

Producción masiva de baculovirus

JUAN DANIEL CLAUS Y ALICIA SCIOCCO DE CAP

1. Introducción	260
2. ¿Producción <i>in vivo</i> o producción <i>in vitro</i> ?	260
3. Producción de baculovirus <i>in vivo</i>	261
3.1. Factores que afectan la multiplicación <i>in vivo</i> de baculovirus	261
3.1.1. El insecto huésped	261
3.1.1.1. Origen	262
3.1.1.2. Edad y estadio de desarrollo	262
3.1.1.3. Sexo	263
3.1.1.4. Huéspedes alternativos	263
3.1.2. El inóculo viral	263
3.1.2.1. Origen	263
3.1.2.2. Actividad.....	264
3.1.2.3. Dosis	265
3.1.3. Las condiciones ambientales	265
3.1.3.1. Temperatura	265
3.1.3.2. Humedad.....	265
3.1.3.3. Fotoperíodo.....	266
3.1.3.4. Alimentación.....	266
3.1.3.5. Recipientes	267
3.2. Procesos de producción <i>in vivo</i> de baculovirus	269
3.2.1. ¿Producción en campo o en instalaciones de cría?	269
3.2.2. La producción de baculovirus en instalaciones de cría	269
3.2.2.1. Formulación.....	270
3.2.2.2. Control de calidad	271

4. Producción de baculovirus en cultivos de células de insecto	272
4.1. Cultivos de células de insectos	273
4.1.1. Líneas celulares	273
4.1.2. Requerimientos nutricionales y medios de cultivo	274
4.1.2.1. Medios de cultivo con suero fetal bovino.....	276
4.1.2.2. Medios de cultivo libres de suero	277
4.1.2.3. Medios definidos	278
4.1.2.4. Medios no definidos	278
4.1.3. Requerimientos fisicoquímicos.....	279
4.1.3.1. Temperatura	279
4.1.3.2. pH.....	280
4.1.3.3. Osmolaridad	280
4.1.3.4. Oxígeno.....	280
4.1.3.5. Sensibilidad mecánica	281
4.1.4. Sistemas de cultivo	282
4.1.4.1. Cultivos estacionarios	282
4.1.4.2. Cultivos en suspensión	283
4.1.4.3. Reactores agitados	284
4.1.4.4. Reactores airlift	285
4.2. Infección de cultivos celulares con baculovirus	286
4.2.1. Inóculo viral	286
4.2.2. Parámetros del proceso de infección	288
4.2.2.1. Densidad celular	288
4.2.2.2. Tiempo y multiplicidad de infección (moi)	289
4.2.2.3. Momento de cosecha.....	290
4.2.2.4. Estrategia de operación	290
4.3. Escalamiento de procesos de producción de baculovirus en procesos celulares.....	292
4.3.1. Factores que condicionan el escalamiento	292
4.3.1.1. Líneas celulares	292
4.3.1.2. Características metabólicas	293
4.3.1.3. Medios de cultivo de las células de insecto.....	293
4.3.1.4. Sensibilidad mecánica y suministro de oxígeno	293
4.3.1.5. Reactores	294
4.3.1.6. Biología de los baculovirus	294
4.3.1.7. Estrategias de operación	294
4.3.1.8. Modelos matemáticos	294
4.3.1.9. Modificaciones genéticas y formulación	295

4.3.2. Escalamiento de procesos de producción de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos ..295

5. Conclusiones298

6. Bibliografía299

1. Introducción

Desde que se reconoció la importancia de los baculovirus como agentes entomopatógenos capaces de controlar plagas en forma natural, se advirtió su potencial como insecticidas para el control de plagas agrícolas o forestales. Obviamente, estos hechos despertaron un interés inmediato por el desarrollo de procesos que permitieran producir grandes cantidades de estos virus con fines industriales. En la sexta década del siglo XX, cuando se desarrollaron las primeras dietas artificiales que permitieron la crianza masiva de insectos bajo condiciones controladas, existía un marcado optimismo respecto a las posibilidades de producir masivamente baculovirus (VANDERZANT *et al.*, 1962). Al mismo tiempo, se establecían las primeras líneas celulares de insectos lepidópteros, que harían posible la multiplicación de baculovirus en cultivos celulares, abriendo el camino a una incipiente tecnología alternativa (GRACE, 1962). Desde entonces hasta ahora han transcurrido casi cuarenta años, durante los cuales se realizaron innumerables aportes, al mismo tiempo que se debieron sortear numerosos escollos, en el avance hacia el desarrollo de procesos tecnológicos y económicamente factibles.

A lo largo de este capítulo se describirán los principales avances registrados en el desarrollo de procesos de producción de baculovirus para control de plagas agrícolas y forestales, tanto *in vivo* como *in vitro*, poniendo especial atención sobre los aportes realizados en la última década y sobre las perspectivas de evolución en los próximos años.

2. ¿Producción *in vivo* o producción *in vitro*?

Hasta el presente, la producción *in vivo* es la metodología usada para la producción de baculovirus, con el propósito de utilizarlos como bioinsecticidas, a escala industrial. Todos los insecticidas virales disponibles en el mercado, como por ejemplo aquellos en base a *Spodoptera exigua* NPV, *Helicoverpa zea* NPV, *Lymantria dispar* NPV, *Cydia pomonella* GV y *Anticarsia gemmatalis* NPV, son producidos sobre sus huéspedes permisivos.

Entre las ventajas que presenta la multiplicación *in vivo* respecto a la multiplicación *in vitro*, se considera en primer lugar el menor costo de producción. Sin embargo, la escala de producción ejerce una considerable influencia en la determinación de la factibilidad económica, y la producción en cultivos celulares en biorreactores se hace más económica a medida que aumenta la escala (MURHAMMER, 1991; RHODES, 1996).

Por otro lado, la producción en larvas infectadas ha sido la técnica utilizada por décadas y existe numerosa información relacionada con los aspectos básicos relacionados, tales como métodos de cría masiva, dietas para insectos, infección viral y procesamiento de la producción (SHAPIRO, 1986; BLACK *et al.*, 1997).

Además, la producción *in vivo* es importante por su habilidad de producir una amplia variedad de virus de insectos que hasta el presente no cuentan con méto-

dos de producción *in vitro* a gran escala. Tales son los casos de los granulovirus y nucleopoliedrovirus de interés económico como LdMNPV, SeNPV, AgMNPV y CfNPV, entre otros.

Sin embargo, la producción *in vivo* presenta ciertas desventajas. Por un lado, la estandarización de la producción es más difícil y el control de calidad, principalmente en lo referente a contaminantes, requiere un esfuerzo adicional. Por otra parte, la producción de virus recombinantes mejorados (rNPVs) puede ser imposible sobre larvas si la elevada virulencia impide que se alcancen niveles importantes de replicación y producción de poliedros virales antes de que se produzca la muerte del huésped infectado.

En suma, en áreas donde la eficacia de baculovirus salvajes sea aceptable y donde los costos de producción sean competitivos respecto a otras estrategias de control, se puede predecir que la producción *in vivo* continuará siendo aplicada (BLACK *et al.*, 1997).

3. Producción de baculovirus *in vivo*

3.1. Factores que afectan la multiplicación *in vivo* de baculovirus

En la producción de baculovirus *in vivo*, a nivel experimental o industrial, el objetivo principal es lograr el mayor rendimiento de cuerpos de inclusión biológicamente activos, al costo más bajo. En ese proceso, se deben tener en cuenta una serie de factores de importancia fundamental para la optimización de la producción, los que influyen además en la calidad del producto final.

Los métodos de producción *in vivo* y los factores que afectan tal producción han sido revisados por varios autores (JAQUES, 1977; SHERMAN, 1985; SHAPIRO, 1986; SHIEH, 1989; SOSA GÓMEZ Y MOSCARDI, 1996; HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998, entre otros). En esta sección se contemplarán los principales aspectos relacionados con la multiplicación viral y se describirán, a manera de ejemplo, algunos de los procedimientos de producción de los baculovirus más utilizados hasta el presente.

3.1.1. El insecto huésped

Para la multiplicación *in vivo* es recomendable contar con una colonia de insectos establecida, preferentemente, en condiciones de laboratorio sobre medio artificial. Este sistema de cría, permite un mayor control de la calidad y la sanidad de los individuos destinados tanto a producción como a estudios de caracterización viral.

La cría de los insectos huéspedes demanda del conocimiento previo de los hábitos de la especie y de sus requerimientos nutricionales y ambientales. En ciertos casos, es posible criar masivamente los individuos durante el estado larval, sin que ello afecte el rendimiento y la calidad del material ni la obtención de los adultos necesarios para la manutención de la cría (*A. gemmatilis*, *Diatraea* spp., *Trichoplusia ni*). En otros, es necesario recurrir a métodos de cría individual debido

a que la especie presenta hábitos de canibalismo a partir de cierto estadio larval (*Spodoptera frugiperda*) o son especies naturalmente solitarias (*C. pomonella*). Estos factores influyen en gran medida sobre el costo de producción, ya que las crías individuales demandan mayor espacio, insumos y mano de obra.

3.1.1.1. Origen

En general, las colonias de insectos se generan a partir de individuos de la especie huésped, colectados en el campo. La presencia de parásitos, patógenos u otros posibles contaminantes asociados, exige un control previo de la sanidad de los individuos a fin de evitar posteriores inconvenientes.

La multiplicación de virus sobre insectos provenientes directamente del campo ha sido utilizada con el fin de abaratar el costo. También se ha recurrido, como se verá más adelante, a la multiplicación en condiciones de campo. En ambos casos la existencia de parasitismo y/o contaminaciones puede ocasionar problemas relativos a la calidad del producto final.

3.1.1.2. Edad y estadio de desarrollo

Como se expresó anteriormente, el objetivo principal es el de obtener el máximo rendimiento de virus y en tal sentido, uno de los factores más importantes es la edad larval. Existe una relación constante entre peso del huésped al momento de la muerte y la producción de cuerpos de inclusión (*occlusion body*, OB). La producción de OBs por miligramo de larva varía normalmente entre $9,2 \times 10^6$ y $4,3 \times 10^7$ en NPVs de lepidópteros, 2×10^5 y 5×10^6 en NPVs de himenópteros, aproximándose a 2×10^7 para granulovirus en lepidópteros (ENTWISTLE Y EVANS, 1985; HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998). Sin embargo, tal relación no depende sólo del peso inicial de la larva, sino del incremento de peso registrado durante el proceso de infección (SHAPIRO, 1986). En tal sentido, para maximizar los rendimientos se utilizan larvas de los últimos estadios de desarrollo (generalmente cuarto estadio), adoptándose en ciertos casos métodos que contribuyen a lograr un mayor incremento de peso en las larvas enfermas.

El agregado de hormonas juveniles en la dieta artificial aumenta el rendimiento de OBs y es un método utilizado en la producción de diversos baculovirus. Como ejemplo se puede citar la producción de CpGV en larvas de *Cydia pomonella* en donde la adición de *methoprene* (como "Altosid") aumenta el rendimiento de gránulos por larva (GLEN Y PAYNE, 1984). De igual manera, esta hormona juvenil, fue probada en la producción de NPV en *Heliothis zea* incorporándola en una concentración del 0,4% en la dieta artificial, con el logro de un incremento de peso larval del 28% y un aumento de productividad de cuerpos de inclusión del 15,8% (SHIEH, 1989).

La máxima producción de cuerpos de inclusión ocurre en los tejidos más ricos en nutrientes y metabólicamente activos, tales como el cuerpo graso, la epidermis, y la matriz traqueal (FEDERICI, 1993). Para un estadio de desarrollo dado, el tiempo requerido para alcanzar la fase de inclusión de las partículas virales y la máxima producción de cuerpos de inclusión depende del aislamiento viral, de la dosis sumi-

nistrada y de la temperatura ambiente. En general, en larvas de lepidópteros infectadas con baculovirus que producen infecciones poliorganotrópicas, la producción máxima se alcanza a los 5-10 días post-tratamiento (FEDERICI, 1998).

3.1.1.3. Sexo

Según experiencias realizadas por Shapiro *et al.* (1981) las hembras de *Lymantria dispar* presentan un estadio adicional respecto a los machos y mayor peso larval. Las hembras infectadas con NPV durante su cuarto y quinto estadios produjeron mayor cantidad de cuerpos de inclusión por larva que los machos, mientras el rendimiento por gramo de larva en ambos sexos no mostró diferencias altamente significativas. En esta especie, por consiguiente, la utilización de hembras para la producción de virus sería el sistema ideal mientras los machos podrían ser utilizados para la producción de machos estériles (SHAPIRO, 1986). De igual manera, larvas de *Spodoptera littoralis* infectadas con baculovirus, mostraron diferencias en mortalidad y rendimiento según sexo (SANTIAGO-ALVAREZ Y VARGAS OSUNA, 1986).

3.1.1.4. Huéspedes alternativos

En ciertos casos, donde el huésped homólogo es difícil de criar a gran escala por no disponerse de dietas artificiales, presentar tamaño pequeño o causar problemas alergógenos, se ha recurrido a la amplificación viral sobre huéspedes alternativos. Como ejemplo, larvas de *Trichoplusia ni* son utilizadas para la producción de AcMNPV y de *Anagrapha falcifera* NPV. Del mismo modo, *Panolis flammea* NPV es propagado en larvas de *Mamestra brassicae* (KELLY Y ENTWISTLE, 1988).

En todos los casos es necesario tener en cuenta que este tipo de sistemas puede acarrear inconvenientes. Debe mantenerse un estricto control acerca de la identidad viral, ya que el suministro de un virus dado puede estimular la aparición de infecciones debidas a virus latentes (HUGHES *et al.*, 1993) y generar o seleccionar variantes con especificidad aumentada para el huésped alternativo, pero disminuida para el huésped primario (WEITZMAN *et al.*, 1992).

3.1.2. El inóculo viral

El inóculo que será utilizado en la producción es previamente amplificado y caracterizado morfológica, biológica y bioquímicamente con el fin de establecer parámetros de calidad utilizables a lo largo del proceso de producción. En base a los estudios mencionados, se puede además realizar la selección de aislamientos con mayor virulencia hacia la especie blanco.

3.1.2.1. Origen

Cuando se trata de un nuevo aislamiento viral, lo más frecuente es que el mismo sea aislado a partir de larvas muertas o enfermas colectadas en el campo. Para obtener un inóculo libre de contaminantes se pueden infectar cultivos celulares, pero no en todos los casos es factible disponer de líneas permisivas. En tales casos, se realiza una primera amplificación en un número limitado de individuos de

la especie susceptible y posteriormente se purifican los cuerpos de inclusión obtenidos. Luego se efectúa una segunda amplificación, en este caso en la mayor escala posible de acuerdo con la cantidad de inóculo purificado disponible. A partir de la tercera amplificación, bajo estricto control de calidad, se obtiene el producto que será utilizado en futuras multiplicaciones (MARTIGNONI, 1999).

El inóculo debe estar libre de contaminantes y en tal sentido, uno de los métodos más utilizados es la purificación de los cuerpos de inclusión en gradientes de densidad de sacarosa. Para el control de la pureza y calidad del inóculo se realizan exámenes por microscopía óptica y electrónica. Paralelamente, es requisito realizar ensayos para la determinación cuali-cuantitativa de contaminantes tales como bacterias, virus u otros microorganismos patógenos.

3.1.2.2. Actividad

Entre baculovirus de una misma especie existen aislamientos que en muchos casos presentan diferente actividad biológica y por ende, diferente virulencia y rendimiento. Por tal motivo, se selecciona aquel que presenta mayor actividad, considerando que en ciertos casos ello también depende de la población de insectos blanco a tratar (ver Capítulo 4).

Pruebas realizadas con 19 aislamientos de LdNPV procedentes de diversos países, mostraron que el más activo contra *L. dispar* resultó ser uno de U.S.A., mientras el menos activo fue el de Japón (SHAPIRO, 1986). De igual manera, trabajos realizados con 14 aislamientos de *Heliothis* NPV mostraron diferencias de hasta un 50% en tiempo letal (HUGHES *et al.*, 1983).

Se sabe que una misma especie de virus puede presentar diferencias en su genoma, que permiten identificar variantes (ver Capítulo 4). Se han descrito numerosas variantes geográficas de diferentes baculovirus, pero hasta el presente, en la mayoría de los casos, no se ha podido establecer una correlación fehaciente entre dichas variantes, distribución geográfica y diferencias significativas en virulencia. Ejemplo de ello es el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfMNPV), y uno de los factores que puede incidir es el hábito migratorio de esta especie plaga (SHAPIRO *et al.*, 1991). Resultados obtenidos con posterioridad en relación con la virulencia de variantes de SfMNPV hacia determinadas poblaciones del huésped (BERRETTA *et al.*, 1998; ESCRIBANO *et al.*, 1999) sugieren que existe una marcada presión de selección natural que deriva en la retención de alta infectividad hacia la población local, presumiblemente por medio de un proceso de co-evolución huésped-patógeno (ESCRIBANO *et al.*, 1999).

Entre los granulovirus, el más estudiado ha sido el de *C. pomonella* (CpGV). Estudios realizados con diversos aislamientos geográficos, mostraron diferencias en virulencia hacia larvas de primer estadio (HARVEY y VOLKMAN, 1983). Posteriores estudios realizados por Crook *et al.* (1985) permitieron establecer los patrones de restricción enzimática del DNA de CpGV de siete orígenes diferentes y el mapa físico de tres variantes geográficas. En este último trabajo, contrariamente a lo expuesto anteriormente, no se encontraron diferencias significativas de infectividad entre los aislamientos analizados.

3.1.2.3. Dosis

Para obtener el máximo rendimiento de OBs por gramo o por larva, se selecciona la dosis más baja que produce el 100% de mortalidad de las larvas destinadas a la producción. Dosis menores pueden implicar que ciertos individuos alcancen el estado pupal y de esa manera, disminuyan el rendimiento total. Para cada sistema en particular es necesario ajustar la dosis y la metodología de aplicación del inóculo adecuadas.

El inóculo puede ser utilizado por incorporación en la dieta artificial, por contaminación superficial, o por aplicación a trocitos de dieta (cuando se realizan multiplicaciones individuales). En sistemas de producción a gran escala la contaminación superficial es la más utilizada.

Según Shapiro (1986), en general las dosis varían entre 1×10^5 a 5×10^7 poliedros por mililitro de dieta, en la mayoría de los sistemas descritos. Es interesante destacar que el incremento de la dosis no asegura un mayor rendimiento, sino que por el contrario, dosis altas pueden ser contraproducentes, ya que disminuyen el tiempo letal y por lo tanto la capacidad de crecimiento de la larva.

3.1.3. Las condiciones ambientales

Hasta ahora se han considerado los factores intrínsecos de la relación huésped-patógeno, pero en el proceso de producción también los factores ambientales poseen gran importancia, tanto en el rendimiento como en la calidad del producto a obtener.

3.1.3.1. Temperatura

Para una misma dosis de inóculo, el incremento de la temperatura afecta el proceso de infección disminuyendo el tiempo letal. La producción se efectúa a temperaturas entre los 20 y los 26°C (SHAPIRO, 1986). Para determinar la temperatura óptima de producción del sistema, se realizan experimentos donde se tiene en cuenta: la temperatura, el rendimiento por larva o por gramo de larva, el tiempo letal y la calidad del producto obtenido.

En general, temperaturas mayores a las mencionadas anteriormente, producen una disminución en el rendimiento y en la calidad. Ensayos realizados para la determinación de la temperatura de producción de LdMNPV, mostraron que tanto el rendimiento como la actividad del virus producido fue similar en larvas expuestas a 23, 26 y 29°C, mientras a 32°C tales parámetros fueron menores (SHAPIRO, 1986). Resultados similares fueron obtenidos en otros sistemas de producción de nucleopoliedrovirus y granulovirus (JAKES, 1977; KELLY Y ENTWISTLE, 1988).

3.1.3.2. Humedad

Mientras la temperatura juega un papel importante en la replicación viral, la humedad relativa no presenta casi efecto sobre ella. Su importancia reside principalmente en la calidad del producto, ya que la humedad excesiva puede provocar estrés en el insecto huésped y favorecer la proliferación de bacterias, hongos u otros microorganismos contaminantes (SOSA-GÓMEZ Y MOSCARDI, 1996).

En los recipientes de multiplicación, es aconsejable que la humedad se mantenga entre el 50 y 70%. De esta manera, se evita la deshidratación de la dieta artificial que sirve como alimento de las larvas y se obtiene una buena calidad de producción. Cabe considerar que en tales recipientes la humedad es mayor que la ambiente, por lo que para lograr dicha humedad relativa, la cámara de incubación debe mantenerse en un 20% por debajo del nivel de humedad deseado dentro de los recipientes. Por otra parte, se deben evitar procesos de condensación de humedad debido a diferencias bruscas de temperatura durante la manipulación de los recipientes de producción.

3.1.3.3. Fotoperíodo

El fotoperíodo no posee un efecto intrínseco en la producción, utilizándose generalmente el mismo que se requiere para la cría del insecto huésped (SHAPIRO *et al.*, 1981).

3.1.3.4. Alimentación

La composición de la dieta para la alimentación de los insectos bajo cría constituye uno de los principales componentes del costo de producción de baculovirus en procesos *in vivo*. Desde el punto de vista de su composición, las dietas pueden ser totalmente naturales o semisintéticas.

La utilización de dietas naturales (follaje, frutos, tubérculos) presenta la ventaja de la adaptación del insecto a su fuente habitual de nutrición. Sin embargo, dadas las restricciones en la disponibilidad, que en ocasiones pueden impedir la continuidad de la producción, y las dificultades en estandarizar la calidad, se aconseja que su uso se restrinja a la alimentación de aquellos insectos para los cuales no se disponga de una dieta artificial.

El desarrollo de las dietas semisintéticas (VANDERZANT *et al.*, 1962) marcó el comienzo del desarrollo de procesos para la producción de baculovirus en forma masiva, al disponer en forma continua de una fuente de alimentación cuya calidad podía ser controlada y asegurada con relativa facilidad. Estas dietas incorporan fuentes de proteínas (gérmen de trigo, caseína, hidrolizados de distintas proteínas, etc), de lípidos y esteroides (aceite de germen de trigo, colesterol), de carbohidratos (azúcar, harinas), de vitaminas (extractos de levaduras, complementos vitamínicos) y en ciertos casos, de sales (ejemplo: sales de Wesson). En función de la respuesta de cada sistema, algunos de estos ingredientes pueden ser omitidos para obtener medios de costo más reducido.

Valores de pH entre 5 y 6 permiten un adecuado desarrollo de los insectos, una buena replicación viral, y además permiten controlar el desarrollo de contaminantes microbianos. Sin embargo, para lograr una adecuada conservación de la dieta y mantener una sanidad adecuada en la cría de los insectos, se adicionan conservantes (ácido sórbico, metil parahidroxibenzoato, ácido benzoico, formaldehído) y antibióticos.

Por último, las formulaciones deben incluir algún agente gelificante (agar, alginatos, etc.) para darle al sustrato la consistencia adecuada.

A manera de ejemplo, en la Tabla 1 se citan algunas referencias de las dietas usadas frecuentemente en la cría de lepidópteros, en medio artificial. Algunas de ellas o sus modificaciones, se encuentran también disponibles comercialmente a través de diversas compañías.

Cabe destacar que la composición de la dieta para cría de los insectos difiere en ciertos ingredientes de la que se utiliza para la multiplicación de virus. En tal sentido, la dieta que se destina para este último fin no posee formaldehído y la inclusión de vitaminas es innecesaria. Mientras que por otra parte, tal como fuera mencionado anteriormente (sección 3.1.1.2), en ciertos casos se incorporan en la dieta hormonas juveniles que aumentan el rendimiento de OBs por larva.

3.1.3.5. Recipientes

Para la elección de los recipientes y sistema de producción se consideran los hábitos de la especie huésped, el tamaño de las larvas, la densidad adecuada y el costo.

Recientemente, se ha diseñado y patentado un modelo de producción masiva que permite la producción de virus sobre gran cantidad de larvas por recipiente de multiplicación (HUGHES, 1994). Según observaciones realizadas, los insectos prefieren comer de los bordes de la superficie de la dieta artificial y no de las partes totalmente planas. Así, Hughes diseñó un recipiente que consiste en una caja en material acrílico que lleva en su interior una tapa metálica con pilares del mismo material dispuestos en forma paralela. Las larvas se ubican naturalmente para alimentarse de la dieta contaminada presente en dichos pilares y de tal manera, miles de larvas pueden ser contaminadas simultáneamente en un solo recipiente (Figura 1). La cantidad de dieta contenida en las cajas de multiplicación está calculada con

Tabla 1. Ejemplos de algunas dietas semisintéticas comúnmente utilizadas en la cría de lepidópteros.

Especie	Referencia
<i>Adoxophyes orana</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Ankersmith, 1985
<i>Agrotis ipsilon</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Blenk <i>et al.</i> , 1985
<i>Anticarsia gemmatilis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Green <i>et al.</i> , 1976
<i>Choristoneura fumiferana</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Robertson, 1985
<i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Poitout y Bues, 1974; Payne, 1981
<i>Diatraea grandiosella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Yin y Pen, 1981
<i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	Hensley y Hammond, 1968
<i>Epinotia aporema</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Green <i>et al.</i> , 1976
<i>Heliothis zea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Shorey y Hale, 1965; Patana, 1985a
<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Shorey y Hale, 1965; Patana, 1985a
<i>Lymantria dispar</i> (Lepidoptera: Lymantriidae)	Odell <i>et al.</i> , 1985
<i>Mamestra brassicae</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Gardiner, 1985
<i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Patana, 1985b
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Poitout y Bues, 1974
<i>Trichoplusia ni</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Shorey y Hale, 1965

el fin de brindar la alimentación de las larvas durante el período que comprende la incubación y hasta la cosecha. Una vez muertas la mayoría de las larvas, se extrae el material de los recipientes fácilmente, por inmersión y agitación en agua. Los desechos orgánicos tales como las heces de los insectos y restos de dieta artificial, quedan en el fondo de la caja acrílica.

Este sistema permite la multiplicación masiva a gran escala, disminuyendo los costos de producción. Inicialmente, fue aplicado para la producción en larvas de *T. ni*, para posteriormente ser probado en *Heliothis* spp., una especie que presenta hábitos canibalísticos en otros sistemas de producción. En nuestro laboratorio, se realizaron ensayos preliminares con larvas de *S. frugiperda*, lográndose resultados de rendimiento por gramo de larva, similares a los obtenidos en producción individual. El sistema desarrollado por Hughes ha sido también experimentado para la producción de baculovirus recombinantes (WOOD Y HUGHES, 1997).

Por último, en los casos en que es indispensable alojar las larvas individualmente, se utilizan contenedores que poseen celdas divisorias, con el fin de disminuir la superficie necesaria dentro de las cámaras de incubación.

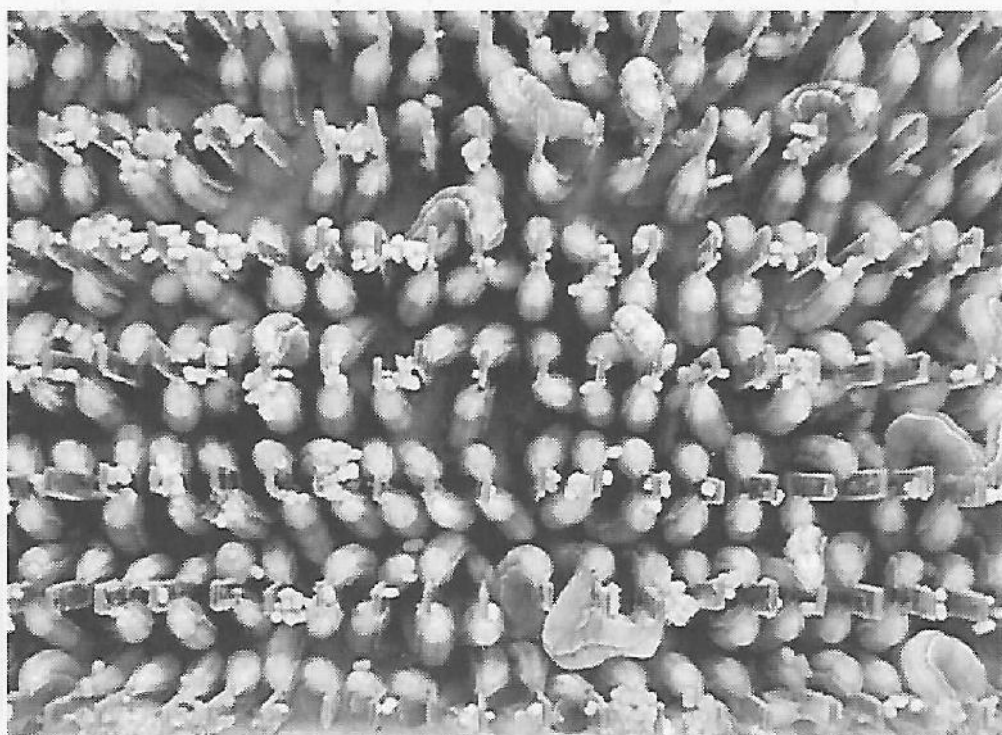


Figura 1.

3.2. Procesos de producción in vivo de baculovirus

3.2.1. ¿Producción en campo o en instalaciones de cría?

Uno de los métodos utilizados para lograr una producción a bajo costo, es la utilización de poblaciones de la especie huésped que están presentes naturalmente en el cultivo. En la producción de AgMNPV en el Centro Nacional de Investigaciones de la Soja (CNPso-EMBRAPA, Londrina, Brasil), se seleccionan lugares donde se manifiesta un nivel elevado de *A. gemmatilis* y se realiza allí la aplicación del baculovirus. Entre el 6^{to} y 12^{vo} día se realiza la colecta de las orugas muertas. En el ciclo agrícola 1991/92, en el estado de Paraná (Brasil) se produjeron por esta metodología 11.000 kg de orugas infectadas con virus, cantidad suficiente para tratar 550.000 ha (SOSA GÓMEZ Y MOSCARDI, 1996).

Según los mismos autores, otro sistema utilizado es el de combinar la producción en laboratorio y en campo, ya sea liberando insectos criados bajo condiciones controladas, sobre plantas de soja tratadas previamente con el baculovirus, o colectando orugas en el campo e infectándolas en laboratorio.

Aunque todos estos sistemas reducen los costos, existen ciertas limitaciones. La producción en campo puede verse afectada por factores bióticos y abióticos que influyen sobre los niveles de abundancia de la población del insecto huésped, como por ejemplo la presencia de parasitoides u otros agentes patógenos. Siguiendo con el mismo ejemplo, durante períodos húmedos se produce en *A. gemmatilis* una enfermedad causada por el hongo *Nomuraea rileyi*, que diezma las poblaciones del insecto e impide la producción de virus en el campo.

Por otra parte, el control de la calidad de la producción es difícil y conlleva problemas en la estandarización de la misma y del producto obtenido. Por ello, siempre que los aspectos económicos y técnicos lo hagan posible, es recomendable la producción en ambientes controlados, tanto para la cría de los insectos huéspedes como para la multiplicación del virus.

3.2.2. La producción de baculovirus en instalaciones de cría

Tanto para producciones a nivel experimental como a gran escala, es necesario contar con una cría masiva del huésped en todas sus etapas de desarrollo, en forma sincronizada y continua.

Las instalaciones de cría deben estar apartadas de aquellas en donde se realiza el proceso de multiplicación y procesamiento del virus, con el fin de evitar contaminaciones. De igual manera se debe mantener un estricto control del personal participante en las diferentes actividades, no permitiendo el ingreso a las instalaciones de cría de aquellas personas que hayan manipulado virus. Lo ideal es que los edificios estén separados y que las instalaciones de cría cuenten con sistemas de presión de aire positivas para minimizar posibles contaminaciones del exterior. De forma similar, las instalaciones de producción deben ser sometidas a depresión, para evitar las fugas de material infeccioso.

El proceso de producción cuenta con una serie de etapas que van desde la cría hasta la cosecha del material infectado y su procesamiento final con el objeto de obtener un producto ya formulado.

Una vez inoculados los insectos, ya sea mediante incorporación del virus en la dieta artificial o por tratamiento en superficie de la misma, se procede a la incubación del material bajo las condiciones controladas seleccionadas a fin de obtener el máximo rendimiento.

El momento de la colecta del material depende del virus y del sistema escogido, aunque en general se realiza al 5^{to}-6^{to} día post-inoculación. En todos los casos, es aconsejable que la misma se realice cuando las larvas presentan estado de flaccidez, antes de que se produzca licuefacción de los tejidos en baculovirus que presentan infecciones poliorganotrópicas. Para la colecta del material se pueden utilizar pinzas, o aspiradores diseñados para tal fin.

Para reducir los costos de mano de obra, en producciones a gran escala, es posible la colecta de las larvas infectadas en forma robotizada. En ese caso, se pueden lavar las larvas muertas sobre la dieta o colectarlas conjuntamente con los remanentes de ésta. Ello trae aparejado contaminantes adicionales en la preparación final, que se tratan de reducir al mínimo ajustando la cantidad de dieta sólo a lo indispensable para el mantenimiento de las larvas durante el proceso de multiplicación.

El almacenamiento del material colectado se realiza a bajas temperaturas. Si bien a 4°C el virus se mantiene activo por largos períodos de tiempo, ciertos microorganismos pueden desarrollarse en esa temperatura. Por ello, el almacenamiento se realiza normalmente a -20°C.

3.2.2.1. Formulación

Para que el producto obtenido posea una eficacia adecuada en condiciones de campo, el último paso en el proceso de producción consiste en la formulación. En este capítulo nos referiremos brevemente a este tema. Para una información más amplia, se puede consultar el Capítulo 10 de este libro.

Las formulaciones pueden ser sólidas o líquidas. Entre las primeras, la más utilizada debido a su bajo costo son los polvos mojables. Estos pueden ser preparados a partir de un homogenato de larvas infectadas o muertas por baculovirus que se mezcla con los ingredientes de la formulación o utilizando virus purificado y liofilizado. Este último proceso encarece el producto, pero sin embargo ha sido utilizado en las formulaciones "Gypchek" de LdMNPV (SHAPIRO, 1982) y "TM Biocontrol-1" de *Orgyia pseudotsugata* MNPV (MARTIGNONI, 1978).

También han sido utilizados métodos de microencapsulación (BULL, 1978; IGNOFFO Y BATZER, 1971; IGNOFFO *et al.*, 1991) con agentes polimerizantes y protectores solares, a fin de obtener cápsulas de diámetros menores a los 100 micrones.

Entre las preparaciones líquidas, la más común es el concentrado emulsionable. El virus es mantenido en suspensión mediante el agregado de un dispersante y un emulsionante soluble en agua. Las preparaciones de los NPVs de *M. brassicae* (Mamestrin, Natural Plant Protection) y de *S. exigua* (Spod-X, Thermo Trilogy

Corporation) registradas comercialmente, son ejemplo de este tipo de formulación.

En todos los casos, es importante añadir protectores contra los UV para obtener una mayor persistencia de virus biológicamente activo en el cultivo. Entre ellos, los abrillantadores, han demostrado que además de brindar protección, poseen la capacidad de aumentar o potenciar la infectividad de baculovirus y otras virosis de insectos (SHAPIRO, 1992; DOUGHERTY *et al.*, 1996; VAIL *et al.*, 1996; SHAPIRO Y ARGUER, 1997, entre otros). Ello puede ser debido a que comprometen la estructura física de la membrana peritrófica de los insectos, la cual es una de las principales barreras que protegen al intestino del insecto contra la acción de microorganismos (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998) (Ver Capítulo 2) y en tal sentido, Wang y Granados (1999) demostraron en ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* que las proteínas de la membrana peritrófica pueden ser solubilizadas por el agregado de Calcofluor, aumentándose así la susceptibilidad de las larvas.

3.2.2.2. Control de calidad

El control de calidad involucra las fases sucesivas de la producción y formulación viral. El producto debe ser caracterizado sobre las bases de su actividad biológica, identidad y posibles contaminantes asociados.

El número de cuerpos de inclusión presentes en el formulado no es, por sí solo, reflejo de la actividad biológica. No existe un método de estandarización que pueda ser usado internacionalmente, como ocurre con otros productos biológicos (*Bacillus thuringiensis*). Varios son los factores que influyen en este sentido. En algunos virus (AcMNPV, LdMNPV, OpMNPV, SeMNPV, CpGV) la especificidad del espectro de huéspedes y la eficacia está relacionada con el aislamiento utilizado y por consiguiente, es difícil crear un estándar con el fin de predecir el comportamiento en campo. Por otra parte, los ingredientes en la formulación hacen variar la actividad del virus en el producto formulado aumentando su potencia (por ejemplo, al añadir abrillantadores ópticos) o disminuyéndola (ciertos protectores contra luz UV, emulsionantes) (BLACK *et al.*, 1997).

Por el momento, la manera más adecuada de determinar la actividad biológica del producto formulado, es la realización de bioensayos. Mediante ellos se estima la concentración letal media (LC_{50}) o la dosis letal media (LD_{50}), en comparación con un patrón de referencia de actividad conocida. Así, cada lote de producción es definido en términos de unidades activas por gramo o por mililitro de formulado.

Para asegurar la identidad del virus, tanto en los inóculos como en el producto formulado, se utilizan métodos bioquímicos para la identificación de ácidos nucleicos (análisis de patrones de DNA por restricción enzimática, tipificación genómica por amplificación de DNA con iniciadores o *primers* específicos, etc.) y métodos inmunoquímicos (ELISA).

El control de calidad requiere también la determinación de contaminantes presentes en la formulación. Se realizan análisis cuali-cuantitativos de los microorganismos, estableciéndose, según reglamentaciones de registro, los valores máximos de los mismos y la ausencia de microorganismos patógenos para animales superiores tales como *Vibrio*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. Técnicas económicas

y de utilidad para la realización de tales análisis son descritas por Hunter-Fujita *et al.* (1998). En tal sentido, se recomienda el método de Miles y Misra para la determinación del número de bacterias viables, así como la utilización de técnicas específicas tales como tinción de Gram y ensayos de oxidasa, de catalasa y de coagulación, para la determinación de presencia o ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Faecal enterococci*, *Bacillus cereus* y *Bacillus sphaericus*, respectivamente. Las coliformes, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. miden aproximadamente 1 µm de largo, son bacterias Gram positivas, catalasa negativas, oxidasa negativas y anaerobias facultativas. *Staphylococcus aureus* es anaeróbica, Gram positiva, catalasa positiva, coagulasa positiva y con forma de coco de aproximadamente 1 µm de diámetro y su presencia en preparaciones de OBs es indicativa de una manipulación del material en condiciones no higiénicas. Cabe destacar que para la identificación tanto de las citadas bacterias como para la identificación de aquellas pertenecientes al género *Bacillus*, se dispone de kits comerciales de diferentes marcas con instrucciones precisas para su uso.

4. Producción de baculovirus en cultivos de células de insecto

La historia de la tecnología del cultivo *in vitro* de células de insecto, excelentemente revisada por Maramorosch (1991), ha acompañado el transcurrir del siglo XX. Los primeros cultivos *in vitro* de células de animales vertebrados fueron establecidos por Harrison en 1902, y la metodología desarrollada por éste impulsó los trabajos posteriores de Goldschmidt, quién fue el primero en cultivar tejidos y células de insectos (BENZ, 1986). Más tarde, a partir de los estudios de Trager sobre la composición química de la hemolinfa, Wyatt diseñó los primeros medios de cultivo para células de insecto (BENZ, 1986). Estos trabajos resultaron el antecedente para el desarrollo de las primeras líneas continuas de células de insectos lepidópteros, establecidas por Grace (1962) a principios de la década de los 60'.

Los trabajos pioneros que llevaron al desarrollo de medios de cultivo y líneas celulares establecidas resultaron cruciales en la evolución de técnicas estandarizadas para el cultivo de células de insecto a escala de laboratorio. Luego, este conocimiento fue aplicado a sistemas de cultivo de células de insecto a mayor escala, usualmente destinados a la producción de grandes cantidades de virus. Posteriormente, la aplicación de conceptos de ingeniería y tecnología de bioprocesos ha permitido escalar el cultivo de células de insecto a niveles que permiten producir masivamente baculovirus o proteínas recombinantes. A pesar de estos adelantos, aún existe un conocimiento limitado, y un número relativamente escaso de publicaciones, acerca de la fisiología de las células de insecto en cultivo, así como también acerca de las alteraciones que las infecciones por baculovirus inducen sobre la fisiología celular, y que condicionan una producción óptima de virus o de proteínas recombinantes.

Por otro lado, la mayor parte de la información publicada en los últimos diez años se refiere a procesos de producción de proteínas recombinantes en el siste-

ma baculovirus-células de insecto, información que no puede ser automáticamente extrapolada a un proceso relacionado, pero intrínsecamente diferente, como lo es la producción de baculovirus incluidos, el fenotipo viral con actividad insecticida.

En las secciones siguientes se revisarán los principales avances registrados hasta el presente en los campos de la biología, la bioquímica y la ingeniería aplicados al desarrollo de procesos de producción de baculovirus *in vitro* a gran escala, y se intentará establecer cuáles son los aspectos que deben aún resolverse para aumentar la factibilidad técnica y económica de estos procesos.

4.1. Cultivos de células de insectos

4.1.1. Líneas celulares

Las células en cultivo constituyen el sustrato sobre el cual se lleva a cabo el proceso de multiplicación viral y, por lo tanto, la producción de poliedros infecciosos. Para ser utilizadas con este propósito, las células deben ser susceptibles a la infección viral, y además deben ser capaces de llevar a cabo eficientemente las etapas del ciclo de replicación viral que culminan en la síntesis de una progenie de poliedros con actividad infecciosa.

Actualmente existen centenares de líneas establecidas a partir de órganos y tejidos de insectos, fundamentalmente de los órdenes Díptera y Lepidóptera (HINK Y HALL, 1989). La mayoría de ellas deriva de ovarios indiferenciados o de tejido embrionario, y por lo tanto pueden consistir en una mezcla de tipos celulares que difieren morfológica y fisiológicamente. El análisis de las propiedades de clones celulares aislados ratifica el bajo nivel de homogeneidad poblacional que presentan las líneas de células de insecto (LENZ *et al.*, 1991; PASUMARTHY Y MURHAMMER, 1994).

De la variedad de líneas celulares establecidas a partir de tejidos de insectos lepidópteros, sólo unas pocas han sido exhaustivamente caracterizadas y presentan propiedades que las hacen utilizables para el desarrollo de procesos de producción de baculovirus o proteínas recombinantes.

La mayoría de los procesos de producción de baculovirus y de expresión de proteínas recombinantes en cultivos de células de insecto, utilizando cepas silvestre o recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *A. californica* (AcMNPV), se han llevado a cabo en alguna de las líneas celulares derivadas de ovarios de *S. frugiperda*, IPLB-Sf21 (VAUGHN *et al.*, 1977) y Sf9, un aislamiento clonal derivado de la primera. En algunos casos han sido explorados, en forma comparativa, los rendimientos obtenidos en líneas celulares derivadas de otros insectos (HINK *et al.*, 1991; KING *et al.*, 1991; DAVIS *et al.*, 1993; CHAI *et al.*, 1996). Algunos de estos estudios demuestran que existen líneas celulares que, sobre la base de la producción por célula, resultan más productivas que IPLB-Sf21 o Sf9. Sin embargo, éstas últimas son aún frecuentemente seleccionadas debido a su adaptabilidad a las condiciones de producción a gran escala de virus o proteínas recombinantes, es decir, adaptación al cultivo en suspensión, rápida cinética de proliferación, crecimiento en medios libres de suero, resistencia a las condiciones de operación en grandes

reactores, etc. Por otro lado, el conocimiento que se posee sobre las mismas y sobre la influencia que los distintos parámetros de cultivo e infección ejercen sobre su productividad, facilitan significativamente el desarrollo de procesos.

Sin embargo, la producción de otros baculovirus distintos a AcMNPV puede requerir la utilización de líneas celulares derivadas del insecto blanco, debido a restricciones de espectro de huésped, como es el caso de los virus de granulosis (WINSTANLEY Y CROOK, 1993) o del virus de la poliedrosis nuclear de *S. exigua* (ScNPV) (HARA *et al.*, 1994), o a la mayor eficiencia alcanzada en la replicación viral, como ha sido demostrado por Castro *et al.* (1997) para la replicación del virus de la poliedrosis nuclear de *A. gemmatilis* en la línea celular homóloga UFLAg-286 (SIEBURTH Y MARUNIAK, 1988), en comparación con otras tres líneas heterólogas. Sin embargo, sólo en muy contados casos han sido caracterizadas las propiedades tecnológicas, o utilizado en procesos de producción, líneas celulares alternativas (STAVROULAKIS *et al.*, 1991; BELISLE *et al.*, 1992; JEM *et al.*, 1997).

4.1.2. Requerimientos nutricionales y medios de cultivo

Así como las células constituyen el sustrato donde se lleva a cabo la producción de virus, el medio de cultivo constituye, junto con el bio-reactor, el ambiente en el cual ese proceso se llevará a cabo. Para que el funcionamiento celular sea adecuado a los fines productivos, en este caso la producción de poliedros de baculovirus con fines bio-insecticidas, el ambiente debe otorgarle a las células en cultivo las condiciones biológicas, fisicoquímicas, mecánicas, etc. apropiadas para que las mismas maximicen su potencial productivo. El medio de cultivo es un factor de primera magnitud en la determinación de la productividad de un sistema baculovirus-línea celular. En efecto, el medio provee los nutrientes necesarios para asegurar la supervivencia, multiplicación y funcionalidad celulares, incluida la capacidad de replicar baculovirus; además, condiciona las características del entorno fisicoquímico (pH, osmolaridad, fuerza iónica y potencial de oxido-reducción). Por otro lado, considerando la economía de un proceso de producción *in vitro* de baculovirus, el costo del medio de cultivo constituye un componente principal del costo total del proceso, por lo cual tiene una incidencia directa en la determinación de la factibilidad económica del mismo.

La composición de los primeros medios de cultivo basales (medios que requieren de una suplementación ulterior) para células de lepidópteros fue derivada de los estudios de Trager y Wyatt (BENZ, 1986), y posteriormente perfeccionados por Grace, que estableció la fórmula que lleva su nombre (GRACE, 1962). Modificaciones de esta formulación, como los medios TNM-FH (HINK, 1970) y TC-100 (GARDINER Y STOCKDALE, 1975), que incorporan hidrolizados proteicos en su composición, son hoy también extensamente utilizados en el cultivo de células de lepidópteros, así como el medio IPL-41 (WEISS *et al.*, 1981). Todos estos medios requieren el agregado de suplementos, usualmente de naturaleza química no definida, para soportar la multiplicación celular y/o la replicación viral. La composición química de estos medios basales será analizada a continuación en relación con su capacidad para satisfacer los requerimientos de una apropiada funcionalidad celular.

Las sales inorgánicas cumplen un papel fundamental en los medios de cultivo. De acuerdo a la composición de sales inorgánicas, se distinguen dos tipos de medios de cultivo para células de insecto que difieren en la relación de concentraciones Na^+ / K^+ (MITSUHASHI, 1989). Algunas líneas celulares son dependientes de esta relación para alcanzar un desarrollo óptimo, mientras otras parecen no depender en absoluto de la misma. Respecto a los requerimientos de iones individuales, estos parecen ser variables para cada línea celular, aunque, en general, las células de insecto resultan bastante flexibles a este respecto. La incorporación de algunas sales en baja concentración puede mejorar algunas propiedades culturales, tal como sucede con el agregado de cloruro de aluminio (III) y sulfato de zinc (II).

Las células de insectos, como las células de mamíferos, pueden multiplicarse en medios de cultivo que contienen glucosa como único hidrato de carbono (MITSUHASHI, 1989). Los requerimientos de glucosa han sido cuantificados para las líneas celulares IPLB-Sf21 y Sf9, determinándose, en distintos experimentos realizados bajo diferentes condiciones, una amplia variación del coeficiente de consumo celular específico (BÉDARD *et al.*, 1993; HENSLER Y AGATHOS, 1994; KAMEN *et al.*, 1991; NEEMAN Y WAGNER, 1996; REUVENY *et al.*, 1992), un hecho que puede ser explicado por la variedad de condiciones experimentales utilizadas, pero también indicativo de la plasticidad nutricional y metabólica de estas células. Las vías a través de las cuales es metabolizada la glucosa no están aún claramente discernidas, pero se pueden establecer diferencias entre aquellas líneas que acumulan lactato en el medio de cultivo, como BM-5 (*Bombyx mori*) (STAVROULAKIS *et al.*, 1991) y BTI-Tn-5B1-4 (*Trichoplusia ni*) (RHIEL *et al.*, 1997), y las líneas de *S. frugiperda*, que no lo hacen (FERRANCE *et al.*, 1993; NEEMANN Y WAGNER, 1996). Respecto a los cambios que la infección por baculovirus induce sobre la demanda de glucosa en las células infectadas, los estudios publicados muestran información contradictoria: mientras algunos encontraron un incremento del consumo celular específico de glucosa (HENSLER Y AGATHOS, 1994; RAGHUNAND Y DALE, 1999), otros han hallado que la demanda no se modifica por la infección (KAMEN *et al.*, 1996), o aún disminuye (WONG *et al.*, 1994). Por otro lado, Raghunand y Dale (1999) encontraron que concentraciones más altas de glucosa permiten alcanzar mayores niveles de replicación viral y de expresión de proteína recombinante.

Los tres medios basales más utilizados tienen una composición cualitativa similar de aminoácidos, aunque el medio IPL-41 es cuantitativamente más rico. Cuatro aspectos deben considerarse respecto a los aminoácidos: su esencialidad, el requerimiento o consumo, su función y las vías de metabolización. De acuerdo a Mitsuhashi (1989), se puede considerar que 15 aminoácidos son esenciales en el cultivo de células de insectos: arginina, cistina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina y valina. Sin embargo, en trabajos posteriores se ha demostrado que la glutamina no es esencial en cultivos de células Sf9 e IPLB-Sf21, a condición que los mismos sean provistos con amonio como fuente de nitrógeno (ÖHMAN *et al.*, 1996). Respecto a la utilización, ha sido repetidamente demostrado que las concentracio-

nes de aminoácidos presentes en los medios de cultivo más usados exceden los reales requerimientos de las líneas de células de *S. frugiperda* (BÉDARD *et al.*, 1993; FERRANCE *et al.*, 1993; RHIEL *et al.*, 1997), y además la proliferación celular no es afectada por la reducción en el contenido de aminoácidos del medio de cultivo (FERRANCE *et al.*, 1993). Casi todos los aminoácidos son consumidos, aunque a distintas velocidades, siendo glutamina, serina, glutamato, aspartato y asparagina los que se consumen más rápidamente (BÉDARD *et al.*, 1993). No se produce amonio como producto del metabolismo de los aminoácidos, pero se ha demostrado que la alanina es consistentemente sintetizada y excretada, constituyendo la principal forma de eliminación del nitrógeno de aquellos aminoácidos utilizados como fuente de energía (BÉDARD *et al.*, 1993; FERRANCE *et al.*, 1993). En cuanto a las funciones de los aminoácidos, éstos son incorporados a las proteínas sintetizadas, pero además algunos de ellos pueden ser utilizados como fuentes de energía, obviamente aquellos que se consumen a mayor velocidad y que fueron citados más arriba (BATHIA *et al.*, 1996). El metabolismo de la glutamina en células de *S. frugiperda* ha sido investigado en varios trabajos (FERRANCE *et al.*, 1993; ÖHMAN *et al.*, 1995; NEEMANN Y WAGNER, 1996). Respecto al metabolismo del resto de los aminoácidos, la información disponible es más escasa. La información publicada es escasa en lo que refiere a cómo la infección con baculovirus modifica la demanda de aminoácidos, y los resultados conocidos son contradictorios (HENSLEY Y AGATHOS, 1994; WONG *et al.*, 1994).

Los medios de cultivo para células de insecto también contienen mezclas de vitaminas, pero sólo en pocos casos se han podido estudiar los requerimientos celulares debido a la necesidad de contar con medios definidos (BECKER Y LANDUREAU, 1981). Algunos medios de cultivo, como el medio de Grace y el IPL-41, incorporan en su formulación la presencia de ácidos orgánicos, como ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico y ácido alfaacetoglutarico, aunque a distintas concentraciones. Estos ácidos, intermediarios del ciclo de Krebs, son rápidamente consumidos en cultivos de células Sf9, con la excepción de ácido succínico, que se acumula cuando el medio es TNM-FH, aunque no en otros medios de cultivo (BÉDARD *et al.*, 1993). Ninguno de estos ácidos parece ser esencial para células de insecto en cultivo, ya que pueden ser cultivadas en medios carentes de los mismos.

4.1.2.1. Medios de cultivo con suero fetal bovino

De acuerdo a Barnes y Sato (1980), la principal función del SFB (o del suero de otras especies de vertebrados) en el cultivo de células animales es la provisión de factores hormonales estimulantes de la proliferación y la funcionalidad celulares, factores de anclaje a la superficie y diseminación celulares, proteínas de transporte de hormonas, lípidos, minerales, etc., y nutrientes, especialmente lípidos, esteroides y oligoelementos minerales, elementos éstos que no son provistos por los medios basales. Además, el SFB provee funciones de protección mecánica y detoxificación. Estos conceptos generales, a pesar de las distancias filogenéticas entre vertebrados e invertebrados, parecen ser aplicables al cultivo de células de insecto, donde el suero bovino fetal constituye el principal suplemento no definido. No

han podido identificarse los factores de crecimiento, activos en cultivos de células de insecto, presentes en el SFB (MITSUHASHI, 1989). Su actividad en los cultivos de células de insecto ha sido analizada en forma cuantitativa por Hild *et al.* (1992) en cultivos de células Sf9, quienes demostraron que se comporta como un limitante estequiométrico y cinético al mismo tiempo, revelando actividades nutricionales y promotoras de la proliferación, respectivamente.

Aunque la adición de suero fetal bovino es práctica, ya que incorpora al medio de cultivo numerosas actividades deficientes en los medios basales, su utilización acarrea también numerosos inconvenientes: es el componente de mayor costo (Wu *et al.*, 1989), su composición es variable de lote a lote, puede estar contaminado con toxinas o microorganismos, e interfiere con los procesos de producción a gran escala.

La bibliografía muestra discordancias respecto a la influencia de la concentración de SFB en la replicación viral y en la expresión de proteínas. Dicha influencia fue evaluada por Broussard y Summers (1989) en células Sf9 cultivadas en medio TNM-FH e infectadas con AcMNPV, quienes obtuvieron los niveles más altos de expresión de poliedrina en medio suplementado con 0,5% de SFB, mientras el rendimiento disminuyó significativamente cuando el suero se adicionó a una concentración de 10 %. Resultados similares obtuvieron para la expresión de beta-galactosidasa recombinante. Trabajando en otra línea celular, Zhang *et al.* (1992) evaluaron la replicación del virus de la poliedrosis nuclear de *B. mori* en cultivos celulares adaptados al crecimiento libre de suero. Los títulos de viriones libres resultaron similares en todas las condiciones ensayadas, pero la producción de poliedros resultó un poco más elevada en los cultivos carentes de suero fetal. Chakraborty *et al.* (1999) obtuvieron rendimientos volumétricos más elevados de poliedros del virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera* (HaSNPV) en cultivos de una línea celular de *Helicoverpa zea* en un medio libre de suero, que cuando el mismo medio se suplementó con SFB, aunque la infectividad de los poliedros obtenidos en esta última condición resultó dos veces mayor. Otros trabajos, por otro lado, han demostrado una reducción en los rendimientos de ambas progenies virales en medios libres de suero, respecto a los medios suplementados con SFB, tanto para AcMNPV (VAUGHN *et al.*, 1991), como para AgMNPV (CLAUS *et al.*, 1993). En ambos casos, la reducción de suero afectó más a la síntesis de poliedros que a la de viriones libres. También se ha advertido una disminución en la síntesis de proteínas recombinantes, expresadas bajo el control del promotor de poliedrina, en cultivos libres de suero (CARON *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993).

4.1.2.2. Medios de cultivo libres de suero

La necesidad de simplificar los medios de cultivo, superar las dificultades que plantea la utilización de suero fetal bovino y reducir los costos de producción, consecuencia de la aplicación de los cultivos de células de insecto a sistemas de producción de proteínas recombinantes a mediana y gran escala, ha llevado al desarrollo de diversas formulaciones completamente libres de suero. Idealmente, estos medios deberían aportar funciones similares o equivalentes a las obtenidas por

suplementación con suero fetal, obviando las desventajas que acarrea su uso. Dos estrategias diferentes se han seguido con este propósito: el enriquecimiento de los medios basales con sustancias de naturaleza química perfectamente definida, o el reemplazo del suero por sustancias de composición indefinida, fundamentalmente hidrolizados de proteínas, extractos naturales y mezclas de lípidos y esteroides. De acuerdo a esto, se pueden distinguir dos grupos de medios de cultivo libres de suero fetal: los medios definidos y los no definidos.

4.1.2.3. Medios definidos

Son medios muy complejos y, en general, de costo de desarrollo y preparación elevados. Por esta razón, si bien estos medios definidos son imprescindibles para realizar estudios profundos de utilización y metabolismo de nutrientes, no se utilizan en procesos de producción. Wilkie *et al.*, (1980) desarrollaron un medio químicamente definido compuesto por 69 sustancias diferentes, en el cual fueron capaces de mantener durante más de 20 pasajes una línea celular de *S. frugiperda*, y replicar al virus de la poliedrosis nuclear de *A. californica*. Sin embargo, no hubo referencias posteriores a su utilización, excepto por la imposibilidad de mantener cultivos de la línea Sf9 (FERRANCE *et al.*, 1993). Otro medio definido, S-20, fue capaz de permitir la multiplicación de una línea celular de *Periplaneta americana* (BECKER Y LANDUREAU, 1981).

4.1.2.4. Medios no definidos

El reemplazo del SFB por componentes no definidos ha sido una alternativa frecuentemente explorada con el objeto de obtener medios de cultivo de costo reducido, utilizables en procesos de producción de biopesticidas o proteínas recombinantes, aunque no permiten obviar todos los inconvenientes que plantea el uso de suero fetal, especialmente la falta de reproducibilidad de lote a lote. Uno de los primeros medios de cultivo libres de SFB y hemolinfa fue el medio desarrollado por Röder (1982), quien adicionó 0,5% de yema de huevo al medio TC-100 para el cultivo de la línea IPLB-Sf21 y la producción de poliedros de AcMNPV en un reactor agitado a escala de 10 litros; los poliedros producidos resultaron indistinguibles, por morfología y virulencia, de los obtenidos a partir de larvas infectadas. Uno de los hechos más significativos en este campo fue el desarrollo de microemulsiones de lípidos y poli-alcoholes surfactantes, que no sólo permitieron el reemplazo del suero fetal bovino, sino que también hicieron posible el cultivo de células de insecto y la producción de baculovirus y proteínas recombinantes a gran escala en reactores oxigenados por burbujeo de aire. Una de éstas microemulsiones, desarrollada por Maiorella *et al.*, (1988), contiene metilésteres de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao, el agente tensoactivo Tween-80, colesterol y acetato de tocoferol, disueltos en etanol y luego emulsionados en el polialcohol "Pluronic F-68", un agente surfactante que actúa como un protector celular frente al stress mecánico (SWIM Y PARKER, 1960). La suplementación del medio IPL-41 con esta microemulsión permitió obtener elevados niveles de producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCS-F) expresado en células Sf-9 cultivadas en un reac-

tor airlift, cuando fue añadida a una concentración de 0,1 %, junto con 0,4 % de ultrafiltrado de extracto de levaduras, en medio IPL-41. Siguiendo este mismo principio, otros suplementos lipídicos han sido ensayados con suceso para reemplazar el SFB (GOODWIN, 1989; HINK, 1991).

Los hidrolizados de proteínas son utilizados frecuentemente como suplementos para el cultivo de células de insecto, y constituyen componentes esenciales de muchos medios de cultivo libres de suero (SCHLAEGER, 1996). Los más usados son los hidrolizados de origen animal, como el hidrolizado de lactoalbúmina, el hidrolizado de caseína, el caldo triptosa ("tryptose broth") e hidrolizados de proteínas de carne vacuna. Estos hidrolizados no sólo actúan como fuente de aminoácidos libres, sino también como modificadores de la proliferación celular, probablemente a través de la actividad de péptidos que serían producto de la hidrólisis enzimática. La actividad de estos hidrolizados depende de la concentración utilizada, de la línea celular ensayada, y frecuentemente también del lote de hidrolizado (MITSUHASHI, 1989). El extracto de levaduras ha demostrado poseer un marcado efecto positivo sobre el crecimiento de cultivos de células de insecto (LEE Y PARK, 1994), así como también sobre la replicación viral (REUVENY *et al.*, 1993a).

Se dispone actualmente de un conjunto de medios de cultivo libres de suero de origen comercial (SCHLAEGER, 1996). Obviamente, la composición de estos medios no es conocida, aunque todos ellos se basan en los principios expuestos en los párrafos precedentes, y su costo es todavía tan elevado que su utilización para la producción de baculovirus para fines bio-insecticidas no siempre genera ventajas económicas respecto al uso de medios suplementados con SFB. Estos medios permiten alcanzar densidades celulares muy altas, y también rendimientos elevados de baculovirus silvestres o proteínas recombinantes. La aptitud de cuatro medios comerciales para sostener la producción de poliedros de AcMNPV en cultivos en suspensión de la línea BTI-Tn-5B1-4 fue ensayada por McKenna *et al.* (1997). No se registraron diferencias significativas entre los cuatro medios respecto a los parámetros de los cultivos sin infectar, y se obtuvieron altos rendimientos específicos de poliedros en los cuatro casos. El análisis de los poliedros por microscopía electrónica, y la cuantificación del DNA viral incluido, no revelaron diferencias significativas entre los poliedros producidos en cultivos y los controles producidos en larvas, pero estos últimos fueron significativamente más infectivos que aquellos. Resultados similares fueron obtenidos por Chakraborty *et al.* (1999) para la producción de poliedros de HaSNPV en medio Sf900II libre de suero, que resultaron cinco veces menos infectivos que los producidos en larvas, atribuyéndose esta diferencia al efecto del método de extracción de los cuerpos de inclusión a partir de las células infectadas.

4.1.3. Requerimientos físicoquímicos

4.1.3.1. Temperatura

La temperatura óptima para el cultivo de células de insecto se encuentra entre los 25 y los 30°C, esto es, considerablemente más baja que la requerida por las células de mamífero. La mayoría de las líneas celulares son cultivadas a 28°C

(SUMMERS Y SMITH, 1987). Con propósitos de mantenimiento, muchas líneas celulares pueden ser conservadas a temperatura reducida (4–8°C), pero en general soportan mal temperaturas superiores a 30°C, a partir de la cual reducen su velocidad específica de multiplicación. Las células adaptadas al crecimiento en medios de cultivo libres de suero fetal son usualmente bastante menos tolerantes a las modificaciones de temperatura (MITSUHASHI Y GOODWIN, 1989). Respecto a la influencia de la temperatura sobre la multiplicación viral o la expresión de proteínas recombinantes, existen informes contradictorios. Hara *et al.* (1993) compararon la expresión de beta-galactosidasa recombinante a varias temperaturas, encontrando que el máximo rendimiento se obtenía a 30°C. Por el contrario, Reuveny *et al.* (1993b) demostraron que la expresión de dos proteínas recombinantes (beta-galactosidasa y glucocerebrosidasa) en la misma línea celular (Sf9) decaía cuando la temperatura subía por encima de 27°C.

4.1.3.2. pH

El pH requerido para un crecimiento óptimo de los cultivos de células de lepidópteros se encuentra entre 6 y 6,50. La influencia del pH en el cultivo de células Sf9 fue estudiado por Hild *et al.* (1992), quienes encontraron que la densidad máxima y la máxima velocidad específica de crecimiento se alcanzaban en un rango de pH entre 6,19 y 6,38. Durante el cultivo, a medida que algunos nutrientes son consumidos y los productos catabólicos se acumulan, se tienden a producir modificaciones del pH. Para evitar estas variaciones, se incorporan sistemas tampón a los medios de cultivo. De todos modos, las células de insecto toleran mejor las variaciones de pH que las células de mamíferos, variaciones que, además, son de menor cuantía, de tal manera que usualmente no se requiere una regulación muy estricta. No existe información publicada acerca del efecto de la regulación del pH sobre la multiplicación viral.

4.1.3.3. Osmolaridad

La influencia de la presión osmótica en el cultivo *in vitro* de células de insecto fue estudiada por Kurtii *et al.* (1974; 1975), quienes determinaron que la osmolaridad óptima para el cultivo de células de *Heliothis zea* se encontraba entre 300 y 310 mOsm/kg. Entre 290 y 360 mOsm/kg, la velocidad de multiplicación específica no resultó inferior al 90% de la velocidad obtenida a la osmolaridad óptima. Estas células parecieron más susceptibles a las osmolaridades inferiores que a las más elevadas. Por otro lado, las células fueron capaces de alterar la osmolaridad del medio a lo largo del tiempo de cultivo. Líneas celulares diferentes pueden presentar requerimientos de osmolaridad diferentes, e incluso pueden reaccionar en forma diversa frente a los distintos tipos de agentes utilizados para modificar la osmolaridad del medio de cultivo (KURTII Y MUNDERLOH, 1984).

4.1.3.4. Oxígeno

El oxígeno disponible es un parámetro crítico en el cultivo de células animales. Teniendo en cuenta la reducida solubilidad del oxígeno en medios acuosos, el

suministro de las cantidades requeridas para permitir la multiplicación celular y la replicación viral constituye un problema crucial a resolver para determinar la factibilidad técnica de un proceso de producción de baculovirus. En este apartado se considerarán la demanda de oxígeno de las células de insecto en cultivo, tanto no infectadas como infectadas, y la importancia del nivel de oxígeno disuelto sobre la multiplicación celular y la producción de baculovirus.

A despecho de consideraciones iniciales acerca de la demanda elevada de oxígeno en cultivos de células de insecto (MALINOWSKI Y DAUGULIS, 1993), los valores determinados en una serie de trabajos, realizados en su mayoría sobre las líneas celulares de *S. frugiperda*, permiten demostrar que el rango de valores de consumo celular específico de oxígeno (1 a 11 mmoles/10⁹ células/día) es similar al observado en cultivos de células de mamíferos (MAIORELLA *et al.*, 1988; SCHOPF *et al.*, 1990; KAMEN *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 1992; REUVENY *et al.*, 1993b; DEUTSCHMANN Y JÄGER, 1994). Este amplio rango parece estar determinado por diferentes condiciones de cultivo o por mediciones efectuadas en diferentes tramos de la curva de multiplicación celular. Por otro lado, la mayoría de los trabajos publicados indican que la infección con baculovirus incrementa la demanda de oxígeno durante, aproximadamente, las primeras veinte horas post-infección (WEISS *et al.*, 1982; SCHOPF *et al.*, 1990; KAMEN *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 1992; HENSLER Y AGATHOS, 1994; KIOUKIA *et al.*, 1995). Una vez superado el pico de síntesis de macromoléculas virales se produce una rápida reducción.

Hink y Strauss (1980) demostraron que el nivel de oxígeno disuelto afecta el crecimiento de los cultivos en suspensión de la línea celular Tn-368, obteniendo la mejor proliferación a un valor de concentración de oxígeno disuelto de 50% de saturación. Valores óptimos diferentes fueron señalados para otras líneas celulares (DEUTSCHMANN Y JÄGER, 1994; ZHANG *et al.*, 1994), pero también en trabajos realizados sobre una misma línea celular (Sf9) (KLÖPPINGER *et al.*, 1990; JAIN *et al.*, 1991; HENSLER Y AGATHOS, 1994). La mayoría de los trabajos publicados ponen énfasis en la importancia de mantener un nivel adecuado de la concentración de oxígeno disuelto durante la fase de infección para obtener elevados rendimientos de baculovirus o proteínas recombinantes (KLÖPPINGER *et al.*, 1990; LINDSAY Y BETENBAUGH, 1992; BLANCHARD Y FERGUSON, 1992; SCOTT *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1993; TATICEK Y SHULER, 1997), aunque existen discordancias respecto a cuál es ese valor óptimo.

4.1.3.5. Sensibilidad mecánica

Todas las líneas celulares establecidas a partir de tejidos y órganos de insectos presentan características morfológicas comunes que condicionan negativamente su utilización en procesos biotecnológicos: su gran tamaño y la carencia de una pared celular. Ambas determinan, conjuntamente, una elevada susceptibilidad a los esfuerzos de cizallamiento que se generan en medios agitados o en presencia de burbujas. Los trabajos iniciales que estudiaron la susceptibilidad de las células de insecto al estrés mecánico parecen haber sobrestimado dicha sensibilidad respecto a la de las células de mamífero (WEISS *et al.*, 1980). Los resultados de trabajos

posteriores indican que la sensibilidad de ambos tipos de células es comparable, y que tanto unas como otras sólo sufren efectos mínimos cuando son sometidas a velocidades de agitación moderadas, en ausencia de burbujas (MURHAMMER, 1991). En contraste, el burbujeo, la cavitación y la incorporación de burbujas a través de remolinos son operaciones nocivas para las células animales cultivadas en suspensión, entre ellas las células de insecto (MURHAMMER, 1991).

La interacción entre burbujas y células de insecto ha sido estudiada en un conjunto de trabajos (TRAMPER *et al.*, 1988; MURHAMMER Y GOOCHE, 1988; TRINK *et al.*, 1994). La mayoría de los estudios indican que, tal como sucede en cultivos de células de mamíferos (HANDA-CORRIGAN *et al.*, 1989), gran parte del daño celular está asociado a la región interfacial líquido-aire donde se produce la ruptura de las burbujas (BAVARIAN *et al.*, 1991). Por otro lado, Murhammer y Gooche (1990) demostraron que también se produce daño celular en la vecindad del generador de burbujas, y que la magnitud del daño es dependiente del diseño del distribuidor, mientras no parece generarse efecto alguno sobre la integridad celular en la región donde se produce el ascenso de las burbujas. Como regla general, se puede decir que el daño celular asociado a la presencia de burbujas es linealmente proporcional al área de interfase gas-líquido (medio de cultivo), y es independiente de las dimensiones (diámetro y altura) del reactor y del número de burbujas. Por lo tanto, el daño celular en reactores aireados por burbujeo sólo dependerá del volumen (tamaño) de las burbujas (CHALMERS, 1996). Las burbujas pequeñas provocan un daño celular asociado a su ruptura mayor que las burbujas más grandes (HANDA-CORRIGAN *et al.*, 1989; Oh *et al.*, 1992).

La demostración que la incorporación del polialcohol "Pluronic F-68" a los medios de cultivo protege a las células de insecto de los efectos del burbujeo, la cavitación y el torbellino, ha permitido acceder a la propagación en suspensión de estas células a gran escala en reactores aireados por burbujeo, tornando accesible la tecnología de cultivo en reactores airlift (MAIORELLA *et al.*, 1988; MURHAMMER Y GOOCHE, 1988). Los fundamentos de la acción protectora del Pluronic F-68 no son aún totalmente comprendidos, aunque su actividad como agente tensoactivo parece inhibir la adhesión celular a la superficie de las burbujas (MURHAMMER, 1991).

4.1.4. Sistemas de cultivo

El interés de la industria biotecnológica en los baculovirus, como bioinsecticidas y como vectores de expresión, ha incentivado el interés por el desarrollo de sistemas de cultivos de células de insecto a gran escala. Se pueden distinguir, a grandes rasgos, dos sistemas básicos para el cultivo de células de insecto a gran escala: los sistemas de cultivo estacionarios y los sistemas de cultivo de células libres en suspensión agitada.

4.1.4.1. Cultivos estacionarios

La mayoría de las líneas celulares establecidas a partir de tejidos de insectos pueden cultivarse adheridas sobre una superficie. Usualmente, la realización de subcultivos no requiere la utilización de agentes enzimáticos o químicos para libe-

rar las células de la superficie, bastando para ello una suave acción mecánica. El cultivo estacionario es una metodología adecuada para el mantenimiento de células, o su propagación a pequeña escala, pero en cambio resulta menos apropiada para los cultivos a gran escala. De todos modos, el cultivo de células de insecto permite superar algunos de los inconvenientes que plantean los sistemas de cultivo en suspensión, como la falta de adaptación de algunas líneas celulares, los efectos derivados de la agitación y el burbujeo, y las bajas concentraciones de producto obtenidas (GOOSEN, 1993). Se revisarán a continuación algunos ejemplos de sistemas de propagación de células de insecto inmovilizadas a gran escala.

Los primeros trabajos en sistemas de células inmovilizadas a gran escala fueron publicados por Weiss *et al.* (1981), quienes propagaron células IPLB-Sf21, en un proceso semiautomatizado, en bancos de botellas giratorias ("roller"). Posteriormente, Weiss y Vaughn (1986) evaluaron un sistema comercial de inmovilización celular y perfusión para el cultivo de la misma línea celular y la producción de poliedros de AcMNPV. Aplicando otro concepto, King *et al.* (1988) encapsularon células IPLB-Sf21 en microcápsulas de alginato-polilisina, obteniendo densidades celulares intracapsulares de 8×10^7 células/ml de cápsulas. Kompier *et al.* (1991) inmovilizaron la misma línea celular en un reactor de lecho estacionario relleno con una fibra sintética. El sistema fue alimentado con medio por perfusión desde un frasco reservorio, oxigenado mediante aireación a través de un tubo de silicona. El tiempo de duplicación del cultivo resultó de 20 horas, y la densidad celular máxima fue de 6×10^6 células/ml de fibra empacada. En cambio, Chung *et al.* (1993) inmovilizaron células de la línea Tn5 sobre esferas de vidrio empacadas en la zona de circulación descendente de un reactor airlift no concéntrico, mientras el medio de cultivo fue oxigenado mediante burbujeo de aire en la zona de circulación ascendente.

4.1.4.2. Cultivos en suspensión

Diversos sistemas de cultivo en suspensión han sido utilizados para la propagación de células de insectos, desde los simples frascos agitados por rotación ("spinner flasks" y frascos erlenmeyer agitados en sistemas orbitales), en pequeña escala, hasta reactores de tipo tanque agitado y airlift, a escala de decenas y cientos de litros. Estos sistemas presentan la ventaja de su escalabilidad, así como también la amplia experiencia acumulada en el campo de las fermentaciones microbianas, cuyos conceptos básicos pueden ser extrapolados al diseño, operación, optimización y control de procesos de cultivo de células de insecto. Los cultivos en suspensión a baja escala, en sistemas donde hay una alta relación superficie/volumen que permite una adecuada transferencia de oxígeno, en general no ofrecen dificultades para obtener elevadas densidades celulares a alta velocidad de multiplicación. En "spinner flasks" de 250 a 500 ml de capacidad, con 50 a 75 ml de volumen de cultivo, dependiendo del medio de cultivo se pueden obtener densidades celulares máximas de hasta 10^7 células viables por ml. Densidades similares pueden ser obtenidas en cultivos realizados en erlenmeyers en agitador orbital a una velocidad entre 100 y 150 rpm.

Sin duda, el principal cuello de botella para la propagación de estas células a gran escala está definido por la combinación de su naturaleza aeróbica y sus características estructurales. En otras palabras, el principal escollo a superar en el diseño de sistemas de cultivo a gran escala de células de insecto radica en como suministrar la cantidad de oxígeno requerida sin incurrir en prácticas agresivas para la integridad estructural y funcional de las células. Algunos de los sistemas desarrollados y/o utilizados para la propagación de células de insecto en suspensión se describen brevemente a continuación, distinguiendo entre sistemas agitados mecánicamente (reactores agitados) y neumáticamente (columnas de burbujeo y reactores airlift).

4.1.4.3. Reactores agitados

En los últimos años ha quedado claramente establecido que los reactores agitados convencionales desarrollados para el cultivo de microorganismos, si son adecuadamente adaptados, pueden ser utilizados para el cultivo de células de insectos a gran escala (Agathos, 1996). La agitación en estos reactores, que debe ser suficiente para mantener la homogeneidad del cultivo y asegurar una adecuada transferencia de nutrientes y, principalmente, oxígeno, se lleva a cabo mecánicamente a través de impulsores. El diseño del impulsor y su velocidad son elementos que ejercen una influencia considerable, determinando la magnitud del daño celular asociado a la operación de agitación. Sin embargo, la forma y la velocidad del impulsor no pueden ser considerados independientemente del método de aireación y de la composición del medio de cultivo. En este sentido, los trabajos de Murhammer y Gooche (1990) permitieron demostrar que es posible utilizar impulsores de paleta plana, o velocidades de agitación elevadas (hasta 850 rpm), si se evita que queden burbujas de aire atrapadas en el seno del cultivo, a través de cavitación o formación de torbellinos, y si el medio es adicionado con "Pluronic F-68". De cualquier manera, desde los trabajos iniciales de Hink y Strauss (1980), quienes demostraron que los impulsores de tipo hélice marina permitían generar una adecuada agitación manteniendo una elevada viabilidad celular, éstos han sido frecuentemente utilizados para equipar reactores agitados para el cultivo de células de insectos a distintas escalas (KOMPIER *et al.*, 1988; CARON *et al.*, 1990; BARKHEM *et al.*, 1992; BLANCHARD Y FERGUSON, 1992). Otros diseños de impulsores han sido utilizados con éxito (KAMEN *et al.*, 1991; JÄGER *et al.*, 1992), y recientemente se ha descrito la aplicación de reactores de pared rotatoria que simulan un ambiente microgravitatorio y permiten generar una adecuada agitación del cultivo en suspensión (COWGER *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la forma en que se introduce oxígeno en un reactor agitado ejerce una influencia considerable sobre su funcionalidad. Tres principios diferentes de aireación han sido utilizados en reactores agitados aplicados al cultivo de células de insecto: superficial, libre de burbujas a través de membranas semipermeables, y por burbujeo de gases.

La aireación superficial puede ser suficiente para sistemas de cultivo agitados a pequeña escala, donde la relación superficie de intercambio a volumen de líquido

es elevada, pero a mayor escala es impracticable, a menos que se consideren modificaciones del reactor, tales como el uso de impulsores de cinta helicoidal y "baffles" superficiales, y el suministro de oxígeno puro (KAMEN *et al.*, 1991), o que sea complementada por burbujeo (HINK Y STRAUSS, 1980).

Los sistemas que utilizan membranas semipermeables de silicona (MILTENBURGER Y DAVID, 1980; EBERHARDT Y SCHUGERL, 1987; COWGER *et al.*, 1999) o de polipropileno (JÄGER *et al.*, 1992) desarrollan adecuadas tasas de transferencia de oxígeno por diferencia de presión parcial del gas entre la fase gaseosa (el interior de la membrana) y la fase líquida (el seno del cultivo), evitando la formación de burbujas. Jäger *et al.* (1992) alcanzaron densidades celulares de casi 5×10^7 células viables utilizando un sistema de aireación libre de burbujas, suministro de oxígeno puro y perfusión del medio de cultivo. Sin embargo, estos sistemas que funcionan óptimamente a baja escala, son difícilmente escalables, limitando su utilidad para la producción masiva de baculovirus.

En los reactores oxigenados por burbujeo, tal como se analizó previamente, el diámetro de las burbujas introducidas en el seno del cultivo ejerce un efecto importante sobre su funcionalidad. Jem *et al.* (1997), en el desarrollo de un proceso de producción a gran escala del virus de la poliedrosis nuclear *Anagrapha falcifera* (AfMNPV), demostraron que la multiplicación celular se inhibe en reactores agitados aireados con burbujas de diámetro inferior a 0,1 mm, mientras que el crecimiento del cultivo se reanuda cuando la aireación pasa a realizarse con burbujas de 1 mm de diámetro. A despecho de esta limitación, los reactores aireados por burbujeo de gases son los que ofrecen mejores perspectivas de escalabilidad. El cultivo de células de insecto a gran escala en reactores agitados está siendo implementado por industrias farmacéuticas productoras de proteínas recombinantes (BARKHEM *et al.*, 1992, GUILLAUME *et al.*, 1992), y también por industrias productoras de baculovirus para control de plagas agrícolas (BELISLE *et al.*, 1992; JEM *et al.*, 1997).

4.1.4.4. Reactores airlift

Los reactores airlift, cuyos principios de diseño y aplicación al cultivo de células de insecto han sido revisados recientemente (AGATHOS, 1996; TRAMPER *et al.*, 1996), presentan una serie de ventajas. Por un lado, permiten alcanzar una adecuada homogeneidad del cultivo y tasas de transferencia de oxígeno elevadas con reducido estrés mecánico. Por otro, a diferencia de los reactores agitados, a medida que aumenta la escala mejora el funcionamiento del reactor debido al incremento de la presión hidrostática que opera como fuerza impulsora en la región de flujo descendente. Además, debido a su simplicidad de diseño y construcción, requieren menor inversión de capital, y los costos de mantenimiento y operación son también más bajos que en los reactores agitados. Sin embargo, la experiencia acumulada en la operación de estos reactores es más limitada, y en el caso particular de su aplicación al cultivo de células de insecto y la multiplicación de baculovirus, sólo en la última década, a partir de la introducción del "Pluronic F68", se registran informes de su utilización exitosa, no sólo a pequeña escala sino también en reactores de decenas de litros.

Maioresella *et al.* (1988) utilizaron un reactor airlift de 21 litros (cuyas dimensiones no especificaron), el cual fue operado a una velocidad de burbujeo de aire de 420 a 1260 ml/min, o 0,02 a 0,06 volumen/volumen/minuto (VVM), introducido al reactor a través de un distribuidor que permitía regular el tamaño de las burbujas entre 0,5 y 1 cm de diámetro. Murhammer y Gooche (1988), en cambio, utilizaron un reactor airlift descartable de 570 ml de volumen de operación (tampoco se indicaron las dimensiones), al cual airearon por microburbujeo a través de un distribuidor de 0,2 μ m de tamaño de poro, con una velocidad de flujo de 2 a 3 ml/min (0,003 a 0,005 VVM). Schlaeger *et al.* (1992) escalaron el proceso de producción de una proteína recombinante en reactores airlift de 23 y 60 litros de volumen. Por otro lado, Belisle *et al.* (1992) cultivaron células Sf9 e IPLB-LdFB, y produjeron poliedros de los virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* y *Lymantria dispar*, respectivamente, en reactores airlift a escala de 40 litros. King *et al.* (1992) utilizaron un reactor airlift de 14 litros de volumen total (145 mm de diámetro, y 100 mm de diámetro y 390 mm de altura del tubo central), aireado con burbujas de 1 cm de diámetro, con una velocidad de flujo entre 0,02 y 0,06 VVM para el cultivo de células Sf9 y la producción de una proteína recombinante. A pesar de estos ejemplos, no hay estudios sistemáticos de optimización de diseño y operación de reactores airlift aplicados al cultivo de células de insecto en la bibliografía disponible, ni tampoco desarrollo de modelos aplicables al escalamiento de procesos en estos reactores.

4.2. Infección de cultivos celulares con baculovirus

Una vez revisados los aspectos generales de los cultivos de células de insectos, y su relación con la producción de baculovirus, se considerarán en las secciones siguientes tres aspectos que ejercen una marcada influencia sobre los rendimientos de las progenies virales en cultivos infectados: el tipo y calidad del inóculo viral, los parámetros del proceso de infección, y el modo de operación.

4.2.1. Inóculo viral

Se denomina inóculo viral en un proceso de producción de poliedros de baculovirus, o proteína recombinante, en cultivos celulares, a la masa de partículas virales no incluidas (viriones libres) que se agrega al cultivo para comenzar la infección. La calidad del inóculo viral no sólo es un determinante principal de la calidad del producto obtenido, sino que también puede ejercer una significativa influencia sobre la productividad de baculovirus en cultivos celulares. Los requerimientos de virulencia en relación a la especie de insecto a controlar, que son similares para los procesos de producción *in vivo* e *in vitro*, fueron analizados previamente. A los mismos se debe sumar la capacidad de replicación en cultivos celulares a niveles que aseguren una productividad de poliedros compatible con la economía del proceso. Por otro lado, debido a los mecanismos de selección de poblaciones virales que operan en los cultivos celulares infectados, donde la infección es transmitida de célula a célula por viriones libres, y la calidad y cantidad de los poliedros producidos no opera como factor de restricción en dicha transmisión, en los procesos *in vitro* se

debe prestar especial atención a la generación y propagación de variantes genómicas que originan rendimientos menores o poliedros con virulencia reducida. Estas variantes resultarían desfavorecidas en la naturaleza, pero no lo son en cultivos celulares, en los cuales se enriquecen a través de los sucesivos pasajes y predominan sobre la población viral parental. Entre las variantes de virulencia reducida que se generan por pasaje repetido en cultivos celulares se encuentran, por un lado, los fenotipos productores de pocos poliedros (fenotipos FP), que han sido descritos para varios baculovirus diferentes (POTTER *et al.*, 1976; FRASER, 1987; WANG *et al.*, 1989), y que se generan, en su mayoría, por inserción de un transposón en el genoma viral (MILLER Y MILLER, 1982; FRASER, 1987), y por el otro, las partículas defectivas interferentes (PDIs) originadas por delección (ver los Capítulos III y IV) descritas por Wickham *et al.* (1991), Kool *et al.* (1991) y Lee y Krell (1992). El pasaje repetido de baculovirus en cultivos celulares lleva a un paulatino enriquecimiento de PDIs, en detrimento de la población viral parental, y a una rápida caída de los rendimientos de producto. Este comportamiento, conocido con el nombre de efecto pasaje, es el responsable de la imposibilidad de sostener la producción en continuo de poliedros (KOMPIER *et al.*, 1988) o proteínas recombinantes (Kool *et al.*, 1991) en cultivos de células de insectos. El efecto pasaje se acelera cuando la inoculación de virus se produce a alta multiplicidad de infección (moi, número promedio de partículas víricas por célula) (WICKHAM *et al.*, 1991), y se magnifica a medida que aumenta el número de rondas de replicación a que se somete el inóculo debido a la mayor velocidad de replicación de los genomas defectivos (KOMPIER *et al.*, 1988; CHAKRABORTY Y REID, 1999). A medida que aumenta la moi se incrementa la proporción de infecciones múltiples, en las que una célula es infectada por más de una partícula viral, permitiendo así que se desarrollen eventos de recombinación que están involucrados en la génesis de PDIs. Por lo tanto, es aconsejable que los inóculos de baculovirus sean preparados en cultivos celulares infectados a baja moi (0,01 a 0,1 UFP / célula), y que los mismos sean sometidos al menor número de amplificaciones posible. Alternativamente, y con el objeto de mantener la virulencia de la cepa de virus, se pueden hacer pasajes por larvas susceptibles y coleccionar hemolinfa para utilizar como semilla al comienzo del proceso de amplificación del inóculo.

Dado que la producción de poliedros de baculovirus a gran escala requiere el uso, como insumo, de grandes cantidades de inóculo viral, resulta necesario estudiar las condiciones de cultivo e infección que permitan optimizar los rendimientos de viriones libres. La obtención de inóculos virales de alto título permite, por un lado, reducir el volumen necesario, y por lo tanto economizar en este insumo de incidencia elevada en el costo total del proceso, y, por otro lado, minimizar la cantidad de etapas de amplificación hasta llegar al volumen de inóculo necesario para infectar el reactor de producción, reduciendo la probabilidad de generación de PDIs. Las condiciones de infección que permiten optimizar el rendimiento de viriones no son necesariamente las mismas que permiten optimizar los rendimientos de poliedros, y deben ser evaluadas para cada proceso (CLAUS *et al.*, 1997). Otra alternativa que permite reducir la demanda de inóculo es el desarrollo de protocolos de producción de poliedros a baja moi (WONG *et al.*, 1996).

4.2.2. Parámetros del proceso de infección

Los procesos de producción de poliedros de baculovirus en cultivos de células de insectos están constituidos por dos etapas, delimitadas por el acto de inoculación del virus al sistema para su propagación. Durante la primera etapa se lleva a cabo la amplificación del sustrato celular, la que transcurre con una determinada cinética que depende de la línea celular, del medio de cultivo y de las condiciones de cultivo impuestas al sistema, tal como fue analizado en secciones precedentes. La segunda etapa comienza en el momento de la infección y, a diferencia de otros procesos de producción de virus en los que se genera un único fenotipo viral (virus de mamíferos, bacteriófagos, etc.), puede dividirse temporalmente en dos fases, de acuerdo al fenotipo cuya síntesis predomine, viriones libres en la primera fase y poliedros en la segunda. Los eventos de esta segunda etapa, su cinética y los rendimientos finales de ambos tipos de progenie, estarán en gran medida determinados por la densidad celular y la calidad del medio de cultivo, por la selección del momento en que se introduce el inóculo viral, y por la multiplicidad de infección. Se analizará a continuación la influencia de cada uno de estos parámetros de infección.

4.2.2.1. Densidad celular

La densidad celular al momento de la infección es uno de los primeros factores cuya importancia en la determinación del rendimiento de los procesos de producción de baculovirus fue señalada. Stockdale y Gardiner (1977) estudiaron el efecto de la densidad celular sobre la producción de poliedros de AcNPV en cultivos de células IPLB-Sf21 en monocapa, demostrando que el rendimiento de poliedros producidos por célula disminuía a medida que la concentración celular se incrementaba, independientemente de la longevidad del medio de cultivo utilizado. Más tarde, Wood *et al.* (1982) reportaron que, en cultivos estáticos de células de *S. frugiperda*, la confluencia celular provocaba una marcada inhibición de la replicación viral, que se traducía en una disminución de la producción de los dos fenotipos virales. Se observó el mismo comportamiento en cultivos de la línea BTI-Tn-5B1-4 (*T. ni*) (WICKHAM Y NEMEROW, 1993; CHUNG Y SHULER, 1993). Bien que la reducción provocada en la replicación viral por la elevada densidad celular en cultivos estáticos parece ser un fenómeno bien probado, no sucede lo mismo en cultivos en suspensión. Weiss *et al.* (1985) reportaron que la infección de cultivos en lote en suspensión a una densidad de $7,5 \times 10^5$ células/ml no producía poliedros de AcMNPV, en contraposición a lo ocurrido con cultivos infectados a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Una notable reducción de los rendimientos de ambas progenies virales fue descrito en cultivos de la línea celular IPLB-Sf21 infectados a alta densidad con el virus de la poliedrosis nuclear de *A. gemmatilis* (AgMNPV) (VISNOVSKY Y CLAUS, 1994). Sin embargo, teniendo en cuenta que un cultivo en lote es un sistema donde la cantidad y calidad de la biomasa y la calidad del medio de cultivo están modificándose constantemente, el efecto referido podría ser atribuido a varios factores: la densidad celular en sí misma, las alteraciones del medio de cultivo (agotamiento de nutrientes, acumulación de productos tóxicos, cambios de pH), las modificaciones de la

funcionalidad celular a lo largo de la curva de multiplicación celular, o un insuficiente abastecimiento de oxígeno debido a la mayor demanda derivada del aumento en la concentración celular. Para delimitar la influencia de estos factores, Caron *et al.* (1990), quienes obtenían una marcada inhibición de la producción de VP6 recombinante cuando la infección en cultivos en lote se producía a una densidad superior a 2×10^6 células/ml, tomaron cultivos de alta densidad (4×10^6 células/ml) y los resuspendieron en medio fresco, a la misma densidad, antes de la infección, obteniendo rendimientos comparables a los producidos a baja densidad celular. Lindsay y Betenbaugh (1992) observaron una marcada inhibición de la producción de dos proteínas recombinantes (VP4 de rotavirus porcino y beta-galactosidasa) cuando la infección se producía a una densidad celular superior a $3,9 \times 10^5$ células/ml (células Sf9), pero la productividad por célula podía ser restaurada si los cultivos de alta densidad eran resuspendidos en medio fresco y aireados superficialmente. Kloukia *et al.* (1995) y Radford *et al.* (1992) también demostraron que es posible obtener altas productividades infectando a alta densidad celular, con la condición de hacerlo en medio fresco y con un suministro adecuado de oxígeno. El conjunto de estos trabajos demuestra que la limitación en la producción en cultivos de alta densidad es de naturaleza predominantemente ambiental, y puede revertirse mediante la renovación del medio de cultivo.

4.2.2.2. Tiempo y multiplicidad de infección (moi)

La elección del momento de la infección también es un factor crítico en la determinación del rendimiento en los sistemas baculovirus-células de insecto. En cultivos en lote, este parámetro está ligado a la densidad celular, y pueden ser aplicados los mismos elementos de análisis expuestos en el apartado precedente. Por otro lado, este factor no puede considerarse en forma aislada respecto a la influencia de la moi, definida como la relación entre el número de viriones y el número de células en el momento de la infección, ya que el valor de ésta va a determinar cuál es la proporción de células que se infectan efectivamente en el momento de agregar el inóculo viral al cultivo, y por lo tanto también, qué proporción de células no se infectarán y continuarán multiplicándose antes de ser infectadas, a tiempos de infección más tardíos, por viriones generados en la sub-población de células infectadas originalmente, cuando las condiciones del cultivo ya no son óptimas. De hecho, cultivos de células IPLB-Sf21, infectados tempranamente con AgMNPV, pero a baja multiplicidad de infección (0.01 dosis infectivas 50% / célula), generan rendimientos virales bajos, similares a los obtenidos en cultivos infectados tardíamente (VISNOVSKY Y CLAUS, 1994). La relación entre tiempo y multiplicidad de infección para la infección de cultivos de células de insecto con baculovirus ha sido analizada por Wong *et al.* (1996), quienes establecieron que, en función del conocimiento de la cinética de infección, una adecuada selección del tiempo de agregado del inóculo viral permite realizar la infección a muy bajas multiplicidades de infección, sin que se resientan los rendimientos de producto, pero que éstos disminuyen significativamente cuando se retarda el tiempo de infección o se disminuye la multiplicidad de infección mas allá de determinados límites.

Por otro lado, además de la referida influencia, que se podría denominar poblacional, ya que determina la magnitud de las poblaciones de células infectadas y no infectadas inicialmente, la *moi*, cuando su valor es superior a 1, determina el número de genomas que ingresan en cada célula, hecho que podría influir sobre la productividad celular específica. Caron *et al.* (1990) publicaron uno de los primeros estudios sistemáticos acerca de la influencia de la *moi* en cultivos en suspensión. En cultivos infectados en la mitad de la fase de multiplicación exponencial, determinaron que cuando la *moi* variaba entre 1 y 10 unidades formadoras de placa (UFP)/célula (cel) no se observaban diferencias ni en la cinética de producción ni en el rendimiento de proteína recombinante, pero que infecciones a una *moi* inferior a 1, como era de esperar, se traducían en una demora en el pico de producción. Por otro lado, Licari y Bailey (1991), trabajando en cultivos en monocapa, determinaron que la formación de producto dependía fuertemente de la *moi* cuando los cultivos eran infectados durante la fase tardía de multiplicación exponencial. En cambio, para cultivos infectados durante la fase exponencial temprana, la producción no resultó dependiente de la *moi* cuando esta varió entre 0,1 y 10 UFP/cel, pero resultó más baja a *moi* mayores o menores. Más recientemente, Reuveny *et al.* (1993a) no encontraron diferencias en los rendimientos de proteína recombinante en cultivos infectados a distintas *moi* (entre 1 y 10 UFP/cel), y a distintos tiempos de infección, siempre que el medio de cultivo fuera renovado tras la infección. Por otro lado, Wickham *et al.* (1991) demostraron que a altas multiplicidades de infección puede producirse un efecto de inhibición sobre la producción de proteínas recombinantes, y que este efecto está ligado al predominio de partículas defectivas interferentes sobre las partículas virales completas.

4.2.2.3. Momento de cosecha

El momento óptimo para la cosecha de poliedros de baculovirus es dependiente de la selección de otros parámetros del proceso de infección, principalmente la *moi*. En cultivos infectados sincrónicamente (alta *moi*), el tiempo de cosecha está determinado sólo por la cinética de producción de poliedros. En cambio, cuando la multiplicidad de infección seleccionada es baja, el momento óptimo para la cosecha estará también influenciado por la cinética de síntesis y liberación de viriones, que llevan a cabo las rondas de infecciones secundarias. En sistemas de infección por baculovirus donde el producto es una proteína recombinante, la selección del momento de cosecha debe tomar en consideración, además, la actividad de proteasas que pueden degradar el producto y disminuir sus rendimientos (LICARI Y BAILEY, 1991; JÄGER *et al.*, 1992).

4.2.2.4. Estrategia de operación

La estrategia de operación más simple para la producción de baculovirus es la operación en lote, en la cual una línea celular se cultiva en un medio apropiado hasta una determinada densidad, posteriormente es infectada, se espera hasta obtener el máximo rendimiento de producto, y se cosecha. En el apartado anterior se ha analizado cómo los parámetros de infección determinan la cinética y los rendimientos en

procesos de producción de poliedros de baculovirus en cultivos celulares en lote. Con el objeto de optimizar rendimiento y productividad, se pueden implementar estrategias de operación que disminuyan el grado de dependencia respecto a dichos parámetros y permitan superar las limitaciones que ellos imponen.

Una de las limitaciones principales que presentan las operaciones en lote es la reducción de los rendimientos cuando las células son infectadas tardíamente durante el crecimiento del cultivo. Esta limitación, que impide acceder a mayores productividades volumétricas por infección de cultivos de alta densidad, puede, sin embargo, ser superada por recambio del medio de cultivo en el momento de la infección (Tom *et al.*, 1995). Esta operación, que es factible en pequeños frascos agitados, es problemática en cultivos a mediana o gran escala. En cambio, es posible superar dicha limitación mediante operaciones de perfusión, que producen una renovación continua del medio de cultivo mientras retienen la biomasa de células mediante filtración en el seno del reactor a través de membranas filtrantes (perfusión interna) (JÄGER *et al.*, 1992), o fuera de él (perfusión externa) por microfiltración tangencial (CARON *et al.*, 1994) o separación ultrasónica (ZHANG *et al.*, 1998). Estos sistemas permiten alcanzar densidades celulares muy elevadas, y obtener rendimientos volumétricos de producto superiores a los alcanzados en simples cultivos en lote, aunque raramente los rendimientos específicos pueden superar a los obtenidos en éstos últimos. Como ventaja adicional, estos sistemas pueden ser infectados a muy baja multiplicidad de infección, reduciendo la demanda de inóculo viral. Sin embargo, su aplicación a la producción de baculovirus para control de plagas agrícolas parece estar limitada por sus posibilidades de escalamiento y por la eficiencia de los sistemas filtración o separación. Por otro lado, la posibilidad de obtener altos rendimientos de poliedros o proteínas recombinantes mediante simple suplementación nutricional, como se verá a continuación, ha reducido las expectativas respecto a la utilización de esta estrategia.

La estrategia de lote alimentado, a través de la adición de soluciones concentradas de nutrientes en cultivos infectados a alta densidad, ha permitido obtener elevados rendimientos volumétricos de proteínas recombinantes (WANG *et al.*, 1993; NGUYEN *et al.*, 1993; REUVENY *et al.*, 1993a; ZHANG *et al.*, 1994; LEE Y PARK, 1995; TATICEK Y SHULER, 1997; BÉDARD *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 1997) y de poliedros virales (CLAUS *et al.*, 1997) equivalentes a los alcanzados en cultivos infectados a baja densidad celular. Este hecho, relevante en sí mismo por su simplicidad tecnológica, por otro lado hecha luz sobre la naturaleza de la limitación de la replicación viral en cultivos de alta densidad, la cual es predominantemente, aunque no exclusivamente, de índole nutricional (RADFORD *et al.*, 1996). Distintos tipos de nutrientes, o mezclas de ellos, han sido usados para alimentar los cultivos de alta densidad, incluyendo glucosa, glutamina, extracto de levaduras, soluciones concentradas de aminoácidos y mezclas lipídicas, pero hasta el presente no se ha podido establecer claramente cuál o cuáles son los nutrientes responsables de la limitación. Un procedimiento optimizado para la producción de proteínas recombinantes mediante cultivos en lote con suplementación en el sistema baculovirus-células de insecto ha sido propuesto por Chan *et al.* (1997).

La producción en cultivos continuos aparece como una opción teóricamente atractiva para reducir los costos de operación de los procesos fermentativos. En el caso de la producción de virus, y de baculovirus en particular, debido a la naturaleza lítica del proceso, la producción continua debe involucrar al menos dos reactores operando en cascada, el primero para la propagación celular y el segundo para la multiplicación viral. Kompier *et al.* (1988) ensayaron un diseño de producción de poliedros de AcMNPV en dos reactores operando en continuo, en el primero de los cuales se propagaba la línea celular IPLB-Sf21, que alimentaba al reactor de infección. El proceso operó durante aproximadamente 30 días, y luego se produjo una rápida caída en la productividad de cuerpos de inclusión y la aparición de anomalías morfológicas en los poliedros producidos. Como se describió más arriba, este efecto es la consecuencia de la generación y selección de partículas defectivas interferentes (efecto pasaje). Este efecto tampoco pudo ser obviado en procesos continuos operando con tres reactores en serie, los dos últimos para infección (VAN LIER *et al.*, 1990, 1992).

Una alternativa a la producción continua de baculovirus es la implementación de estrategias semicontinuas. Un proceso de este tipo fue desarrollado por Zhang *et al.* (1993) para la producción de una proteína recombinante en la línea celular Bm-5. En el mismo, que constaba de dos reactores en serie, el primero fue inicialmente inoculado con células y cosechado a una elevada densidad. El 90 % del cultivo fue transferido al segundo reactor, mientras el 10% restante quedó como inóculo para la producción de un nuevo lote de células. En el segundo reactor, las células transferidas fueron infectadas y el reactor operado con perfusión para mantener un nivel óptimo de nutrientes. Al final del período de producción, el segundo reactor fue cosechado, y vuelto a inocular con células para iniciar un nuevo lote de producción. De esta forma cada reactor opera en forma discontinua, mientras que el conjunto opera en forma continua, por lo menos mientras el sistema se mantenga estéril.

4.3. Escalamiento de procesos de producción de baculovirus en cultivos celulares

Si bien la producción en cultivos celulares ha sido recomendada como una alternativa de superación de los problemas inherentes a los procesos de producción *in vivo* de baculovirus para el control de plagas agrícolas, hasta el presente, y de acuerdo a la bibliografía disponible, no se han podido desarrollar procesos de producción *in vitro* a gran escala. A pesar de los importantes avances que se han producido en los últimos años, una serie de factores técnicos y económicos, pero también de índole básica, han confluído para que ese objetivo no se haya cumplido. A continuación se analizarán esos factores y se intentará esbozar cuales son los campos en que se deberá trabajar para que estos procesos resulten finalmente factibles.

4.3.1. Factores que condicionan el escalamiento

4.3.1.1. Líneas celulares

No existen líneas celulares establecidas específicamente, a partir de cada hues-

ped natural, para todos los baculovirus que presentan interés agronómico, y en caso que existan, pueden no presentar características relevantes para el desarrollo de procesos de producción de baculovirus. En este campo se requieren importantes esfuerzos tendientes a establecer nuevas líneas celulares que posean propiedades tecnológicas (adaptación a la suspensión, buena cinética de multiplicación, etc.) y permitan generar altas productividades virales.

4.3.1.2. Características metabólicas de las células de insecto

Si se compara el conocimiento acumulado sobre el comportamiento metabólico de las células de insecto y de mamíferos, y su influencia sobre el desarrollo de procesos productivos, se observa una considerable brecha. Más aún, la mayoría del conocimiento disponible ha sido obtenido sobre unas pocas líneas celulares, básicamente las de *S. frugiperda*. Será necesario, en el futuro próximo, obtener conocimientos más profundos acerca de las características particulares de los procesos metabólicos en distintas líneas de células de insecto, y su relación con los eventos de la replicación viral.

4.3.1.3. Medios de cultivo

La falta de medios de cultivo racionalmente desarrollados en función de los estrictos requerimientos celulares, consecuencia de lo expuesto en el apartado anterior, es uno de los problemas que tiene un mayor impacto económico. Los medios de cultivo actuales poseen una composición sobredimensionada respecto a algunos componentes, pero por otro lado no pueden satisfacer los requerimientos de producción a elevadas densidades celulares. Ha sido señalado que para que un proceso de producción de baculovirus en cultivos celulares para el control de plagas agrícolas sea factible económicamente, el costo del medio de cultivo no puede superar U\$S 1 / litro (GONG *et al.*, 1997) o U\$S 2,5 / litro (RHODES, 1996). Mientras no se posean los conocimientos básicos para el desarrollo de medios absolutamente definidos, el uso de suplementos no definidos de bajo costo para reemplazar el suero fetal bovino será la alternativa para alcanzar ese objetivo, aunque eso signifique seguir dependiendo de las variaciones inherentes a su composición indefinida. Por otro lado, los nuevos medios de cultivo deberán ser capaces de permitir la producción viral en condiciones de muy elevadas densidades celulares (superiores a 10^7 células/ml).

4.3.1.4. Sensibilidad mecánica y suministro de oxígeno

Es en este campo donde se han producido algunos de los avances más significativos en la biotecnología aplicada a la producción de baculovirus en cultivos celulares. El estudio de las interacciones entre burbujas y células en el seno de medios líquidos, y la introducción del "Pluronic F-68", entre otros compuestos, como agente de protección celular, han permitido que los cultivos de células de insecto puedan ser abastecidos de oxígeno mediante burbujeo. Este hecho, a su vez, ha abierto la puerta a la realización de cultivos en reactores a gran escala y a elevadas densidades celulares.

4.3.1.5. Reactores

Desde el punto de vista de la factibilidad económica, uno de los hechos más relevantes es la demostración que los fermentadores microbianos, con mínimas adaptaciones, pueden aplicarse a la producción a gran escala de baculovirus en cultivos celulares (AGATHOS, 1996). La utilización de reactores agitados y airlift para la producción de baculovirus a escala de decenas y centenas de litros, aún por debajo de la escala necesaria para que estos procesos resulten económicamente factibles (RHODES, 1996), demuestra que es posible acceder a tales escalas de producción. Por otro lado, la posibilidad de utilizar fermentadores de tipo estándar permitiría integrar estos procesos en plantas multipropósito, reduciendo el nivel de las inversiones en capital para equipamiento o utilizando instalaciones que se encuentran sub-utilizadas.

4.3.1.6. Biología de los baculovirus

La elucidación de algunos aspectos del ciclo de multiplicación de los baculovirus y su relación con los procesos que ocurren en las células infectadas podría tener un fuerte impacto sobre los rendimientos de baculovirus en cultivos celulares y el desarrollo de nuevos procesos de producción. A manera de ejemplo, el estudio de los factores que gobiernan la distribución de genomas entre ambos fenotipos virales, y la posibilidad de manipular dicha distribución para favorecer la producción de viriones libres o poliedros, podría dar origen a una nueva generación de procesos semicontinuos de mayor productividad. La productividad en el proceso de fermentación tiene un marcado efecto sobre la economía de producción, hecho que ha sido claramente expuesto en el modelo desarrollado por Rhodes (1996). De acuerdo al mismo, un proceso de producción de baculovirus en cultivos celulares sería rentable cuando los rendimientos de poliedros resultan superiores a $1,7 \times 10^8$ cuerpos de inclusión / ml.

4.3.1.7. Estrategias de operación

Ya se ha analizado el impacto que tiene la selección adecuada de la estrategia de infección y de operación de los cultivos infectados en términos de productividad. La posibilidad de alcanzar rendimientos volumétricos elevados mediante suplementación nutricional de cultivos de alta densidad, que además significa una enorme simplificación tecnológica, sólo ha demostrado ser útil en cultivos de células de ovarios de *S. frugiperda* (IPLB-Sf21 y Sf9), donde la acumulación de productos tóxicos conocidos del metabolismo celular es, a los efectos prácticos, nula. Otras líneas celulares actualmente utilizadas en procesos de producción no presentan el mismo comportamiento (RHIEL *et al.*, 1997), haciendo difícil la adopción de la misma estrategia para aumentar la productividad. En estos casos se deberán ensayar nuevas alternativas para alcanzar ese objetivo.

4.3.1.8. Modelos matemáticos

El desarrollo de modelos matemáticos es una herramienta de gran valor en el escalamiento de procesos biológicos, ya que al enfatizar los aspectos cuantitativos

de los mismos permiten la identificación de parámetros significativos y la predicción del comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones. Sólo un número limitado de modelos han sido elaborados para describir las interacciones entre baculovirus y células de insecto en cultivos infectados (POWER Y NIELSEN, 1996). de Gooijer *et al.* (1989, 1992) modelaron la producción en continuo de baculovirus silvestres en una cascada de reactores, pero este sistema fue limitado experimentalmente por el efecto pasaje, comentado más arriba. El modelo de Licari y Bailey (1992) fue desarrollado para optimizar la producción de una proteína recombinante en función de los parámetros de infección en cultivos estáticos en lote. Power *et al.* (1994) desarrollaron un modelo para optimizar el tiempo y la multiplicidad de infección en cultivos en lote para la producción de una proteína recombinante. El modelo de Yang *et al.* (1996), desarrollado para escalar racionalmente un proceso de producción de una proteína recombinante, está basado en la consideración del impacto del agotamiento de nutrientes sobre la productividad del sistema. Por último, Dee y Shuler (1997) desarrollaron un modelo que describe las etapas iniciales del proceso de infección. Se trata en todos los casos de modelos que toman en consideración aspectos parciales, si bien relevantes, de los procesos de infección y replicación. Entre aquellos aspectos que no han sido considerados en los modelos existentes, y cuya relevancia se magnifica en función de la escala de producción, la consideración de la influencia de la hidrodinámica del sistema y su relación con otros factores (cinética de adsorción viral, disponibilidad efectiva de nutrientes y oxígeno, estrés mecánico celular, etc.) aparece como una necesidad para escalar procesos de producción de baculovirus en distintos tipos de reactores. Por otro lado, en la medida que se disponga de un caudal de conocimientos importante sobre la evolución de los reservorios intracelulares de compuestos y estructuras relevantes para el proceso de replicación (nucleótidos, aminoácidos, DNA viral, RNA viral, proteínas virales, etc.) se podrá abordar la formulación de modelos estructurados, que hasta el presente solo han sido esbozados (SHULER *et al.*, 1990).

4.3.1.9. Modificaciones genéticas y formulación

En estos campos también se han verificado importantes contribuciones en los últimos años, las cuales son revisadas en otros capítulos. La generación de baculovirus más patogénicos, a través del aislamiento de cepas más virulentas o el desarrollo de recombinantes, podría tener un importante impacto sobre la reducción de las dosis a aplicar para obtener un determinado nivel de control, haciendo aceptables, desde un punto de vista económico, procesos de menor productividad o mayor costo. La optimización de las técnicas de formulación y aplicación podría resultar en un efecto similar. Por otro lado, como se discutió más arriba en este capítulo, la producción de baculovirus modificados genéticamente puede tornarse impracticable en larvas infectadas, dejando como única alternativa la producción *in vitro* en cultivos celulares.

4.3.2. Escalamiento de procesos de producción de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos

En la Tabla 2 se resumen algunos ejemplos de procesos de producción que han

Tabla 2. Escalamiento de procesos de producción de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos.

Línea celular	Medio de cultivo	Virus	Tipo de reactor	Atención	Escala	Estrategia de operación	Producto	Referencia
IP13-S22	TC-100 + 10% SFB	(Δ) AdNPV	células encapsuladas en alginate / polistireno	s. perficia	NI ^{III}	lote	AdNPV, ácidos	Kling <i>et al.</i> , 1988
IP13-S22	TN14-FH + 10% SFB	(Δ) AdNPV	células inmovilizadas sobre reservorio de alimentación del sistema de perfusión	libre de burbujas el reservorio de alimentación del sistema de perfusión	50 ml	perfundión	proteína recombinante	Kamper <i>et al.</i> , 1991
S9	TN14-FH + 10% SFB	(Δ) AdNPV	agitado (impulsor de celda helicoidal)	s. perficia	11 l	lote	proteína recombinante	Kamper <i>et al.</i> , 1991
S9	IP14-FH + 10% SFB	(Δ) AdNPV	agitado	b. bujeo y atención superficial	100	lote	proteína recombinante	Barkham <i>et al.</i> , 1992
IP13-S22	EX - CELL 400	(Δ) AdNPV	agitado	b. bujeo	150	lote	proteína recombinante	Gullerme <i>et al.</i> , 1992
NR	medio libre de suero no definido	AdNPV	agitado	b. bujeo	100	NR	poliédicos	Jam <i>et al.</i> , 1997
S9/BT-Tn5914	EX - CELL 400 y 405	(Δ) AdNPV	agitado	s. perficia	2 l	lote	VLPs ("virus like particles")	Jiang <i>et al.</i> , 1995
S9	EX-CELL	(Δ) AdNPV	agitado	b. bujeo	2 l	lote	VLPs ("virus like particles")	Cruz <i>et al.</i> , 1998
S9	FL-41 libre de SFB	(Δ) AdNPV	a. dif.	b. bujeo	21 l	lote	proteína recombinante	Matovala <i>et al.</i> , 1998
S9	S900	(Δ) AdNPV	a. dif.	b. bujeo	14 l	lote	proteína recombinante	Kling <i>et al.</i> , 1992
S9	EX - CELL 401	(Δ) AdNPV	a. dif.	b. bujeo	30 l	lote	proteína recombinante	S'ah <i>et al.</i> , 1992
S9	EX - CELL 401	AdNPV	a. dif.	b. bujeo	40 l	lote	poliédicos	Bellale <i>et al.</i> , 1992
IP13-LFTE (Lymantria dispar)	EX - CELL 401	LdNPV	a. dif.	b. bujeo	40 l	lote	poliédicos	Bellale <i>et al.</i> , 1992
S9	SF-1	(Δ) AdNPV	a. dif.	b. bujeo	50 l	lote	proteína recombinante	Schaeffer <i>et al.</i> , 1992
BT-Tn5914	EX - CELL 405	(Δ) AdNPV	agitado	microaeróbico	36 l	lote optimizado	proteína recombinante	Yang <i>et al.</i> , 1996
S9	EX - CELL 400	(Δ) AdNPV	agitado	b. bujeo	12 l	lote alimentario	proteína recombinante	Aguiar <i>et al.</i> , 1993
S9	S9001	(Δ) AdNPV	agitado	b. bujeo	2 l	lote alimentario	proteína recombinante	Rachford <i>et al.</i> , 1996
S9	S9001	(Δ) AdNPV	agitado	s. perficia	11	lote con recambio de medio	proteína recombinante	Tom <i>et al.</i> , 1995

Tabla 2. Continuación Escalamiento de procesos de producción de baculovirus y proteínas recombinantes en cultivos de células de insectos.

Línea celular	Medio de cultivo	Virus	Tipo de reactor	Alreación	Escala	Estrategia de operación	Producto	Referencia
Sf9	ISCF-M3 libre de suero	(r) AcMNPV	agitado	botellado	5 l	lotó alimentado y escalado proteína recombinante de medio		Reuseny et al., 1993a
IPB-Sf21	EX - CELL 401	(r) AcMNPV	agitado	litro de burbujas a través de membrana semi-permeable	5 l	lotó con perfusión interna	proteína recombinante	Jäger et al., 1992
Sf9	EX - CELL 401 + 1% SFE	(r) AcMNPV	agitado	NR	2 l	lotó con perfusión externa	proteína recombinante	Zhang et al., 1998
Bm-5 (<i>Bombix mori</i>)	IPL-41 + 10% SFE	(r) EmNPV	agitado	litro de burbujas	1,5 l	semicontinuo con cascada de 2 reactores y recambio de medio de cultivo	proteína recombinante	Zhang et al., 1993
IPB-Sf21	TNW-FH + 1% SFE	AcMNPV	agitado	superficial	1 l	continuo (cascata de 2 reactores)	polioctos	Komper et al., 1995

*(ts): termosensible

***(r): recombinante

***NI: no informado

sido escalados, a diferentes niveles, en los últimos años. Aparecen allí distintos tipos de procesos, difiriendo entre sí en las líneas celulares, los medios de cultivo, los virus utilizados, los reactores, las formas de aireación, las estrategias de operación y el tipo de producto. Del análisis de dicha tabla se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- a) Las líneas celulares establecidas a partir de ovarios de *S. frugiperda* han sido, por mucho, las más utilizadas en procesos a gran escala, y sólo existe una limitada experiencia en la utilización de otras pocas líneas celulares.
- a) La tendencia respecto a los medios de cultivo es la utilización de medios libres de suero fetal bovino, algunos desarrollados en las propias unidades de producción.
- b) La mayoría de los procesos listados se llevaron a cabo en reactores preexistentes, adaptados a las necesidades de los sistemas de cultivo de células frágiles, tanto reactores agitados como airlift.
- c) La oxigenación de los cultivos a través del burbujeo es una metodología ampliamente probada y exitosa.
- d) Los procesos de producción a mayor escala desarrollaron una estrategia de operación en lote, pero en los de mediana escala se utiliza ya frecuentemente la operación en lote alimentado.
- e) La mayoría de los procesos listados tienen como objetivo la producción de proteínas recombinantes, incluyendo la producción de VLPs ("virus like particles") (CRUZ *et al.*, 1998; JIANG *et al.*, 1998). Es claro que el mayor impulso de desarrollo sobre el sistema baculovirus-células de insecto proviene de las industrias interesadas en la producción de ese tipo de proteínas, pero es probable que ese impulso se traslade a la producción de baculovirus, silvestres y recombinantes, para control de plagas agrícolas y forestales.

5. Conclusiones

En las secciones precedentes se han revisado los avances producidos en el desarrollo de procesos para la producción de baculovirus como agentes de control de plagas agrícolas, y se han esbozado, además aquellos campos donde deberán producirse nuevos aportes en el camino de tornar a estos procesos más eficientes y competitivos.

Los procesos de producción de baculovirus *in vivo* aparecen como tecnologías bien establecidas, generando productos que son aplicados para el control de numerosas plagas agrícolas y forestales (MOSCARDI, 1999). Sin embargo, estas tecnologías parecen estar limitadas en cuanto a sus posibilidades de escalamiento, y pueden encontrar dificultades para adecuarse a la producción de una nueva generación de baculovirus mejorados genéticamente.

Por otro lado, todavía no existen procesos de producción de baculovirus en cultivos celulares que hayan arribado a la fase de colocación de productos a disposición de los granjeros y agricultores. En contrapartida, los importantes avances rea-

lizados en los últimos años en las tecnologías de cultivo de células de insecto y en la propagación de baculovirus, impulsados por los desarrollos surgidos de la utilización de estos virus como vectores para la expresión de proteínas recombinantes, han generado un campo de investigación y desarrollo enormemente dinámico. Aunque, como se analizó previamente, aún subsisten cuestiones a resolver, numerosos obstáculos tecnológicos han sido ya superados, y con ello ha aumentado también la factibilidad económica de estos procesos, cuyas posibilidades parecen crecer con la escala de producción.

En síntesis, en la medida que los desarrollos en las tecnologías de producción en cultivos de células de insectos finalmente lleven a la concreción de procesos competitivos, como parece ser previsible, es probable que en el futuro ambas metodologías coexistan, y se complementen, aplicadas a la generación de diferentes productos, a distintas escalas, o bajo diferentes contextos socio-económicos que tornen más factible la utilización de alguna de ellas.

6. Bibliografía

- AGATHOS, S.N. 1996. *Insect cell bioreactors*. Cytotechnol. **20**:173-189.
- ANKERSMITH, G.W. 1985. Adoxophyes orana, p. 165-175. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), Handbook of insect rearing Vol.II. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- BATHIA, R., G. JESIONOWSKI, J. FERRANCE Y M.M. ATAAL. 1996. *Insect cell physiology*. Cytotechnol. **20**:33-41.
- BARKHEM, T., B. CARLSSON, A. DANIELSSON, U. NORINDER, H. FRIEBERG Y L. ÖHMAN. 1992. Production in a 100 liter stirred tank reactor of functional full length human thyroid receptor β_1 in Sf9 insect cells using a recombinant baculovirus, p. 235-246. En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- BARNES, D. Y G. SATO. 1980. Serum-free cell culture: an unifying approach. Cell **22**:649-655.
- BAVARIAN, F., L.S. FAN Y J.J. CHALMERS. 1991. Microscopic visualization of insect cell-bubble interactions. I: rising bubbles, air-medium interface, and the foam layer. Biotechnol. Prog. **7**:140-150.
- BECKER, J. Y J.C. LANDUREAU. 1981. Specific vitamin requirements of insect cell line (*P. Americana*) according to their tissue origin and in vitro conditions. In Vitro **17**:471-476.
- BÉDARD, C., R. TOM Y A.A. KAMEN. 1993. Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: Insights into growth limitation and metabolism. Biotechnol. Prog. **9**:615-624.
- BÉDARD, C., S. PERRET Y A.A. KAMEN. 1997. Fed-batch culture of Sf-9 cells supports 3×10^7 cells per ml and improves baculovirus-expressed recombinant protein yields. Biotechnol. Lett. **19**:629-632.
- BELISLE, B.W., C. CELERI, K. TANG, T. MONTGOMERY Y T. GONG. 1992. From shake flask to large scale: cell and virus production in serum-free media, p. 226-233.

- En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- BNZ, G.A. 1986. *Introduction: historical perspectives*, p. 1-36. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- BERRETTA, M., M.L. RIOS Y A. SCIOCCO DE CAP. 1998. *Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of Spodoptera frugiperda from Argentina*. J. Invertebr. Pathol. **71**:280-282
- BLACK, B.C., L.A. BRENNAN, P.M. DIERKS E I.E. GARD. 1997. *Commercialization of Baculoviral Insecticides*, p. 341-397. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York y London.
- BLANCHARD, J.H. Y C.H.R. FERGUSON. 1992. *Effect of different levels of dissolved oxygen on recombinant protein production in Sf9 cells*, p. 247-254. En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- BLENK, R.G., R.J. GOUGER, T.S. GALLO, L.K. JORDAN Y E. HOWELL. 1985. *Agrotis ipsilon*, p. 177-187. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), *Handbook of insect rearing Vol.II*. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- BROUSSARD, D.R. Y M.D. SUMMERS. 1989. *Effects of serum concentration and media composition on the level of polyhedrin and foreign gene expression by baculovirus vectors*. J. Invertebr. Pathol. **54**:144-150.
- BULL, D.I. 1978. *Formulation of microbial insecticides: microencapsulation and adjuvants*. Mic. Publ. Entomol. Soc. Am. **10**:11-20.
- CARON, A.W., J. ARCHAMBAULT Y B. MASSIE. 1990. *High level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system*. Biotechnol. Bioengn. **36**:1133-1140.
- CARON, A.W., R.L. TOM, A.A. KAMEN Y B. MASSIE. 1994. *Baculovirus expression system scaleup by perfusion of high-density Sf-9 cell cultures*. Biotechnol. Bioengn. **43**:881-891.
- CASTRO, M.E., M.L. SOUZA, S. ARAUJO Y S.L. BILIMORIA. 1997. *Replication of Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines*. J. Invertebr Pathol. **69**:40-45
- CHAI, H., M. AL-RUBEAI, K.L. CHUA Y M.G.S. YAP. 1996. *Insect cell line dependent gene expression of recombinant human tumor necrosis factor- β* . Enzyme Microb. Technol. **18**:126-132.
- CHAKRABORTY, S., C. MONSOUR, R. TEAKLE Y S. REID. 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.
- CHAKRABORTY, S. Y S. REID. 1999. *Serial passage of a Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus in Helicoverpa zea cultures*. J. Invertebr. Pathol. **73**:303-308.
- CHALMERS, J.J. 1996. *Shear sensitivity of insect cells*. Cytotechnol. **20**:163-171.
- CHAN, L.C.L., P.F. GREENFIELD Y S. REID. 1997. *Optimising fed-batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system*. Biotechnol. Bioengn. **59**:178-188.

- CHUNG, I.S. Y M.L. SHULER. 1993. *Effect of Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 cell density on human secreted alkaline phosphatase production*. Biotechnol. Lett. **15**:1007-1012.
- CHUNG, I.S., R.A. TATICEK Y M.L. SHULER. 1993. *Production of human alkaline phosphatase, a secreted, glycosylated protein, from a baculovirus expression system and the attachment-dependent cell line Trichoplusia ni BTI-TN-5B1-4 using a split-flow, airlift bioreactor*. Biotechnol. Prog. **9**:675-678.
- CLAUS, J.D., G.E. REMONDETTO, S.A. GUERRERO, A.M. DEMONTE, M. MURGUÍA Y A.J. MARCIPAR. 1993. *Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures*. J. Biotechnol. **31**:1-15.
- CLAUS, J.D., P.D. GHIRINGHELLI Y V. ROMANOWSKI. 1997. *Environmental dependence of polyhedra yields in IPLB-Sf-21 cells infected with Anticarsia gemmatilis multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus*, p. 165-171. En: K. Maramorosch y J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A.
- COWGER, N.L., K.C. O'CONNOR, T.G. HAMMOND, D.J. LACKS Y G.L. NAVAR. 1999. *Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flasks*. Biotechnol. Bioengn. **64**:14-26.
- CROOK, N.E., R.A. SPENCER, C.C. PAYNE Y D.J. LEISY. 1985. *Variation in Cydia pomonella granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants*. J. Gen. Virol. **66**:2423-2430.
- CRUZ, P.E., A. CUNHA, C.C. PEIXOTO, J. CLEMENTE, J.L. MOREIRA Y M.J.T. CARRONDO. 1998. *Optimization of the production of virus-like particles in insect cells*. Biotechnol. Bioengn. **60**:408-418.
- DAVIS, T.R., T.J. WICKHAM, K.A. MCKENNA, R.R. GRANADOS, M.L. SHULER Y H.A. WOOD. 1993. *Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines*. In Vitro Cell. Dev. Biol. **29 A**:388-390.
- DE GOOIJER, C.D., F.L.J. VAN LIER, E.J. VAN DEN END, J.M. VLAK Y J. TRAMPER. 1989. *A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures*. Appl. Microb. Biotechnol. **30**:497-501.
- DE GOOIJER, C.D., R.H.M. KOKEN, F.L.J. VAN LIER, M. KOOL, J.M. VLAK Y J. TRAMPER. 1992. *A structured dynamic model for the baculovirus infection process in insect-cell reactor configurations*. Biotechnol. Bioengn. **40**:537-548.
- DEE, K.U. Y M.L. SHULER. 1997. *A mathematical model of the trafficking of acid-dependent enveloped viruses: application to the binding, uptake, and nuclear accumulation of baculovirus*. Biotechnol. Bioengn. **54**:468-490.
- DEUTSCHMANN, S.M. Y V. JÄGER. 1994. *Optimization of the growth conditions of sf21 insect cells for high-density perfusion culture in stirred-tank bioreactors*. Enzyme Microb. Technol. **16**:506-512.
- DOUGHERTY, E M., K.P. GUTHRIE Y M. SHAPIRO. 1996. *Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection*. Biol. Control **7**:71-74.
- EBERHARDT, U. Y K. SCHUGERL. 1987. *Investigations of reactors for insect cell culture*. Develop. Biol. Standard. **66**:325-330.
- ENTWISTLE, P.F. Y H.F. EVANS. 1985. *Viral control*, p. 347-412. En: G.A. Kerkut y L.I.

- Gilbert (ed.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 12, Pergamon Press, Oxford, Gran Bretaña.
- ESCRIBANO, A., T. WILLIAMS, D. GOULDSON, R.D. CAVE, J.W. CHAPMAN Y P. CABALLERO. 1999. *Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas*. J. Econ. Entomol. **92**:1079-1085
- FEDERICI, B.A. 1993. *Viral pathobiology in relation to insect control*, p. 81-101. En: N. Beckage, B. Federici y N. Thompson (ed.), *Parasites and Pathogens of Insects*, Vol.2. Academic Press. U.S.A.
- FEDERICI, B.A. 1998. *Naturally Occuring Baculoviruses for Insect Pest Control*, p. 301-320. En F.R. Hall y J.J. Menn (ed.), *Biopesticides: Use and Delivery*, Humana Press, New Jersey, U.S.A.
- FERRANCE, J.P., A. GOEL Y M.M. ATAAL. 1993. *Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development*. Biotechnol. Bioeng. **42**:615-624.
- FRASER, M.J. 1987. *FP mutation of nuclear polyhedrosis viruses: a novel system for the study of transposon-mediated mutagenesis*, p. 265-293. En: K. Maramorosch (ed.), *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*, Academic Press, New York, U.S.A.
- GARDINER, B.O.C. 1985. *Mamestra brassicae*, p. 381-385. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), *Handbook of insect rearing Vol.II*. Elsevier, N.Y. U.S.A.
- GARDINER, R.G. Y H. STOCKDALE. 1975. *Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol., **25**:363-370.
- GLEN, D. M. Y C.C. PAYNE. 1984. *Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of Cydia pomonella in the United Kingdom*. Ann. Appl. Biol. **104**:87-98.
- GONG, T., K.J. JFM, J.S. MANNING, R. GEORGIS Y T. MONTGOMERY. 1997. *In vitro production of Anagrapha falcifera multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in two insect cell lines*, p. 149-155. En: K. Maramorosch y J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A.
- GOODWIN, R.H. 1989. *Construction of peptoliposomes for the incorporation of nutrient lipid supplements in insect cell culture media*. J. Tissue Culture Meth. **12**:17-20.
- GOOSEN, M.F.S. 1993. *Insect cell immobilization*, p. 69-104. En: M. F. A. Goosen, A. J. Daugulis y P. Faulkner (ed.), *Insect Cell Culture Engineering*, Marcel Dekker, New York, U.S.A.
- GRACE, T.D.C. 1962. *Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro*. Nature **195**:788-789.
- GREEN, G.L., LEPLA, N.C. Y W.A. DICKERSON. 1976. *Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium*. J. Econ. Entomol. **69**:487-488.
- GUILLAUME, J.M., H.M. SORIA, N. COUTEAULT, D.R. HURWITZ, M.C. MULTON Y A. CRESPO. 1992. *Insect cell fermentation scale-up for recombinant protein production*, p. 255-261. En J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.

- HANDA-CORRIGAN, A., A.N. EMERY Y R.E. SPIER. 1989. *Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanism of cell damage by bubbles*. Enzyme Microb. Technol. **11**:230-235.
- HARA, T., K. NONAKA, H. KAWAGUCHI, S. OGATA Y N. ETOU. 1993. *Effects of temperature on Escherichia coli beta-galactosidase expression in baculovirus-insect cell system*. Biosci. Biotech. Biochem. **57**:996-997.
- HARA, K., M. FUNASHOKI, K. TSUDA Y T. KAWARABATA. 1994. *Susceptibility of lepidopteran cell lines to a Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus*. Appl. Entomol. Zool. **29**:395-402.
- HARVEY, J.P. Y L.E. VOLKMAN. 1983. *Biochemical and biological variation of Cydia pomonella (codling moth) granulosis virus*. Virology **124**:21-34.
- HENSLEY, W.T. Y S.N. AGATHOS. 1994. *Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells*. Cytotechnol. **15**:177-186.
- HENSLEY, S.D. Y A.M. HAMMOND. 1968. *Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet*. J. Econ. Entomol. **61**:1742-1743.
- HILD, H.M., A.N. EMERY Y M. AL-RUBEAI. 1992. *The effect of pH, temperature, serum concentration and media composition on the growth of insect cells*, p. 316-321. En J. M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- HINK, W. F. (1970) *Established insect cell line from the cabbage looper, Trichoplusia ni*. Nature **226**:466-467.
- HINK, W.F. Y E.M. STRAUSS. 1980. *Semi-continuous culture of the Tn-368 cell line in fermentors with virus production in harvested cells*, p. 27-33. En E. Kurstak, K. Maramorosch y A. Dübendorfer (ed.), *Invertebrate Systems In Vitro*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holanda.
- HINK W.F. Y R.L. HALL. 1989. *Recently established cell lines*, p. 269-296. En J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell System Applications*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- HINK, W.F. 1991. *A serum-free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins*. In Vitro **27 A**:397-401.
- HINK, W.F., D.R. THOMSEN, D.J. DAVIDSON, A.L. MEYER Y F.J. CASTELLINO. 1991. *Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines*. Biotechnol. Prog. **7**:9-14.
- HUGHES, D., R.D. POSSEE Y L.A. KING. 1993. *Activation and detection of a latent baculovirus resembling Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus in Mamestra brassicae insects*. Virology **194**:608-615.
- Hughes, P.R. 1994. *High density rearing system for larvae*. U.S. Pat. 5,351,643.
- HUGHES, P.R., R.R. GETTING Y W.J. MCCARTHY. 1983. *Comparison of the time-mortality response of Heliothis zea to 14 isolates of Heliothis nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **41**:256-261.
- HUNTER-FUJITA, F.R., P.F. ENTWISTLE, H.F. EVANS Y N.E. CROOK. 1998. *Insect Viruses and Pest Control*. John Wiley & Sons, Chichester, Gran Bretaña.
- IGNOFFO, C.M. Y O.F. BATZER. 1971. *Microencapsulation and ultraviolet protectants*

- to increase sunlight stability of an insect virus. *J. Econ. Entomol.* **64**:850-853.
- IGNOFFO, C.M., B.S. SHASHA Y M. SHAPIRO. 1991. *Sunlight ultraviolet protection of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus through starch-encapsulation technology*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**:134-136.
- JÄGER, V., E. GRABENHORST, A. KOBOLD, S.M. DEUTSCHMANN Y H.S. CONRADT. 1992. *High density perfusion culture of insect cells for the production of recombinant proteins*, p. 274-284. *En*: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- JAIN, D., K. RAMASUBRAMANYAN, S. GOULD, A. LENNY, M. CANDELORE, M. TOTA, C. STRADER, K. ALVES, G. CUCA, J.S. TUNG, G. HUNT, B. JUNKER, B.C. BUCKLAND Y M. SILBERKLANG. 1991. *Large-scale recombinant protein production using the insect cell-baculovirus expression vector system: Antistatin and beta-adrenergic receptor*, p. 345-351. *En* R. E. Spier, J. B. Griffiths y B. Maignier (ed.), *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*, Butterworth-Heinemann, Oxford, Inglaterra.
- JAQUES, R.P. 1977. *Stability of entomopathogenic viruses*. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* **10**:99-114.
- JEM, K.J., T. GONG, J. MULLEN Y R. GEORGIS. 1997. *Development of an industrial insect cell culture process for large scale production of baculovirus biopesticides*, p. 173-180. *En*: K. Maramorosch y J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A.
- JIANG, B., V. BARNIAK, R.P. SMITH, R. SHARMA, B. CORSARO, B. HU Y H.P. MADORE. 1998. *Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis*. *Biotechnol. Bioeng.* **60**:369-374.
- KAMEN, A.A., R.L. TOM, A.W. CARON, C. CHAVARIE, B. MASSIE Y J. ARCHAMBAULT. 1991. *Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor*. *Biotechnol. Bioengn.* **38**:619-628.
- KAMEN, A.A., C. BÉDARD, R. TOM, S. PERRET Y B. JARDIN. 1996. *On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus-infected and uninfected insect cell bioreactor cultures*. *Biotechnol. Bioengn.* **50**:36-48.
- KELLY, P.M. Y P.F. ENTWISTLE. 1988. *In vivo mass production in the cabbage moth (Mamestra brassicae) of a heterologous (Panolis) and homologous (Mamestra) nuclear polyhedrosis virus*. *J. Virol. Methods* **19**:249-256.
- KING, G.A., A.J. DAUGULIS, P. FAULKNER, D. BAYLY Y M.F.A. GOOSEN. 1988. *Growth of baculovirus-infected insect cells in microcapsules to a high cell and virus density*. *Biotechnol. Lett.* **10**:683-688.
- KING, G.A., A.J. DAUGULIS, P. FAULKNER Y M.F.A. GOOSEN. 1992. *Recombinant-galactosidase production in serum-free medium by insect cells in a 14-L airlift bioreactor*. *Biotechnol. Prog.* **8**:567-571.
- KING, L.A., S.G. MANN, A.M. LAWRIE Y S.H. MULSHAW. 1991. *Replication of wild-type and recombinant Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in a cell line derived from Mamestra brassicae*. *Virus Research* **19**:93-104.

- KIOUKIA, N., A.W. NIENOW, A.N. EMERY Y M. AL-RUBEAI. 1995. *Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus*. J. Biotechnol. **38**:243-251.
- KLÖPPINGER, M., G. FERTIG, E. FRAUNE Y H.G. MILTENBURGER. 1990. *Multistage production of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures*. Cytotechnol. **4**:271-278.
- KOMPIER, R., J. TRAMPER Y J.M. VLAK. 1988. *A continuous process for the production of baculovirus using insect-cell cultures*. Biotechnol. Lett. **10**:849-854.
- KOMPIER, R., N. KISLEV, I. SEGAL Y A. KADOURI. 1991. *Use of a stationary bed reactor and serum-free medium for the production of recombinant proteins in insect cells*. Enzyme Microb. Technol. **13**:822-827.
- KOOL, M., J.W. VONCKEN, F.L.J. VAN LIER, J. TRAMPER Y J.M. VLAK. 1991. *Detection and analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties*. Virology **183**:739-746.
- KURTII, T.J., S.P.S. CHAUDHARY Y M.A. BROOKS. 1974. *Influence of physical factors on the growth of insect cells in vitro I. Effect of osmotic pressure on growth rate of a moth cell line*. In Vitro Cell. Devel. Biol. **10**:149-156.
- KURTII, T.J., S.P.S. CHAUDHARY Y M.A. BROOKS. 1975. *Influence of physical factors on the growth of insect cells in vitro II. Sodium and potassium as osmotic pressure regulators of moth cell growth*. In Vitro Cell. Devel. Biol. **11**:274-285.
- KURTII, T.J. Y U.G. MUNDERLOH. 1984. *Mosquito cell culture*. Adv. Cell Cult. **3**:259-302.
- LEE, H.Y. Y P. KRELL. 1992. *Generation and analysis of defective genomes of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **66**:4339-4347.
- LEE, S.H. Y T.H. PARK. 1994. *Growth limiting factors influencing high density culture of insect cells in Grace's medium*. Biotechnol. Lett. **16**:327-332.
- LEE, S.H. Y T.H. PARK. 1995. *Two-phase cultivation of insect cells for production of recombinant proteins*. Biotechnol. Tech. **9**:719-724.
- LENZ, C.J., A.H. MCINTOSH, C. MAZZACANO Y U. MONDERLOH. 1991. *Replication of Heliothis zea nuclear polyhedrosis virus in cloned cell lines*. J. Invertebr. Pathol. **57**:227-233.
- LICARI, P. Y J.E. BAILEY. 1991. *Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: Multiplicity of infection and intracellular protein degradation*. Biotechnol. Bioengn. **37**:238-246.
- LICARI, P. Y J.E. BAILEY. 1992. *Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: optimizing infection strategies for enhanced recombinant proteins yields*. Biotechnol. Bioengn. **39**:432-441.
- LINDSAY, D.A. Y M.J. BETENBAUGH. 1992. *Quantification of cell culture factors affecting recombinant protein yields in baculovirus-infected insect cells*. Biotechnol. Bioengn. **39**:614-618.
- MAIORELLA, B., D. INLOW, A. SHAUGER Y D. HARANO. 1988. *Large-scale insect cell culture for recombinant protein production*. Bio/Technology **6**:1406-1410.
- MALINOWSKI, J.J. Y A. DAUGULIS. 1993. *Bioreactor design for insect cell cultivation: a review*, p. 51-68. En: M.F.A. Goosen, A.J. Daugulis y P. Faulkner (ed.), Insect Cell Culture Engineering, Marcel Dekker, New York, U.S.A.

- MARAMOROSCH, K. 1991. *Founders Lecture*. Thomas D.C. Grace-Insect Tissue Culture Pioneer. J. Invertebr. Pathol. **58**:151-156.
- MARTIGNONI, M.E. 1978. *Virus in biological control: production, activity and safety*, p. 140-147. En: M.J. Brooks, R.W. Stark and R. Campbell (ed.), *The Douglas-fir Tussock Moth: a Synthesis*. U.S.D.A.
- MARTIGNONI, M.E. 1999. *History of TM BioControl-1: the first registered virus-based product for control of a forest insect*. Am. Entomol. **45**:30-37.
- McKENNA, K.A., M.L. SHULER Y R.R. GRANADOS. 1997. *Increased virus production in suspension culture by a Trichoplusia ni cell line in serum-free media*. Biotechnol. Prog. **13**:805-809.
- MILLER, D.W. Y L.K. MILLER. 1982. *A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element*. Nature **299**:562-564.
- MILTENBURGER, H.G. Y P. DAVID. 1980. *Mass production of insect cells in suspension*. Develop. Biol. Standard. **46**:183-186.
- MITSUHASHI, J. 1989. *Nutritional requirements of insect cells in vitro*, p. 3-20. En: J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell System Applications*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- MITSUHASHI, J. Y R.H. GOODWIN. 1989. *Serum-free culture of insect cells in vitro*, p. 31-44. En: J. Mitsuhashi (ed.), *Invertebrate Cell System Applications*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera*. Annu. Rev. Entomol. **44**:257-289.
- MURHAMMER, D.W. 1991. *The use of insect cell cultures for recombinant protein synthesis: engineering aspects*. Appl. Biochem. Biotechnol. **31**:283-310.
- MURHAMMER, D.W. Y C.F. GOOCHE. 1988. *Scale-up of insect cell cultures: protective effects of Pluronic F-68*. Bio/Technology **6**:1411-1418.
- MURHAMMER, D.W. Y C.F. GOOCHE. 1990. *Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection*. Biotechnol. Prog. **6**:391-397.
- NEEMANN, J. Y R. WAGNER. 1996. *Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells*. J. Cell. Physiol. **166**:152-169.
- NGUYEN, B., K. JARNAGIN, S. WILLIAMS, H. CHAN Y J. BARNETT. 1993. *Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system*. J. Biotechnol. **31**:205-217.
- ODELL, T.M., C.A. BUTT Y A.W. BRIDGEFORTH. 1985. *Lymantria dispar*, p. 355-367. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), *Handbook of insect rearing Vol.II*. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- OII, S.K.W., A.W. NIENOW, M. AL-RUBEAI Y A.N. EMERY. 1992. *Further studies on the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging*. J. Biotechnol. **22**:245-270.
- ÖHMAN, L., J. LJUNGGREN Y L. HÄGGSTROM. 1995. *Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate limited fed batch cultures*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**:1006-1013.

- ÖHMAN, L., M. ALARCÓN, J. LJUNGGREN, A.K. RAMQVIST Y L. HÄGGSTROM. 1996. *Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells*. Biotechnol. Lett. **18**:765-770.
- PASUMARTHY, M.K. Y D.W. MURHAMMER. 1994. *Clonal variation in the Spodoptera frugiperda IPLB-Sf21-AE insect cell population*. Biotechnol. Prog. **10**:314-319.
- PATANA, R. 1985a. *Heliothis zea/Heliothis virescens*, p. 329-334. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), Handbook of insect rearing Vol.II. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- PATANA, R. 1985b. *Spodoptera exigua*, p. 465-468. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), Handbook of insect rearing Vol.II. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- PAYNE, C.C. 1981. *The susceptibility of the pea moth, Cydia nigricana, to infection by the granulosis virus of the codling moth Cydia pomonella*. J. Invertebr. Pathol. **37**:71-77.
- POITOUT, S. Y R. BUES. 1974. *Elevage des chenilles de vingthuit especes de lepidopteres Noctuidae et des deux especes d'Arctiidae sur milieu artificiel simple*. Ann. Zool. Ecol. Anim. **6**:431-441.
- POTTER, K.N., P. FAULKNER Y E.A. MACKINNON. 1976. *Strain selection during serial passage of Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **18**:1040-1050.
- POWER, J.F., S. REID, K.M. RADFORD, P.F. GREENFIELD Y L.K. NIELSEN. 1994. *Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture*. Biotechnol. Bioengn. **44**:710-719.
- POWER, J.F. Y L.K. NIELSEN. 1996. *Modelling baculovirus infection of insect cells in culture*. Cytotechnol. **20**:209-219.
- RADFORD, K.M., S. REI Y P.F. GREENFIELD. 1992. *Improved production of recombinant proteins by the baculovirus expression system using nutrient enriched serum free media*, p. 297-303. En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- RADFORD, K.M., S. REID Y P.F. GREENFIELD. 1996. *Substrate limitation in the baculovirus expression vector system*. Biotechnol. Bioengn. **56**:32-44.
- RAGHUNAND, N. Y B.E. DALE. 1999. *Alteration of glucose consumption kinetics with progression of baculovirus infection in Spodoptera frugiperda cells*. Appl. Biochem. Biotechnol. **80**:231-242.
- REUVENY, S., C.W. KEMP, L. EPPSTEIN Y J. SHILOACH. 1992. *Carbohydrate metabolism in insect cultures during cell growth and recombinant protein production*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **655**:230-237.
- REUVENY, S., J. KIM, C.W. KEMP Y J. SHILOACH. 1993a. *Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures*. Biotechnol. Bioengn. **42**:235-239.
- REUVENY, S., J. KIM, C.W. KEMP Y J. SHILOACH. 1993b. *Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:619-623.
- RHIEL, M., C.M. MITCHELL-LOGEAN Y D.W. MURHAMMER. 1997. *Comparison of Trichoplusia ni BTI-Tn-5B1-4 (High FiveTM) and Spodoptera frugiperda Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures*. Biotechnol. Bioengn., **55**:909-920.

- RHODES, D.J. 1996. *Economics of baculovirus-insect cell production system*. Cytotechnol. **20**:291-297.
- ROBERTSON, J.L. 1985. *Choristoneura occidentalis* and *Choristoneura fumiferana*, p. 227-236. En: P. Singh y R.F. Moore (ed.), *Handbook of insect rearing Vol.II*. Elsevier, N.Y., U.S.A.
- RÖDER, A. 1982. *Development of a serum-free medium for cultivation of insect cells*. Naturwissenschaften **69**:92-93.
- SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Y E. VARGAS OSUNA. 1986. *Differential mortality between male and female Spodoptera littoralis larvae infected with baculovirus*. J. Invertebr. Pathol. **47**:374-376.
- SCHLAEGER, E.J. 1996. *Medium design for insect cell culture*. Cytotechnol. **20**:57-70.
- SCHLAEGER, E.J., H. LOETSCHER Y R. GENTZ. 1992. *Fermentation scale-up: production of soluble human TNF receptors*, p. 201-208. En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- SCHOPF, B., M.W. HOWALDT Y J.E. BAILEY. 1990. *DNA distribution and respiratory activity of Spodoptera frugiperda populations infected with wild-type and recombinant Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Biotechnol. **15**:169-186.
- SCOTT, R.I., J.H. BLANCHARD Y C.H.R. FERGUSON. 1992. *Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of Spodoptera frugiperda (Sf-9) insect cells*. Enzyme Microb. Technol. **14**:798-804.
- SHAH, G., B. CROSSET Y R.S. HALE. 1992. *Growth and infection of Sf9 cells for production of EGFR-TK at 30L scale*, p. 216-225. En: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. Editiones Roche, Basel, Suiza.
- SHAPIRO, D.L., J.R. FUXA, H.D. BRAYNE Y D.P. PASHLEY. 1991. *DNA restriction polymorphism in wild isolates of Spodoptera frugiperda nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **58**:96-105.
- SHAPIRO, M. 1982. *In vivo mass production of insect viruses*, p. 463-492. En: E. Kurstak (ed.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, N.Y., U.S.A.
- SHAPIRO, M. 1986. *In vivo Production of Baculoviruses*, p. 31-62. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The Biology of Baculoviruses*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- SHAPIRO, M. 1992. *Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus*. J. Econ. Entomol. **85**:1682-1686.
- SHAPIRO, M. Y R. ARGAUER. 1997. *Components of the stilbene optical brightener Tinopal LPW as enhancers for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus*. J. Econ. Entomol. **90**:899-904.
- SHAPIRO, M., R. A. BELL Y C. D. OWENS. 1981. *In vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus*, p. 633-655. En: C.C. Doane y M.L. McManus (ed), *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*, USDA Forest Service, Washington D.C., U.S.A.

- SHERMAN, K. E. 1985. *Considerations in the large scale and comercial production of viral insecticides*, p. 757-774. En: K. Maramorosh y K.E. Sherman (ed), *Viral insecticides for biological control*, Academic Press, U.S.A.
- SHIEH, T.R. 1989. *Industrial production of viral pesticides*. *Advances in Virus Research* **36**:315-343.
- SHOREY, H. H. Y R. L. HALE. 1965. *Mass rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium*. *J. Econ. Entomol.* **58**:522-524
- SHULER, M.L., T. CHO, T. WICKHAM, O. OGOHA, M. KOOL, D.A. HAMMER, R.R. GRANADOS Y H.A. WOOD. 1990. *Bioreactor development for production of viral pesticides or heterologous proteins in insect cell cultures*. *Ann. NY Acad. Sci.* **589**:399-422.
- SIEBURTH, P.J. Y J.E. MARUNIAK. 1988. *Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, Anticarsia gemmatilis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **24**:195-198.
- SOSA GÓMEZ, D.R. Y F. MOSCARDI. 1996. *Producción de virus patógenos de ácaros e insectos*, p. 223-240. En: R. Lecuona (ed.), *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina.
- STAVROULAKIS, D.A., N. KALOGERAKIS, L.A. BEHIE Y K. IATROU. 1991. *Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures*. *Biotechnol. Bioengn.* **38**:116-126.
- STOCKDALE, H. Y G.R. GARDINER. 1977. *The influence of the condition of cells and medium on production of polyhedra of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **30**:330-336.
- SUMMERS, M.D. Y G.E. SMITH. 1987. *Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Boletín N° 1555. Texas Agricultural Experiment Station, College Station, Texas, U.S.A.
- SWIM, H.E. Y R.F. PARKER. 1960. *Effect of Pluronic™ F-68 on growth of fibroblasts in suspension on rotatory shaker*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **103**:252-254.
- TATICEK, R.A Y M.L. SHULER. 1997. *Effect of elevated oxygen and glutamine levels on foreign protein production at high cell densities using the insect cell-baculovirus expression system*. *Biotechnol. Bioengn.* **54**:142-152.
- TOM, R.L., M.T. DEBANNE, C. BÉDARD, A.W. CARON, B. MASSIE Y A.A. KAMEN. 1995. *Improved yields of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor produced using the baculovirus expression system by medium replacement following infection*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**:53-58.
- TRAMPER, J., D. SMIT, J. STRAATMAN Y J.M. VLAK. 1988. *Bubble-column design for growth of fragile insect cells*. *Bioprocess Engn.* **3**:37-41.
- TRAMPER, J., J.M. VLAK Y C.D. DE GOOIJER. 1996. *Scale up aspects of sparged insect-cell bioreactors*. *Cytotechnol.* **20**:221-229.
- TRINK, K., M. GARCÍA-BRIONES, F. HINK Y J.J. CHALMERS. 1994. *Quantification of damage to suspended insect cells as a result of bubble rupture*. *Biotechnol. Bioengn.* **43**:37-45.
- VAIL, P.V., D.F. HOFFMANN Y J. S. TEBBETS. 1996. *Effects of fluorescent brighteners*

- on the activity of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuid species. Biol. Contr. 7:121-125.
- VANDERZANT, E.S., C.D. RICHARDSON Y S.W. FORT. 1962. Rearing of the bollworm on artificial diet. J. Econ. Entomol. 55:140-148.
- VAN LIER, F.L.J., E.J. VAN DEN END, C.D. DE GOOIJER, J.M. VLAK Y J. TRAMPER. 1990. Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:43-47.
- VAN LIER, F.L. J., W.C.J. VAN DER MEIJNS, N.A. GROBBEN, R.A. OLIE, J.M. VLAK Y J. TRAMPER. 1992. Continuous β -galactosidase production with a recombinant baculovirus insect-cell system in bioreactors. J. Biotechnol. 22:291-298.
- VAUGHN, J.L., R.H. GOODWIN, G.J. TOMPKINS Y P. MCCAWLEY. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro 13:213-217.
- VAUGHN, J.L., F. FAN, E.M. DOUGHERTY, J.R. ADAMS, D. GUZO Y J.T. MCCLINTOCK. 1991. The use of commercial serum replacements in media for the in vitro replication of nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 58:297-304.
- VISNOVSKY, G. Y J. CLAUS. 1994. Influence of time and multiplicity of infection on the batch production of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus in lepidopteran insect cell cultures, p. 123-128. En: E. Galindo y O. T. Ramírez (ed.), Advances in Bioprocess Engineering, Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- WANG, H.G.H., M.J. FRASER Y L.C. CARY. 1989. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis virus. Gene 81:97-108.
- WANG, M.Y., V. VAKHARIA Y W. BENTLEY. 1993. Expression of epoxide hydrolase in insect cells: a focus on the infected cell. Biotechnol. Bioengn. 42:240-246.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1999. Disruption of the insect midgut defense system by specific targeting of the peritrophic membrane. Abstracts XXXII Meeting of the Soc. Invert. Pathol., Irvine, 22 al 27 de Agosto, p. 79.
- WEISS, S.A. Y J.L. VAUGHN. 1986. Cell culture methods for large-scale propagation of baculoviruses, p. 63-88. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), The Biology of Baculoviruses. II. Practical Application for Insect Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- WEISS, S.A., S.S. KALTER, J.L. VAUGHN Y E. DOUGHERTY. 1980. Effect of nutritional, biological and biophysical parameters on insect cell culture for large-scale production. In Vitro 16:222-223.
- WEISS, S.A., G.C. SMITH, S.S. KALTER Y J.L. VAUGHN. 1981. Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. In Vitro 17:495-502.
- WEISS, S.A., T. ORR, G.C. SMITH, S.S. KALTER, J.L. VAUGHN Y E.M. DOUGHERTY. 1982. Quantitative measurement of oxygen consumption in insect cell culture infected with polyhedrosis virus. Biotechnol. Bioengn. 24:1145-1154.
- WEISS, S.A., D. PELOW, G.C. SMITH, J.L. VAUGHN Y E. DOUGHERTY. 1985. Biotechnical aspects of a large-scale process for insect cells and baculoviruses, p. 1-16. En: E. Kurstak (ed.), Techniques in setting up and maintenance of tissue and cell cultures, Vol. C110, Elsevier Scientific Publishing, County Clare, Irlanda.

- WEITZMAN, M.D., R.D. POSSEE Y L.A. KING. 1992. *Characterization of two variants of Panolis flammea multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Virol. **73**:1881-1886.
- WICKHAM, T.J., T. DAVIS, R.R. GRANADOS, D.A. HAMMER, M.L. SHULER Y H.A. WOOD. 1991. *Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection*. Biotechnol. Lett. **13**:483-488.
- WICKHAM, T.J. Y G.R. NEMEROW. 1993. *Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system*. Biotechnol. Prog. **9**:25-30.
- WILKIE, G.E.I., H. STOCKDALE Y S.V. PIRT. 1980. *Chemically-defined media for production of insect cells and viruses in vitro*. Develop. Biol. Standard **46**:29-37.
- WINSTANLEY, D. Y N.E. CROOK. 1993. *Replication of Cydia pomonella granulosis virus in cell cultures*. J. Gen Virol. **74**:1599-1609.
- WONG, T.K.K., L.K. NIELSEN, P.F. GREENFIELD Y S. REID. 1994. *Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of Sf9 insect cells infected with a recombinant baculovirus*. Cytotechnol. **15**:157-167.
- WONG, T.K.K., C.H. PETER, P.F. GREENFIELD, S. REID Y L.K. NIELSEN. 1996. *Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept*. Biotechnol. Bioengn. **49**:659-666.
- WOOD, H.A., L.B. JOHNSTON Y J.P. BURAND. 1982. *Inhibition of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in high density Trichoplusia ni cell cultures*. Virology **119**:245-254.
- WOOD, H.A. Y P.R. HUGHES. 1997. *Recombinant viral insecticides: Delivery of environmentally safe and cost effective products*. Entomophaga **41**:361-373.
- WU, J., G. KING, A.J. DAUGULIS, P. FAULKNER, D.H. BONE Y M.F.A. GOOSEN. 1989. *Engineering aspects of insect cell suspension culture: a review*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**:249-255.
- YANG, J.D., P. GECIK, A. COLLINS, S. CZARNECKI, H.H. HSU, A. LASDUN, R. SUNDARAM, R. MUTHUKUMAR Y M. SILBERKLANG. 1996. *Rational scale-up of a baculovirus-insect cell batch process based on medium nutritional depth*. Biotechnol. Bioengn. **52**:696-706.
- YING, C.M. Y W.K. PENG. 1981. *A simplified soybean and wheat germ diet for rearing the southwester corn borer, Diatraea grandiosella Dyar (Lepidoptera: Pyralidae)*. Ann. Ent. Soc. Am. **74**:425-427.
- ZHANG, J., N. KALOGERAKIS, L.A. BEHIE Y K. IATROU. 1992. *Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells Bm-5 and the production of baculovirus BmNPV*. Biotechnol. Bioengn. **40**:1165-1172.
- ZHANG, J., N. KALOGERAKIS, L.A. BEHIE Y K. IATROU. 1993. *A two-stage bioreactor system for the production of recombinant proteins using a genetically engineered baculovirus/insect cell system*. Biotechnol. Bioengn. **42**:357-366.
- ZHANG, J., N. KALOGERAKIS, L.A. BEHIE Y K. IATROU. 1994. *Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cells (Bm5) suspension culture*. Biotechnol. Prog. **10**:636-643.

ZHANG, J., A. COLLINS, M. CHEN, L. KNYAZEV Y R. GENTZ. 1998. *High-density perfusion culture of insect cells with a BioSep ultrasonic filter*. Biotechnol. Bioengn. 59:351-359.