

## EFFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR Y LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO

Cuitláhuac Chávez-Peña<sup>a</sup>, Neydeli Adriana Ayala-Mendivil<sup>b</sup>,  
Octavio Tonatiuh Ramírez<sup>a</sup> y Laura A. Palomares<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62210.

<sup>b</sup>Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de Febrero, no.818 Sur, Col. Centro,  
Ciudad Obregón, Sonora, México. \*E-mail: laura@ibt.unam.mx

### RESUMEN

El sistema células de insecto-baculovirus ha demostrado ser un sistema útil y versátil para la producción de proteínas recombinantes. Consiste en la infección de células de insecto con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína de interés. Una de las principales limitantes del sistema es obtener resguardos virales con alto contenido de partículas virales infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp). En este trabajo se evaluó el efecto de la multiplicidad de infección (MDI) y la concentración celular al momento de la infección (CCI) en la amplificación de un baculovirus recombinante. Se evaluaron combinaciones de MDI de 0.1 y 1 ufp/célula con CCI de 1 y 2 x10<sup>6</sup> cél/mL. Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las células infectadas, la concentración de proteína total y de la proteína gp64 en el sobrenadante de los cultivos y los títulos virales al momento de la cosecha. Se encontró que una MDI de 0.1 ufp/cél y una concentración celular de 1x10<sup>6</sup> cél/mL resultaron en el mayor título viral, 3.8 ± 2 x10<sup>8</sup> ufp/mL. Los mayores títulos virales estuvieron acompañados por un menor crecimiento celular. Los resultados de este trabajo pueden ser utilizados para producir resguardos de baculovirus recombinantes con títulos virales altos y mejorar la eficiencia del proceso.

**Palabras Clave:** Baculovirus, células de insecto, concentración celular, multiplicidad de infección, títulos virales.

### ABSTRACT

The insect cell-baculovirus expression system is versatile and useful for the production of recombinant proteins. It consists in infecting insect cell cultures with a recombinant baculovirus that contains the gene of interest. An important limitation of the system is the limited availability of baculoviral stocks with high titers of infectious particles (plaque forming units, pfu). In this work, the effect of multiplicity of infection (MOI) and cell concentration at the time of infection (CCI) on the yield of baculovirus infectious particles was investigated. Combinations of two values for MOI (0.1 or 1 pfu/cell) and CCI (1 or 2 x10<sup>6</sup> cel/mL) were tested. Kinetics of cell growth, total protein and gp64 concentrations in the culture supernatant, and the baculovirus titer at the time of harvest were determined. The highest viral titers, 3.8 ± 2 x10<sup>8</sup> pfu/mL, were obtained in cultures infected at a MOI = 0.1 pfu/cell and a CCI = 1x10<sup>6</sup> cell/mL. Such cultures had the lowest cell growth after infection. The results obtained in this work can be used for the efficient production of baculovirus stocks with high viral titers.

**Key Words:** Baculovirus, insect cells, cell concentration, multiplicity of infection, viral titers.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes que ha tenido mucho éxito para cierto tipo de aplicaciones es el sistema células de insecto-baculovirus (SCI-B). Específicamente, el SCI-B ha sido utilizado para la producción de proteínas virales recombinantes que se ensamblan en partículas similares a los virus nativos, las partículas pseudovirales (PPV). La vacuna Cervarix, aprobada en México para la prevención de cáncer cervicouterino, está basada en PPV del virus de papiloma humano y es producida por el SCI-B. Además, varias vacunas veterinarias son producidas con este sistema. Un gran número de proteínas recombinantes con uso en investigación, desarrollo de biofármacos y diagnóstico han sido expresadas en el SCI-B. El SCI-B se ha utilizado para la producción de vectores recombinantes para terapia génica, como es el caso de vectores de virus adenoasociados<sup>[1]</sup>, o incluso el propio baculovirus, que es capaz de entregar genes eficientemente a células de mamíferos<sup>[2,3,4]</sup>. Otras aplicaciones incluyen la rápida generación de proteínas recombinantes para el desarrollo de terapias personalizadas.

El SCI-B consiste en utilizar un baculovirus, virus con un rango de hospedero restringido a artrópodos, como vector para entregar un gen de interés a células de insecto cultivadas *in vitro*. El baculovirus nucleopoliedrovirus de multicápside de *Autographa californica* (AcMNPV) es el más utilizado en el SCI-B, por ser capaz de infectar cerca de 30 líneas celulares de insectos<sup>[3]</sup>. Su genoma, de 131 kpb, contiene uno de los promotores más fuertes conocidos, el promotor que regula la expresión del gen *polh*, que codifica para la proteína poliedrina. Con el fin de utilizar el baculovirus como vector, se sustituye *polh* por el gen de interés, ya que esta proteína no es necesaria para la replicación viral *in vitro*. La expresión de los genes heterólogos bajo el control del promotor de *polh* permite obtener rendimientos de hasta 50% de proteína recombinante con respecto a la proteína total<sup>[3]</sup>. Existen otros promotores de baculovirus con características particulares que son utilizados con menor frecuencia.

La producción de proteínas recombinantes en el SCI-B es un sistema de dos etapas. Inicialmente, se cultivan las células de insecto hasta obtener la concentración celular deseada (concentración celular al tiempo de infección, CCI). Entonces se agrega un volumen del resguardo de baculovirus que contiene la cantidad de partículas infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp) necesaria para infectar al cultivo con la multiplicidad de infección (MDI, número de partículas virales infecciosas agregadas por cada célula en el cultivo) deseada. El diseño de estrategias de producción de proteínas recombinantes en el SCI-B se basa en la manipulación de la CCI, la MDI y el tiempo de cosecha. Estas variables están interrelacionadas, se manipulan fácilmente y tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos<sup>[5,6,7]</sup>.

La MDI utilizada determina la fracción de la población celular que es infectada al inicio del cultivo. Esta relación puede ser modelada mediante la distribución de Poisson<sup>[8]</sup> (Figura 1). A MDI mayores de 5 ufp/cél, el 100 % de la población es infectado con el baculovirus recombinante adicionado al cultivo. En consecuencia, el virus toma control de la célula, promueve la síntesis de sus proteínas y evita la síntesis de las proteínas celulares<sup>[3,9]</sup>. Cuando se utilizan MDI menores que 5 ufp/cél, sólo una fracción de la población es infectada inicialmente. Las células infectadas producen nueva progenie viral entre las 12 y las 20 horas postinfección<sup>[9]</sup>. La progenie viral es la que infecta el resto del cultivo y la que al final del cultivo constituye el nuevo resguardo viral amplificado. La producción de baculovirus recombinantes conlleva la síntesis de altas cantidades de ADN viral, además de las proteínas virales. Esto impone una alta carga metabólica a la célula, la que se ve reflejada por una alta velocidad de consumo de oxígeno y de otros nutrientes<sup>[10,11]</sup>. Mientras mayor sea la CCI utilizada, mayor será el consumo de nutrientes y oxígeno del cultivo. Altas CCI pueden resultar en un insuficiente abastecimiento de nutrientes y oxígeno, mientras que bajas CCI pueden resultar en concentraciones celulares demasiado bajas, ya que las células infectadas no continúan en crecimiento. Ambos escenarios resultan en una baja productividad de baculovirus recombinantes.

Uno de los principales factores limitantes en el uso del SCI-B es la disponibilidad del resguardo de baculovirus recombinante, el que es producido en cultivos anteriores de células de insecto<sup>[12,13]</sup>. Mientras varios trabajos han estudiado el efecto de las condiciones de infección sobre la producción de proteína recombinante, pocos trabajos han estudiado la producción de baculovirus recombinantes. Destacan los trabajos de Tsai *et al.*<sup>[13]</sup> y de Carinhas *et al.*<sup>[4]</sup>, quienes determinaron el papel de la MDI sobre la producción de baculovirus recombinante para la entrega de genes a células de mamífero y no para la producción de proteínas recombinantes en células de insecto. Ambos trabajos utilizaron un baculovirus recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP, por sus siglas en inglés). Carinhas *et al.*<sup>[4]</sup> utilizaron MDI muy altas, 30 ufp/cél, las que no son adecuadas para la expansión de resguardos virales por la aparición de partículas virales defectuosas, mientras que Tsai *et al.*<sup>[13]</sup> no evaluaron diferentes CCI. En este trabajo evaluamos el efecto de la MDI y la CCI en la expansión de un baculovirus recombinante, que será utilizado como resguardo viral para la producción de proteínas recombinantes por el SCI-B.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Línea celular y baculovirus recombinante

Se utilizó la línea celular de insecto Sf9, proveniente de *Spodoptera frugiperda*, cultivada en medio libre de suero Sf900II (Invitrogen). El mantenimiento de rutina de las células se hizo en matraces agitados de 250 mL con un volumen de trabajo de 40 mL y una agitación de 110 rpm, sub-cultivando las

células cada 72 horas con inóculos de  $5-7 \times 10^5$  células/mL. Para las infecciones se utilizó un resguardo viral del baculovirus recombinante BacCap desarrollado por Urabe *et al.*<sup>[1]</sup> Este baculovirus contiene el gen que codifica para las proteínas de la cápside del virus adenoasociado tipo 2.

### Diseño experimental

Se evaluó el efecto de la concentración celular al tiempo de la infección (CCI) y multiplicidad de infección (MDI) (variables independientes) sobre la producción de proteína gp64 de baculovirus y el título viral (variables dependientes) en cultivos de células Sf9. Para ambas variables independientes se seleccionaron dos niveles:  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  células/mL para la concentración celular y 0.1 y 1.0 unidades formadoras de placa (ufp)/célula para las multiplicidades de infección. Se hicieron experimentos por duplicado para cada una de las 4 combinaciones posibles (Figura 2). El análisis de resultados se hizo mediante un ANOVA (análisis de varianza) con una confianza del 95 % ( $\alpha=0.05$ ).

### Infección de las células con baculovirus recombinantes

A partir de cultivos de células Sf9 en fase exponencial con una viabilidad mayor al 95%, se prepararon cultivos en matraces agitados de 250 mL con un volumen de trabajo de 37 mL a las dos concentraciones celulares a evaluar (3 matraces por concentración). La concentración celular se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano. Los matraces se infectaron a las MDI listadas anteriormente y se utilizó un tercer matraz sin infectar como control. Con el fin de mantener volúmenes similares en todos los cultivos, el volumen del resguardo viral requerido para cada infección fue llevado a 3 mL con medio de cultivo agotado (sobrenadante de un cultivo de células de

insecto de 72 horas de edad). Se utilizó medio agotado para no introducir nutrientes adicionales a los cultivos. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L y se determinó la concentración y la viabilidad celular. Las muestras se centrifugaron a 650 g durante 10 minutos a 4°C para separar las células del sobrenadante, estos últimos se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

### Cuantificación de proteína total

Se utilizó el método de Bradford con el reactivo de Bio-Rad y el protocolo estándar para placas de 96 pozos descrito por el fabricante. Se preparó una curva estándar de albúmina bovina en un rango de 50 a 500  $\mu$ g/mL y diluciones apropiadas de las muestras a analizar. Se colocaron por triplicado 10  $\mu$ L de las diluciones de estándar o muestra en placas de 96 pozos y se adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Las muestras se incubaron durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas. La concentración de proteína se calculó mediante interpolación en la curva estándar.

### Contenido relativo de proteína gp64

La proteína gp64 de baculovirus se cuantificó utilizando análisis densitométrico de inmunodetecciones en membrana (Western blot). Se mezclaron 75  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo con 25  $\mu$ L de solución amortiguadora de carga 4X (0.25 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 0.001% azul de bromofenol, 40% glicerol y 20%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se hirvieron 10 min. Se cargaron 30 mL de muestra por pozo y se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12%, usando una solución amortiguadora de Tris-glicina (24.8 mM Tris, 192 mM glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA), en un sistema semi-seco (Owl Scientific) a 400 mA durante 2 h, con soluciones amortiguadora de Tris-glicina. Las membranas se incubaron 1 h en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevaron a cabo lavados con una solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.1% (PBST). Para la detección de la proteína gp64 de baculovirus, las membranas se incubaron durante una hora con el anticuerpo monoclonal FastPlax (Novagen) a una dilución 1:10,000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa preparado a una dilución 1:2,500. Las membranas se revelaron usando una solución de carbazol. Se realizó un análisis densitométrico de las membranas de Western blot con la ayuda del programa ImageJ v. 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Los resultados se reportan normalizados con respecto a una muestra control de gp64, a cuya área por intensidad se le dio el valor de 1 unidad/mL.

### Determinación de títulos virales

Se determinó el título viral (unidades formadoras de placa, ufp/mL) de los sobrenadantes colectados a las 120 horas post infección. Se utilizó el método propuesto por Mena *et al.*<sup>[14]</sup> En placas de 96 pozos (2 cajas por muestra a titular) se sembraron  $5 \times 10^3$  células/pozo en 50  $\mu$ L de medio SF900-II. Se prepararon

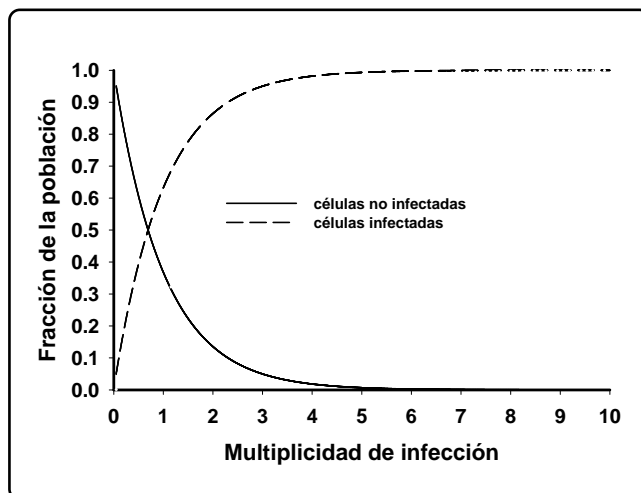


Figura 1. Distribución de Poisson que muestra el efecto de la multiplicidad de infección sobre la fracción de la población de células de insecto infectada durante la infección primaria.

diluciones seriadas ( $10^0$  a  $10^{-10}$ ) del resguardo viral a titular y se agregaron 10  $\mu\text{L}$ /por pozo usando 16 pozos por dilución y 16 pozos como control negativo, a los que se les adicionó medio de cultivo. Las placas se incubaron a  $27^\circ\text{C}$  en un ambiente húmedo durante 6 días. Al término del periodo de incubación se agregaron 10  $\mu\text{L}$ /pozo de una solución (5 mg/mL) de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las cajas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en agitación moderada, se centrifugaron por 10 minutos a 2,000 g y se descartó el sobrenadante. Los cristales formados fueron solubilizados con 50  $\mu\text{L}$ /pozo de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los datos de absorbancia y dilución viral se ajustaron a un modelo logístico (Ecuación 1) usando el programa Sigmaplot 11.0.

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $Y$  representa la absorbancia,  $D$  la dilución viral,  $Y_0$  la absorbancia mínima (que corresponde a la viabilidad mínima detectada),  $a$  es la absorbancia máxima,  $b$  es la pendiente de la curva y  $D_0$  es la dilución a la cual la respuesta fue del 50%. A partir de este valor se calculó el título viral como se describe en Mena *et al.*<sup>[14]</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diseño experimental generó un total de cuatro combinaciones de las variables a evaluar, según se describe en la Figura 2. Una vez infectados los cultivos, se colectaron muestras cada 24 horas y se realizaron análisis para detectar diferencias en el crecimiento celular, producción de proteína o generación de baculovirus ocasionadas por las condiciones de cultivo e infección empleadas. En la Figura 3 se muestran las cinéticas de crecimiento de los cultivos. La concentración celular máxima alcanzada fue menor en los cultivos infectados con la mayor MDI. El incremento de concentración celular a las 120 horas en relación a las condiciones iniciales fue de aproximadamente dos veces para los cultivos infectados con 0.1 ufp/cél y de 1.5 veces para los cultivos infectados a 1.0 ufp/cél (Figura 3). En contraste,

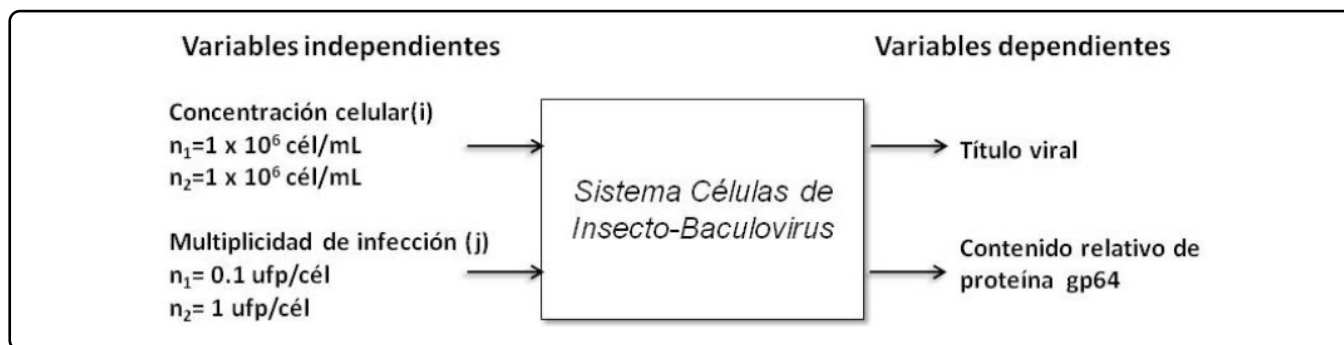


Figura 2. Diseño experimental.

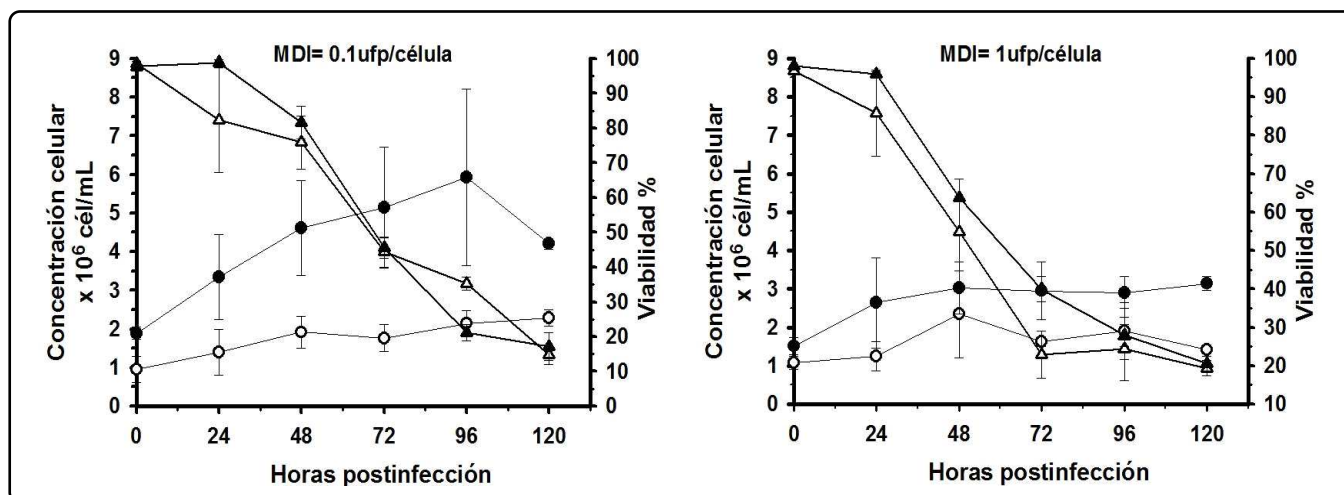


Figura 3. Cinéticas de crecimiento y viabilidad de cultivos de células de insecto Sf9 infectados a dos concentraciones celulares iniciales,  $1 \times 10^6$  (símbolos vacíos) o  $2 \times 10^6$  (símbolos llenos) cél/mL, y con dos multiplicidades de infección (MDI). Círculos, concentración celular. Triángulos, viabilidad.

los cultivos control no infectados duplicaron su concentración celular aproximadamente cada 24 horas (datos no mostrados), lo que indica que fue la infección con baculovirus la que provocó la disminución en el crecimiento celular. Además, los cultivos infectados a la mayor MDI mostraron un rápido descenso de la viabilidad a partir de las 24 horas postinfección, mientras que el descenso inició a las 48 horas en los cultivos infectados a la MDI menor. Las viabilidades observadas al final de los cultivos fueron similares en todas las condiciones experimentales evaluadas (Figura 3). El limitado crecimiento y la disminución de la viabilidad en cultivos de células de insecto infectados con baculovirus recombinantes han sido observados por varios grupos de investigación y son provocados por el control que el baculovirus ejerce sobre las células al promover la síntesis de las proteínas baculovirales a expensas de las celulares<sup>[3,9]</sup>. El menor crecimiento observado en los cultivos infectados a mayor MDI se debe a la infección de un mayor número de células en el cultivo, las que dejan de crecer (Figura 1).

Las muestras de los cultivos se procesaron para obtener el sobrenadante, que contiene las partículas virales infecciosas y constituye un potencial resguardo viral. Se determinó el contenido relativo de gp64 de baculovirus mediante Western blot (Figuras 4 y 5) y la concentración de proteína total en estas muestras (Figura 5). La concentración de proteína total a  $T_0$  fue de  $48.2 \pm 6 \mu\text{g/mL}$  para todos los cultivos y en todos los experimentos la concentración de proteína más alta se alcanzó entre las 96 y las 120 horas postinfección. La concentración de proteína total en el sobrenadante a lo largo del cultivo se vio afectada tanto por la CCI como por la MDI utilizada. Se detectó una mayor concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivos a CCI alta, mientras que la concentración de proteína

en los sobrenadantes de cultivos infectados a baja MDI fue mayor que la de cultivos infectados a alta MDI. Los cultivos con una CCI alta e infectados a baja MDI alcanzaron la mayor concentración de proteína total,  $1053 \pm 190 \mu\text{g/mL}$  (Figura 5a), mientras que los cultivos con una CCI baja e infectados a una alta MDI llegaron a una concentración de tan sólo  $482 \pm 132 \mu\text{g/mL}$  (Figura 5b). Esto es resultado de una mayor concentración celular en los cultivos a alta CCI y baja MDI. Sin embargo, es necesario resaltar que la concentración de proteína en el sobrenadante por célula fue mayor en los cultivos infectados a una CCI de  $1 \times 10^6$  cél/mL. Este comportamiento podría ser el resultado de una limitación de nutrientes u oxígeno en los cultivos a altas CCI, como ha sido observado anteriormente<sup>[4,10,11]</sup>.

La proteína gp64 está presente en la membrana de la progenie viral, por lo que podría ser útil para hacer un estimado de la progenie viral producida sin necesidad de realizar la titulación de los baculovirus, proceso que dura varios días. Se midió gp64 con el fin de evaluar si su concentración y los títulos virales correlacionaban. Los perfiles de producción de gp64 fueron similares para todas las condiciones experimentales ensayadas. Se observó proteólisis en gp64 conforme aumentó el tiempo postinfección (Figura 4), fenómeno previamente reportado por otros autores<sup>[15]</sup>. En la Figura 5 (c y d) se observa que en todos los casos el mayor incremento en la concentración de gp64 se dio entre las 24 y las 48 horas postinfección, alcanzando una concentración máxima entre las 72 y las 96 horas. Únicamente hubo diferencia a las 24 horas postinfección, cuando la concentración relativa de gp64 fue 3 veces mayor en los cultivos infectados a una alta MDI (Figura 5b), en comparación con los que fueron infectados a una baja MDI (Figura 5a). La concentración relativa máxima fue de  $1.6 \pm 0.1$  unidades/mL, la que se obtuvo a las 96 horas postinfección en el cultivo infectado con 1 ufp/cél a una CCI de  $1 \times 10^6$  cél/mL. Por otro lado, las condiciones que resultaron en una menor producción de gp64 ( $1.4 \pm 0.1$  unidades/mL) fueron una MDI de 1 ufp/cél a una CCI de  $2 \times 10^6$  cél/mL.

Una vez transcurridas 120 horas desde la infección, se cosecharon los cultivos y se procesaron como se describe en materiales y métodos para la obtención de los sobrenadantes. La cosecha se realizó a las 120 horas postinfección, ya que éste es el tiempo sugerido para cosechar durante la amplificación de resguardos virales<sup>[9]</sup>. Se determinó el título viral en los sobrenadantes, el cual es una medición de la cantidad de baculovirus infecciosos presentes. Los títulos virales obtenidos se listan en la Tabla I y se muestran gráficamente en la Figura 6. El mayor título viral se obtuvo en los cultivos infectados a bajas CCI y MDI. Además, se observó que mientras a la MDI menor la concentración celular tuvo un importante efecto sobre el rendimiento de baculovirus, a alta MDI la CCI no tuvo efecto alguno en la producción de baculovirus

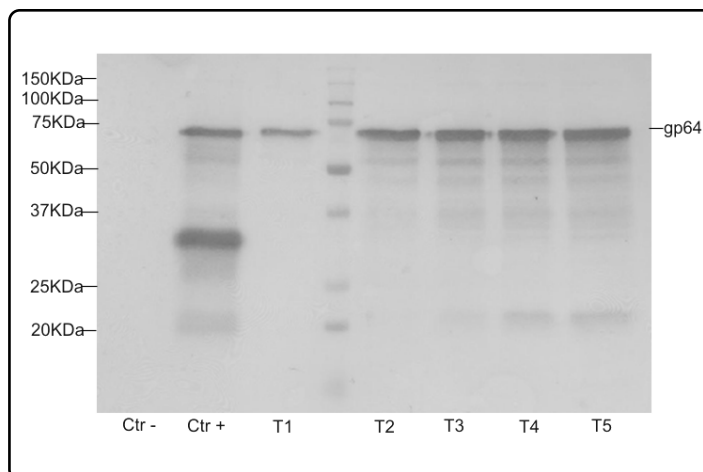


Figura 4. Inmunodetección en membrana de la proteína gp64 de la envoltura del baculovirus. La banda detectada entre 75 y 50 KDa corresponde a la proteína gp64 intacta. El resto de las bandas observadas corresponden a productos de degradación que conservan el epítipo del anticuerpo monoclonal utilizado. (Ctr -) control negativo, (Ctr +) control positivo, (T0, T1, T2, T3, T4) Sobrenadantes de cultivo de las 24, 48, 72, 96 y 120 horas postinfección.

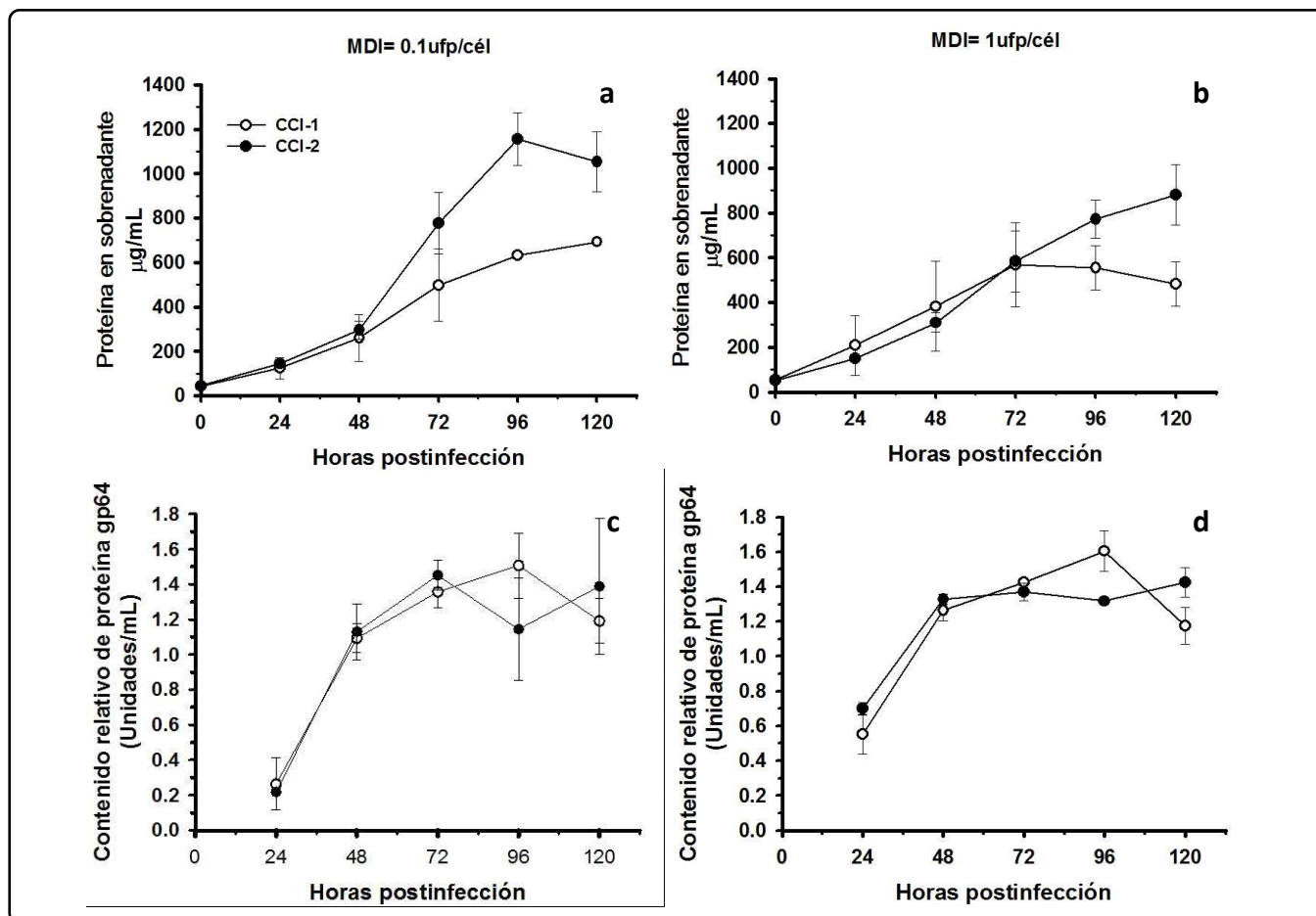


Figura 5. Perfiles de producción de proteína total (a, b) y contenido de proteína gp64 (c, d) en cultivos infectados a diferentes CCI y MDI.

CCI, x10 <sup>6</sup> cél/mL	Título viral, x10 <sup>8</sup> ufp/mL	
	MDI 0.1 ufp/cél	MDI 1 ufp/cél
1	3.8±2.0	1.6±0.7
2	1.7±0.03	1.1±0.3
	Título viral específico, ufp/cél <sup>a</sup>	
1	153.1±82.4	88.9±63.4
2	29.9±9.7	32.7±5.0

a. Se dividió el título viral entre la concentración celular máxima alcanzada en cada cultivo.

Tabla 1. Títulos virales obtenidos a 120 horas postinfección.

infecciosos. Sin embargo, un análisis de varianza de los datos no mostró un efecto significativo de ninguno de los dos parámetros evaluados en el rendimiento volumétrico de partículas infecciosas, dada la alta desviación estándar obtenida en los títulos virales. Cabe destacar que, aunque altos, los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo fueron mucho menores

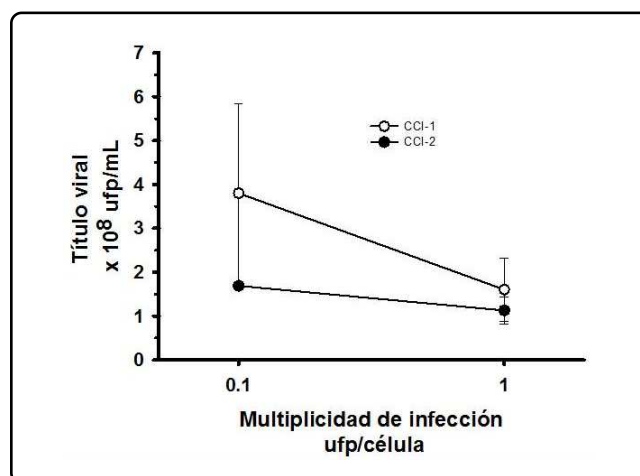


Figura 6. Efecto de la MDI y la CCI sobre la producción de baculovirus.

que aquellos comúnmente obtenidos utilizando otras técnicas de titulación de virus<sup>[16]</sup>. Con el fin de evaluar si los cambios observados en el título viral se debían a una mayor productividad

de cada célula en el cultivo o a diferencias en la concentración celular, se calculó el rendimiento de baculovirus por célula en el cultivo (Tabla I). Se observó que las células en los cultivos infectados a una CCI menor produjeron entre 5 y 3 veces más baculovirus infecciosos que las células infectadas a alta CCI. Los cultivos con mayor rendimiento de baculovirus por célula fueron aquéllos infectados a una baja MDI y CCI, los que también tuvieron el mayor rendimiento volumétrico. La MDI tampoco tuvo un efecto en el rendimiento específico de baculovirus a altas CCI. Sin embargo, hubo una relación inversa entre la concentración celular máxima alcanzada y los títulos virales específicos obtenidos.

El efecto de la MDI y CCI en los rendimientos de baculovirus infecciosos no concuerda con reportes anteriores sobre la productividad de proteína recombinante por el SCIB, donde se ha encontrado la máxima productividad en combinaciones de bajas CCI con bajas MDI o de altas CCI con altas MDI. El trabajo más cercano al presentado aquí es el de Carinhas *et al.*<sup>[4]</sup> Sin embargo, las estrategias propuestas en ambos trabajos difieren de forma importante. Ellos utilizaron MDI substancialmente mayores. La infección de cultivos a una CCI de  $2 \times 10^6$  cél/mL con una MDI de 30 ufp/cél les permitió alcanzar títulos virales con un orden de magnitud mayor a los alcanzados en este trabajo. Sin embargo, el uso de multiplicidades tan altas está asociado con la aparición de partículas virales defectuosas, lo cual resulta en la disminución de la producción del producto recombinante de interés<sup>[17]</sup>. Además, el uso de MDI tan altas no es práctico para amplificar resguardos virales, pues requiere de grandes volúmenes del resguardo viral inicial, el que normalmente sólo está disponible en pocas cantidades. Trabajos anteriores han mostrado que una alta productividad de proteína recombinante no necesariamente está acompañada de una alta productividad de baculovirus<sup>[18]</sup>. A excepción de la concentración celular máxima, no se encontró relación entre alguno de los parámetros medidos y los rendimientos volumétricos o específicos de baculovirus.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron las condiciones de infección que resultan en los mayores rendimientos de baculovirus infecciosos producidos por células de insecto. Las condiciones con mayores rendimientos específicos y volumétricos fueron una MDI de 0.1 ufp/cél a una CCI de  $1 \times 10^6$  cél/mL. En estas condiciones se obtuvieron títulos virales de  $3.8 \pm 2 \times 10^8$  ufp/mL y rendimientos específicos de  $153 \pm 82$  ufp/cél. La obtención de los mayores títulos virales estuvo acompañada de un menor crecimiento celular después de la infección. Los resultados de este trabajo pueden ser utilizados para producir resguardos de baculovirus recombinantes con títulos virales mayores y mejorar la eficiencia del proceso.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo CONACyT-Salud

126663 y PAPIIT-UNAM proyectos IN223210 y 224409. Se contó con el apoyo técnico de Vanessa Hernández y Ana Ruth Pastor. Cuitláhuac Chávez agradece el apoyo del CONACyT durante sus estudios de posgrado (becario 269049).

## REFERENCIAS

1. Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R.M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human Gene Therapy* **13**, 1935-1943 (2002).
2. Kost, T.A. & Condreay, J.P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology* **20**, 173-180 (2002).
3. Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S. & Ramírez, O.T. "Principles and Applications of the Insect-Cell-Baculovirus Expression Vector System" en *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications* (ed. Ozturk, S. & W.S. Hu) 627-692 (Taylor and Francis, Nueva York, 2006).
4. Carinhas, N. *et al.* Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**, 1041-1049 (2009).
5. Radford, M.K. *et al.* The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non secreted products. *Cytotechnology* **24**, 73-81 (1997).
6. Hu, Y.C. & Bentley, W.E. Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus like-particles by baculovirus co-infection: deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology and Bioengineering* **75**, 104-119 (2001).
7. Maranga, L., Cruz, P.E., Aunins, J.G. & Carrondo, M.J. Production of core and virus like particles with baculovirus infected cells. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* **74**, 183-206 (2002).
8. Mena, J.A., Ramírez, O.T. & Palomares, L.A. Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two recombinant baculoviruses for the production of virus-like particles. *BMC Biotechnology* **7**, 39 (2007).
9. O'Reilly, D.R., Miller, L.K. & Luckow, V.A. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual* (Oxford University Press, New York, 1994).
10. Palomares, L.A., López, S. & Ramírez, O.T. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of insect cell cultures. *Biochemical Engineering Journal* **19**, 87-93 (2004).
11. Elias, C.B., Zeiser, A., Bédard, C. & Kamen, A.A. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of  $5.2 \times 10^7$  cells per mL and production of b-galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering* **68**, 381-388 (2000).
12. Ross, O.H., McCabe, D.D., Hollis, G.F. & Rosenfeld, S.A. Methods for baculovirus amplification- Application to large scale recombinant protein production in insect cells. *Biotechnology Techniques* **12**, 463-465 (1998).
13. Tsai, C.T. *et al.* Factors influencing the production and storage of baculovirus for gene delivery: An alternative perspective from the transducing titer assay. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1345-1351 (2007).
14. Mena, J.A., Ramírez, O.T. & Palomares, L.A. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* **34**, 260-263 (2003).

15. Oomens, A.G.P., Monsma, S.A. & Blissard, G.W. The baculovirus gp64 envelope fusion protein: Synthesis, oligomerization and processing. *Virology* **209**, 592-603 (1995).
16. Roldao, A., Oliveira, R., Carrondo, M.J.T. & Alves, P.M. Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *Journal of Virological Methods* **159**, 69-80 (2009).
17. Wickham, T.J. *et al.* Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters* **13(7)**, 483-488 (1991).
18. Palomares, L.A., González, M. & Ramírez, O.T. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: Impact on shear protection, recombinant protein and baculovirus production. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 324-331 (2000).