad de consumo de glucosa responden a cambios en el patrón de consumo/secreción de glucosa que ya fueron advertidos precedentemente en cultivos de la línea saUFL-AG-286 (Gioria, 2008) y otras líneas de células de lepidópteros (Ferrance y col., 1993; Drews y col., 1995; Doverskog y col., 1997).

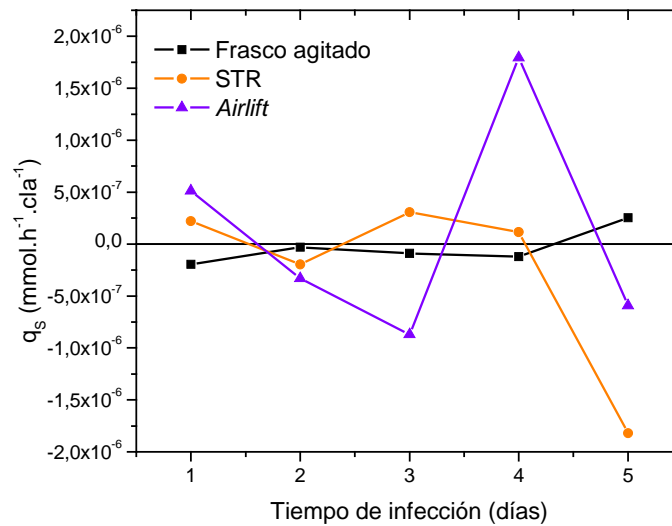


Figura IV.3.12: Velocidades de consumo específico de glucosa (q_s), en los diferentes sistemas de cultivo de células saUFL-AG-286 infectadas con AgMNPV. Los cultivos se incubaron a 27°C y se infectaron con una MOI de $0,5 \text{ DIC}_{50}\cdot\text{célula}^{-1}$ y una ICD de $3 \times 10^5 \text{ células viables}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Con respecto a la acumulación de amonio, se observó que en los cultivos realizados en el STR y el frasco agitado, la concentración de este metabolito fue incrementando hasta alcanzar un valor máximo de 9 mM para el primero y de 10,9 mM para el segundo cultivo. Por último, la concentración final en el *airlift* fue sólo levemente superior (3,90 mM) a la concentración de inicio del cultivo (Figura IV.3.13).

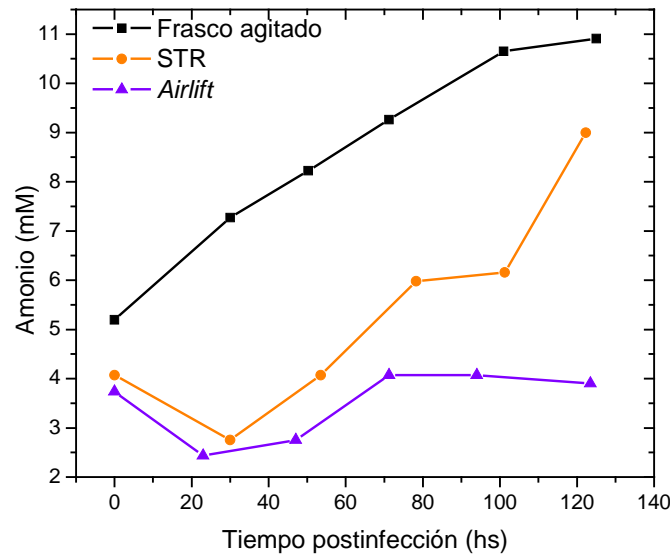


Figura IV.3.13: Evolución de la concentración de amonio en cultivos agitados de la línea celular saUFL-AG-286 infectadas con AgMNPV. Los cultivos se realizaron en el medio UNL-10 a 27°C y se infectaron con una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

La evolución de la producción de poliedros virales en función del tiempo se muestra en la figura IV.3.14. Los primeros pre-poliedros virales se observaron a las 24 horas post-infección en los cultivos llevados a cabo en los bio-reactores, mientras que en la botella su aparición fue evidente recién a partir de las 48 horas. Posteriormente, se produjo un incremento sostenido de la producción de poliedros en los tres sistemas, que se extendió hasta aproximadamente las 96 horas post-infección. A partir de allí, la velocidad de producción de los cuerpos de oclusión decayó significativamente y el recuento permaneció casi constante. La producción volumétrica alcanzada en los bio-reactores fue similar, aproximadamente 2x10⁸ OBs.mL⁻¹, mientras que en pequeña escala la concentración máxima alcanzada fue de 2,49x10⁸ OBs. mL⁻¹, casi 25% superior a la obtenida en los reactores.

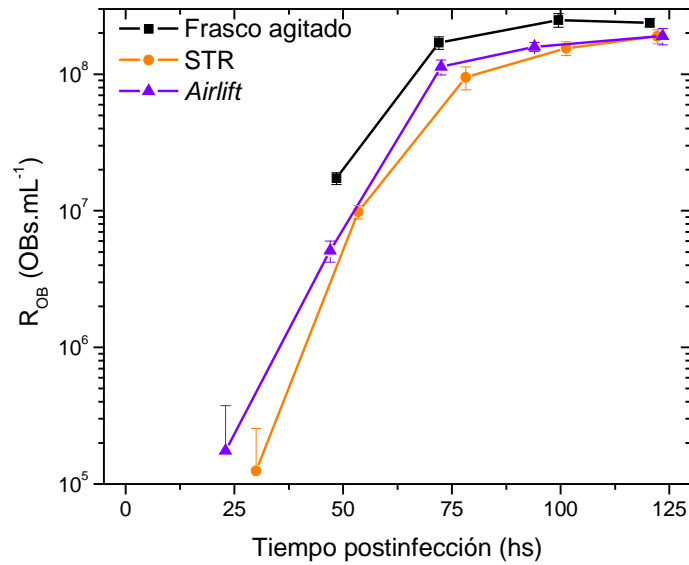


Figura IV.3.14: Rendimiento volumétrico de poliedros en función del tiempo de infección de los cultivos agitados de la línea celular saUFL-AG-286. Los cultivos se realizaron en el medio UNL-10 a 27°C y se infectaron con AgMNPV a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

La MDCV alcanzada en el frasco agitado resultó ser 1,3 y 2,6 veces mayor que en los reactores tanque agitado y *airlift*. Sin embargo, la capacidad celular específica para producir poliedros fue superior en este último reactor, en el cual cada célula produjo 49 y 52 % más de poliedros que cada célula infectada en el STR y en el frasco agitado, respectivamente (Tabla IV.3.4).

Tabla IV.3.4: Parámetros obtenidos en los diferentes cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV. Los cultivos se realizaron en el medio UNL-10 a 27°C y se infectaron a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

| | Frasco agitado | STR | <i>Airlift</i> |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| MDCV (cel. viables.mL ⁻¹) | 8,11x10 ⁵ | 6,18x10 ⁵ | 3,14x10 ⁵ |
| R _{OB} (pol.mL ⁻¹) | 2,49x10 ⁸ | 1,89x10 ⁸ | 1,90x10 ⁸ |
| RE _{OB} (pol.cel ⁻¹) | 307 | 306 | 605 |

La evolución del título de virus brotado en función del tiempo de infección se muestra en la figura IV.3.15. Como puede observarse, la aparición de los viriones brotados fue más evidente en el cultivo realizado en el frasco agitado, en dónde a partir de las 22 horas aumentó su concentración considerablemente. La cinética de acumulación de este fenotipo viral en el STR presentó una velocidad de producción menor al cultivo realizado en frasco agitado; sin embargo, al final del cultivo, alcanzó concentraciones del mismo orden que las obtenidas en pequeña escala. En el reactor *airlift*, en cambio, el título de BVs comenzó a incrementarse recién luego de las 23 horas post-infección, alcanzando el pico máximo a las 94 horas luego de inoculado el virus en el reactor; además, el título máximo de BVs alcanzado en el reactor *airlift* resultó dos órdenes de magnitud inferior a los obtenidos en el frasco agitado y en el STR.

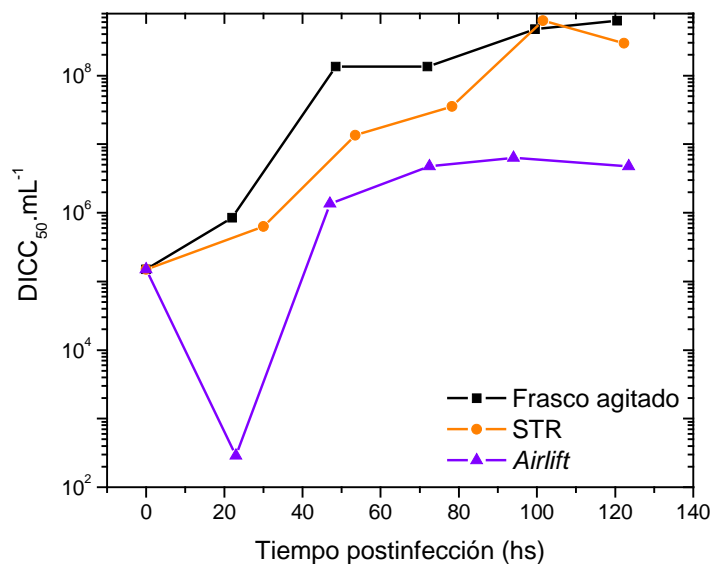


Figura IV.3.15: Evolución de viriones brotados en función del tiempo de infección de los cultivos agitados de la línea celular saUFL-AG-286. Los cultivos se realizaron en el medio UNL-10 a 27°C y se infectaron con AgMNPV a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3x10⁵ células viables.mL⁻¹.

La adsorción del virus a la célula es una etapa determinante de la velocidad con que transcurre el proceso de infección, y seguramente afecta la cinética de producción viral. Por esta razón se estudió como evolucionó la adsorción viral en los dos reactores utilizados en este trabajo. Los cultivos celulares, a una densidad inicial de 3x10⁵ células.mL⁻¹, se infectaron con el AgMNPV a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹. Se tomaron muestras a distintos tiempos

durante las primeras cinco horas de cultivo, determinándose la concentración de viriones brotados en los respectivos sobrenadantes. La evolución del porcentaje de adsorción viral en función del tiempo post-infección está representado en la figura IV.3.16. En la misma se observa que, a excepción de unos pocos puntos, la cinética de adsorción sigue un patrón similar en ambos cultivos. En el cultivo realizado en el STR luego de las cinco horas de cultivo se adsorbió un 98,7% del inóculo viral inicial, mientras que, en el reactor *airlift* la adsorción viral fue del 99,8%. Al analizar la adsorción viral durante la primera hora del ensayo, puede verse que la velocidad de adsorción fue mayor en el reactor *airlift*. El análisis de los datos obtenidos a partir de ambos cultivos, permite concluir que la infección del cultivo en el reactor *airlift* fue más efectiva, ya que las células detuvieron su desarrollo luego de la infección, y la MDCV alcanzada fue menor. En el STR, las células continuaron proliferando luego de la infección, alcanzando una MDCV de $6,18 \times 10^5$ células viables.mL⁻¹, lo que produjo un incremento del 55,6% respecto a la densidad celular inicial.

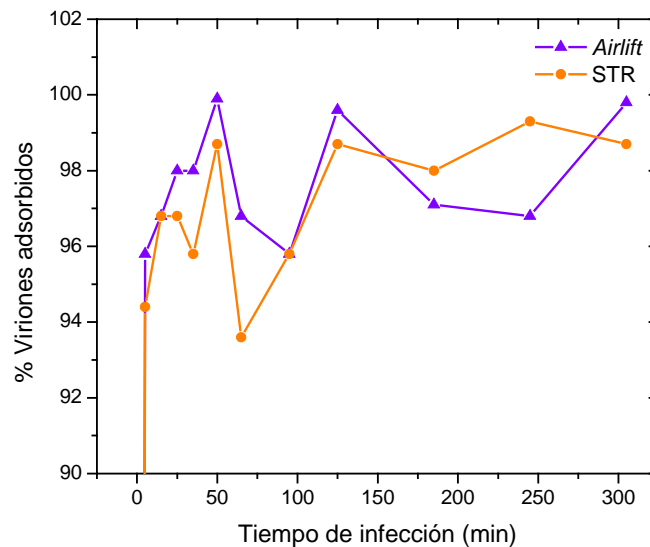


Figura IV.3.16: Cinética de adsorción viral en los cultivos en suspensión agitados de la línea celular saUFL-AG-286. Los cultivos se realizaron en el medio UNL-10 a 27°C y se infectaron con AgMNPV a una MOI de 0,5 DICC₅₀.célula⁻¹ y una ICD de 3×10^5 células viables.mL⁻¹.

IV.3.3. Discusión

El escalado del cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 se realizó utilizando dos reactores estándares, uno de ellos con agitación neumática y el otro con agitación mecánica. Previo a este trabajo existía un conocimiento limitado respecto a la factibilidad del escalado de cultivos en suspensión de esta línea celular en reactores, en contraste con el estudio intensivo de las líneas Sf21, Sf9 y “High Five”, en una gran variedad de modelos de reactor y escalas de trabajo, debido a su aplicación en distintos procesos de producción de proteínas recombinantes (Wong y col., 1995; Maranga y col., 2004; Gotoh y col., 2004; Lecina y col., 2006). Como la línea celular saUFL-AG-286 es un candidato para el desarrollo de un proceso de producción de un bioinsecticida viral, un producto de valor unitario sensiblemente inferior que el de una proteína recombinante de uso diagnóstico, terapéutico o vacunal, la selección de los modelos de reactor incluidos en este estudio se llevó a cabo considerando la accesibilidad a la potencial inversión requerida por parte de la industria de agrobiológicos. Es así que se seleccionaron un reactor de tipo tanque agitado, de uso habitual en la referida industria para el cultivo de bacterias, configurado y operado como tal, y un reactor de tipo *airlift*, de construcción sencilla y económica, y desprovisto de instrumentación. En paralelo, se llevaron a cabo cultivos en frascos con agitación orbital, en las condiciones óptimas establecidas en el capítulo 1.

La velocidad específica de proliferación celular y la densidad celular máxima alcanzaron sus valores más elevados en el cultivo de células saUFL-AG-286 llevado a cabo en el reactor *airlift*, inclusive más elevados que en el control efectuado a escala reducida en frasco agitado. El valor obtenido para el primer parámetro es significativamente mayor que el alcanzado por Gioria y col. (2006), en cultivos en medio suplementado con suero en frascos tipo *spinner*, y también ligeramente más alto que el referido por Gioria (2008) para cultivos en los mismos frascos, pero en un medio libre de suero de composición similar al utilizado en esta tesis. Debe remarcarse además que, luego de la inoculación, las células comenzaron a proliferar inmediatamente en forma exponencial, no observándose la presencia de una fase *lag*, con una velocidad específica que se mantuvo casi constante, en su valor máximo, hasta las 72 hs. de cultivo. Si se considera que los parámetros de un cultivo son determinados, en última instancia, por el estado fisiológico promedio de las células individuales que lo componen, la ausencia de una fase *lag*, y el valor y la constancia de la velocidad específica de proliferación, como así también la muy elevada viabilidad, revelan la calidad del estado

fisiológico de las células saUFL-AG-286 durante su cultivo en el reactor *airlift*. Por otro lado, el elevado rendimiento de células en glucosa alcanzado en el mismo reactor, y la reducida producción específica de amonio, en comparación con los otros sistemas evaluados, constituyen evidencias acerca de la eficiencia metabólica alcanzada por las células saUFL-AG-286 durante su cultivo en este reactor. Una de las ventajas de los reactores *airlift* frente al clásico reactor tipo tanque agitado radica en que, por las características particulares de la dinámica del fluido en el reactor, se pueden alcanzar altas tasas de transferencia de masa, con un mínimo gradiente de fuerzas de corte (Chisti, 1989). De esta manera, si la geometría y la operación del reactor *airlift* son apropiadas, se puede obtener una adecuada transferencia de oxígeno, en un ambiente homogéneo y de reducida exposición a focos de estrés mecánico. Los parámetros de cultivo y metabólicos ponen en evidencia, entonces, que el diseño del reactor *airlift* utilizado, así como las condiciones de operación, son apropiadas para sostener la proliferación de la línea celular saUFL-AG-286, y además, que esta línea puede ser cultivada en reactores con agitación neumática, en presencia de burbujas. En este sentido, la línea celular saUFL-AG-286 demuestra similares aptitudes que la línea Sf-21 (Visnovsky y col., 2003).

La densidad celular máxima alcanzada en el cultivo en el reactor *airlift* resultó más elevada que la obtenida en los otros dos sistemas evaluados en este trabajo, y apenas ligeramente inferior (10 - 20%) respecto a las obtenidas en frascos con agitación pendular, en el mismo medio de cultivo (Gioria, 2008) y en un medio suplementado con suero fetal (Gioria y col., 2006). Estos valores de densidad celular máxima, aproximadamente entre 3 y $3,5 \times 10^6$ células viables por mL de cultivo, son significativamente inferiores a los alcanzados en cultivos de células Sf9 y Sf21. Por ejemplo, Maranga y col. (2004) alcanzaron una densidad celular de 6×10^6 células.mL⁻¹ al cultivar un clon de la línea celular Sf21 en el medio libre de suero Sf900II en reactores de tipo tanque agitado de 2 y 25 litros; por su parte, Pamboukiam y col. (2008) obtuvieron una concentración máxima de $10,7 \times 10^6$ células.mL⁻¹ al cultivar la línea celular Sf9 en un bio-reactor de un litro, utilizando el mismo medio de cultivo; y Rodas y col. (2005), alcanzaron un máximo de $8,8 \times 10^6$ para la misma línea celular, también en el medio Sf900II. Para la línea saUFL-AG-286, en cambio, nunca se pudo superar el valor de $4-5 \times 10^6$ células viables por mL, aun en cultivos de células adaptadas al medio libre de suero comercial Sf900II (resultados no publicados). La imposibilidad de alcanzar mayores densidades celulares, en cultivos en lote, podría ser un rasgo inherente a la propia línea celular, rasgo que

podría estar determinado por las particulares características metabólicas de las células, o por su sensibilidad a la acción de factores autócrinos generados por las propias células durante su proliferación (Doverskog y col., 1997). La línea celular BTI-TN5B1-4, que tampoco ha podido ser cultivada hasta densidades tan elevadas como las que se pueden alcanzar en cultivos de Sf9 (Rhiel y col., 1997), coincidentemente presenta un patrón de comportamiento metabólico con algunas características comunes a las de saUFL-AG-286, principalmente la acumulación de amonio en forma proporcional al incremento de la densidad celular (Gioria y col., 2006; Rhiel y col., 1997). En cambio, las células Sf9 se caracterizan por no producir ni excretar amonio, ni ningún otro catabolito reconocido hasta el presente (Doverskog y col., 1997; Drews y col. 2000; Rhiel y col., 1997). Ésta u otras diferencias fisiológicas o metabólicas podrían explicar porqué diferentes líneas de células de insectos poseen distintos potenciales de acumulación poblacional.

Las células saUFL-AG-286 se adaptaron también a proliferar en un reactor tanque agitado de fondo plano, equipado y operado tal como se lo hace en un cultivo bacteriano. El comportamiento del cultivo no difirió significativamente, en ninguno de los parámetros evaluados, respecto al comportamiento en frascos agitados, excepto por una fase *lag* ligeramente más extendida en el tiempo, aunque luego compensada por una velocidad específica de proliferación más rápida durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo. La viabilidad celular resultó comparable en ambos sistemas, lo cual podría considerarse un indicador que el nivel de estrés mecánico impuesto sobre las células, como consecuencia de la agitación por las turbinas *Rushton* impulsadas a 250 rpm, no resultó más deletéreo que el debido a la agitación en un frasco cilíndrico en forma orbital, aun en presencia de influjo de gas en forma de burbujas. Por tanto, las células saUFL-AG-286 parecen ser tan resistentes al estrés mecánico imperante en un reactor de tipo tanque agitado como las células Sf21 (Maranga y col., 2004). De todos modos, la comparación de parámetros con el cultivo en el reactor *airlift* demuestra la superioridad de este último para cultivar células de gran tamaño y carentes de pared celular, como las de la línea celular saUFL-AG-286.

Los procesos de infección y replicación viral transcurrieron de manera diferente en los tres sistemas de cultivo estudiados, aunque los rendimientos finales de poliedros virales resultaron prácticamente similares. Al evaluar la proliferación celular se observó que, a pesar de haber sido infectados los tres sistemas de forma asincrónica, a la misma multiplicidad de infección y similares densidades celulares iniciales, no hubo proliferación post-infección en el

cultivo realizado en el reactor *airlift*, mientras que en los otros dos sistemas se verificó un incremento de la densidad celular luego de la infección. Si se supone que las células que resultan infectadas dejan de proliferar (Kioukia y col., 1995; Zhang y col., 2005), la magnitud de la proliferación post-infección en un cultivo puede considerarse un indicador de la eficiencia de la infección: a mayor proliferación, menos eficiente es la infección. Por tanto, la falta de proliferación post-infección en el reactor *airlift* podría estar indicando que la infección se produjo de manera más eficiente que en el STR y en el cultivo agitado. Esta hipótesis parece estar avalada por una adsorción que transcurrió de forma ligeramente más rápida en el reactor *airlift*, respecto al STR, durante la primera hora luego del agregado del inóculo viral. Es posible que las características de diseño del reactor *airlift* utilizado en estos experimentos, que proporciona una relativamente elevada velocidad de circulación de líquido, favorezca la probabilidad de colisión entre virus y células, y por lo tanto una cinética de infección más rápida (Visnovsky, 2005). Sin embargo, dado que la multiplicidad de infección utilizada fue de $0,5 \text{ DICC}_{50} \cdot \text{célula}^{-1}$, no cabría esperar que la infección fuera sincrónica, y por lo tanto que el conjunto de las células en cultivo en el reactor *airlift* interrumpieran su proliferación inmediatamente luego del agregado del inóculo viral. Este comportamiento es diferente al observado por Maiorella y col. (1988) en cultivos infectados de células Sf9 en un medio libre de suero en un reactor *airlift* de 21 L, en los cuales la detención de la proliferación celular recién se verificó a las 24 horas post-infección, aun con infecciones realizadas a multiplicidades de infección superiores a 1, por lo cual la inmediata detención de la proliferación celular post-infección no parece ser una propiedad inherente a la evolución de los cultivos de células de lepidópteros infectados con baculovirus en reactores *airlift*, en general. Jorio y col. (2006) demostraron que las partículas de baculovirus tienden a agregarse entre sí, y que este fenómeno es responsable de la reducción de los títulos de *stocks* de baculovirus preservados a distintas temperaturas. Una posible explicación para la rápida detención de la proliferación celular post-infección en el reactor *airlift* es que las condiciones de turbulencia imperantes en el reactor, debido a la elevada velocidad de circulación de líquido, contribuyan a disociar los agregados de partículas virales del inóculo viral, de tal manera que la multiplicidad de infección real sea significativamente más alta que la teórica, y también mas elevada que la MOI real en el frasco agitado y en el STR. Por lo tanto, la detención de la proliferación celular en el reactor *airlift* podría ser el resultado de la combinación de dos fenómenos, una mayor multiplicidad de infección real y una cinética de

adsorción más rápida, ambos fenómenos derivados de la dinámica de la circulación de líquido en el reactor.

La falta de proliferación post-infección en el reactor *airlift* estuvo acompañada por un consumo muy reducido de glucosa y una falta de acumulación de amonio. En ninguno de los sistemas estudiados se verificó limitación por agotamiento de glucosa. Por otro lado, como se discutió en el capítulo previo, la acumulación de amonio podría ser un factor inhibitorio de la capacidad de las células saUFL-AG-286 para replicar AgMNPV y para producir poliedros virales. Por tanto, la falta de excreción de amonio constituiría una condición favorable para potenciar la producción de cuerpos de oclusión en los cultivos infectados en el reactor *airlift*. El comportamiento del STR fue diferente, acumulándose amonio durante prácticamente toda la evolución del cultivo infectado, con una producción por célula de $8,09 \times 10^{-6}$ mmol, que resultó 17% superior, en promedio, a la producción específica de amonio en cultivos infectados en frascos agitados, y más de 900% superior a la producción específica de amonio en el reactor *airlift*. Si bien la concentración máxima de amonio en el STR no superó el valor de 11 mM que Gioria (2008) había determinado como límite para detectar una interferencia de la acumulación de amonio con la capacidad de producción de poliedros de AgMNPV en cultivos de células saUFL-AG-286, la elevada producción específica de amonio en el STR podría estar revelando que la fisiología celular resultó menos favorable para afrontar la replicación viral y la producción de cuerpos de oclusión que en el reactor *airlift*, aunque prácticamente equivalente a la imperante en los cultivos infectados en frascos agitados.

En consonancia con la hipótesis anterior, la comparación de los rendimientos específicos de cuerpos de oclusión de AgMNPV en los tres sistemas revela que las células saUFL-AG-286 infectadas en el reactor *airlift* fueron capaces de producir 2 veces más poliedros que las células infectadas en frascos agitados o en el STR. Si se toman en consideración los resultados de los experimentos mostrados en el capítulo 2, específicamente la relación entre la densidad máxima de células viables y el rendimiento celular específico de poliedros (Figura IV.2.7.A), se puede derivar la siguiente ecuación que permite predecir el rendimiento específico de cuerpos de oclusión en función de la máxima densidad de células viables alcanzada en cultivos infectados:

$$RE_{OBS} = 775,34 - 5,24 \times 10^{-4} \times MDCV \quad (IV.3.1)$$

Introduciendo en la ecuación el valor de la máxima densidad de células viables alcanzado en el reactor *airlift*, se puede predecir que el rendimiento específico de cuerpos de oclusión, en un cultivo a pequeña escala en frasco agitado, con una densidad máxima similar, hubiera alcanzado a 613 poliedros por célula, un valor prácticamente igual a los 605 poliedros por célula realmente obtenidos en el reactor *airlift*. La similitud entre el valor predicho y el obtenido demuestra que las células cultivadas e infectadas en el reactor *airlift* pueden expresar una capacidad específica de producción de poliedros virales equivalente a la de las células infectadas a menor escala en frascos agitados. Es notable, por otro lado, que la elevada capacidad celular para producir poliedros haya estado acompañada por una limitada habilidad para producir virus brotado, significativamente inferior a la de las células saUFL-AG-286 infectadas en el STR o en frascos agitados. Este resultado parece confirmar observaciones realizadas previamente por Gioria (2008), que mostraban que en este sistema virus – célula – medio de cultivo, el incremento de la capacidad de producción de un fenotipo viral se realiza a expensas de una reducción en la habilidad para producir el otro fenotipo. Este fenómeno no ha podido ser aún explicado.

Introduciendo en la ecuación (IV.3.1) la densidad máxima de células viables alcanzada en el STR, se puede predecir que, en un cultivo similar en un frasco agitado, se hubiera alcanzado un rendimiento específico de cuerpos de oclusión de 451 poliedros por célula, un valor que resulta casi 50% superior al efectivamente obtenido en el STR (306 poliedros por célula), lo cual demuestra que la capacidad intrínseca de las células saUFL-AG-286 para producir poliedros de AgMNPV resulta depreciada por las condiciones imperantes en el reactor. La reducida capacidad celular para producir poliedros en el STR podría resultar consecuencia de limitaciones para replicar al virus, pero el elevado título de virus brotado alcanzado en el sobrenadante de cultivo de la infección en el reactor STR demuestra que las células conservan la capacidad de replicar al virus y ensamblar viriones brotados. Por tanto, una explicación más plausible podría ser que la interferencia se produzca sobre los eventos que conducen al ensamblaje de los cuerpos de oclusión, un proceso más tardío y más complejo, durante el ciclo de replicación de los baculovirus, que el ensamblaje de virus brotado. Es posible que una fisiología celular sub-óptima, vinculada a la heterogeneidad ambiental que caracteriza a este reactor, revelada por la elevada excreción de amonio, o bien el impacto del estrés mecánico sobre la funcionalidad celular, afecten el normal desarrollo del proceso de ensamblaje de cuerpos de oclusión.

A pesar de las diferencias en la capacidad específica de producción de cuerpos de occlusión de AgMNPV en los dos reactores estudiados, los rendimientos volumétricos finales de poliedros fueron iguales, y ambos resultaron un 20% inferior al rendimiento alcanzado en el cultivo control infectado en un frasco agitado. Las causas que motivaron que los rendimientos finales en uno y otro reactor resultaron menores a los del control son diferentes. Mientras en el reactor *airlift*, con una elevada producción por célula, la limitación radicó en la reducida densidad celular, en el reactor tanque agitado, por el contrario, la razón del reducido rendimiento volumétrico de cuerpos de occlusión fue la limitada capacidad celular para producir poliedros. En uno y otro reactor, entonces, no se cumplieron las previsiones del modelo desarrollado en el capítulo anterior (ecuación IV.2.3), que vincula la multiplicidad de infección y la densidad celular inicial con el rendimiento volumétrico de poliedros, demostrando la sensibilidad del modelo frente a la influencia de factores que modificarían la velocidad de infección, como en el reactor *airlift*, o que alterarían la capacidad celular para producir poliedros, como en el reactor de tipo tanque agitado. Sin embargo, se debe destacar la robustez del sistema virus – célula – medio de cultivo, que, independientemente del sistema utilizado en el escalamiento, en condiciones de cultivo y/o infección sub-óptimas, mantuvo el rendimiento de producto en un nivel no inferior al 70% del alcanzado en condiciones óptimas a escala de 12 mL. Estos rendimientos volumétricos, obtenidos en reactores estándares que pueden utilizarse para el cultivo de otros microorganismos, y en un medio de bajo costo, son aun tres veces más elevados que los obtenidos, para el mismo producto viral, en un bio-reactor con células Sf9 cultivadas en un medio libre de suero comercial de alto costo, empleando un reactor específicamente diseñado para el cultivo de células animales (Rodas y col., 2005), y se encuentran en el límite determinado por el modelo establecido por Rhodes (1996) para el desarrollo de un proceso económicamente factible de producción de baculovirus insecticidas en cultivos de células de insectos lepidópteros.

~Capítulo 4~

IV.4.1. Introducción

Bacillus thuringiensis (Bt) es la principal bacteria entomopatógena utilizada para el control de plagas agrícolas y forestales, como así también para combatir vectores de transmisión de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla. Los productos obtenidos en cultivos de esta bacteria, que representan el 90-95% del volumen de los insecticidas biológicos producidos anualmente, son utilizados como componentes de diferentes sistemas de manejo integrado de plagas (Udayasuriyan y col., 1996; Zouari y col., 2002).

Bt se caracteriza por la presencia de varios plásmidos que codifican para proteínas entomotóxicas (δ -endotoxinas), conocidas como proteínas cristalinas (Cry), que son sintetizadas durante la fase de esporulación como protoxinas en inclusiones cristalinas intracelulares. Con la completa esporulación y lisis de la célula madre, los cristales son liberados al medio externo (Schnepf y col., 1998).

Las toxinas Cry tienen un espectro muy definido de actividad insecticida, por lo general restringido a unas pocas especies dentro de un orden particular de insectos. Actualmente han sido definidas toxinas para insectos del orden de lepidópteros (mariposas y polillas), dípteros (moscas y mosquitos), coleópteros (escarabajos y gorgojos) y himenópteros (avispas y abejas). Una pequeña minoría de toxinas Cry muestran actividad contra especies que no sean insectos, tales como nematodos (Maagd y col., 2001; Bravo y col., 2007).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* (Btk) produce un cristal bipiramidal, que incluye las proteínas Cry 1 Aa, Cry 1 Ab, Cry 1Ac y Cry 2 Aa (Schnepf y col., 1998). Algunos autores han propuesto que este serovar es capaz de producir cristales cúbicos asociados a la presencia de la toxina Cry 2 (Gomes Monnerat y col., 2007). Cry 1 es una protoxina de 130 kDa de peso molecular, que es capaz de producir un fragmento activo N-terminal de 65 kDa contra insectos lepidópteros (Crickmore y col., 1998; Kwa y col., 1998); por su parte el peso de la protoxina Cry 2 es de aproximadamente 70 kDa y el peso de la toxina activa se aproxima también a 65 kDa (Rukmini y col., 2000). Particularmente la subclase 2A de Cry 2 se ha reportado como una toxina activa para lepidópteros y dípteros (Rukmini y col., 2000; Sauka y Benintende, 2008).

La producción de Bt se lleva a cabo en bio-reactores de capacidad industrial. La escala de producción y el costo del medio de cultivo lo hacen el más económico de todos los insecticidas microbianos para producir. Sin embargo, su costo es aún elevado si se lo compara con muchos insecticidas sintéticos (Flexner y Belnavis, 1998). Las materias primas utilizadas

en la formulación de medios de cultivo tienen un importante impacto sobre la economía de los procesos de producción industrial de Bt (Rowe y Margaritis, 2004). Una alternativa utilizada para hacer económicamente factibles los procesos de producción de Bt es la utilización de medios de cultivo formulados a partir de distintos sub-productos y desechos de origen agrícola o industrial (Adams y col., 1999-2002; Lachhab y col., 2001; Zouari y Jaoua, 1999; Zouari y col., 2002), o aun de procesos de tratamiento de aguas (Lachhab y col., 2001; Tirado Montiel y col., 2001; Vidarthi y col., 2002). La utilización de desechos de un primer proceso como materia prima para un proceso secundario influye favorablemente sobre la factibilidad económica de ambos, el original y el secundario, y además contribuye a reducir el impacto ambiental global. En los procesos de producción viral en cultivos celulares, como la producción de baculovirus en cultivos de células de insecto, el medio de cultivo termina constituyendo un fluido que debe descartarse luego de la recuperación del producto. Este medio de desecho podría aun ser suficientemente rico como para sostener la propagación de organismos nutricionalmente menos exigentes que las células de insecto. La utilización del efluente de descarte de la producción de baculovirus en cultivos celulares para la propagación de una bacteria de interés económico, como Btk, podría significar una contribución en el camino al desarrollo de procesos económicamente factibles de producción de bioinsecticidas virales *in vitro*.

Por otro lado, como se comentó previamente, una de las limitaciones a la expansión del uso de agentes biológicos radica en que sus propiedades insecticidas son menos notables que las de aquellos de origen químico. Para mejorar esas propiedades se han encarado proyectos de modificación genética (Tomalski y Miller, 1991). Se ha demostrado que un baculovirus modificado genéticamente para expresar una delta endotoxina de Bt posee una aptitud insecticida mejorada respecto al virus silvestre (Chang y col., 2003). Sin embargo, por tratarse de un producto genéticamente modificado, está sometido a numerosas regulaciones y restricciones. Un co-producto que contenga ambos insecticidas, producidos en un único proceso fermentativo, y por lo tanto de origen natural, podría expresar propiedades similares al recombinante. Existen escasos antecedentes de procesos fermentativos que permitan obtener más de un producto (Parajó y col., 1997; Lin y col., 2004; Eiteman y col. 2008), y en nuestro conocimiento, ninguno que haya sido desarrollado para producir un virus animal y un producto bacteriano. Por otro lado, no existen tampoco antecedentes sobre la producción, en un único lote fermentativo, de dos insecticidas microbianos.

En este capítulo se presenta un estudio de la propagación, esporulación y expresión de la actividad tóxica de Btk en cultivos realizados en condiciones axénicas y polixénicas. En esta última condición, se propone y verifica la factibilidad de la producción de un bioinsecticida combinado, de base viral y bacteriana, un co-producto de AgMNPV y Btk generado en un único proceso fermentativo. Adicionalmente, se realizó una evaluación preliminar de la factibilidad del escalamiento del proceso de co-producción en dos tipos de reactores, un reactor tanque agitado y un reactor de tipo *airlift*, frecuentemente utilizados en la industria de agrobiológicos.

IV.4.2. Resultados

IV.4.2.1. Caracterización del crecimiento de cultivos de Btk en un medio estándar

Con el objetivo de caracterizar cinéticamente el crecimiento del bacilo, así como la producción de los cristales paraspóricos, se realizaron cultivos por duplicado en el medio caldo tripteína soja (CTS), incubándolos a 30 °C sobre un agitador orbital a 180 rpm. Con los datos obtenidos se realizó la curva de crecimiento que se muestra en la figura IV.4.1.

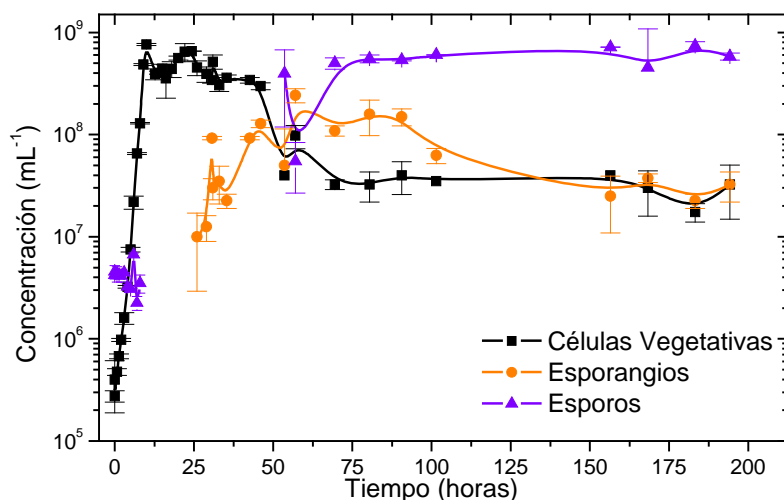


Figura IV.4.1: Curva de crecimiento y diferenciación de Btk HD-1 en medio de cultivo CTS. Los cultivos se incubaron a 30 °C sobre un agitador orbital a 180 rpm. Se tomaron muestras periódicas que fueron cuantificadas mediante recuento en cámara de Neubauer. Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar de los recuentos realizados en cada cultivo.

Como se observa en la figura IV.4.1, en el lapso inicial de 10 horas se desarrolla la fase de crecimiento exponencial. La misma, se caracteriza por una velocidad específica de crecimiento celular de 0,8 h⁻¹. Ésta fue calculada mediante regresión lineal desde la pendiente de la gráfica semilogarítmica, en base neperiana (n =12; R= 0,9913).

Luego de las 10 horas de cultivo, se inició la fase estacionaria. Esta fase estuvo caracterizada por el mantenimiento de la concentración de células vegetativas. Al promediar dicha fase, se produjo la aparición de esporangios. Hacia las 50 horas de cultivo se comenzó a observar la aparición de esporos libres, coincidentemente con la disminución en el recuento de células vegetativas. La concentración de esporos alcanzó su valor máximo hacia las 70 horas de cultivo, y se mantuvo constante hasta el final del experimento.

En la figura IV.4.2 se muestran sendas microfotografías de los extendidos realizados a la muestra correspondiente a la cosecha del cultivo, a la que se le realizó tanto coloración simple como tinción de esporos.

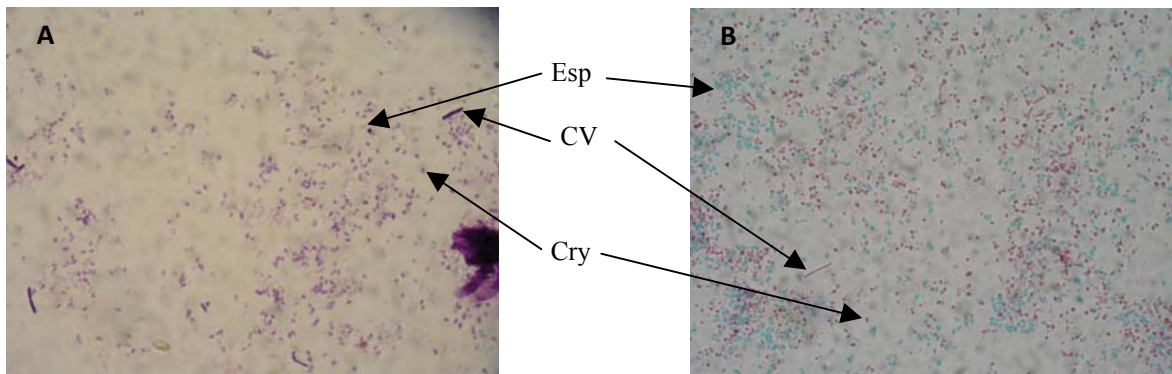


Figura IV.4.2: Microfotografías de extendidos de un cultivo de Btk. A) Coloración simple. B) Coloración diferencial para esporos y células vegetativas. Para detalles ver el texto.

Como se observa en la figura IV.4.2 A), con la coloración simple empleando cristal violeta se tiñen las células vegetativas (C.V.) y los cuerpos parasporicos (Cry), mientras que los esporos (Esp.) se observan como estructuras sin teñir. Por otro lado, como se observa en la microfotografía mostrada en la figura IV.4.2 B), con la coloración diferencial empleando verde de malaquita se tiñen los esporos, de color verde, mientras que las células vegetativas y los cristales toman la coloración de contraste.

Finalmente, se procesaron cultivos realizados en forma paralela para extraer las proteínas cristalizadas en los cuerpos parasporicos. El extracto obtenido fue resuelto electroforéticamente en geles de poliacrilamida. Los resultados se muestran en la figura IV.4.3.

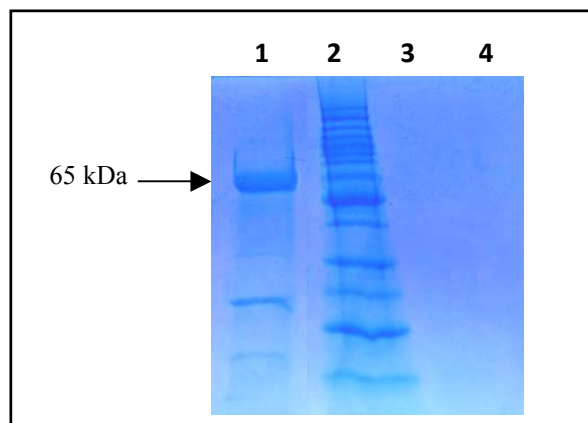


Figura IV.4.3: Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12 %, teñido con azul de Coomassie. Las indicaciones numéricas corresponden a: 1) extracto del cultivo; 2) marcadores de pesos moleculares (rango: 10 a 220 kDa); 3) y 4) primer y segundo lavado con PBS, respectivamente, del *pellet* de cultivo.}

Como se observa en la figura IV.4.3, no se detectó la presencia de proteínas en los sobrenadantes de lavado con PBS. Mediante la aplicación de la técnica de extracción alcalina, se obtuvo una banda proteica mayoritaria de 65 kDa de peso molecular (calle 1). Esta banda correspondería a un producto de degradación de las protoxinas, posiblemente debido a la acción de proteasas secretadas por la bacteria, según se demostró en otros trabajos publicados previamente (Reddy y col., 1998; Rukmini y col., 2000; Tan y Donovan, 2000).

IV.4.2.2. Cultivo de Btk en reactores.

A continuación, el mismo bacilo fue cultivado en reactores. Para ese fin se emplearon el reactor tanque agitado y el reactor *airlift* que se describieron en el capítulo 3. El medio de cultivo utilizado fue UNL-10, y la temperatura de incubación fue de 30 °C. Los cultivos se inocularon con una suspensión de esporos de forma tal que el inóculo inicial resultó, en cada caso, 5×10^6 esporas.mL⁻¹. Diariamente se tomaron muestras de cada cultivo, en las cuales se determinó la concentración de las diferentes formas bacterianas.

En la figura IV.4.4 se aprecia la evolución del cultivo realizado en el reactor de tipo tanque agitado, en el cual la concentración de oxígeno disuelto fue regulada automáticamente en el 40% de saturación. Los esporos utilizados como inóculo desaparecieron a partir de las dos horas post-inoculación, momento a partir del cual se comenzó a detectar la forma vegetativa del bacilo, la cual proliferó en forma exponencial hasta las 9,5 horas post-inoculación. La velocidad específica de crecimiento fue $0,799 \text{ h}^{-1}$. Ésta fue calculada mediante regresión lineal desde la pendiente de la gráfica semilogarítmica, en base neperiana ($n = 5$; $R = 0,9928$). La concentración de esporangios alcanzó su máximo a las 45,5 horas, siendo la misma de 4×10^8 esporangios.mL⁻¹. Al mismo tiempo aparecieron los primeros esporos y cristales, que incrementaron su concentración en los días posteriores a expensas de la lisis de esporangios, cuya concentración se redujo.

El reactor con agitación neumática utilizado se trató del reactor *airlift* concéntrico descrito previamente. Debido a la imposibilidad de adaptar un electrodo al sistema, la concentración de oxígeno disuelto no pudo ser regulada. Se decidió arbitrariamente que el flujo de aireación sea de $0,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (perfil de aireación 1).

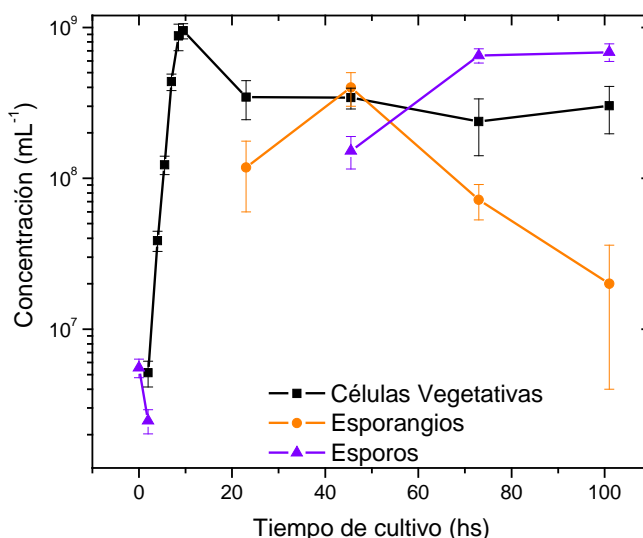


Figura IV.4.4: Evolución de las diferentes estructuras bacterianas de Btk, en un cultivo realizado en un STR en el medio UNL-10, a 30 °C con una concentración de oxígeno disuelto regulada automáticamente en el 40% de saturación. El mismo fue inoculado con una concentración de esporos de 5×10^6 esporos.mL⁻¹

En la figura IV.4.5 se muestra la evolución del cultivo del bacilo en el reactor *airlift*, utilizando el medio UNL-10. La evolución del cultivo resultó sustantivamente diferente a la observada en los dos cultivos referidos previamente, principalmente por el escaso nivel alcanzado de diferenciación celular. El número máximo de células vegetativas fue de $3,48 \times 10^8$ células mL⁻¹, registrado a las 22,50 horas post-inoculación.

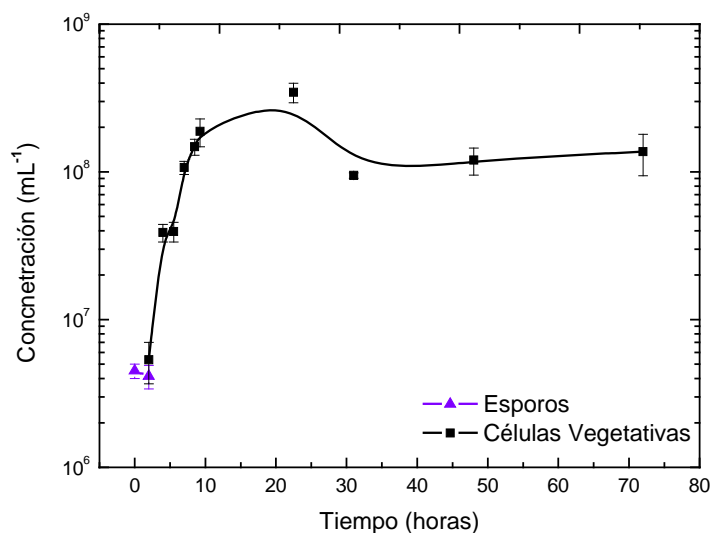


Figura IV.4.5: Curva de crecimiento de Btk, en el medio UNL-10, en un bio-reactor *airlift*, incubado a 30 °C, utilizando el perfil de aireación n° 1. El mismo se inoculó con esporos a una concentración inicial de 5×10^6 esporos.mL⁻¹.

La velocidad específica de crecimiento fue de $0,55 \text{ h}^{-1}$, no se observaron estructuras de resistencias, ni formación de cristales parasporicos. Además, las células vegetativas se cargaron de vacuolas, que podrían tratarse de cuerpos de almacenamiento de polisacáridos o de polihidroxicanoatos (Wakisaka y col., 1982; Walther y col., 1986; He y col., 2002). Diversos trabajos realizados por otros autores (Avignone-Rossa y col., 1992; Morris et al, 1996; Razo Flores et al, 1997; Rowe et al, 2003) resaltan la importancia de la oxigenación de estos cultivos, especialmente para la esporulación. Es posible, entonces, que el flujo de aireación suministrado al cultivo, $0,20 \text{ L min}^{-1}$, haya resultado insuficiente para sostener la diferenciación de las células vegetativas a esporos y cristales. Tomando como base esta suposición se decidió reforzar la aireación del reactor, para comprobar si a mayores flujos de aire se podía obtener una completa diferenciación celular, con formación de esporos y cristales. Se planteó entonces el siguiente esquema de aireación: las primeras 3 horas de cultivo, el flujo de aire fue de $0,20 \text{ L min}^{-1}$; a partir de entonces y hasta las 10 horas, el caudal empleado fue de $1,00 \text{ L min}^{-1}$ y la alimentación se realizó con oxígeno puro. A continuación, y hasta las 24 horas, el caudal con el que se insufló oxígeno fue de $0,50 \text{ L min}^{-1}$. Pasadas las 24 horas de desarrollo del cultivo, se alimentó nuevamente con aire a una velocidad de $0,20 \text{ L min}^{-1}$ (Perfil de aireación 2). En la figura IV.4.6 se muestra la curva de crecimiento de Btk, en el medio UNL-10 con el perfil de aireación antes descrito.

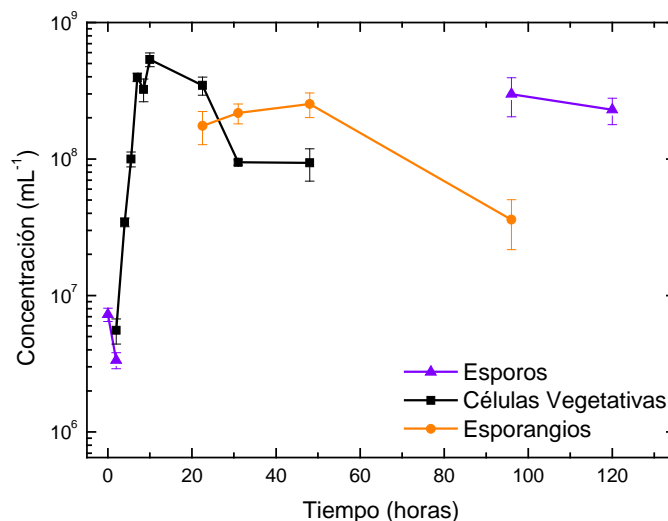


Figura IV.4.6: Curva de crecimiento de un cultivo de Btk, en el medio UNL-10, en un bio-reactor *airlift*, incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando el perfil de aireación n° 2. El mismo se inoculó con esporos a una concentración inicial de 5×10^6 esporos.mL⁻¹.

En la figura IV.4.6 puede observarse que, bajo las condiciones del nuevo régimen de aireación, se produjo la diferenciación de células vegetativas a esporos ($2,29 \times 10^8$ esporos mL^{-1}), y la consecuente producción de cristales parasporicos. El máximo número de células vegetativas fue de $5,37 \times 10^8$ células mL^{-1} , y se alcanzó a las 10 horas post-inoculación. La velocidad específica de crecimiento fue de $0,84 \text{ h}^{-1}$.

En la tabla IV.4.1 se resumen algunos parámetros determinados en los diferentes cultivos en bio-reactores. En la misma, se ve claramente la superioridad del STR en lo que respecta a la máxima densidad celular, rendimiento de esporos y, sobre todo, en la eficiencia de esporulación, siendo la misma un 41,2% mayor con respecto al reactor *airlift*. Esta menor eficacia para diferenciar las células a esporos en el reactor *airlift*, es probable que se deba a una insuficiencia en el suministro de oxígeno durante la fase de desarrollo exponencial del cultivo.

Tabla IV.4.1: Parámetros obtenidos en los cultivos de Btk realizados en bio-reactores.

| Parámetro | STR | <i>Airlift</i> (Perfil 1) | <i>Airlift</i> (Perfil 2) |
|---|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| $\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$ | 0,79 | 0,55 | 0,84 |
| Tiempo de duplicación (hs) | 0,87 | 1,26 | 0,82 |
| Máxima densidad alcanzada [(N° CV \pm DS) $\times 10^8 \text{ mL}^{-1}$] | 9,5 \pm 1,1 | 3,46 \pm 0,52 | 5,37 \pm 0,62 |
| Rendimiento de esporos [(N° de esporos \pm DS) $\times 10^8 \text{ mL}^{-1}$] | 6,88 \pm 0,92 | - | 2,29 \pm 0,51 |
| Eficiencia de Esporulación (%)* | 72,4 | 0 | 42,6 |

*Se calcula como: (N° de esporos/ N° de células vegetativas)*100.
DS: Desviación estándar.

Para obtener una evidencia adicional sobre la relación entre la oxigenación de los cultivos de Btk, la diferenciación celular y la producción de la endotoxina, se llevó a cabo un nuevo experimento utilizando cultivos en frascos de tipo Erlenmeyer. En este ensayo se emplearon diferentes volúmenes de medio de cultivo, en frascos de similares dimensiones y geometría, además de un control incubado en condiciones estáticas. Frascos conteniendo 15, 30 y 60 mL de medio de cultivo UNL-10 fueron inoculados con una suspensión de esporos realizada en un buffer salino de fosfatos de forma tal de lograr una concentración inicial de

5×10^6 esporos.mL⁻¹. Los cultivos se incubaron a 30 °C, siendo la velocidad de agitación de 180 rpm, hasta la diferenciación de las células vegetativas en esporos y cristales. Los rendimientos finales de formas de resistencia se muestran en la figura IV.4.7.

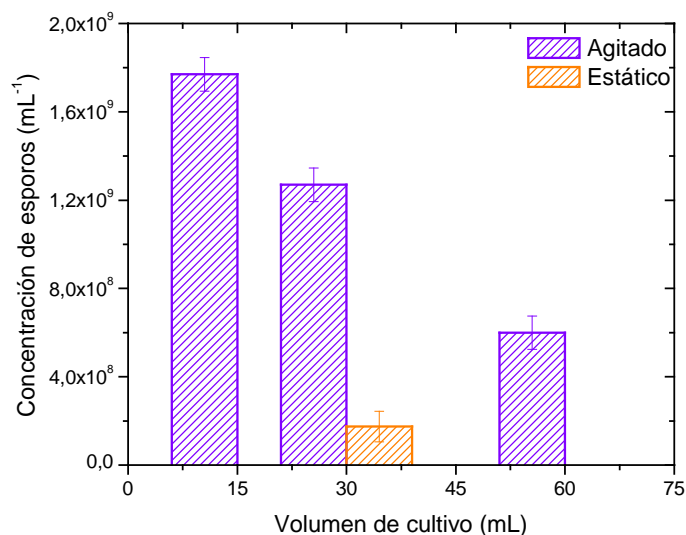


Figura IV.4.7: Concentraciones finales de esporos obtenidas en cultivos agitados a 180 rpm, realizados con distintos volúmenes del medio UNL-10 y en un cultivo sin agitación. Los mismos fueron inoculados con esporos de Btk HD-1 a una concentración inicial de 5×10^6 esporos.mL⁻¹ e incubados a 30 °C.

Como se observa en la figura IV.4.7, con el aumento del volumen de medio de cultivo empleado disminuyó la concentración de estructuras de resistencia obtenidas en cada cultivo. Además, cultivos de 30 mL realizados en condiciones estáticas produjeron 7,3 veces menos estructuras de resistencia que el mismo cultivo incubado en agitación.

Si bien estos resultados demostrarían la importancia del oxígeno en la evolución de los cultivos de Btk, serán necesarios nuevos experimentos que evalúen, además, la incidencia de la agitación y el mezclado sobre los cultivos realizados en estas condiciones.

IV.4.2.3. Evaluación del desarrollo de Btk sobre cultivos infectados de la línea UFL-Ag-286.

En la siguiente etapa experimental, se caracterizó el crecimiento de Btk en el medio de cultivo UNL-10 en condiciones polixénicas, que consta de un cultivo de la línea celular de lepidóptero UFL-AG-286 en el medio UNL-10 infectada con AgMNPV. El mismo se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers utilizando 30 mL de medio que fueron incubados a 30 °C sobre un agitador orbital a 180 rpm. Se realizó como control un cultivo en el medio CTS. En la tabla

IV.4.2 se muestran los parámetros obtenidos en el medio UNL-10 polixénico y en el medio control.

Tabla IV.4.2: Comparación de los parámetros de cultivo obtenidos al cultivar el Btk en condiciones axénicas empleando el medio de cultivo CTS, y de manera polixénica en el cultivo de la línea celular UFL-AG-286 infectada con el AgMNPV.

| Parámetro | CTS | UNL-10 polixénico |
|--|-----------------|-------------------|
| μ [h ⁻¹] | 0,8 | 0,63 |
| Tiempo de duplicación (hs) | 0,87 | 1,1 |
| Max. densidad alcanzada [(N° CV \pm DS) x 10 ⁸ mL ⁻¹] | 6,55 \pm 0,07 | 8,10 \pm 1,30 |
| Rendimiento de esporos [(N° de esporos \pm DS) x 10 ⁸ mL ⁻¹] | 5,83 \pm 0,46 | 8,25 \pm 0,87 |
| Eficiencia de Esporulación (%) | 89 | 100 |

*Se calcula como: (N° de esporos/ N° de células vegetativas)*100.
DS: Desviación estándar.

De la comparación de las velocidades de crecimiento, se puede observar que el bacilo duplica 1,3 veces más rápido cuando se utiliza como medio de cultivo el CTS. Sin embargo, a pesar de tener un tiempo de duplicación mayor, la máxima densidad celular y el mayor rendimiento de estructuras de resistencia se alcanzaron cuando Btk se desarrolló en el medio UNL-10 polixénico. Se obtuvo un 23,7 % más de células vegetativas, mientras que el rendimiento de esporos fue 1,42 veces superior con respecto al medio control.

En la figura IV.4.8 se observa un extendido realizado a partir de la muestra tomada al momento de la cosecha del cultivo realizado en condiciones polixénicas. En la misma es posible observar la coexistencia de células infectadas con AgMNPV y de las estructuras bacterianas características de un cultivo en fase estacionaria tardía de Btk. Es decir que al final del cultivo se encuentran presentes las estructuras que les dan características insecticidas a estos organismos separadamente, aunque la mera presencia de los poliedros virales no implica la preservación de su integridad estructural y su actividad biológica, que podrían afectarse por el desarrollo del bacilo.

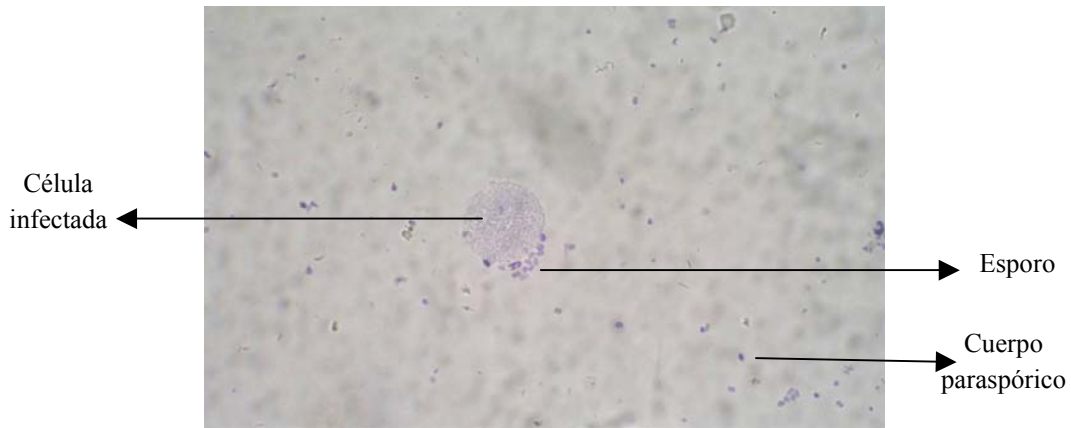


Figura IV.4.8: Coloración simple del extendido de un cultivo de Btk realizado en condiciones polixénicas.

El siguiente paso en este trabajo fue estudiar si el desarrollo del bacilo no afectaba los poliedros virales, ya que es sabido que Bt produce proteasas (Reddy y col., 1998; Rukmini y col., 2000; Tan y Donovan, 2000), que podrían llegar a hidrolizar la matriz de poliedrina que envuelve a los viriones ocluidos, dejando expuestos a los mismos a daños del microambiente en el que están inmersos, como podría ser la inactivación de los viriones por partículas reactivas del oxígeno. Con el objetivo de dilucidar si el desarrollo de Btk en el medio conteniendo poliedros de baculovirus puede alterar la estructura de la poliedrina viral, se realizaron extracciones alcalinas utilizando la técnica descrita para las proteínas cristalizadas en cuerpos paraspóricos de Bt a diferentes tiempos de cultivo. Los extractos obtenidos se resolvieron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (Figura IV.4.9.A). Los *pellets* obtenidos post-extracción fueron resuspendidos en SDS y sometidos a una corrida electroforética. A partir de la muestra correspondiente a las 19 horas de cultivo, los *pellets* obtenidos post-extracción fueron, además, diluidos al tercio (Figura IV.4.9.B).

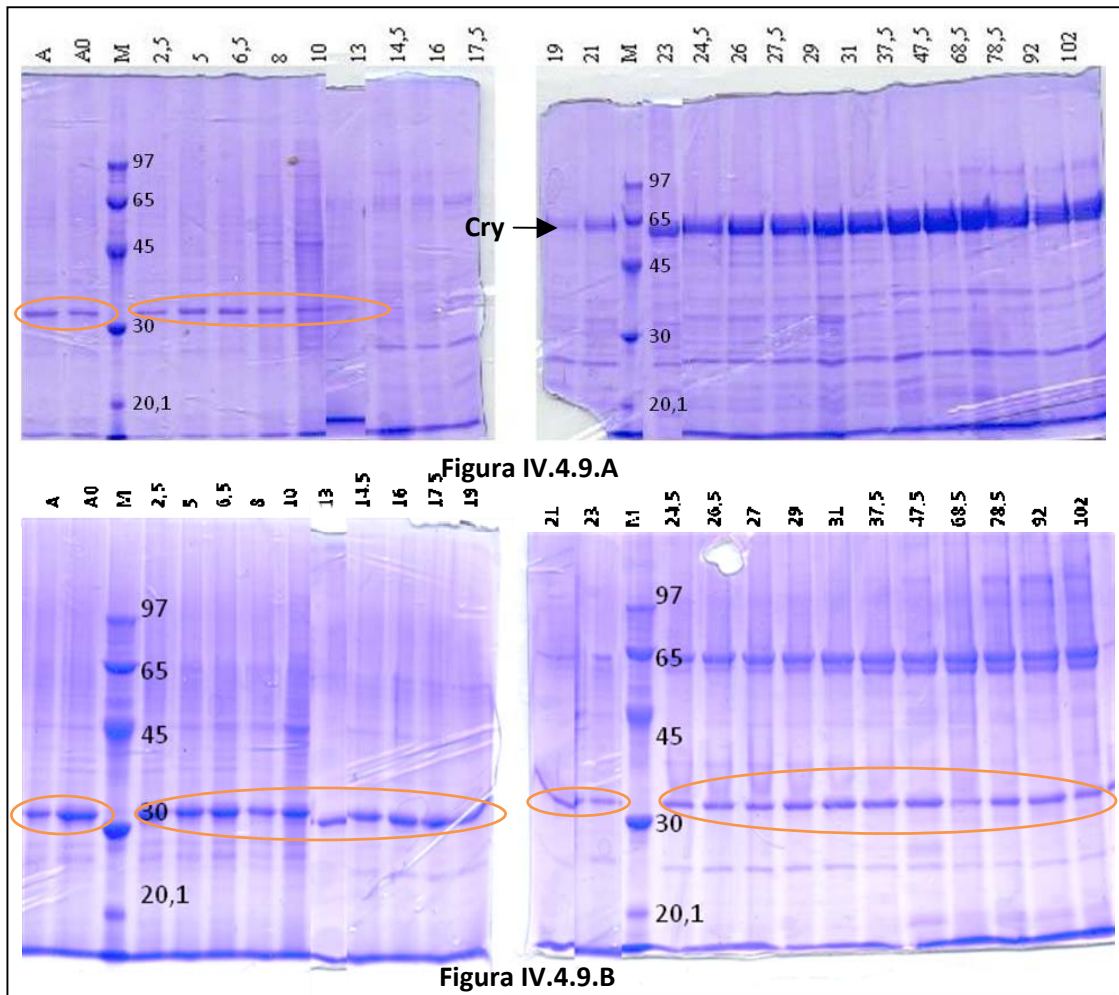


Figura IV.4.9: Geles de poliacrilamida al 12%. A) Extractos alcalinos de muestras tomadas a distintos tiempos de cultivos. B) *Pellets* resuspendidos en SDS. Desde t=19hs en adelante fueron diluidos al tercio para ser resueltos en la electroforesis. Las indicaciones numéricas corresponden al tiempo de cultivo en horas. M: marcador de peso molecular. A: Calle donde se sembró la muestra correspondiente al medio UNL-10 polixénico antes de ser inoculado con esporos del Btk. ○ Bandas correspondientes a la poliedrina. Cry: Banda correspondiente a la entomotoxina bacteriana.

En la figura IV.4.9.A se puede observar que la banda atribuible a la proteína cristalina mayoritaria de los poliedros, poliedrina, aparece en los extractos alcalinos hasta las 13 horas de cultivo, tiempo a partir del cuál la misma deja de ser extraída, o es degradada, y comienza a observarse la aparición de la banda de 65 KDa atribuida a la proteína entomotóxica producida por el bacilo. La intensidad de esta banda se incrementa con el correr del tiempo, indicando claramente el aumento de la concentración de dicha proteína al incrementarse el tiempo de cultivo, a excepción de las muestras correspondientes a las últimas 48 horas de cultivo, en dónde esta banda aparece un poco más tenue.

El análisis de la figura IV.4.9.B aporta información en relación a la desaparición de la banda putativa de poliedrina de los extractos alcalinos, a partir de las 13 horas de cultivo. Como se puede observar, esta banda se encuentra presente en todas las muestras, mientras que la banda de 65 KDa lo hace a partir de las 21 horas de cultivo. Es decir que, luego de proceder a realizar la extracción por medio de carbonato de sodio, la poliedrina permanecería mayoritariamente en el *pellet*, sin degradarse, y sólo estaría presente en los extractos alcalinos hasta que se produce la irrupción en el cultivo de la endotoxina de Btk. Este comportamiento podría atribuirse a que las condiciones empleadas no resultan suficientemente enérgicas como para extraer ambas proteínas, o que la presencia de la endotoxina, o de algún otro producto del cultivo de Btk de aparición contemporánea, ejercería un efecto protector sobre la estructura de los poliedros virales, impidiendo su disolución y la liberación de la poliedrina. De cualquier manera, los resultados de este experimento permiten apreciar, cualitativamente, que la poliedrina viral, principal componente estructural del fenotipo insecticida no resulta degradada durante la propagación de Btk en el mismo medio de cultivo.

Para evaluar de manera semi-cuantitativa la evolución de la concentración de poliedrina en los cultivos polixénicos se realizaron dos nuevos geles al 12% (no mostrados), en donde se sembraron concentraciones conocidas de albúmina, que permitieron evaluar por densitometría la cantidad de poliedrina en dos muestras, la del medio UNL-10 conteniendo poliedros virales, y la del mismo medio luego del cultivo del bacilo. En este caso, no se utilizó el carbonato como agente extractante, sino que las muestras de cultivos luego de ser lavadas con PBS se resuspendieron directamente en SDS. Mediante el programa LabImage v2.7 *free edition* se pudo determinar que la concentración de proteína de la banda atribuible a poliedrina fue similar, antes y después de la inoculación y propagación del bacilo. Por tanto, aparentemente las proteasas generadas por el bacilo durante su desarrollo no degradarían la proteína mayoritaria de los poliedros, o si lo hacen es en una magnitud que no puede apreciarse con la metodología empleada.

IV.4.2.4. Evaluación de la actividad biológica de diversos formulados sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*.

Los resultados obtenidos anteriormente demuestran la factibilidad de producir cristales entomotóxicos de Btk en un medio en el cual se multiplicó previamente, en un cultivo de células de insecto, el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis*, sin que la propagación del bacilo altere, aparentemente, la integridad de los poliedros virales. Si,

además, éstos conservaran su actividad biológica, sería posible plantear la co-producción de ambos insecticidas, el de origen viral y el origen bacteriano, en un único producto de acción dual. Con el objetivo de evaluar la factibilidad de esta hipótesis, se procedió a evaluar la actividad biológica de diversos formulados sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Las muestras sometidas a bio-ensayo fueron las siguientes:

- Cultivo de la línea UFL-AG- 286 infectada con AgMNPV en el medio UNL-10
- Cultivo de Btk en el medio UNL-10.
- Cultivo de Btk en condiciones polixénicas.

Además se realizaron los siguientes controles:

- Medio UNL-10, para descartar actividad insecticida debido al medio de cultivo.
- Cultivo de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti), en el medio UNL-10. Bti es un bacilo gran positivo, que produce proteínas entomotóxicas cuyo blanco de acción son dípteros, no presentando actividad contra lepidópteros.
- Cultivo de Bti en condiciones polixénicas. Debido al parentesco entre ambas cepas bacterianas, se realizó este control con el objetivo de evaluar si los poliedros de AgMNPV, generados en la primera etapa de producción, presentan una pérdida de poder insecticida, después de soportar el desarrollo de Bti.

En la tabla IV.4.3 se observan los resultados de mortalidad, expresada en concentración letal media, que corresponden al promedio de 3 bioensayos válidos realizados cada uno en días diferentes. Se considera un ensayo válido si cumple los postulados descritos por Ibarra y Federici (1987). Como se puede ver en la misma, la valoración de los cultivos de Btk se realizó mediante el recuento de esporos. Si bien los esporos no tienen actividad insecticida, puede presentar una actividad sinérgica a la misma (He y col., 2003). Por otro lado, la producción de la entomotoxina se encuentra estrechamente relacionada al proceso de esporulación y algunos autores proponen la existencia de una relación de uno a uno entre esporos y cristales, es decir por cada esporangio que se lisa, se liberan al ambiente un espora y un cristal (Obeta y Okafor, 1984). Por tal motivo, en este trabajo se optó por realizar la valoración de los cultivos de Btk teniendo en cuenta su concentración de esporos.

Tabla IV.4.3: Actividad biológica de diversos formulados sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*.

| Muestra | Poliedros (mL ⁻¹) | Esporos (mL ⁻¹) | CL ₅₀ ^a (μL.mL ⁻¹ de dieta) | CV ^b (%) |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------|--|---------------------|
| AgMNPV | 2,03 x 10 ⁸ | - | 0,52 [0,42-0,64] | 3,27 |
| Btk | - | 9,73 x 10 ⁸ | 0,33 [0,27-0,38] | 5,96 |
| AgMNPV + Btk | 2,05 x 10 ⁸ | 9,7 x 10 ⁸ | 0,41 [0,35-0,47] | 15,7 |
| Bti (6) | - | 8,43 x 10 ⁸ | >50,00 | ND |
| AgMNPV + Bti | 2,15 x 10 ⁸ | 3,53 x 10 ⁸ | 0,46 [0,37-0,57] | 10,87 |
| Medio UNL-10 | - | - | - | - |

^a Concentración letal media y límites de confianza del 95%; ^b Coeficiente de variación

Haciendo uso de los datos de concentraciones de poliedros y esporos de cada muestra testeada, se expresó la concentración letal media en esporos y en poliedros por mililitro de dieta, respectivamente. Los datos resultantes se muestran en la figura IV.4.10.

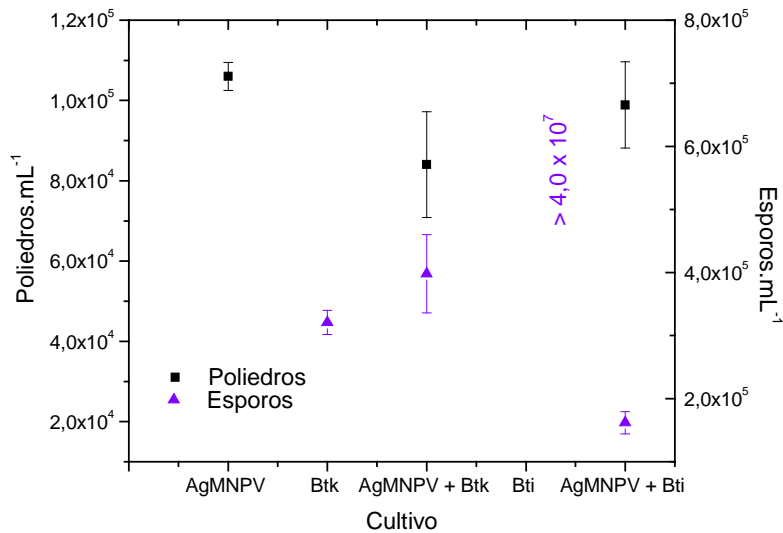


Figura IV.4.10: Concentración letal media expresado en número de esporos y número de poliedros por mL de dieta de los diferentes cultivos realizados sobre el medio UNL-10.

El análisis de la figura IV.4.10 y la tabla IV.4.3 permite apreciar que tanto los esporos de Btk, como los poliedros de AgMNPV, cuando fueron producidos en el medio UNL-10,

resultaron activos contra larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*. El producto de fermentación monoxénica de Btk resultó significativamente más activo que el producto de la replicación de AgMNPV ($p < 0,01$). La mezcla de ambos, cuando fueron producidos en forma secuencial en un mismo cultivo, también resultó activa. La actividad del co-producto (CL_{50} 0,41 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ de dieta) resultó intermedia respecto a la de los mono-productos: mayor que la de los poliedros de AgMNPV (CL_{50} 0,52 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ de dieta), y menor que la de los esporos de Btk (CL_{50} 0,33 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ de dieta), cuando cada uno fue producido y aplicado como mono-producto. Sin embargo, considerando que las condiciones experimentales empleadas en los ensayos de actividad biológica no permiten discriminar entre los efectos producidos por cada co-producto, no se puede establecer fehacientemente que el efecto de mortalidad fuera producto de la actividad de uno, otro, o ambos, y de que manera, y en que medida, interaccionaron cuando se suministraron como co-producto a los insectos blanco. De todos modos, como la actividad de los esporos de Btk y los poliedros de AgMNPV, calculada en el co-producto como si cada uno de los componentes estuviera aislado (Figura IV.4.10), resultó diferente a la determinada para cada insecticida producido como mono-producto, es razonable suponer que ambos establecen alguna forma de interacción cuando se aplican como un co-producto. Con la información obtenida en estos experimentos no es posible determinar la naturaleza de esa interacción, pero la co-producción o la co-aplicación de poliedros de AgMNPV parece interferir de manera antagónica sobre la actividad de Btk, que reduce ligeramente su actividad en el co-producto (CL_{50} $3,98 \times 10^5$ esporos. mL^{-1}) respecto al mono-producto (CL_{50} $3,21 \times 10^5$ esporos. mL^{-1}). Por otro lado, la co-producción de Btk sobre la suspensión de poliedros de AgMNPV, y su co-aplicación, contribuyen a incrementar la actividad biológica del producto de fermentación (CL_{50} $8,4 \times 10^4$ poliedros. mL^{-1}) respecto al producto de la propagación monoxénica de AgMNPV (CL_{50} $1,1 \times 10^5$ poliedros. mL^{-1}). Será necesario realizar experimentos que separen los procesos de producción y aplicación, trabajando con mezclas de distinta concentración de cada insecticida, para poder confirmar estas interacciones.

Una de las cuestiones más relevantes a resolver durante el proceso de co-producción radica en la preservación de la actividad de los poliedros virales durante la propagación y esporulación de Btk. Como se mencionó anteriormente, las condiciones experimentales empleadas no permitían discriminar entre los efectos producidos por los esporos de Btk y los poliedros de AgMNPV, por lo cual no resultó posible establecer si éstos últimos eran activos

en el co-producto Btk-AgMNPV. Para resolver esta cuestión se introdujo el control de co-producción Bti-AgMNPV, en el cual, dado que Bti no es activo sobre el insecto blanco ($CL_{50} > 4 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹), la actividad del co-producto es atribuible enteramente a los poliedros de AgMNPV. La actividad de los poliedros de AgMNPV en este co-producto ($CL_{50} 9,89 \times 10^4$ poliedros.mL⁻¹) es prácticamente idéntica a la de los poliedros virales cuando son producidos en el cultivo monoxénico ($CL_{50} 1,05 \times 10^5$ poliedros.mL⁻¹). Es decir, la actividad biológica de los poliedros virales no resultó modificada por la propagación de Bti, y por lo tanto es altamente probable que también resulte preservada cuando la bacteria propagada es Btk, dado el estrecho parentesco filogenético entre ambos bacilos.

IV.4.2.5. Producción del co-producto bioinsecticida a mayor escala

La producción del co-producto bioinsecticida a mayor escala se realizó en el reactor tanque agitado. Se utilizó la misma unidad empleada para el cultivo e infección de la línea celular saUFL-AG 286 descrita en el capítulo 3 de los resultados del presente manuscrito. La producción de los poliedros virales se llevó a cabo según lo descrito en el mencionado capítulo, alcanzándose un rendimiento de $1,7 \times 10^8$ poliedros.mL⁻¹. Posteriormente, se procedió a la inoculación del cultivo con esporas de Btk de forma tal que la concentración inicial resultó de 5×10^6 esporos.mL⁻¹. En esta parte del proceso la temperatura de incubación fue de 30 °C. La velocidad de agitación inicial fue de 250 rpm, elevándose la misma según los requerimientos de oxigenación del bacilo. En este caso la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo de forma automática en 40%. El caudal de aire utilizado durante todo el cultivo fue de 80 mL.min⁻¹. Durante las 3 y 24 horas de cultivo se alimentó con oxígeno puro para satisfacer los requerimientos de oxígeno del bacilo. La formación de espuma se controló automáticamente mediante el empleo de una sonda de nivel y el agregado de simeticona (30000 ppm). Diariamente, se realizaron determinaciones del consumo global de oxígeno del reactor. Además, se tomaron muestras, en las cuales se determinó la concentración de las diferentes formas bacterianas, la concentración de glucosa y amonio.

En la figura IV.4.11 se observa la evolución de las diferentes estructuras bacterianas en el cultivo realizado en el reactor tanque agitado. En la misma se observa que los esporos que forman parte del inóculo utilizado van disminuyendo su concentración hasta dejar de detectarse luego de la cuarta hora de cultivo. No se observó una fase de latencia en el cultivo, y la fase exponencial se extendió hasta las nueve horas post-inoculación. La misma se caracterizó por una velocidad específica de crecimiento celular de $0,85 \text{ h}^{-1}$. Ésta fue calculada

mediante regresión lineal desde la pendiente de la gráfica semilogarítmica, en base neperiana ($n = 5$; $R = 0,9787$).

La muestra correspondiente a las 24 horas de iniciado el cultivo, no pudo ser cuantificada mediante el recuento en cámara debido a que las diferentes formas bacterianas se encontraban formando cúmulos imposibles de cuantificar. Hacia las 49 horas de cultivo se observaron esporos libres y cristales paraspóricos, coincidentemente con la disminución en el recuento de células vegetativas. La concentración de esporos alcanzó su valor máximo hacia las 77,5 horas de cultivo, y se mantuvo constante hasta el final del experimento.

En la figura IV.4.12 se observa que el consumo global de oxígeno acompañó la proliferación del bacilo, alcanzando su máximo a las 9 horas de cultivo.

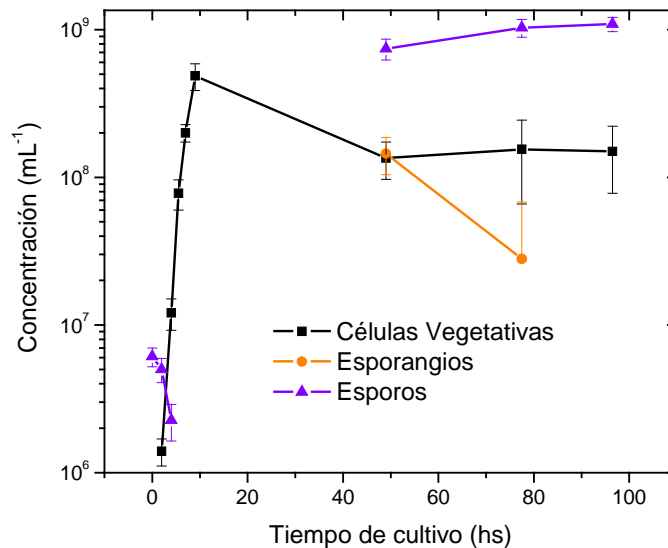


Figura IV.4.11: Evolución de las diferentes estructuras de Btk en el cultivo realizado en condiciones polixénicas en un reactor tanque agitado con un volumen operativo de 800 mL. Se inoculó con una concentración de esporos inicial de 5×10^6 esporos.mL⁻¹ y se incubó a 30 °C, manteniendo la concentración de oxígeno disuelto de automática al 40%.

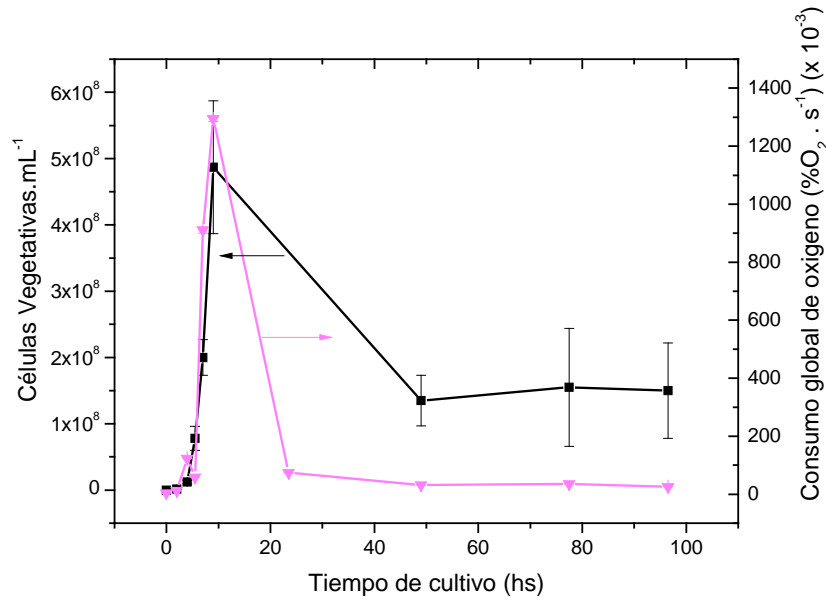


Figura IV.4.12: Consumo global de oxígeno en función del tiempo.

La glucosa resultó consumida a partir de las 2 horas post-inoculación, hasta las 23,5 horas de cultivo, cuando su concentración tendió a cero, manteniéndose constante hasta el final del cultivo. El amonio fue producido durante todo el cultivo alcanzando su concentración máxima al momento de la cosecha (77,5 hs), siendo la misma de 29,97 mM (Figura IV.4.13).

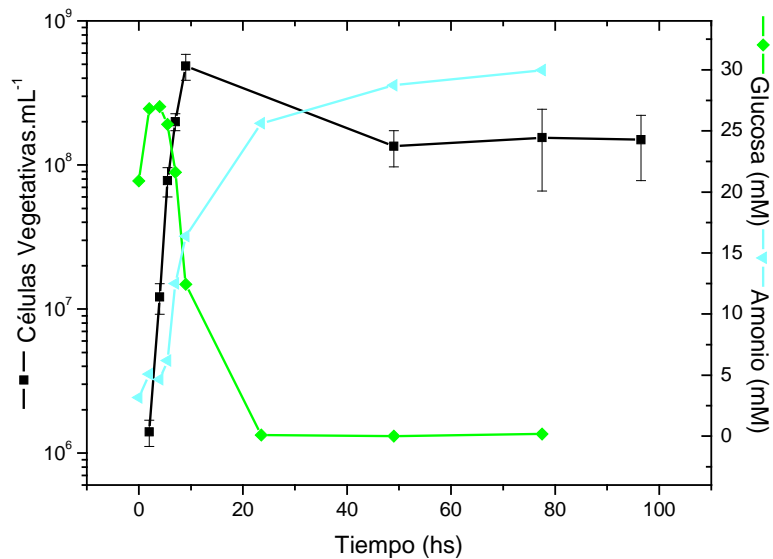


Figura IV.4.13: Consumo de glucosa y producción de amonio de Btk en un cultivo realizado en reactor tanque agitado, empleando el medio de cultivo UNL-10 polixénico.

Tabla IV.4.4: Parámetros de cultivo de Btk obtenidos en las diferentes escalas de producción del co-producto bioinsecticida.

| Parámetro de cultivo | Frasco agitado | STR |
|--|-----------------|----------------|
| μ (h^{-1}) | 0,63 | 0,85 |
| Tiempo de duplicación (hs) | 1,1 | 0,81 |
| Rendimiento Esporos [(Nº Esporos \pm DS) $\times 10^8$ mL $^{-1}$] | 8,25 \pm 0,87 | 10,9 \pm 1,2 |

Como puede observarse en la tabla IV.4.4, al aumento en la escala de producción se asoció el incremento de la velocidad específica de crecimiento y del rendimiento final de esporos. La utilización del bio-reactor, con todos los controles que permite su configuración, permitió alcanzar una velocidad específica de crecimiento 1,35 veces mayor. El rendimiento de esporos en el reactor fue de $1,09 \times 10^9$ esporos.mL $^{-1}$, y la misma fue el máximo rendimiento de esporos obtenido en este trabajo.

IV.4.3. Discusión

En este trabajo se demostró que Btk puede ser cultivado en medios axénicos, como así también en un medio efluente de un proceso de producción de baculovirus en cultivos celulares libres de suero, aún en presencia de los productos de dicho proceso. Las cinéticas de proliferación de este microorganismo fueron similares a las descritas por otros autores (Yang y Wang, 1998), independientemente del medio utilizado, consistiendo típicamente en tres etapas: exponencial, esporulación y lisis. Por otro lado, la observación microscópica de los cultivos permitió apreciar la existencia de cuatro etapas morfológicamente distinguibles, en coincidencia con lo descrito previamente por Berbert-Molina y col. (2008):

- Fase I: crecimiento vegetativo; se caracterizó por un crecimiento exponencial seguido por un período no exponencial, durante la cual se observaron bacilos largos, uniformes y aislados, y además bacilos dobles y cadenas, con alta movilidad.
- Fase II: transición a la esporulación; caracterizada por bacilos más cortos, células aisladas, poca motilidad y comienzo de la floculación.
- Fase III: esporulación; formación de esporangios, intensa floculación celular, y decrecimiento de la curva de proliferación.
- Fase IV: maduración de los esporos y lisis celular; aparición de esporas y cristales proteicos, desaparición de los flóculos, desaceleración de la curva de crecimiento.

Cuando el microorganismo se cultivó en el medio CTS, la velocidad específica de crecimiento fue de $0,80 \text{ h}^{-1}$; mientras que al utilizar el medio UNL-10 en el mismo sistema de cultivo se alcanzó una velocidad específica de proliferación un 20% menor. Estos valores están en el orden de los informados por otros autores para Bt. Vidyarthi y col. (2002), lograron una velocidad específica de crecimiento de 0.64 h^{-1} , cuando cultivaron Btk en un medio caldo de soja suplementado con extracto de levadura. Por su parte, Rowe y col. (2003), reportaron una velocidad de crecimiento específica de 0.47 h^{-1} , cuando Btk se cultivó en un medio que contenía 10 g L^{-1} de glucosa. Esta concentración de glucosa está por encima de la utilizada en esta tesis, variando la concentración en el medio UNL-10 polixénico entre 5,5 y 6 g.L^{-1} , quizás este sea el motivo por el cuál difieren las velocidades específicas de crecimiento, ya que algunos autores mostraron que altas concentraciones de nutrientes inhiben el crecimiento de Bt, perjudicando a su vez el proceso de esporulación y la síntesis de toxina (Zouari y Jaoua, 1999; Özkan y col., 2003; Bebert-Molina y col., 2008). Sin embargo, en los casos dónde se reportan efectos inhibitorios sobre el normal desarrollo de Bt, se utilizaron

concentraciones de glucosa más elevadas que la reportada por Rowe y col. (2003), siendo de 35 g.L⁻¹ para Btg (*Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*), 56 g.L⁻¹ para Btk y 75 g.L⁻¹ para Bti (Berbert-Molina y col. 2008).

Por otro lado, Vidyarthi y col. (2002) observaron que una velocidad específica de crecimiento menor, como en el caso del crecimiento en el medio UNL-10 polixénico, respecto al medio CTS en frascos agitados, generó una mayor concentración de células vegetativas y estructuras de resistencia. Según estos autores, la razón sería que a menores velocidades específicas de crecimiento el sustrato se degrada lentamente, lo que ayudaría a madurar los esporos y daría lugar a la síntesis correcta de la endotoxina antes de la lisis de los esporangios.

El estudio de las proteínas insecticidas que produce esta cepa de Btk reveló la presencia de una banda mayoritaria de aproximadamente 65 kDa, no observándose la banda de 130 KDa correspondiente a la proteína cristalina Cry 1, así como tampoco la banda de aproximadamente 70 KDa correspondiente a la protoxina Cry 2, también descrita como una de las constituyentes del cristal paraspórico producido por Btk HD-1 (Schnepf y col., 1998). La banda de 65 KDa podría corresponder al producto de degradación de ambas protoxinas, activadas por proteasas generadas por el microorganismo durante el cultivo. En Btk se han caracterizado tres proteasas intracelulares de masas moleculares 92, 72 y 69 KDa (Rukmini y col., 2000). Si bien en este trabajo se ha utilizado EDTA 1mM, conjuntamente con el extractante CO₃Na₂, para inhibir las proteasas, ya que se ha descrito que en Btk HD-1 una metaloproteasa endógena estaría involucrada en la activación de la protoxina (Reddy y col., 1998), es posible que la concentración de EDTA utilizada no haya resultado suficiente. En el trabajo publicado por Rukmini y col. (2000) se utilizó EDTA 100 mM para inhibir la proteasa de 69 KDa de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Además, Reddy y col. (1998), determinaron que sólo el 26% de la actividad proteasa fue inhibida con EDTA. Sin embargo, no todas las cepas de Btk exhiben esta fuerte actividad proteolítica. Andrews y col. (1985) observaron que la cepa HD-251 de Btk presentó una actividad proteolítica menor al 10% de la que determinaron en la cepa LB1. En esta última la actividad se incrementó contemporáneamente con la síntesis del cristal proteico, razón por la cual en las corridas electroforéticas realizadas sobre extractos de esta última cepa, además de la banda de 135 kDa observable en los extractos de la cepa HD-251, se apreció la existencia de una banda adicional de 68 KDa, que correspondería al producto de degradación de la toxina por proteasas endógenas.

La producción de proteasas por parte del bacilo, en un cultivo conteniendo poliedros de AgMNPV, abre la posibilidad de que la integridad de éstos últimos sea afectada por la actividad de aquellas, como consecuencia de la degradación proteolítica de las proteínas virales. Poliedrina, la proteína mayoritaria de la estructura de los cuerpos de oclusión, parece no resultar susceptible, al menos dentro del nivel de discernimiento que ofrece la técnica utilizada. Además, el análisis de los ensayos de actividad biológica realizados con el co-producto AgMNPV-Bti, que presentó una capacidad insecticida que no difirió significativamente de la del mono-producto viral, parece ratificar que la integridad estructural de los poliedros, que deviene en la preservación de su actividad biológica, no se ve afectada por la propagación y esporulación bacteriana.

Sin embargo, por otro lado, el comienzo de la fase de esporulación bacteriana se asoció con la emergencia de un cambio en la susceptibilidad de los poliedros virales a la solubilización en medio alcalino, que podrían alterar la capacidad insecticida viral. El análisis electroforético de los polipéptidos presentes en los extractos alcalinos y los *pellets* insolubles remanentes muestra que los poliedros de AgMNPV se tornan resistentes a la disolución alcalina cuando Btk comienza a esporular. Este aumento de la resistencia a la disolución alcalina en presencia de los esporos bacterianos podría, eventualmente, impactar sobre la actividad biológica viral, ya que la liberación de los viriones ocluidos, que dan comienzo a la infección en el tracto digestivo del huésped, es una condición necesaria para que el virus pueda expresar su capacidad patogénica. Si bien este efecto no fue advertido en los ensayos de actividad biológica realizados con el co-producto AgMNPV-Bti, no puede descartarse que el mismo se produzca en la mezcla AgMNPV-Btk.

Por otro lado, los poliedros de AgMNPV presentaron una CL_{50} de $1,06 \times 10^5$ poliedros.mL⁻¹ de dieta. Este valor es significativamente mayor que los determinados por Morales y col. (2001) y Rodas y col. (2005) para la cepa 2D de AgMNPV, aunque las metodologías utilizadas para la evaluación fueron diferentes a la empleada en este trabajo. No se evaluó en forma paralela la actividad biológica de los poliedros de la cepa de AgMNPV utilizada en esta tesis, obtenidos por propagación en larva, y por lo tanto, no es posible establecer si el elevado valor de la CL_{50} determinado aquí se debe a las diferencias metodológicas señaladas anteriormente, a diferencias en la virulencia de las distintas cepas de AgMNPV, o a una pérdida de la virulencia del virus utilizado en los experimentos de esta tesis debido a su pasaje en cultivos celulares. Esta última alternativa no parece probable, ya

que poliedros de la misma cepa viral, con idéntico número de pasajes en cultivos celulares, presentaron una actividad biológica similar a la de los poliedros obtenidos a partir de larvas infectadas (Gioria, 2008).

La actividad biológica de Btk, producido como mono-producto en medio axénico UNL-10, fue aproximadamente similar, o mayor, a la determinada en otros trabajos, aunque estas comparaciones deben tomarse con precaución debido a las diferencias en las cepas bacterianas y huéspedes utilizados. Mientras la concentración letal 50% determinada para Btk producido en medio UNL-10 resultó igual a $3,21 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹ de dieta, Amin y col. (2008) determinaron que la mezcla espora-cristal, obtenida de cultivos alimentados de Btk, presentó CL₅₀ de $8,6 \times 10^6$; $2,3 \times 10^7$ y $6,1 \times 10^7$ sobre larvas del primer estadio de *Spodoptera littoralis*, *Sesamia cretica* y *Anagasta kuehniella*, respectivamente. Por otro lado, Zhang y col. (2009), determinaron que la cepa comercial BMB005 de Btk presentó una concentración letal de $0,623 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de dieta sobre larvas neonatas de *Spodoptera exigua*, concentración que es 1,9 veces mayor a la que el bioinsecticida de Btk HD-1 evidenció sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*.

La evaluación de la actividad insecticida revela la existencia de interacciones entre los componentes del co-producto insecticida. La actividad biológica específica de Btk pareció reducirse cuando fue propagado en condiciones polixénicas, respecto a la actividad insecticida del producto propagado en medio axénico. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no permiten discriminar si el aumento de la CL₅₀ se debe a una verdadera reducción de la actividad insecticida de la preparación bacteriana durante su preparación, o bien es el producto de una interferencia debida a la co-aplicación del baculovirus durante los ensayos de actividad biológica. Por el contrario, la actividad insecticida de la preparación viral-bacteriana fue mayor que la del mono-producto viral. Schmidt y col. (2009) determinaron que la ingestión de dosis sub-letales de CryFa2 por parte de larvas de *Agrotis ipsilon* producía un aumento de la susceptibilidad a la infección por el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Agrotis ipsilon*. Raymond y col. (2006) observaron, por el contrario, la existencia de antagonismo entre AcMNPV y la toxina Cry1Ac cuando se aplicaron en *Plutella xylostella*. Por otro lado, Liu y col. (2006), quienes estudiaron la interacción entre el virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera* y la toxina Cry1Ac de Bt Berliner en diferentes condiciones experimentales, determinaron que en la mayoría de las condiciones estudiadas que involucraban la aplicación conjunta de ambos insecticidas, la interacción era antagónica.

La información obtenida en esta tesis es insuficiente para establecer la naturaleza de la interacción entre AgMNPV y Btk. Se deberán realizar nuevos ensayos, en los cuales se separen los procesos de producción y aplicación, y se trabaje con distintas dosis de ambos insecticidas, para dilucidar si esa interacción es fruto de la co-producción, de la co-aplicación, o de ambas.

El escalado de la producción de Btk se llevó a cabo utilizando bio-reactores con diferentes tipos de agitación, mecánica y neumática. Bio-reactores de las mismas características han sido utilizados por otros autores obteniendo buenos resultados en lo que respecta a rendimiento. La configuración del reactor *airlift* utilizado en este trabajo no permitió la correcta proliferación y diferenciación de Btk. Esto se debió a la incapacidad del mismo de transferir el oxígeno requerido por la bacteria durante su fase de crecimiento exponencial. Avignone Rossa y col. (1992), observaron un rendimiento de esporos 2,25 mayor cuando los cultivos no se realizaron limitados en oxígeno. Por otro lado, estos autores describieron que la interrupción de la aireación, en cultivos donde la fase exponencial se desarrolló bajo condiciones no limitadas, la esporulación no fue inhibida, pero sí lo fue la síntesis de la toxina (Sarrafzadeh y Navarro, 2005). Parece probable que el cultivo de Btk en el reactor *airlift* utilizado en este trabajo se desarrolló en condiciones limitantes de oxígeno durante su desarrollo exponencial, y por tal razón no logró diferenciarse a esporos y cristales. La modificación en el perfil de aireación, en la que se otorgó un caudal de oxígeno mayor, contribuyó a suplir de manera más efectiva los requerimientos respiratorios de este organismo. Sin embargo, la eficiencia de esporulación en este reactor estuvo muy por debajo de la obtenida en la otra configuración de reactor utilizada en este trabajo (STR), en el que se mantuvo la concentración de oxígeno disuelto de manera automática, asegurando que no exista una deficiencia en este nutriente. Huang y col. (2001), lograron incrementar la producción de la exotoxina thuringiensina y la eficiencia de esporulación al modificar la estrategia de aireación en un reactor *airlift*, que les permitió controlar el nivel de espuma además de la concentración de oxígeno disuelto, la cuál se mantuvo en 10%. El bio-reactor *airlift* utilizado en este trabajo no permite la adaptación de sensores de ningún tipo, por tal motivo, para poder aplicar una estrategia semejante, se debería diseñar y construir un nuevo reactor que admita este tipo de dispositivos.

El cultivo de Btk HD-1 en el reactor tanque agitado permitió obtener altos rendimientos de esporos en los dos medios de cultivo utilizados, UNL-10 axénico y UNL-10 polixénico.

Sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento al utilizar como medio de cultivo el UNL-10 polixénico. Si comparamos los rendimientos alcanzados para este medio de cultivo a las diferentes escalas utilizados se observa que el rendimiento de esporos fue un 32% superior cuando se utilizó el reactor. Esta diferencia se debe probablemente a que en el reactor la transferencia de masa fue mejor que en el Erlenmeyer, otorgando a las células todos los nutrientes requeridos más efectivamente. Por otro lado, la velocidad específica de crecimiento fue también superior en el reactor. Al incrementar 26,7 veces la escala de producción se obtuvo un aumento del 35% en la velocidad de proliferación específica, mientras que, Razo Flores y col. (1997), al escalar el cultivo de Btk, en 78,6 veces el tamaño, apreciaron una reducción de la velocidad de crecimiento del 13%.

En lo que respecta a rendimientos de esporos, como ya se mencionó anteriormente, la síntesis de la toxina está estrechamente ligada con el proceso de esporulación, por esta razón es común encontrar en la bibliografía que al producir Bt se informen solamente las concentraciones de esporos, o también se acompaña esta información con las concentraciones de toxina. Sin embargo, es preferible que se evalúe la actividad biológica de los productos de fermentación obtenidos, ya que, como lo han demostrado otros autores, altos rendimientos de esporos no implican una elevada entomotoxicidad del producto (Farrera, y col., 1998). Al utilizar el medio UNL-10 polixénico se obtuvo un rendimiento promedio, en ambas escalas, de $9,57 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹, este valor fue 2,09 y 1,64 veces más grande que el promedio de esporos obtenidos en las fermentaciones en bio-reactores realizadas en medio UNL-10 y a la concentración alcanzada en el medio control CTS, respectivamente. En muchos trabajos publicados los rendimientos de esporos fueron mayores que los alcanzados en este trabajo. Tal es el caso de Ghribi y col. (2007), que utilizando un STR y un medio de cultivo a base de almidón, soja y agua de mar diluida, obtuvieron concentraciones de esporos que variaron entre $3,2$ y $4,5 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹ de la cepa BNS3 de Btk, según fueran variando el perfil de aireación del mismo. Ozkan y col. (2010), al utilizar deshechos de aves de corral, obtuvieron 18,8 veces más esporos de la cepa 81 de Btk que al utilizar un medio comercial ($6,4 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹). Por su parte, Prabakaran y col. (2008), alcanzaron rendimientos de esporos de Bti de $3,4 \cdot 10^{11}$ esporos.mL⁻¹, utilizando como medio de cultivo agua de coco con el agregado de una solución salina. Avignone Rossa y col. (1992), obtuvieron rendimientos semejantes a los alcanzados en este trabajo en condiciones polixénicas, los mismos variaron entre $7,9$ y $9,1 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹ en cultivos no limitados por oxígeno en un medio de cultivo que constó

de una base salina adicionada de glucosa y extracto de levadura. Yezza y col. (2006) alcanzaron rendimientos de esporos de la cepa HD-1 de Btk que variaron entre $6,47 \times 10^7$ y $6,67 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹, utilizando como medio de cultivo suspensiones de diferentes plantas de tratamiento de efluentes. Como puede verse, los rendimientos de esporos obtenidos, así como también la producción de proteínas entomotóxicas no son ajenos a la diferente composición de los medios de cultivo utilizados. El medio UNL-10 polixénico se presenta como un buen candidato para el desarrollo industrial de Btk, debido a que soporta el desarrollo y la diferenciación del mismo, sumado a la posibilidad de tener un bioinsecticida dual. Una alternativa para intensificar los rendimientos sería la utilización de sistemas de cultivo alimentados, siempre y cuando además de incrementar el rendimiento de esporos se intensifique su poder insecticida.

~Conclusiones~

Conclusiones

✓ Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que los cultivos en suspensión de células de insecto en botellas de pequeño volumen, sometidos a agitación orbital, pueden constituir un sistema útil para el desarrollo de procesos en los cuales se requiere trabajar con múltiples unidades, para estudiar los efectos de varias variables, con reducido costo experimental.

✓ Se estableció un sistema experimental consistente en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-10, en botellas de vidrio de 100 mL de volumen, mantenidos en un agitador orbital con temperatura regulada. En este sistema se pudo determinar la combinación de condiciones operativas mediante las cuales es posible alcanzar un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular.

✓ La combinación de ambas variables que permitió alcanzar el valor máximo de la velocidad específica de proliferación permitió también obtener los rendimientos más elevados de cuerpos de oclusión en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 infectados con el virus AgMNPV.

✓ El sistema de cultivo en suspensión de células saUFL-AG-286 fue aplicado a estudiar, la influencia de dos parámetros de infección, la densidad celular al momento del agregado del inóculo viral y la multiplicidad de infección, sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos infectados. El análisis de los resultados demostró que la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión, como así también su rendimiento final, se correlacionaron con la densidad celular máxima alcanzada en cada cultivo infectado, y que ésta última, a su vez, depende de la selección de la densidad celular al momento de la inoculación viral y la multiplicidad de infección.

✓ Se desarrolló un modelo empírico, el cual resultó útil para establecer la combinación de los parámetros de infección que permiten alcanzar el rendimiento máximo de cuerpos de oclusión.

✓ Diferentes combinaciones de los parámetros multiplicidad de infección y densidad celular inicial pueden determinar la misma densidad celular máxima y, en consecuencia, el mismo rendimiento de cuerpos de oclusión. De esta manera, resultó posible alcanzar máximos rendimientos de poliedros mediante la infección temprana de los cultivos en suspensión a una baja multiplicidad de infección. Este resultado tiene un impacto favorable sobre la economía

del proceso, ya que minimiza el consumo de *stock* viral, y contribuye a preservar la calidad del producto, ya que al reducir los requerimientos de *stock* se necesita un número menor de rondas de amplificación para preparar el inóculo viral, disminuyendo la probabilidad de variación del genoma viral.

✓ Infectando en esas condiciones se pudieron obtener rendimientos de cuerpos de oclusión tan elevados como 3×10^8 poliedros.mL⁻¹.

✓ El cultivo de células saUFL-AG-286 en el medio de libre de suero UNL-10 se escaló en dos bio-reactores de diferente configuración, un tanque con agitación mecánica a través de impulsores de tipo *Rushton*, oxigenado por insuflado de aire, y un reactor *airlift* concéntrico, demostrando que estas células pueden adaptarse a las condiciones imperantes en procesos fermentativos característicos de la industria productora de agro-biológicos.

✓ El reactor *airlift* mostró una aptitud superior que el reactor con agitación mecánica para el cultivo de esta línea celular, aptitud demostrada a través de una mayor velocidad celular específica de proliferación, una densidad celular máxima más elevada, la ausencia de fase *lag*, una viabilidad más elevada, un más eficiente uso de la glucosa, principal fuente de energía en los cultivos de las células saUFL-AG-286, y una menor producción y excreción de amonio, el principal tóxico producto del metabolismo celular.

✓ Los cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en ambos reactores produjeron elevados rendimientos volumétricos de cuerpos de oclusión virales, si bien resultaron 30% inferiores a los previstos de acuerdo al modelo empírico desarrollado en cultivos infectados a escala de frascos agitados.

✓ En el reactor *airlift*, la reducción del rendimiento volumétrico parece ser la consecuencia de una mayor eficiencia en la infección inicial, que limitó la proliferación celular, y por lo tanto el número de células productoras de poliedros, mientras que la capacidad específica de cada célula fue similar a la obtenida en cultivos en frascos agitados que alcanzaron la misma densidad celular máxima.

✓ La reducción del rendimiento volumétrico de poliedros en cultivos infectados en el reactor de tipo tanque agitado parece ser consecuencia de una reducción en la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión. La heterogeneidad ambiental que caracteriza al reactor, y el estrés mecánico impuesto por la agitación, podrían ser los factores determinantes de la limitada habilidad de las células saUFL-AG-286 para producir poliedros de AgMNPV en el reactor de tipo tanque agitado.

✓ Es importante destacar que ambos reactores fueron configurados para simular las condiciones operativas típicas de las fermentaciones bacterianas industriales, de tal manera se demuestra que es posible alcanzar rendimientos económicamente significativos en condiciones de producción industrial.

✓ Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron la factibilidad de producir esporos y cristales entomotóxicos de *Bacillus thuringiensis* sobre cultivos de células saUFL-AG-286 previamente infectados con AgMNPV en el medio de cultivo libre de suero, y de bajo costo, UNL-10.

✓ La propagación del bacilo, y su esporulación, no alteraron la actividad biológica de los cuerpos de oclusión de AgMNPV producidos en la primera etapa del proceso de co-producción, ni tampoco parecieron afectar la integridad de la poliedrina viral.

✓ El proceso de co-producción de ambos insecticidas biológicos se escaló en un reactor de tipo tanque agitado, en el cual se obtuvo como productos finales una mezcla en suspensión de poliedros de AgMNPV y esporos y cristales de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*.

✓ La evaluación de la actividad biológica de la mezcla insecticida sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis* mostró que existe interacción entre ambos, aunque la dilucidación de la naturaleza de esta interacción requerirá la realización de experimentos específicos.

✓ En nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de un proceso que permite producir dos insecticidas biológicos en una misma fermentación, y es también la primera descripción de un proceso que combina, en un mismo reactor, la multiplicación de un virus en cultivos de una línea celular eucariota, y la propagación y esporulación de una bacteria. Estos resultados pueden constituir un aporte al desarrollo de procesos fermentativos económicamente factibles de producción de agentes biológicos de control de plagas.

~Resumen~

Resumen

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), una de las principales plagas de los cultivos de soja, puede ser eficientemente controlada mediante la utilización de insecticidas de origen biológico. Dos de los bioinsecticidas utilizados con ese propósito son el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) y las entomotoxinas producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Btk). A pesar de sus innegables ventajas ambientales, la aceptación de estos plaguicidas, y la expansión de su aplicación, están condicionadas por dos factores principales: sus propiedades insecticidas son menos notables que las que caracterizan a los productos de síntesis química y, por otro lado, exhiben una relación actividad/precio menos ventajosa. Con el objetivo de contribuir a superar estas limitaciones, se propuso estudiar la factibilidad de desarrollar un proceso fermentativo combinado para obtener un co-producto constituido por ambos bio-insecticidas. Para tal fin se desarrolló una estrategia experimental en cuatro etapas: establecimiento del sistema de cultivo de la línea celular saUFL-AG-286 en frascos con agitación orbital; estudio de la influencia de las condiciones de infección, modelado y optimización de la producción del insecticida viral; escalado de la producción viral en reactores de diseño estándar; y estudio de la factibilidad de obtención del co-producto viral bacteriano.

En primer término se estableció un sistema experimental consistente en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286 en el medio libre de suero UNL-10, en botellas de vidrio de 100 mL de volumen, mantenidos en un agitador orbital con temperatura regulada. En este sistema se estudió la influencia de dos variables operativas, la velocidad de agitación y el volumen de llenado de las botellas, mediante la utilización de un diseño experimental de tipo factorial completo. Además, se pudo determinar la combinación de condiciones operativas mediante las cuales es posible alcanzar un valor óptimo de la velocidad específica de proliferación celular. Este valor óptimo, $0,02273 \pm 0,00052 \text{ h}^{-1}$, es similar al determinado para la misma línea celular en cultivos con agitación pendular ($0,024 \text{ h}^{-1}$ en el medio TC-100 suplementado con suero y $0,026 \text{ h}^{-1}$ en el medio libre de suero UNL-8). La combinación de ambas variables que permitió alcanzar el valor máximo de la velocidad específica de proliferación permitió también obtener los rendimientos más elevados de cuerpos de oclusión en cultivos de la línea celular saUFL-AG-286 infectados con el virus AgMNPV.

Una vez establecido, el sistema de cultivo en suspensión de células saUFL-AG-286 en frascos con agitación orbital fue aplicado a estudiar, utilizando dos series experimentales con diseño factorial completo con punto central, la influencia de dos parámetros de infección, la densidad celular al momento del agregado del inóculo viral y la multiplicidad de infección, sobre la producción de poliedros de AgMNPV en cultivos infectados. El análisis de los resultados demostró que la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión, como así también su rendimiento final, se correlacionaron con la densidad celular máxima alcanzada en cada cultivo infectado, y que ésta última, a su vez, depende de la selección de la densidad celular al momento de la inoculación viral y la multiplicidad de infección. A partir de análisis de regresión de los resultados obtenidos en ambas series experimentales se pudo derivar un modelo empírico, el cual resultó útil para establecer la combinación de los parámetros de infección que permiten alcanzar el rendimiento máximo de cuerpos de oclusión. Una importante conclusión que deriva de los resultados obtenidos en este trabajo es que diferentes combinaciones de los parámetros multiplicidad de infección y densidad celular inicial pueden determinar la misma densidad celular máxima y, en consecuencia, el mismo rendimiento de cuerpos de oclusión. De esta manera resultó posible alcanzar máximos rendimientos de poliedros mediante la infección temprana de los cultivos en suspensión a una baja multiplicidad de infección, minimizando la demanda de inóculo viral, por tanto reduciendo el número de rondas de replicación para preparar el volumen de *stock* requerido, y en consecuencia, también contribuyendo a reducir la probabilidad de variación del genoma viral. Infectando en tales condiciones se pudieron obtener rendimientos de cuerpos de oclusión tan elevados como 3×10^8 poliedros.mL⁻¹, rendimientos que son consecuencia de la aptitud intrínseca de las células saUFL-AG-286 para replicar al virus AgMNPV, para el cual son naturalmente susceptibles y permisivas, de la capacidad del medio libre de suero UNL-10 para satisfacer los requerimientos específicos de la replicación viral y la producción de cuerpos de oclusión, y de la identificación de las condiciones de infección que permiten optimizar dichos rendimientos.

El cultivo de células saUFL-AG-286 en el medio de libre de suero UNL-10 se escaló en dos bio-reactores de diferente configuración, un tanque con agitación mecánica a través de impulsores de tipo *Rushton*, oxigenado por insuflado de aire, y un reactor *airlift* concéntrico, demostrando que estas células pueden adaptarse a las condiciones imperantes en procesos

fermentativos característicos de la industria productora de agro-biológicos. El reactor *airlift* mostró una aptitud superior que el reactor con agitación mecánica para el cultivo de esta línea celular, aptitud demostrada a través de una mayor velocidad celular específica de proliferación, una densidad celular máxima más elevada, la ausencia de fase *lag*, una viabilidad más elevada, un más eficiente uso de la glucosa, principal fuente de energía en los cultivos de las células saUFL-AG-286, y una menor producción y excreción de amonio, el principal tóxico producto del metabolismo celular.

Los cultivos de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV en ambos reactores produjeron elevados rendimientos volumétricos de cuerpos de oclusión virales, si bien resultaron 30% inferiores a los previstos de acuerdo al modelo empírico desarrollado en cultivos infectados a escala de frascos agitados. En el reactor *airlift*, la reducción del rendimiento volumétrico parece ser la consecuencia de una mayor eficiencia en la infección inicial, que limitó la proliferación celular, y por lo tanto el número de células productoras de poliedros, mientras que la capacidad específica de cada célula fue similar a la obtenida en cultivos en frascos agitados que alcanzaron la misma densidad celular máxima. Por otro lado, la reducción del rendimiento volumétrico de poliedros en cultivos infectados en el reactor de tipo tanque agitado parece ser consecuencia de una reducción en la capacidad celular específica de producción de cuerpos de oclusión. La heterogeneidad ambiental que caracteriza al reactor, y el estrés mecánico impuesto por la agitación, podrían ser los factores determinantes de la limitada habilidad de las células saUFL-AG-286 para producir poliedros de AgMNPV en el reactor de tipo tanque agitado. Es importante destacar que ambos reactores fueron configurados para simular las condiciones operativas típicas de las fermentaciones bacterianas industriales, de tal manera que los resultados alcanzados en esta tesis demuestran que es posible alcanzar rendimientos económicamente significativos en condiciones de producción industrial.

Por último, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron la factibilidad de producir esporos y cristales entomotóxicos de *Bacillus thuringiensis* sobre cultivos de células saUFL-AG-286 previamente infectados con AgMNPV en el medio de cultivo libre de suero, y de bajo costo, UNL-10. La propagación del bacilo, y su esporulación, no alteraron la actividad biológica de los cuerpos de oclusión de AgMNPV producidos en la primera etapa del proceso de co-producción, ni tampoco parecieron afectar la integridad de la poliedrina viral. El

proceso de co-producción de ambos insecticidas biológicos se escaló en un reactor de tipo tanque agitado, en el cual se obtuvo como productos finales una mezcla en suspensión de poliedros de AgMNPV y esporos de cristales de *Bacillus thuringiensis var. Kurstaki*. La evaluación de la actividad biológica de la mezcla insecticida sobre larvas neonatas de *Anticarsia gemmatalis* mostró que existe interacción entre ambos, aunque la dilucidación de la naturaleza de esta interacción requerirá la realización de experimentos específicos.

En nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de un proceso que permite producir dos insecticidas biológicos en una misma fermentación, y es también la primera descripción de un proceso que combina, en un mismo reactor, la multiplicación de un virus en cultivos de una línea celular eucariota, y la propagación y esporulación de una bacteria. Estos resultados pueden constituir un aporte al desarrollo de procesos fermentativos económicamente factibles de producción de agentes biológicos de control de plagas.

~Abstract~

Abstract

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), a major pest of soybean crops, can be efficiently controlled by using insecticides of biological origin. Two of the bio-insecticides used for this purpose are the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) and the entomotoxins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk). Despite its undeniable environmental advantages, acceptance of these pesticides, and the expansion of its application are conditioned by two main factors: its insecticidal properties are less remarkable than those that characterize the products of chemical synthesis and, moreover, exhibit a less advantageous activity/price relationship. In order to help overcome these limitations, it was proposed to study the feasibility of developing a combined fermentation process to obtain a co-product consisting of two bio-insecticides, AgMNPV and Btk. To this end, a four steps experimental strategy was developed: establishment of a suspension culture system for the cell line saUFL-AG-286 in flasks with orbital shaking; study of the influence of the conditions of infection, modelling and optimization of AgMNPV production in suspension cultures of saUFL-AG-286 cells; scaling-up of viral production in standard bio-reactors; and evaluation of the feasibility to obtain the viral-bacterial co-product.

First, it was established an experimental system consisting of suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in the serum-free medium UNL-10, in glass bottles of 100 mL volume, kept in a heated orbital shaker. In this system, the influences of two operational variables, the stirring speed and the filling volume of bottles, were studied using a full-factorial experimental design. In addition, it was determined the combination of operating conditions by which it is possible to reach an optimal value of the specific rate of cell proliferation. This optimal value is similar to that determined for the same cell line in cultures made in spinner flasks. The combination of both variables that permitted reach the maximum value of the specific rate of proliferation also allowed to obtain the highest yield of AgMNPV occlusion bodies in infected cultures of the saUFL-AG-286 cell line.

Once established, the system of saUFL-AG-286 cell suspension cultures in flasks with orbital shaking was applied to study the influence of two parameters of infection, the initial cell density and the multiplicity of infection on the viral production. The influence of both conditions of infection on the yield of occlusion bodies (OBs) of AgMNPV, produced in

serum-free suspension cultures of saUFL-AG-286 cells, was investigated by two 2^2 full factorial experiments with centre point. The yield of occlusion bodies proved to be sensitive to the modification of infection conditions. Maximum yield as high as 3×10^8 OBs.mL⁻¹ was attained provided that the maximum density of viable cells was in the range between 4 and 8×10^5 cells.mL⁻¹. The optimum value of the maximum density of viable cells could be reached by the combination of several values of initial cell density and multiplicity of infection. A regression model was established and validated in order to optimize the infection conditions.

The culture of saUFL-AG-286 cells in the serum-free medium UNL-10 was scaled-up in two different bio-reactors, a tank with mechanical agitation by Rushton-type impellers, oxygenated by bubbling air or oxygen, and a concentric airlift reactor, showing that these cells can adapt to the conditions that characterize the industrial fermentation processes producing agro-microbiological agents. The airlift reactor proved more apt than the mechanically stirred reactor for the cultivation of the saUFL-AG-286 cell line. The cultures in the airlift reactor showed a higher cell specific proliferation rate, a higher maximum cell density, the absence of lag phase, a higher viability, a more efficient use of glucose, the main source of energy in cultures of saUFL -AG-286 cells, and lower production and excretion of ammonia, the main toxic product of cellular metabolism.

AgMNPV infected cultures of saUFL-AG-286 cells in both bio-reactors produced high volumetric yields of viral occlusion bodies, although they were 30% lower than expected according to the empirical model developed in cultures infected in shaking bottles. The reduction of the volumetric yield of occlusion bodies of AgMNPV in the airlift reactor seems to be the result of greater efficiency in the initial infection that limited cell proliferation, and therefore the number of cells producing polyhedra, while the specific capacity of each cell was similar to that obtained in shake-flask cultures that reached the same maximum cell density. On the other hand, in the stirred tank type reactor, the limited ability of saUFL-AG-286 cells to produce AgMNPV OBs appears to be the cause of the reduced volumetric yield. Importantly, both reactors were configured to simulate the operating conditions typical of industrial bacterial fermentations, so that the results achieved in this thesis show that it is possible to achieve viral yields economically significant in industrial production conditions.

Finally, the results obtained in this thesis demonstrated the feasibility of producing spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* on cell cultures of the saUFL-AG-286 cell line previously infected with AgMNPV in the serum-free and low-cost medium UNL 10. The propagation of the bacteria, and its sporulation, did not alter the biological activity of AgMNPV occlusion bodies produced in the first stage of the co-production process, nor seem to affect the integrity of the viral polyhedrin. The co-production process was scaled-up in a stirred tank type reactor, obtaining as final product a mixture of AgMNPV occlusion bodies and spores and toxic crystals of *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. The evaluation of the biological activity of the mixture on neonate larvae of *Anticarsia gemmatalis* showed that there is interaction between both insecticides, although the elucidation of the nature of this interaction will require the implementation of specific experiments.

To our knowledge, this is the first description of a process that can produce two biological insecticides in the same fermentation, and is also the first description of a process that combines, in the same reactor, the multiplication of a virus in cultures of a eukaryotic cell line and the propagation and sporulation of a bacterium. These results can make a contribution to the development of economically feasible fermentation processes for production of biological agents for pest control.

~Referencias~

Referencias

- Adams, J.; McClintock, J. (1991). Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1 Nuclear polyhedrosis viruses of insects. En: Atlas of Invertebrate Viruses. (Editores: Adams, J.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 87 – 204.
- Adams, T.; Eiteman, M.; Adang, M. (1999) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. Bioresour. Technol. **67**: 83-87.
- Adams, T.; Eiteman, M.; Hanel, B. (2002) Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. Bioresour. Technol. **82**: 33-41.
- Aloi, L.; Cherry, R. (1996). Cellular response to agitation characterized by energy dissipation at the impeller tip. Chem. Eng. Science **51**: 1523-1529.
- Amin, G.; Alotaibi, S.; Youssef, N.A.; Saleh, W. D. (2008). Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. World J. Microbiol. Biotechnol. **24**:2465–2471.
- Annathur, G.V.; Pierce, J.L.; Combs, R.G.; Rathore, A.S.; Banerjee, A.; Steimeyer, D.E. (2003). Improvements in spinner-flask designs for insect-cell suspension culture. Appl. Biochem. Biotechnol. **38**(1): 15-18.
- Andrews, R.E.; Bibilos, M.M.; Bulla L.A. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol. **50**(4): 737-742.
- Aragón, J. (2007). Sistema de alarma de plagas agrícolas con trampas de luz y observaciones de campo. En *Planeta soja*. Editado por C.I.E.M. Juárez.
- Aronson, A. (2002) Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cell. Mol. Life Sci. **59**: 417-425.
- Avignone-Rossa, C.; Arcas, J.; Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. **8**: 301-304.
- Ayres, M.; Howard, S.; Kuzio, J.; Lopez-Ferber, M.; Possee, R. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virol. **202** (2): 586 - 605.
- Azanza, J.R.; García Quetglas, E.; Sádaba, B.; Gómez-Giu, A. (2008). Tenofovir: farmacología e interacciones. Enferm Infecc Microbiol Clin. **26** (8):2-6.
- Barreiro, P.; Soriano, V. (2005). Estrategias terapéuticas en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med Clin (Barc). **124**(17):661- 667.
- Barreiro, P.; Simarro, N.; Rodríguez-Nóvoa, S. (2006). Antirretrovirales. Medicine **9**(59): 3845-3851.
- Batista, F.; Pereira, C.; Mendonça, R.; Moraes, A. (2005). Enhancement of Sf-9 cells and baculovirus production employing Grace's medium supplemented with milk whey ultrafiltrate. Cytotechnol. **49**: 1 - 9.
- Becker, N (1997) Microbial control of mosquitoes: management of the upper Rhine mosquito population as a model programme. Parasitol. Today **13**: 485-487.
- Bédard, C.; Tom, R.; Kamen, A. (1993). Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. Biotechnol. Progr. **9**: 615 - 624.

- Bédard, C.; Kamen, A.A.; Tom, R.; Massie, B. (1994) Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high density batch cultures. *Cytotechnol.* **15**: 129 - 138.
- Bédard, C.; Kamen, A. (1997). Metabolism of insect cells culture *in vitro*. En: *Invertebrate cell culture*. (Editores: Maramorosch, K.; Mitsuhashi, J.). USA. 35 - 41.
- Benslimane, C.; Elias, C.; Hawari, J.; Kamen, A. (2005). Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radio labeling studies. *Biotechnol. Progr.* **21**: 78 - 86.
- Benz, G. (1986). Introduction: historical perspectives. En: *The biology of baculoviruses*, Vol I. (Editores: Granados, R.; Federici, B.), CRC press, Boca Ratón, Florida, U.S.A. 1-36.
- Berbert-Molina, M. A.; Prata, A. M. R.; Pessanha, L. G.; Silveira, M. M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:1397–1404.
- Blissard, G.; Rohrmann, G. (1989). Location, sequence, transcripcional mapping and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **170**: 537 - 555.
- Braunagel, S.C.; Parr, R.; Belyavskiy, M.; Summers, M.D. (1998). *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase. *Virology* **244**: 195-211.
- Braunagel, S.; Burks, J.; Rosas-Acosta, G.; Harrison, R.; Summers, M. (1999). Mutations within the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus FP 25 K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J. Virol.* **73** (10): 8559 - 8570.
- Bravo, A.; Gómez, I.; Conde, J.; Muñoz-Garaya, C.; Sánchez, J.; Miranda, R.; Zhuang, M.; Gill, S.S.; Soberón, M. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *BBA.* **1667**: 38– 46.
- Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423–435.
- Broderick, N.; Robinson, C.; McMahon, M.; Holt, J.; Handelsman, J.; Raffa, K. (2009). Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol.* **7**:11.
- Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M. (2001). Estructura y clasificación de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. (Editores: Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M.) Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 16 – 46.
- Calles, K.; Erikson, U.; Häggström, L. (2006). Effect of conditioned medium factors on productivity and cell physiology in *Trichoplusia ni* insect cell cultures. *Biotechnol. Progr.* **22**: 653-659.
- Carinhas, N.; Bernal, V.; Monteiro, F.; Carrondo, M.; Oliveira, R.; Alves, P. (2010). Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism. *Metab. Eng.* **12**: 39–52.
- Carner, G.; Turnipseed, S. (1977). Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. Econ. Entomol.* **70** (5): 608 - 610.
- Castro, M.; Souza, M.; Araujo, S.; Bilimoria, S. (1997). Replication of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **69**: 40-45.

- Castro, M.; Ribeiro, Z.; Souza, M. (2006). Infectivity of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: Morphology, viral production and protein synthesis. *Biolog. Control* **36**: 299-304.
- Chakraborty, S.; Kanhaisingh, P.; Greenfield, P.; Reid, S.; Teakle, R. (1995). *In vitro* production of wild-type *Heliothis* baculoviruses for use as biopesticides. *Aust. Biotechnol.* **5** (2): 82 - 86.
- Chakraborty, S.; Monsour, C.; Teakle, R.; Reid, S. (1999). Yield, biological activity, and field performance of a wild-type *Helicoverpa* nucleopolyhedrovirus produced in *H. zea* cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 199 - 205.
- Chalmers, J.J. (1996). Shear sensitivity of insect cells. *Cytotechnol.*, **20**: 163-171.
- Chang, L.; Grant, R.; Aronson, A. (2001). Regulation of the packaging of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin into inclusions. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5032-5036.
- Chang, J.H.; Choi, J.I.; Jin, B.R.; Roh, R.Y.; Olszewski, J.A.; Seo, S.J.; O'Reilly, D.R.; Je, Y.H. (2003). An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *J. Invertebr. Pathol.* **84**: 30-37.
- Charlton, C.; Volkman, L. (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**: 245 - 254.
- Cherry, A.; Williams, T. (2001). Control de insectos plagas mediante los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. (Editores: Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M.). Editorial: M.V. Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 389 - 450.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. (1989) On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* **34**(11):1391-1392.
- Chisti, Y. (2000). Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol.* **18** (10): 420-432.
- Chung, I.; Shuler, M. (1993). Effect of *Trichoplusia ni* BTI-Tn 5B1-4 cell density on human secreted alkaline phosphatase production. *Biotechnol. Progr.* **9**: 675 - 678.
- Claus, J.; Remondetto, G.; Guerrero, S.; Demonte, A.; Murguía, M.; Marcipar, A. (1993). *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures. *J. Biotechnol.* **31**: 1 - 15.
- Claus, J.; Ghiringhelli, P.; Romanowski V. (1997). Environmental dependence of polyhedra yields in IPLB-Sf-21 cells infected with *Anticarsia gemmatalis* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. En: *Invertebrate Cell Culture Novel Directions and Biotechnology Applications*. (Editores: Maramorosch, K.; Mitsuhashi, J.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A. 165 - 171.
- Claus, J.; Sciocco de Cap, A. (2001). Producción masiva de baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. (Editores: Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M.). Editorial: M.V. Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 257 - 312.
- Crecchio, C.; Stotzky, G. (2001) Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 573-581.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.

- De Gooijer, C.; Koken, R.; van Lier, F.; Kool, M.; Vlak, J.; Tramper, J. (1992). A structured dynamic model for the baculovirus infection process in insect-cell reactor configurations. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 537 - 548.
- Del Ponte, E. (1958). Metamorfosis. En: *Manual de Entomología médica y veterinaria*. Editorial: Librería del Colegio. 63-68.
- Donaldson, M.; Wood, A.; Kulakosky, M.; Shuler, M. (1999). Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line: influence of ammonia, time of harvest, temperature, and dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* **63**(3): 255 - 262.
- Doverskog, M.; Ljunggren, J.; Öhman, L.; Häggström, L. (1997). Physiology of cultured animal cells. *J. Biotechnol.* **59**:103 - 115.
- Doverskog, M.; Bertram, E.; Ljunggren, J.; Öhman, L.; Sennerstam, R.; Häggstrom, 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.; Vilu, R. (1995). The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf-9 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* **40**: 187 - 198.
- Duetz, W.A.; Witholt, B. (2004). Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. *Biochem. Eng. J.* **17**: 181-185.
- Eiteman, M.; Lee, S.; Altman, E. (2008). A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *J. Biol. Eng.* doi:10.1186/1754-1611-2-3
- Elias, C.; Zeiser, A.; Bédard, C.; Kamen, A. (2000). Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of $5,2 \times 10^7$ cells per ml and production of β -galactosidase at high cell density by fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **68** (4): 382 - 388.
- Engelhard, E.; Kam-Morgan, L.; Washburn, J.; Volkman, L. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **91**: 3224 - 3227.
- Farrera, R. R.; Pérez-Guevara, F.; de la Torre M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl. Microbiol. Technol.* **40**: 614-622.
- Faulkner, P.; Kuzio, J.; Williams, G.; Wilson, J. (1997). Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **78**: 3091 - 3100.
- Federici, B. (1986). Ultrastructure of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. I. (Editores: Granados, R; Federici, B.). CRC press, Boca Raton, Florida, USA. 62 – 88.
- Fernández-Larrea, O.(2002). Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*. **64**: 110-115.
- Ferrance, J.; Goel, A.; Atai, M. (1993). Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flow within the primary pathways and medium development. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 697 - 707.
- Fertig, G.; Rahn, H.; Angermann, A.; Klöppinger, M.; Miltenburger, H. (1993). Biotechnological aspects of the production of human pro-kallikrein using the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus – baculovirus-expression system. *Cytotechnol.* **11**(1): 67 - 75.
- Finney, D., 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Flexner, L.; Belnavis, D. (1998). Microbial insecticides. En: Biological and Biotechnological Control of Insect Pests (Agriculture & Environment Series.). (Editores: Jack E. Rechcigl y Nancy A. Rechcigl). Capítulo 2.

Fraser, M. (1986). Ultra structural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res. **95**: 189 - 195.

Funk, C.; Braunagel, S.; Rohrmann, G. (1997). Baculovirus structure. En: The baculoviruses. (Editores: Miller, L.). Plenum Press, New York, USA. 7 - 27.

Ghribi, D.; Zouari, N.; Trabelsi, H.; Jaoua, S. (2007). Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbón catabolite repression through adequate control of aeration. Enzyme Microb. Technol. **40**: 758-765.

Ghribi, D.; Zouari, N.; Trigui, W.; Jaoua, S. (2007). Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochem. **42**: 374–378 [0]

Gioria, V.V.; Jäger, V.; Claus, J.D. (2006). Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatilis* cell line. Cytotechnol. **52**: 113-124.

Gioria, V.V. (2008). Estudio del comportamiento de cultivos de la línea celular UFL-AG-286: requerimientos nutricionales, proliferación en medios libres de suero y replicación del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatilis*. Tesis doctoral, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Santa Fe, Universidad Nacional del Litoral.

Gohar, M.; Perchat, S. (2001). Sample Preparation for b-Exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Anal. Biochem. **298**: 112–117.

Gombart, A.; Pearson, M.; Rohrmann, G.; Beaudreau, G. (1989). A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. Virol. **169** (1): 182 - 193.

Gomes Monnerat, R.; Cardoso Batista, A.; Telles de Medeiros, P.; Soares Martins, E.; Melatti, V.; Botelho Praça, L.; Fiúza Dumas, V.; Morinaga, C.; Demo, C.; Menezes Gomes, A.; Falcão, R.; Brod Siqueira, C.; Oliveira Silva-Werneck, J.; Berry, C. (2007). Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. Biol. Control. **41**: 291–295.[0]

Gong T.; Jem K.; Manning S.; Georgis R.; Montgomery T. (1997). *In vitro* production of *Anagrapha falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in two insect cell lines. (Editores: Maramorosch, K.; Mitsuhashi, J.). Science Publishers Incompany, Enfield. USA, 149-155.

Gotoh, T.; Chiba, K.; Kikuchi, K. (2004). Oxygen consumption profiles of Sf-9 insect cells and their culture at low temperature to circumvent oxygen starvation. Biochem. Eng. J. **17**: 71-78.

Granados, R.; Williams, K. (1986). *In vivo* infection and replication of baculoviruses. En: The biology of baculoviruses. Vol. I. (Editores: Granados, R; Federici, B.). CRC press, Boca Ratón, Florida, USA. 89 - 108.

Grasela, J.J., McIntosh, A.H. (1998). *In vitro* and *in vivo* host range of *Anticarsia gemmatilis* multiple nuclear polyhedrosis virus. In Vitro Cell. Develop. Biol. Anim. **34**: 79-83.

Grochulski, P.; Masson, L.; Borisova, S.; Pusztai-Carey, M.; Schwartz, J.; Brousseau, R.; Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. **254**: 447-464.

Guihard, G.; Laprade, R.; Schwartz, J. (2001) Unfolding affects insect cell permeabilization by *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin. Biochim. Biophys. Acta **1515**: 110-119.

- He, J., Chen, S., Yu, Z. (2002) Determination of poly- β -hydroxybutyric acid in *Bacillus thuringiensis* by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* **973**: 197-202.
- He, J.; Luo, X.; Chen, S.; Cao, L.; Sun, M.; Yu, Z. (2003). Determination of spore concentration in *Bacillus thuringiensis* through the analysis of dicoplinatate by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **994**: 207-212.
- Herniou, E.; Olszewski, J.; O'Reilly, D.; Cory, J. (2004). Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *J. Virol.* **78** (7): 3244 - 3251.
- Hild, H.; Emery, A.; Al-Rubeai, M. (1992). The effect of pH, temperature, serum concentration and media composition on the growth of insect cell. En: *Baculovirus and recombinant protein production processes*. Vlak, J.; Schlager, E.; Bernard, A. (eds.). Roche, Basel, Suiza. 316 – 321
- Hinds, W.; Osterberger, B. (1931). The occurrence of *Anticarsia gemmatalis* as a soybean pest in Louisiana in 1929. *J. Econ. Entomol.* **24**:1168 - 1173.
- Hink, W. (1970). Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nat.* **266**: 466 - 467.
- Hink, W.; Strauss, E.; Ramoska, W. (1977). Propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture: methods for infecting cells. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 185 - 191.
- Hink, W.; Strauss, E. (1980). Semi-continuous culture of the TN-368 cell line in fermenters with virus production in harvested cells. (Editores: Kurstak, E.; Maramorosch, K.; Dubendorfer, A.). Elsevier / North-Holland Biomedical Press, New York, USA.
- Hink, W.F.; Hall, R.L. (1989). Recently established invertebrate cell lines En: *Invertebrate Cell System Applications*. Vol. II. (Editores: Mitsuashi, J.). CRC Press Inc., Florida, 269.
- Hongzhang, C.; Fujian, X.; Zhonghou, T.; Zuohu, L. (2002). A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. *J. Biosc. Bioengineer.* **93**(2): 211-214.
- Horton, H.; Burand, J. (1993). Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cell and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* **67** (4): 1860 - 1868.
- Hu, Y.; Lu, J.; Chang, Y. (2003). High-density cultivation of insect cells and production of recombinant baculovirus using a novel oscillating bioreactor. *Citotechnol.* **42**: 145-153.
- Huang, T.K.; Wang, P.M.; Wu, W.T. (2001) Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. *Biochem. Eng. J.* **7**:35–39.
- Iannone, N. (2007). ALERTA! Plagas de soja. Edited by C.s.d. alerta: INTA Pergamino.
- Ibarra, J.; Federici, B. (1987). An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **3**: 187–192.
- Ibarra, J.; Del Rincón Castro, M. (2001). Capacidad insecticida de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. (Editores: Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M.). Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 203 - 224.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dB (2006). The Universal Virus Database, version 3. Büchen – Osmond, C. Columbia University, New York, USA.
- İçgen, Y.; İçgen, B.; Özcengiz, G. (2002a) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res. Microbiol.* **153**: 605-609.

- Içgen, Y.; Içgen, B.; Özcengiz, G. (2002b). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Res. Microbiol.* **153**: 599-604.
- Jarvis, D.; García, A. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp 64 protein. *Virology*. **205**: 300 - 313.
- Jäger, V. (1996). Perfusion bioreactors for the production of recombinant proteins in insect cells. *Cytotechnol.* **20**: 191 - 198.
- Jehle, J.; Blissard, G.; Bonning, B.; Cory, S.; Herniou, E.; Rohrmann, G.; Theilmann, D.; Thien S.; Vlak, J. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* **151**: 1257 - 1266.
- Jorio, H.; Tan, R.; Meghrous, J.; Bourget, L.; Kamen, A. (2006). Analysis of baculovirus aggregates using flow cytometry. *J. Virol. Methods* **134**: 8-12.
- Kamen, A.; Tom, R.; Caron, A.; Chavarie, C.; Massie, B.; Archambault, J. (1991). Culture of insect cells in a *Helical ribbon* impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 619 - 628.
- Katsuma, S.; Noguchi, Y.; Zhou, C.; Kobayashi, M.; Maeda, S. (1999). Characterization of the 25 K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: implications for post-mortem host degradation. *J. Gen. Virol.* **80**: 783 - 791.
- Kioukia, N.; Al-Rubeai, M.; Zhang, Z.; Emery, A. N.; Nienow, A. W.; Thomas, C. R. (1995). A study of uninfected and baculovirus infected *Spodoptera frugiperda* cells in T- and spinner flasks. *Biotechnol. Lett.* **17**: 7-12.
- Kirwood, T.; Bangham, R. (1994). Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Microbiol.* **91**: 8685 - 8689.
- Klöpffinger, M.; Fertig, G.; Fraune, E.; Miltenburger, H. (1990). Multistage production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures. *Cytotechnol.* **4** (3): 271 - 278.
- Kool, M.; Voncken, J.; van Lier, F.; Tramper, J.; Vlak, J. (1991). Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*. **183** (2): 739 - 746.
- Kool, M.; van den Berg, P.; Tramper, J.; Goldbach, R.; Vlak, J. (1993a). Location of two putative origins of DNA replication *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. **192** (1): 94 - 101.
- Kool, M.; Voeten, J.; Goldbach, R.; Tramper, J.; Vlak, J. (1993b). Identification of seven putative origins of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *J. Gen. Virol.* **74**: 2661 - 2668.
- Krell, P. (1996). Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnol.* **20**: 125-137.
- Kumar, A.; Shuler, M. (1995). Model of a split-flow airlift bioreactor for attachment-dependent, baculovirus-infected insect cells. *Biotechnol. Progr.* **11**: 412-419.
- Kuppusamy, M.; Balaraman, K. (1990) Effect of corn-steep liquor on growth and mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* de Barjac 1978 and *B. Sphaericus* Neide 1904. *Indian J. Esp. Biol.* **29**: 187-189.
- Kwa, M.; Maagd, R.; Stiekema, W.; Vlak, J.; Bosh, D. (1998) Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C to cultured insect cells. *J. Invertebr. Pathol.* **71**: 121-127.
- Lachhab, K.; Tyagi, R.; Valéro, J. (2001) Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochem.* **37**: 197-208.

- Laemmli, U.K.. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lecina, M.; Soley, A.; Gracia, J.; Espunya, E.; Lázaro, B.; Cairó, J.; Godia, F. (2006). Application of on-line OUR measurements to detect action points to improve baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *J. Biotechnol.* **125**: 385-394.
- Lee, S.; Park, T. (1995). Two-phase cultivation of insect cells for production of recombinant protein. *Biotechnol. Tech.* **9**(10): 719 - 724.
- Lee, W.-D.; Akao, T.; Yamashita, S.; Katayama, H.; Maeda, M.; Sayito, H.; Mizuki, E.; Ohba, M. (2000). Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**: 218-223.
- Licari, P.; Bailey, J.E. (1992). Modelling the population-dynamics of baculovirus-infected insect cells—optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. *Biotechnol. Bioengn.* **39**: 432–441.
- Lin, J.P.; Tian, J.; You, J.F.; Jin, Z.H.; Xu, Z.N.; Cen, P.L. (2004). An effective strategy for the co-production of *S*-adenosyl-l-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. *Biochem. Eng. J.* **21**: 19–25.
- Liu, X.; Zhang, Q.; Xu, B.; Li, J. (2006) Effects of Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on larval mortality and pupation. *Pest. Manag. Sci.* **62**(8):729-737.
- López y López, V. E.; de la Torre, M. (2005). Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 254-260.
- Lu, J.; Chung, Y.; Chan, Z.; Hu, Y. (2005). A novel oscillating bioreactor BelloCell: implications for insect cell culture and recombinant protein production. *Biotechnol. Lett.* **27**: 1059-1065.
- Lua, L.; Reid, S. (2000). Virus morphogenesis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* serum-free suspension culture. *J. Gen. Virol.* **81**: 2531 - 2543.
- Lua, L.; Pedrini, M.; Reid, S.; Robertson, A.; Tribe, D. (2002). Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. *J. Gen. Virol.* **83**: 945 - 955.
- Lua, L.; Reid, S. (2003). Growth, viral production and metabolism of a *Helicoverpa zea* cell line in serum-free culture. *Cytotechnol.* **42**: 109 - 120.
- Lynn, D.; Oberlander, H. (1983). The establishment of cell lines from imaginal wing discs of *Spodoptera frugiperda* and *Plodta interpunctella*. *J. Insect Physiol.* **29**: 591 - 596.
- Lynn, D. (1996). Development and characterization of insect cell lines. *Cytotechnol.* **20**: 3 - 11.
- Lynn, D. (2003). Comparative susceptibilities of twelve insect cell lines to infection by three baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* **82**: 129 - 131.
- Lynn, D.; Ferkovich, S. (2004): New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. *J. Insect Sci.* **4**: 9.
- Ma, X. M.; Liu, X. X.; Ning, X.; Zhang, B.; Han, F.; Guan, X.M.; Tan, Y. F.; Zhang, Q. W. (2008). Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Invertebr. Pathol.* **99**: 123–128.

- Maagd, R.A.; Bakker, P.L.; Masson, L.; Adang, M.J.; Sangadala, S.; Stiekema, W.; Bosch, D. (1999) Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**(2): 463–471.
- Maagd, R.; Bravo, A.; Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TIG* **17**: 193-199.
- Maiorella, B.; Inlow, D.; Shauger, A.; Harano, D. (1988). Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Biotechnol.* **6**: 1406 - 1410.
- Maranga, L.; Cunha, A.; Clemente, J.; Cruz, P.; Carrondo, M. (2004). Scale-up of virus-like particles productions: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *J. Biotechnol.* **107**: 55-64.
- Marteijn, R.; Oude-Elferink, M.; Martens, D.; de Gooijer, C.; Tramper, J. (2000). Effect of low inoculation density in the scale-up of insect cell cultures. *Biotechnol. Progr.* **16** (5): 795 - 799.
- Marzban, R.; He, Q.; Liu, X.; Zhang, Q. (2009). Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **101**: 71–76.
- McKenna, K.; Shuler, M.; Granados, R. (1997). Increased virus production in suspension culture by a *Trichoplusia ni* cell line in serum-free media. *Biotechnol. Prog.* **13**: 805 - 809.
- Mendonça, R.; Palomares, L.; Ramírez, O. (1999). An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J. Biotechnol.* **72**: 61 - 75.
- Meghrou, J.; Aucoin, M.; Jacob, D.; Chabal, P.; Arcand, N.; Kamen, A. (2005). Production of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors using a Baculovirus/Insect Cell suspension Culture System: from shake flasks to a 20-L Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **21**(1): 154-160.
- Milne, R.; Liu, Y.; Gauthier, D.; van Frankenhuyzen, K. (2008). Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* **99**: 166–172.
- Miltenburger, H.; Naser, W.; Harvey, J.; Huber, J.; Huger, A. (1984). The cellular substrate: a very important requirement for baculovirus *in vitro* replication. *Z Naturforsch.* **39**: 993 - 1002.
- Miltenburger, H. (1985). Qualitative and quantitative aspects of animal cell *in vitro* systems. *Dev. Biol. Stand.* **60**: 147 - 159.
- Mitchell-Logean, C.; Murhammer, D. (1997). Bioreactor headspace purging reduces dissolved carbon dioxide accumulation in insect cell cultures and enhances cell growth. *Biotechnol. Prog.* **13**: 875-877.
- Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Go´mez, D.R.; Paro, F.E.; Soldorio, I.L. (2001). Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect. *Biol. Control* **20**: 247–253.
- Morris, O.; Converse, V.; Kanagaratnam, P.; Davies J. S. (1996) Effects of Cultural Conditions on Spore-Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* (HD133). *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 129-136.
- Moscardi, F. (1999). Assement of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **44**: 257 - 289.
- Moscardi, F.; Morales, L.; Santos, B. (2002). The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. *Proceedings of the 8th International Colloquium on*

- Invertebrate Pathology and Microbial Control, Society for Invertebrate Pathology, Foz do Iguaçu, Brazil. Embrapa Soja, Londrina, Documents. **184**: 86 - 91.
- Moscardi, F.; Santos, B. (2005). Produção commercial de nucleopoliedrosis de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidóptero: Noctuidae) em laboratório. Proceeding of the IX Simposio de Controle Biológico. Recife. Brazil. 42.
- Müller, R.; Pearson, M.; Russell, R.; Rohrmann, G. (1990). A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization. *Virology*. **176** (1): 133 - 144.
- Müller, N.; Girard, P.; Hacker, D.; Jordan, M.; Wurn, F. (2005). Orbital shaker technology for the cultivation of mammalian cells in suspension. *Biotechnol. Bioeng.* **89** (4): 400 - 406.
- Mummigatti, S.; Raghunathan, A. (1990) Influence of media composition on the production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *Thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **55**: 147-151.
- Murhammer, D. (1996). Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 199 - 220.
- Negrete, A.; Kotin, R. (2007). Production of recombinant-adenovirus associated vectors using two bioreactors configurations at different scales. *J. Virol. Methods* **145**: 155-161.
- Nickerson, K.; Pinto, J.; Bulla, L. (1974) Sporulation of *Bacillus thuringiensis* without concurrent derepression of tricarboxylic acid Cycle. *J. Bacteriol.* **117**: 321-323.
- Obeta, J. A.; Okafor, N. (1984). Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** (4): 863-867.
- O'Connor, K.; Cowger, N.; De Kee, D.; Schwarz, R. (2002). Prolonged shearing of insect cells in a coquette bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 600-608.
- Öhman, L.; Alarcón, M.; Ljunggren, J.; Ramqvist, A.; Häggström, L. (1996). Glutamine is not essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnol. Lett.* **18** (7): 765 - 770.
- Ozcan, O.; Içgen, B.; Özcengiz, G. (2010). Pretreatment of poultry litter improves *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides production. *Bioresour. Technol.* **101**: 2401-2404.
- Özkan, M.; Dilek, F. B.; Yetis, U.; Özcengiz, G. (2003). Nutritional and cultural parameters influencing antidipterian delta-endotoxin production. *Res. Microbiol.* **154**: 49-53.
- Ozturk, S.; Riley, M.; Palsson, B. (1992): Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 418 - 431.
- Palomares, L.; Ramirez, O. (1998). Insect cell culture: recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production. *Adv. Biopr. Engineer.* II: 25 - 52.
- Palomares, L.; Ramirez, O. (1998). Insect cell culture: recent advances, bioengineering challenges and implications in protein production. En: *Advances in Bioprocess Engineering II*. (Editores: Galindo E., Ramirez O.T.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 25-52.
- Palomares, L.; Estrada-Mondaca, S.; Ramirez, O. (2005). Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. En: *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies (Biotechnology and Bioprocessing series)*. (Editores: Taylor and Francis Group). New York. USA. 627 - 692.

- Pamboukian, M. M.; Jorge, S. A. C.; Santos, M. G.; Yokomizo, A. Y.; Pereira, C. A.; Tonso, A. (2008). Insect cells respiratory activity in bioreactor. *Citotechnol.* **57**: 37-44.
- Parajó, J.C.; Santos, V.; Vázquez, M. (1997). Co-production of carotenoids and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Biotechnol. Lett.* **19**: 139-141.
- Passarelli, A.; Miller, L. (1993). Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n and lef-2. *J. Virol.* **67** (4): 2149 - 2158.
- Pearson, M.; Russell, R.; Rohrmann, G. (2001). Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions. *Virol.* **291**: 22 - 31.
- Pedrini, M.; Nielsen, L.; Reid, S.; Chan, L. (2005). Properties of a unique mutant of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus that exhibits a partial many Polyhedra and few Polyhedra phenotype upon extended serial passaging in suspension cell cultures. *In Vitro Cell. Development. Biol. Animal.* **41**: 289 - 297.
- Pedrini, M.; Christian, P.; Nielsen, L.; Reid, S.; Chan, L. (2006). Importance of virus-medium interactions on the biological activity of wild-type *Heliothis* nucleopolyhedroviruses propagated via suspension insect cell culture. *J. Virol. Methods.* **136**: 267 - 272.
- Pirt, J. (1975). Oxygen demand and supply. En: *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications. 81-93.
- Pombo, V.; Velloso, L.; Ribeiro, B.; Bão, S. (1998). Structural and ultrastructural changes during the infection of UFLAg-286 cell with the baculovirus AgMNPV. *J. Invertebr. Pathol.* **72**: 239 - 245.
- Prabakaran, G.; Balaraman, K. (2006) Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biol. Control* **36**: 288-292.
- Prabakaran, G.; Hoti. S.L.; Manonmani, A.M.; Balaraman, K. (2008). Coconut water as a cheap source for the production of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. *Acta Trop.* **105**: 35-38.
- Radford, K.; Reid, S.; Greenfield, P. (1997). Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnol. Bioeng.* **56**: 32 - 44.
- Rady, M.; el-Deen, A. (1991). Effect of nutritive elements on the extracellular protein of different *Bacillus* strains, toxic to mosquito larvae. *J. Egypt. Parasitol.* **21**: 575-583.
- Rainer, B.W. (1990). Determination methods of the volumetric oxygen transfer coefficient $k_{L}a$ in bioreactors. *Chem. Biochem. Eng.* **4**: 185-196.
- Raymond, B.; Sayyed, A.H.; Wright, D.J. (2006) The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with resistance management for *Bacillus thuringiensis*: co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* **93**(2):114-120.
- Razo Flores, E.; Perez, F.; de la Torre, M. (1997) Scale-Up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *J. Ferment. Bioengineer.* **83**: 561-564.
- Reddy, S.; Suresh Kumar, N.; Venkateswerlu, G. (1998). Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains. *Biotechnol. Lett.* **20** (3): 279-281.
- Reed, L.J.; Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493.

- Regis, L.; Silva-Filha, M.; Nielsen-LeRoux, Ch.; Charles, J. (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol.* **17**: 377-380.
- Reuveny, S.; Kim, Y.; Kemp, C.; Shiloach, J. (1993). Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 235 - 239.
- Rhiel, M.; Mitchell-Logean, C.; Murhammer, D. (1997). Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **55** (6): 909 - 920.
- Rhodes, D. (1996). Economics of baculovirus-insect cell production systems. *Cytotechnol.* **20**: 291 - 297.
- Rodas, V.; Marques, F.; Honda, M.; Soares, D.; Jorge, S.; Antoniazzi, M.; Medugno, C.; Castro, M.; Ribeiro, B.; Souza, M.; Tonso, A.; Pereira, C. (2005). Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Citotechnol.* **48**: 27 - 39.
- Rowe, G.; Margaritis, A.; Wei, N. (2003) Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. *Biotechnol. Bioengn.* **86**: 377-388.
- Rowe, G.; Margaritis, A. (2004). Bioprocess design and economical analysis for the comercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*. *Biotechnol. Bioengineer.* **86** (4): 377-388.
- Rukmini, V.; Reddy, Ch.; Venkateswerlu, G. (2000) *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**: 109-116.
- Ryll, T.; Valley, U.; Wagner, R. (1994): Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mamalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 184 - 193.
- Salama, H.; Foda, M.; Selim, M.; El-Sharaby, A. (1983) Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spore and biologically-active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Zentralbl. Mikrobiol.* **138**: 553-563.
- Sarrafzadeh, M.H.; Navarro, J.M. (2005). The effect of oxygen on the sporulation, sintesis de δ -endotoxina y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* H14. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s1 1274-005-9037-9.
- Sauka, D.H.; Sánchez, J.; Bravo, A.; Benintende, G.B. (2007). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* **94**: 125–129.
- Sauka, D.; Benintende, G.B. (2008) *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.* **40**: 124-140.
- Scherrer, P.; Lüthy, P.; Trumpi, B. (1973) Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentration. *Appl. Microbiol.* **25**: 644-646.
- Schmidt, N.R.; Haywood, J.M.; Bonning, B.C. (2009) Toward the physiological basis for increased *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus infection following feeding of *Agrotis ipsilon* larvae on transgenic corn expressing Cry1Fa2. *J. Invertebr. Pathol.* **102**(2):141-148.
- Schneider, M.; Reymond, F.; Marison, I. W.; von Stockar, U. (1995). Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. *Enzyme Microbial Technol.* **17** (9): 839-847.
- [0]Schnepf, E. (1995) *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 305-312.

- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.; Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 775-806.
- Sciocco de Cap, A. (2001). Biología y patogénesis de los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. (Editores: Caballero, P.; Williams, T.; López-Ferber, M.) Editorial: M.V.Phytona-España en colaboración con Universidad Pública de Navarra. 47 - 72.
- Sieburth, P.; Maruniak, J. (1988a). Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 453 - 458.
- Sieburth, P.; Maruniak, J. (1988b). Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* **24** (3): 195 - 198.
- Siegel, J. (2001) The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**: 13-21.
- Soares de Rezende, S.H.; Castro, M.E.B.; Lobo de Souza, M. (2009). Accumulation of few polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus in cell culture. *J. Invertebr. Pathol.* **100**: 153-159.
- Soberón, M.; Fernández, L.E.; Pérez, C.; Gill, S.S.; Bravo, A. (2007) Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* **49**: 597-600.
- Son, J.; Buchholz, R.; Park, J.; Kim, S. (2005). Production of baculoviruses and expression of green fluorescent protein in immobilised Sf21 insect cell cultivation. *Biochem. Eng. J.* **29**: 55-61.
- Stavroulakis, D.; Kalogerakis, N.; Behie, L. (1991). Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 116 -126.
- Stockdale, H.; Gardiner, G. (1977). The influence of the condition of cells and medium on production of polyhedra of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 330 - 336.
- Szewczyk, B.; Hoyos-Carvajal, L.; Paluszek, M.; Skrzecz, I.; Lobo do Souza, M. (2006). Baculoviruses: re-emerging biopesticides. *Biotechnol. Adv.* **24** (2): 143 - 160.
- Tan, Y.; Donovan, W. (2000). Deletion of *apr A* and *npr A* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *J. Biotechnol.* **84**: 67-72.
- Taticek, R.; Shuler, M. (1997). Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **54**: 142-152.
- Taticek, R.; Choi, C.; Phan, S.; Palomares, L.; Shuler, M. (2001). Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol. Progr.* **17**: 676 - 684.
- Tirado Montiel, M.; Tyagi, R.; Valero, J. (2001) Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Res.* **35**: 3807-3816.
- Tomalski, M.D.; Miller, L.K. (1991). Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* **352**: 82-85.
- Tsao, E.; Mason, M.; Cacciuttolo, M.; Bowen, S. (1996). Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 130 - 138.
- Udayasuriyan, V.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi, T. (1996) Enhanced expression of *cryIA(a)* Gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioengineer.* **82**: 306-308.

- van Lier, F.; van den End, E.; de Gooijer, C.; Vlak, J.; Tramper, J. (1990). Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33** (1): 43 - 47.
- van Lier, F.; van der Meijs W.; Grobber, N.; Olie, R.; Vlak, J.; Tramper, J. (1992). Continuous beta-galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. *J. Biotechnol.* **22** (3): 291 - 298.
- van Lier, F.; van Duijnhoven, G.; de Vaan M.; Vlak, J.; Tramper, J. (1994). Continuous beta-galactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in a two-stage bioreactor system. *Biotechnol. Progr.* **10** (1): 60 - 64.
- Vaughn, J. (1976). The production of nuclear polyhedrosis virus in large volume cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **28**: 233 - 237.
- Vaughn, J.; Godwin, R.; Tompkins, G. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro.* **13**: 213 - 217.
- Vidarthi, A.; Tyagi, R.; Valero, J.; Surampalli, R. (2002) Studies on the production of *B. thuringiensis* using wastewater sludge as a raw material. *Water Res.* **36**: 4850-4860.
- Villacide, J.; Corley, J. (2007). Manejo integrado de la avispa barrenadora de los pinos *Sirex noctilio*. Serie técnica: "Manejo integrado de Plagas Forestales". (Editores: Villacide, J.M. y J.C. Corley). Cuadernillo n° 1. Noviembre de 2007. ISSN 1851-4103.
- Vimala Devi, P. ; Ravinder, T.; Jaidev, C. (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol.* **88**: 163-168.
- Visnovsky, G. (2005). Optimization of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus in insect cell cultures in airlift reactors. The Kreitman School of Advanced Graduated Studies, Ben-Gurion University of the Negev, Israel.
- Visnovsky, G.; Claus, J. (1994). Influence of time and multiplicity of infection on the batch production of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in lepidopteran insect cell cultures. *Adv. Biopr. Eng.* 123 - 128.
- Visnovsky, G.; Claus, J.; Merchuk, J. (2003). Airlift reactors as a tool for insect cells and baculovirus mass production. *Lat. Am. Appl. Res.* **33**: 117 - 121.
- Wakisaka, Y.; Masaki, E.; Nishimoto, Y. (1982). Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hidroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** (6): 1473-1480.
- Walther, C.; Couche, G.; Pfannenstiel, M.; Egan, S.; Bivin, L.; Nickerson, K. (1986) Analysis of Mosquito larvicidal potencial exhibited by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 650-653.
- Wang, N.; Butler, J. P.; Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**: 1124-1127.
- Weber, W., Weber, E., Geisse, S., Memmert, K. (2002). Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. *Cytotechnol.* **38**: 77-85.
- Weiss, S.; Smith, G.; Kalter, S.; Vaughn, J. (1981). Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. *In Vitro.* **17**(6): 495 - 502.

- Weiss S.; Orr T.; Smith G.; Kalter S.; Vaughn J.; Dougherty, E. (1982). Quantitative measurement of oxygen consumption in insect cell culture infected with polyhedrosis virus. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1145 -1154.
- Weiss, S.A.; Vaughn, J.L. (1986). Culture methods for insect cell propagation of baculovirus. En: *The biology of baculoviruses, Vol. II. Practical Application for Insect Control.* (Editores: Granados R. R., and Federici B.A.). Boca Raton, Florida, CRC Press, 64.
- Whitford, M.; Faulkner, P. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **66** (8): 4763 - 4768.
- Wilkie, G.; Stockdale H.; Pirt, S. (1980). Chemically-defined media for production of insect cells and viruses *in vitro*. *Dev. Biol. Stand.* **46**: 29 - 37.
- Wong, K.; Peter, C.; Greenfield, P.; Reid, S.; Nielsen, L.K., (1996). Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept. *Biotechnol. Bioengn.* **49**: 659 - 666.
- Wood H.; Johnston L.; Burand J. (1982). Inhibition of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in high-density *Trichoplusia ni* cell cultures. *Virol.* **119**: 245 - 254.
- Wyatt, G. (1961). The biochemistry of insect hemolymph. *Annu. Rev. Entomol.* **6**: 75.
- Wu, S.; Dale, B.; Liao, J. (1993). Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 104 - 110.
- Wu, J. (1995). Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.* **43**: 81-94.
- Yamaji, H.; Tagai, S.; Fukuda, H. (1999): Optimal production of recombinant protein by the baculovirus-insect cell system in shake-flask culture with medium replacement. *J. Biosc. Bioeng.* **87** (5): 636 - 641.
- Yang, J.; Gecik, P.; Collins, A.; Czarnecki, S.; Hsu, H.; Lasdun, A.; Sundaram, R.; Muthukumar, G.; Silberklang, M. (1996). Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth. *Biotechnol. Bioengn.* **52**: 696-706.
- Yang, X.; Wang, S. (1998). Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 95-98.
- Yeza, A.; Tyagi, R.D.; Valéro J.R.; Surampalli, R.Y.(2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresour.Technol.* **97**: 1850–1857.
- Zhang, Y.H.; Enden, G.; Merchuk, J. C. (2005). Insect cells–baculovirus system: Factors affecting growth and low MOI infection. *Biochem. Eng. J.* **27**: 8-16.
- Zhang, X.; Liang, Z.; Siddiqui, Z.A.; Gong, Y.; Yu, Z.; Chen, S. (2009). Efficient screening and breeding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high toxicity against *Spodoptera exigua* and *Heliothis armigera*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10295-009-0556-5.
- Zouari, N.; Jaoua, S. (1999) Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme Microbial Technol.* **25**: 364-371.
- Zouari, N.; Ali, S.; Jaoua, S. (2002) Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in a gruel fish meal media. *Enzyme Microbial Technol.* **31**: 411-418.