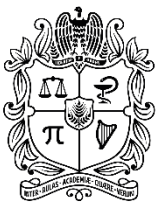


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis termodinámico y metabólico de un sistema biológico células de insecto *Spodoptera frugiperda* (sf9) y su infección con un virus recombinante *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (BvGCN4-NA1)

Lina Maria Fajardo Figueroa

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2022

Análisis termodinámico y metabólico de un sistema biológico células de insecto *Spodoptera frugiperda* (sf9) y su infección con un virus recombinante *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (BvGCN4-NA1)

Lina Maria Fajardo Figueroa

Trabajo final presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director (a):

Ph.D., M.Sc.,.IQ. Camilo Alberto Suárez Méndez

Línea de Investigación:

Bioprocess Intensification and Rational Design

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2022

A mis padres

Declaración de obra original

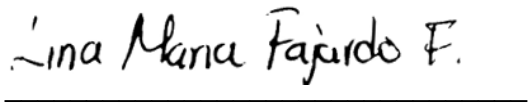
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Lina Maria Fajardo Figueroa

Fecha 5/10/2022

Agradecimientos

Deseo expresar gratitud a Dios y a todas las personas que hicieron parte de este camino tan enriquecedor a nivel académico y personal.

En particular a mi asesor Camilo Suarez por invitarme a explorar esta línea investigativa y su colaboración a lo largo del desarrollo y por supuesto a Hugo, por introducir para nosotros esta temática.

A los integrantes del grupo BIRD que en medio de la virtualidad estaban prestos a escuchar y aportar a este trabajo.

A Yessenia y su familia por abrir las puertas de su hogar y construir una linda amistad.

A mi papá, mamá, hermano y Rocky por ser mi centro, amor y fortaleza para afrontar los desafíos de la vida.

A ellos y las demás personas que conocí y reencontré en este camino infinitas gracias, porque es por ustedes que las dificultades se convierten en aventuras y las aventuras en oportunidades.

Resumen

Análisis termodinámico y metabólico de un sistema biológico células de insecto *Spodoptera frugiperda* (sf9) y su infección con un virus recombinante *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (BvGCN4-NA1)

En el presente trabajo se aborda el análisis de la producción de proteínas recombinantes con interés bio-farmacéutico a través de la tecnología de expresión en células de insecto mediante la infección con baculovirus recombinantes. Esta es una estrategia ampliamente utilizada que aún tiene desafíos en el diseño, modelamiento y entendimiento (Monteiro, 2015). En primer lugar, se analiza bajo una perspectiva termodinámica de caja negra la etapa de crecimiento celular encontrando que su modelamiento es posible a través de una metodología, dirigida principalmente a microorganismos, la cual se puede adaptar a eucariotas con especial consideración en la definición y diferenciación de la fuente de energía, carbono y nitrógeno. En particular, cuando se considera en el análisis una fuente de nitrógeno orgánica, la cual induce un sobreflujo de electrones que pueden terminar en biomasa o en subrpoductos carbonados como lactato. Aunque no fue posible reproducir los escenarios planteados en un modelo metabólico, mediante el análisis metabólico se identificó la importancia de considerar las rutas de asimilación de nitrógeno (orgánico e inorgánico) y el uso de métodos estadísticos como herramienta para la mejora de estos procesos. Finalmente, basado en el análisis de tiempos característicos derivados de cinéticas reportadas para la etapa de infección y producción en la literatura, se encontró que el evento celular que principalmente afecta la homogeneidad y la productividad de las proteínas recombinantes es el evento de unión virus-célula ya que su tiempo característico puede variar considerablemente y afectar otros subprocesos. Además, se encontró que, en la producción de proteínas complejas a nivel intracelular, su expresión se ve favorecida en linajes celulares con velocidades de internalización más bajas.

Palabras clave: *Spodoptera frugiperda*; proteínas recombinantes, baculovirus, termodinámica, tiempo característico

Abstract

Thermodynamic and metabolic analysis of a biological system: insect cells *Spodoptera frugiperda* (sf9) and their infection with a recombinant virus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (BvGCN4-NA1)

Here, the analysis of producing recombinant proteins of bio-pharmaceutical interest based on its expression in insect cells through infection with recombinant baculoviruses was addressed. This approach is a widely used strategy that still has challenges in design, modeling and understanding (Monteiro, 2015). First, the cell growth stage was analyzed from a black box thermodynamic perspective, showing that this modeling approach may be used to this biological model, even though it was formerly meant for microorganisms. The methodology can be applied to eukaryotes having special consideration on the definition and differentiation of the energy, carbon, and nitrogen sources. When an organic nitrogen source is considered in the analysis, it induces an overflow of electrons that can end up in biomass or in carbon by-products such as lactate. Although it was not possible to reproduce some scenarios proposed in a metabolic model, the metabolic analysis did show the importance of considering nitrogen assimilation routes (organic and inorganic) and the use of statistical methods as a tool to improve these processes. Finally, based on the analysis of characteristic times derived from kinetics reported for the infection and production stage in literature, it was found that the virus-cell union is the cellular event that mainly affects homogeneity and productivity of recombinant proteins since its characteristic time can vary considerably affecting other subsequent subprocesses. In addition, it is shown that their expression is favored in cell lines with lower internalization rates in the production of complex proteins at the intracellular level**.**

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; protein production, baculovirus, thermodynamic, characteristic time

Contenido

Pág.

Resumen IX

Lista de figuras XIII

Lista de tablas XV

Lista de Símbolos y abreviaturas XVI

Introducción 1

1. Marco teórico 3
1.1 Sistema de expresión células de insecto-baculovirus 3
1.2 Infección con baculovirus a nivel industrial 5
1.3 Productos recombinantes obtenidos en un sistema IC-BEVs 7
1.4 Ciclo de infección de *in vitro* 9
1.5 Baculovirus: *Autographa Californica* (AcMNPV) 11
1.6 Cultivos de células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (sf9) 12
1.7 Ingeniería del bioproceso 15
1.7.1 Modelos estequiométricos 17
1.7.2 Modelos metabólicos 19
1.7.3 Modelos cinéticos 20
1.8 Modelos termodinámicos de caja negra 25
1.8.1 Producción de energía catabólica 27
1.8.2 Predicción de los parámetros Herbert -Pirt 27
1.9 Construcción y análisis de modelos metabólicos 30
1.10 Análisis de escala de tiempo y los tiempos característicos 31

2. Problema de investigación y objetivos 35
2.1 Planteamiento del problema 35
2.2 Hipótesis 35
2.3 Objetivos 35
2.3.1 Objetivo general 35
2.3.2 Objetivos específicos 35

3. Metodología 37
3.1 Estimación de la reacción de proceso mediante el modelo de caja negra 37
3.1.1 Estimación de la fuente orgánica de nitrógeno 39
3.1.2 Estimación de la fórmula elemental de la biomasa 40
3.2 Análisis de los modelos de caja negra 41
3.3 Planteamiento del modelo metabólico 41

3.4 Simulaciones computacionales 41
3.5 Identificación de tiempos característicos 41
3.6 Análisis de tiempos característicos 42

4. Resultados y discusión 45
4.1 Modelo de caja negra 45
4.1.1 Fórmula elemental de la biomasa 45
4.1.2 Fórmula elemental de la fuente orgánica de nitrógeno 45
4.1.3 Escenario de análisis 1: Glucosa como donador de electrones y fuente de carbono 45
4.1.4 Escenario de análisis 2: Glucosa como donador de electrones y una fuente de nitrógeno orgánica 48
4.1.5 Análisis de los modelos de caja negra 53
4.2 Análisis metabólicos 55
4.3 Análisis de escala de tiempo en la infección con baculovirus 62
4.3.1 Unión virus - célula 68

5. Conclusiones y recomendaciones 71
5.1 Conclusiones 71
5.2 Recomendaciones 73

Anexos 75

Anexo A: Composición de las células de insecto y coeficientes molares 75

Anexo B: Lista de reacciones bioquímicas consideradas en el modelo metabólico de células sf9 76

Anexo C: Composición de fuente de nitrógeno orgánica 80

Anexo E. Tiempos característicos 81

Bibliografía 83

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1:Representación y comparación de un sistema de infección con un baculovirus brotados (BV) de cepa silvestre (a) y uno recombinante (b)*. Tomada y adaptada de Van Oers (2011). 3
Figura 1-2: Representación de un esquema convencional de producción de proteínas recombinantes IC-BEVS a escala industrial. Figura tomada y adaptada de Contreras-Gómez et al (2013). 6
Figura 1-3: Representación del ciclo de infección con un baculovirus recombinante para la expresión de proteínas recombinantes. Figura de elaboración propia basada en figuras presentadas en Fabre et al (2019), Blissard & Theilmann (2018) y Hass (2004). 9
Figura 1-4:Cuerpos de oclusión y fenotipos virales de un virus tipo nucleopoliedrovirus multicápside. Figura tomada y adaptada de Van Oers (2011). 12
Figura 1-5: Metabolismo esquemático de la síntesis de masa celular y producto en células de insecto sf9*. Figura tomada y adaptada de Xie &Wang (1994). 14
Figura 1-6: Mecanismo de infección de un baculovirus*. Figura tomada y adaptada de Dee & Shuler (1997). 21
Figura 1-7: Mecanismo de infección para una co-infección con tres baculovirus monocistrónicos*. Figura tomada y adaptada de Roldαo et al., (2007). 23
Figura 1-8: Definición del sistema en un modelo de caja negra. Figura tomada y adaptada de Heijnen & Kleerebezem (2010). 26
Figura 1-9: Representación esquemática de los tiempos característicos en un proceso.32
Figura 3-1: Escenarios para el análisis del metabolismo de células de insecto..... 38
Figura 3-2: Procedimiento usado para determinar los tiempos característicos a partir de modelos cinéticos..... 42
Figura 3-3: Procedimiento usado para analizar la escala de tiempo de un conjunto de subprocesos..... 43
Figura 4-1: Comportamiento de los coeficientes estequiométricos de la reacción del global de crecimiento en función de la velocidad de crecimiento para el Escenario 1: Glucosa con amonio y Escenario 2: Glucosa con fuente orgánica de nitrógeno. 51
Figura 4-2: Estimación de la cantidad específica de ATP para los casos de estudio propuestos. 57
Figura 4-3: Flujos metabólicos de reacción 15 (catalizada por la enzima málica) y reacción 69 (catalizada por la enzima GOGAT) que presentaron cambios en direccionalidad. 57

Figura 4-4: Modelo esquemático de la red de asimilación de nitrógeno*. Figura tomada y adaptada de Wang (2011). 61
Figura 4-5: Estimación de tasas de síntesis específica de ATP netas para los escenarios propuestos 2 y 3. 62
Figura 4-6: Representación de los eventos considerados para el análisis de tiempo de escala. 1: unión virus-célula, 2: Internalización del virus, 3: replicación del ADN viral 4: síntesis de ARN, 5: Síntesis de proteína de interés 6: muerte celular intrínseca (no se muestra)..... 63
Figura 4-7:Tiempos característicos estimados para cinco eventos celulares basados en la información cinética reportada por Dee y Shuler (1997), Roldão et al., (2007) y Haas (2004). 64
Figura 4-8: Variación del tiempo característico de unión en función de la concentración celular y la constante de unión..... 69

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Vacunas comerciales y terapias basadas en tecnología de expresión de baculovirus para uso veterinario o humano. Tabla tomada y adaptada de Fabre et al (2019)..... 8
Tabla 1-2: Parámetros de cultivo de células de insecto sf9. Tabla tomada y adaptada de Drugmand (2007) y Cox et al (2014). 13
Tabla 3-1: Escenarios que definen el subproceso determinante a partir de los tiempos característicos y la ocurrencia de un par de subprocesos. 44
Tabla 4-1. Relaciones Herbert-Pirt de los compuestos que intervienen en el escenario de glucosa como donador de electrones y fuente de carbono. 47
Tabla 4-2: Relaciones Herbert-Pirt de los compuestos que intervienen en el escenario de glucosa como donador de electrones y una fuente orgánica de carbono. 50
Tabla 4-3: Coeficientes de reparto metabólico en el nodo de piruvato de células Sf9 de *S. frugiperda* no infectadas para los dos casos de estudio 2 y 3. 59
Tabla 4-4: Coeficientes de reparto metabólico en el nodo oxoglutarato de células Sf9 de *S. frugiperda* no infectadas..... 60
Tabla A-1: Composición de las células de insecto sf9 y coeficientes molares en etapa de crecimiento. Tomado y adaptado de Monteiro (2015). 75
Tabla B-2: Lista de reacciones consideradas para el análisis MFA de las células de insecto sf9. Tomado y adaptado de Monteiro (2015). 76
Tabla B-3: Coeficientes de partición del nodo Piruvato. Tomado y adaptado de Bernal (2009)..... 79
Tabla B-4: Coeficientes de partición del nodo AKG. Tomado y adaptado de Bernal (2009). 79
Tabla C-5: Composición de la fuente de nitrógeno orgánica y su respectivo grado de reducción y energía de formación. Las fracciones molares se calcularon de acuerdo a lo reportado por Monteiro (2015) (Monteiro, 2015). 80
Tabla E-6: Eventos de infección celular con sus respectivas constantes cinéticas y tiempos característicos de Dee & Shuler (1997)..... 81
Tabla E-7: Eventos de infección celular con sus respectivas constantes cinéticas y tiempos característicos de Roldão et al., (2007). 81

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
a	Sustrato requerido para formación de biomasa	$mol\ S/Cmol\ X$	Ec 1.7
a_{ana}	cantidad de sustrato necesario para formar una mol de biomasa (actúa como fuente de carbono)	$mol\ S/Cmol\ X$	Ec 1.8
a_{cat}	Cantidad estequiométrica de sustrato destinado para el catabolismo de una cmolx	$mol\ S/Cmol\ X$	Ec 1.7
A	Matriz de coeficientes estequiométricos de la red metabólica		Ec 1.14
a_n	Cantidad de fuente de nitrógeno necesario para formar una mol de biomasa (actúa como fuente de carbono)	$mol\ N/Cmol\ X$	
b	Sustrato requerido para la formación de producto	$mol\ S/\ mol\ P$	Ec 1.4
b_{cat}	Cantidad estequiométrica de sustrato destinado al catabolismo para hacer termodinámicamente viable la reacción de producto anabólico	$mol\ S/mol\ P$	Ec 1.13
b_{min}	Mínima cantidad estequiométrica de sustrato consumido por mol de producto anabólico	$mol\ S/mol\ P$	Ec 1.13
b_{TDF}	Cantidad estequiométrica de sustrato destinado al catabolismo para suministrar la energía necesaria para la formación de enlaces en el producto anabólico	$mol\ S/mol\ P$	Ec 1.13
f_{cat}	número de veces que la reacción catabólica necesita ejecutarse para generar suficiente energía para impulsar la reacción anabólica		Ec 1.9
k_f	constante intrínseca de unión de una proteína viral a un receptor	$\frac{ml}{\#r \cdot cell}$	Sección 1.7.3
Ka	Constante cinética experimental de unión viral	$\frac{ml}{cell\ \cdot h}$	Sección 1.7.3

$K_{a_{max}}$	Constante cinética máxi,a experimental de unión viral	$\frac{ml}{cell \cdot h}$	Sección 1.7.3
K_{d_1}	Constante cinética por muerte celular intrínseca	h^{-1}	Sección 1.7.3
K_{ev}	Constante cinética de endocitosis	h^{-1}	Sección 1.7.3
K_{fus}	Constante cinética de fusión de la membrana viral con el endosoma	h^{-1}	Sección 1.7.3
K_n	Constante cinética de transporte de partículas al núcleo	h^{-1}	Sección 1.7.3
K_{rDNA}	Constante cinética de replicación de ADN viral	h^{-1}	Sección 1.7.3
$K_{sRNA_{VP_i}}$	Constante cinética de síntestis de ARN de una proteína VP_i	h^{-1}	Sección 1.7.3
$K_{tran,v}$	Constante cinética de degradación de partículas en lisosomas	h^{-1}	Sección 1.7.3
m_G	Energía necesaria para el mantenimiento celular	$kJ/Cmol\ X \cdot h$	Ec 1.11
$\min SSR$	Residual de mínimos cuadrados		Ec 1.16
m_s	Sustrato requerido para mantenimiento	$mol\ S/Cmol\ X \cdot h$	Ec 1.12
np	número de carbonos del producto		Ec 1.13
NoC_{cs}	Número de carbonos de la fuente de carbono	$carbonos/mol$	Ec 1.10
q_i	velocidades específicas de consumo de consumo/producción del compuesto i	$\frac{mol_i}{C_{mol}X \cdot h}$	Sección 1.8
r	Matriz de las velocidades extracelulares conocidas		Ec 1.15
R	Constante universal de los gases ideales	$J/mol \cdot K$	Ec 1.11
R_{sf}	cantidad de receptores celulares	$\frac{\#r}{cell}$	Sección 1.7.3
t_i	Tiempo característico de un evento i	h	Sección 1.10
T	Tempertara	K	Ec 1.11
$Y_{AD,min}$	mínima cantidad de aceptor de electrones que se requiere por mol de donador	$mol\ donador/mol\ aceptor$	Ec 1.5
$Y_{ATP/cell}$	Requerimiento de ATP por célula	$\mathrm{m}mol\ ATP/10^6 cell$	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
α	Número de receptors por virus	$\#receptores/virus$	Sección 1.7.3
γ_i	Grado de reducción del metabolito i	$\frac{emol}{mol}$	Sección 1.8

Símbolo	Término	Unidad	Definición
$\Delta_{cat}G$	Energía libre de Gibbs de la reacción catabólica	kJ/mol	Ec 1.6
$\Delta G^{\max}_{\text{diss Xi}}$	Energía libre de Gibbs necesario para la producción de 1 C mol de biomasa	$\frac{kJ}{mol}$	Ec 1.10
ΔG^{0}_{fi}	Energía de formación del compuesto i	kJ/mol	Ec 1.6
$\Delta_P G_{th}$	Energía libre de Gibbs para la reacción de producto anabólico	$\frac{kJ}{mol}$	Ec 1.13
$\Delta_R G^{o'}$	Energía libre de Gibbs de reacción en condiciones estándar	kJ/mol	Ec 1.6
σ_r^2			Ec 1.16
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}	
μ_{max}	Velocidad específica de crecimiento máxima	h^{-1}	
η	Eficiencia		

Subíndices

Subíndice	Término
e	Extracelular
i	Intracelular

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AcMNPV	Virus Autographa Californica
ACOA	Acetil Coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin Trifosfato
AKG	Oxoglutarato
Ala	Alanina
Amm	Amonio
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BV	Viriones Brotados
BvGCN4-NA1	Virus Autographa californica que contiene un gen insertado de la proteína neraminidasa de influenza N1
CCI	Concentración celular al momento de infección
Cit	Citrato
CO2	Dióxido de carbono
Cys	Cisteína
dAMP	(desoxi)adenosina monofosfato

dCMP	(desoxi)citidina monofosfato
dGMP	(desoxi)guanosina monofosfato
dTMP	(desoxi)Timidina monofosfato
DO	Control de oxígeno disuelto
F6P	Fructosa 6- fosfato
FA	Ácidos grasos
FAD	Dinucleótido de flavina adenina oxidado
FADH2	Dinucleótido de flavina adenina reducido
Fum	Fumarato
G6P	Glucosa 6 fosfato
GAP	Gliceraldehído 3 fosfato
GL	Grados de libertad
Glc	Glucosa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GP64	Proteína de capa viral GP64
hpi	Horas despues de la infección
Hys	Histidina
IC-BEVS	Sistema de Expresión Células de Insecto - Baculovirus
Ile	Isoleucina
Lac	Lactato
Leu	Leusina
Lys	Lisina
Mal	Malato
mARN	ARN mensajero
Met	Metionina
MFA	Análisis de flujos meabólicos
MOI	Multiplicidad de Infección
NAD (H)	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducida
NAD (P)	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) oxidada
O_2	Oxígeno
OAA	Oxaloacetato
Obs	Cuerpos de oclusión
ODV	Viriones Ocluídos
OUR	Velocidad máxima de consumo de oxígeno
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
polh	Promotor de expresión génica tardía polH
Pro	Prolina
PROTEIN	Proteina
Pyr	Piruvato
R5P	Ribosa 5 fosfato
RQS	Coeficiente de Respiración
Ser	Serina
sf	Linaje celular Spodoptera Furgiperda
sf21	Linea celular Spodoptera frugiperda sf21
sf9	Linea celular Spodoptera Furgiperda sf9
SUC	Succinato
SUCOA	Succinil coA
TCA	Ciclo del Ácido tricarboxílico

Thr	Treonina
TOI	Tiempo de infección
Tyr	Tirosina
UMPRN	Uridina Monofosfato
UREA	Urea
vADN	ADN viral
Val	Valina
VLP	Estructuras proteícas similares a virus
VP_i	Proteína i de una estructura VLP

Introducción

Actualmente, el cultivo celular *in vitro* de células de insecto es ampliamente utilizado como sistema de expresión de proteínas, virus recombinantes, vacunas, tejidos, entre otros (Van Oers et al., 2015). Estos productos están dirigidos principalmente al tratamiento de enfermedades en animales y humanos en el mercado de la industria farmacéutica (Possee et al., 2020) . Esto es posible dada la analogía entre la maquinaria celular de células de insecto y mamíferos, las cuales tienen la capacidad de procesar complejos proteicos de alto nivel y expresarlos en ubicaciones tanto a nivel intracelular, extracelular o de membrana (M. Cox et al., 2014; Fabre et al., 2019). Las instrucciones para el procesamiento de un producto determinado generalmente son entregadas directamente al núcleo de las células de insecto a través de uno/o varios virus recombinantes, los cuales contienen el/los genes de interés.

La familia de virus más explorada es *Baculoviriade* ya que son virus conocidos por afectar a gran parte de la población de insectos (Slack et al., 2006). Entre ellos, el género *nucleopolyhedrovirus* (NPV) ha sido el más estudiado (Grzywacz, 2017), el cual se caracteriza por expresar una matriz proteica bajo el promotor (*polh*) de la proteína poliedrina. A este sistema biológico de interacción entre células de insecto y virus, se le conoce como IC-BEVS por sus siglas en inglés y distintos enfoques a nivel molecular y de proceso se han llevado a cabo para dilucidar su complejidad y en especial, para mejorar la productividad, rendimiento y calidad de productos recombinantes a gran escala (Bosma et al., 2018; A. Contreras-Gómez et al., 2014; Kamen et al., 2021; Y. Liu et al., 2010; Lubelski et al., 2014; Monteiro, 2015).

La versatilidad de este tipo de bioprocesos y su amplia aplicación en sectores tales como el agroindustrial (para el control de insectos) y el de salud (para producción de fármacos biológicos y terapia génica) exige procesos robustos, con facilidad en el diseño y operación y óptimas relaciones costo-tiempo (Zalai et al., 2021). que permita actuar con rapidez,

especialmente ante sucesos como epidemias o pandemias. Se ha pronosticado que el mercado global de productos bio-farmaceúticos crezca en 8.59% según la tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) para el periodo de 2019 a 2024 (O'Flaherty et al., 2020). En Colombia, la comercialización y producción de fármacos de origen biotecnológico se ha visto impulsado por la emergencia sanitaria de Covid-19, por lo que el panorama político respecto a la producción de biológicos es alentador (Semana, 2021), y representa una oportunidad prometedora para incursionar y profundizar en este campo de estudio

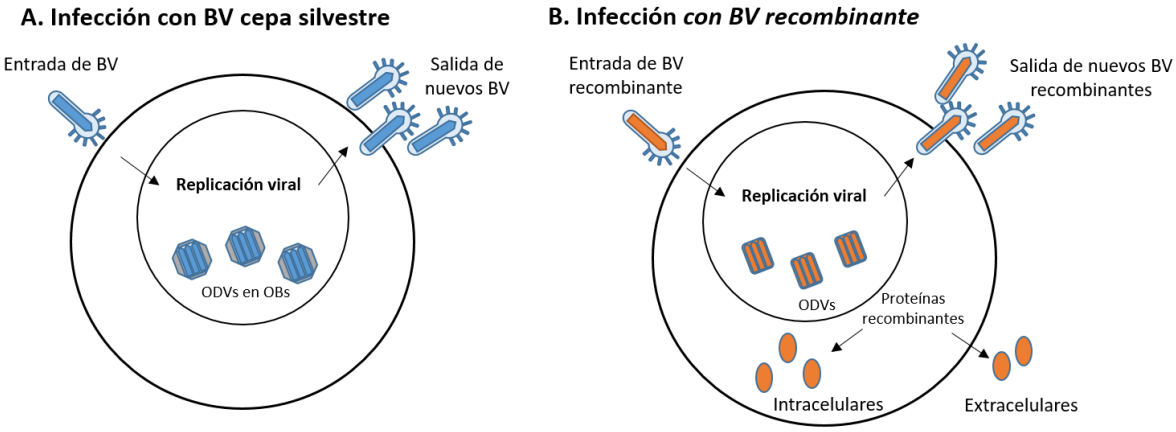
A pesar de que esta tecnología ha superado varios desafíos (Carinhas et al., 2011; Monteiro, 2015; van Oers, 2011), aún quedan algunos por superar, especialmente aquellos relacionados con el conocimiento y entendimiento de estos procesos. Es por esto, que en este trabajo se analiza un sistema IC-BEVS desde una perspectiva termodinámica, metabólica y cinética, a partir de la construcción de un modelo termodinámico de caja negra para la etapa de crecimiento celular de las células de insecto y evaluando su desempeño en un modelo metabólico propuesto en la literatura con el propósito de complementar ambas visiones, además se aborda la infección con baculovirus desde un punto de vista cinético para obtener una mirada alterna de la infección y así aportar al conocimiento y construcción de estos bioprocesos.

1. Marco teórico

1.1 Sistema de expresión células de insecto-baculovirus

Los sistemas de expresión células de insecto – baculovirus (IC-BEVS) son una plataforma para la expresión de proteínas recombinantes, que se fundamenta en la capacidad de los baculovirus para infectar células de insecto y la habilidad de las células para procesar la información contenida en el virus (Figura 1-1). Para infecciones *in vitro*, se utiliza principalmente un fenotipo de baculovirus, los denominados viriones brotados (BV), los cuales se caracterizan por diseminar la infección viral dentro de un insecto

Figura 1-1:Representación y comparación de un sistema de infección con un baculovirus brotados (BV) de cepa silvestre (a) y uno recombinante (b)*. Figura tomada y adaptada de Van Oers (2011).



*En ambos casos la infección ocurre por la entrada del BV a la célula y viaje al núcleo, dónde se replica. En la infección con la cepa silvestre la formación de cuerpos de oculsión (Obs) que contienen viriones ocluídos (ODVs) se forman al igual que nuevos BVs. En la infección con un recombinante, los genes que codifican para el empaquetamiento de los ODV's se han reemplazado por el gen de interés, que codifica para la expresión de proteínas heterólogas ya sea a nivel intracelular o extracelular y/o para la expresión de nuevos BV recombinantes.

Un BV silvestre, entra a la célula y viaja al núcleo para replicarse (Figura 1-1A), ahí se procesa su información genética y expresa dos fenotipos virales: viriones brotados (BV), que dejan la célula para seguir infectando otras células y los viriones ocluídos (ODVs), que se almacenan en el núcleo para ser empaquetados más adelante por proteínas estructurales como la poliedrina, en lo que se denomina cuerpos de oclusión (Obs). Un BV recombinante, al igual que uno silvestre, entra a la célula y viaja al núcleo para replicarse (Figura 1-1B) y podrá expresar ambos fenotipos virales (dependiendo del diseño del constructo), sin embargo, en este caso, el BV recombinante tiene una modificación en el gen que codifica para la proteína estructural (poliedrina), el cual se ha reemplazado por uno de interés y, por lo tanto, además de los fenotipos virales se obtiene la proteína deseada (van Oers, 2011). Así pues, el principio de la expresión se basa en el alto nivel de la expresión génica del baculovirus en las células de insecto, impulsada por promotores génicos tardíos de proteínas estructurales del baculovirus, cuyos genes se reemplazan por el de una proteína recombinante (Fabre et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, los promotores génicos tardíos controlan la actividad génica, por lo que los virus recombinantes se construyen alrededor de éstos. Los más utilizados por su alta expresión son polH, p10 y gp64, p6.9 y vp39 que codifican para proteínas estructurales del virus. Para construir un baculovirus recombinante, actualmente existen varios métodos de modificación génica comerciales que se han ido adaptando a las necesidades de los usuarios, el método de modificación de virus dependerá del tipo de virus a emplear, el huésped y las características específicas del producto recombinante a expresar, algunos de estos métodos se basan en la co-transfección[1] del genoma viral con el plásmido[2] que lleva el gen de interés, o también mediante recombinación homóloga del gen a través de genoma viral linealizado. Además, se destacan las tecnologías Bac-to-Bac® desarrollado por Invitrogen, en la cual el gen de interés se inserta por transposición específica del sitio en el vector viral dentro de las células de *Escherichia coli;* y el sistema

[1] Transfección: Es un término utilizado para describir la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos u otras herramientas.
[2] Plásmidos: son moléculas circulares de ADN extracromosómico que se replican de forma independiente al ADN cromosómico y se utilizan en ingeniería genética para transportar material genético recombinante.

FlashBAC® desarrollado por Oxford Expression Technologies en el que la recombinación homóloga ocurre entre un vector viral y un plásmido de transferencia en células de insecto (Fabre et al., 2019).

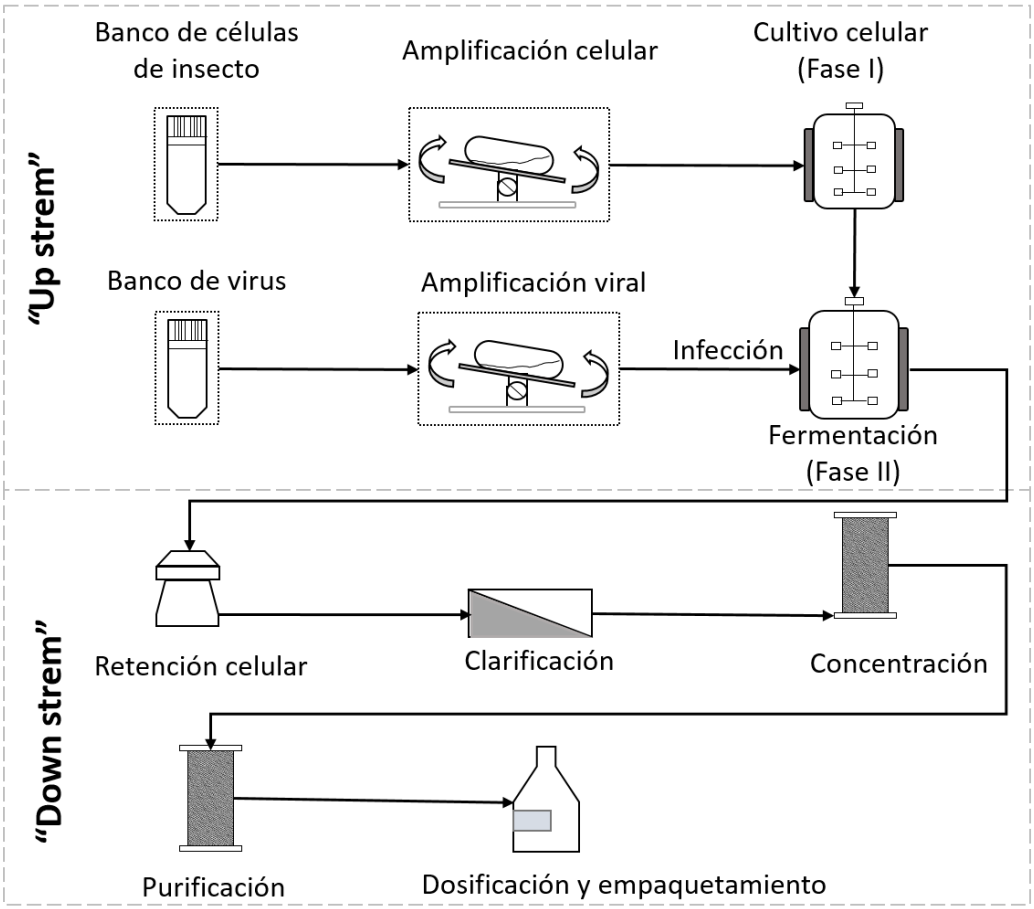
1.2 Infección con baculovirus a nivel industrial

El desarrollo de las aplicaciones de los IC-BEVS a nivel industrial generalmente se llevan bajo condiciones controladas *in vitro* y el esquema convencional del proceso se representa en la Figura 1-2. Bajo este alcance, la tecnología IC-BEVS generalmente involucra dos fases distintas de cultivo celular dentro de una etapa denominada "*up stream* " o aguas arriba: Primero, las células se cultivan para alcanzar la densidad celular deseada a partir de un banco de células y segundo, se infectan para producir el producto de interés (proteínas, complejos proteicos que asemejan estructuras de virus (VLP), antígenos u otros) a partir de un banco de virus que ha sido amplificado (M. M. J. Cox, 2012). El momento para la infección con baculovirus *in vitro* puede ser simultánea o después del crecimiento celular como se plantea en la Figura 1-2, sin embargo, este último es el más utilizado a nivel industrial debido a que las condiciones de cultivo que permiten alcanzar altas densidades celulares son bastante diferentes de las condiciones apropiadas para una alta producción durante la fase de infección (J. C. Drugmand, 2007).

Posterior a la infección, sigue la etapa de "*down stream*" o aguas abajo, en la que se incluyen todas las operaciones relacionadas a la separación, concentración y purificación del producto recombinante. En la Figura 1-2 se indica de manera general algunos de los pasos que involucra esta fase, pero es de resaltar que esta etapa es muy importante ya que debe garantizar la seguridad sanitaria del producto, por lo que, en la realidad, diversas estrategias se utilizan para alcanzar dicho objetivo. En la figura 1-2 se propone primero, una recolección de las células y separación de los vectores virales, normalmente llevado a cabo por operaciones como ultra centrifugación, ultrafiltración y reciclaje de medio de cultivos. Seguido a esto, existe un proceso de clarificación para eliminar agregados grandes, cápsides vacías y los restos celulares del medio comprendido por operaciones de centrifugación, microfiltración y filtración profunda. Posteriormente, se lleva el efluente a unidades de concentración y purificación para eliminar proteasas, endotoxinas, pirógenos y ADN viral y celular, a través de operaciones de cromatografía, intercambio

iónico, de membrana y/o exclusión de tamaño (A. Contreras-Gómez et al., 2014). Una vez se logra la pureza deseada, el producto está listo para formularse y empacarse.

Figura 1-2: Representación de un esquema convencional de producción de proteínas recombinantes IC-BEVS a escala industrial. Figura tomada y adaptada de Contreras-Gómez et al (2013).



Por otra parte, existen ciertas configuraciones o estrategias de infección. Si la infección ocurre por varios virus recombinantes (baculovirus monocistrónicos) que infectan la célula para la fabricación de varias proteínas que se ensamblan para formar una estructura determinada se conoce como co-infección (por ejemplo, en el ensamble de complejos proteicos que simulan la estructura de un virus (VLP's)), además si ocurre por un solo virus que codifica todas las proteínas necesarias (baculovirus policistrónicos) se denomina co-

expresión (Fabre et al., 2019). También se ha optado por combinar dichas estrategias para dar lugar a un producto recombinante deseado.

1.3 Productos recombinantes obtenidos en un sistema IC-BEVs

Desde la aprobación de la manipulación genética de los baculovirus en la década de los 80's (J. Drugmand et al., 2012; Tripathi & Shrivastava, 2019) y la aceptación de uso de productos recombinantes para uso terapéutico en humanos por la Agencia Europea de Medicinas (EMA) en 2007 y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2009 (A. Contreras-Gómez et al., 2014) se desencadenaron numerosos estudios explotando esta tecnología (IC-BEVS) para el desarrollo de fármacos biológicos.

La aplicación inicial y con mayor investigación de los BEVS es el control de plagas mediante la producción de bioinsecticidas para el sector agrícola. Esto en consecuencia de que la familia de baculovirus es capaz de infectar y propagarse entre una amplia variedad de insectos y su actividad es de carácter lítica (Grzywacz, 2017). Los casos de estudio con mayor importancia en este sector son: el control de la polilla de la manzana en Europa y América del Norte y del Sur, el control de *A. gemmatalis* (oruga del frijol terciopelo) en cultivos de soya en Brasil, el control de la polilla de la papa en Sur América, el control de lepidópteros deshojantes: para uso forestal en América del Norte, el control de *Heliothis/Helicoverpa spp.* en cultivos de algodón en India, Australia y China.

Sin embargo, por su versatilidad y rentabilidad, el IC-BEVS ha ganado importancia en el sector farmacéutico en la última década, particularmente para expresión de proteínas heterólogas para diagnóstico e inmunización, partículas proteicas similares a virus (VLP) y virus adeno-asociados como candidatos a vacunas y vectores de transducción en células mamarias para terapia génica (Fabre et al., 2019). Hasta la fecha, existen en el mercado cinco vacunas para uso animal y cuatro productos para uso humano que incluyen vacunas, inmunoterapia y vectores de terapia génica. En la Tabla 1-1, se presenta los fabricantes, la marca comercial, el producto expresado y la enfermedad a la que se dirigen dichos productos. Es de destacar, que el mercado de estos productos es dominado por compañías de origen europeo y americano. A nivel mundial, compañías como Merck, Bayer AG,

GlaxoSmithKline, uniQure, Protein Sciences Corporation, entre otras, ofrecen productos y servicios clínicos basados en esta tecnología (Fabre et al., 2019). Actualmente este mercado se ha visto impulsado aún más por la pandemia de Covid-19 (Jhaveri, 2021).

Tabla 1-1: Vacunas comerciales y terapias basadas en tecnología de expresión de baculovirus para uso veterinario o humano. Tabla tomada y adaptada de Fabre et al (2019).

Año	Nombre comercial	Compañía	Producto expresado	Propósito
Uso veterinario				
1998	Porcilis Pesti	Merck	E2 glicoproteina	Contra la peste porcina clásica
2001	Bayovac CSF E21	Bayer AG	E2 glicoproteina	
2005	Circumvent PCV	MSD Animal Health	PCV ORF2	Contra el circovirus porcino tipo 2
2008	Ingelvac CircoFLEX	Boehringer Ingelheim	PCV ORF2	
2009	Procilis PCV	Merck	PCV ORF2	
Uso humano				
2007	Cervarix	GlaxoSmith-Kline	HPV L1 proteína (cadena 16 y 19)	Contra el virus del papiloma humano
2010	Provenge	Dendreon	PAP-GM-CSF[1] AAV	Contra el cáncer de próstata
2012	Glygebra[2]	UniQure	Vector AAV con transgén de lipoproteína lipasa	Contra la deficiencia familiar de lipoproteína lipasa
2013	Flubok	Subunidad	Influenza HA	Vacuna antigripal trivalente anual

[1]Fosfatasa ácida prostática acoplada a factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
[2] Descontinuado
AAV, Virus Adenoasociados; HPV, Virus del papiloma humano; PCV, circovirus porcino; VLPs , complejos proteicos que simulan la estructura de un virus;

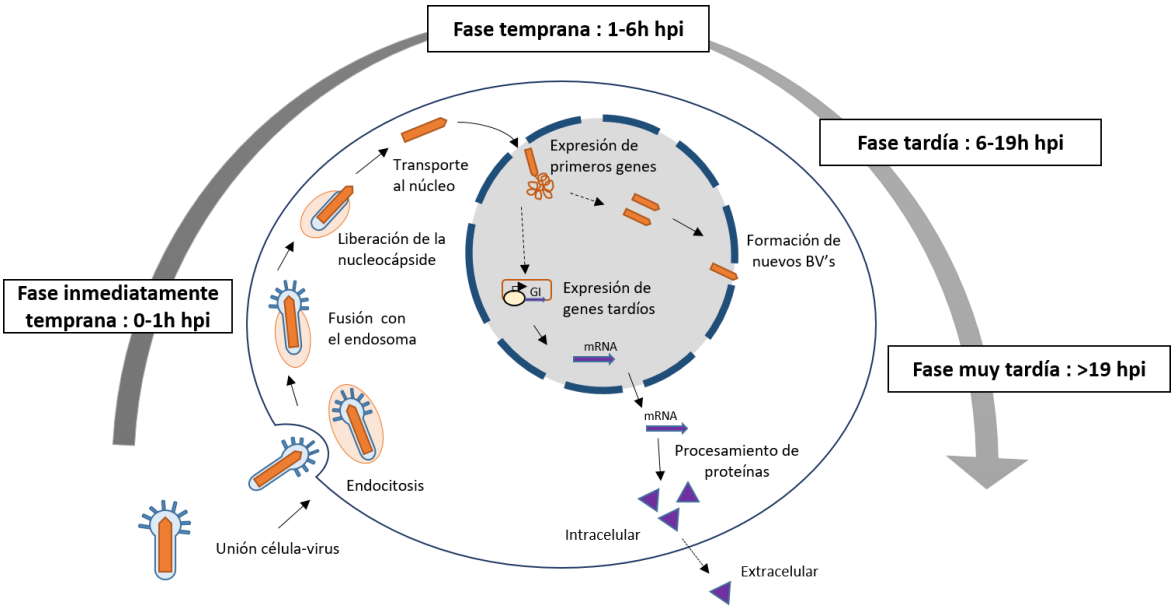
En cuanto a nivel de investigación, a través de esta tecnología se han estudiado candidatos a vacunas en humanos para el tratamiento Diabetes, Hepatitis E, Parvovirus B19, Influenza H5, Norwalk, Virus de Inmunodeficiencia Humana, Chikunguña y Coronavirus, entre otros; y, en animales para el tratamiento de la leucemia felina, la peste equina africana, la fiebre

del Valle del Rift, gripe aviaria y el parvovirus canino (Chang et al., 2020; A. Contreras-Gómez et al., 2014; M. M. J. Cox, 2012; Jhaveri, 2021; F. Liu et al., 2013; Sokolenko et al., 2012), entre otros, demostrando así la versatilidad de este tipo de bioprocesos, además de su importancia ya que se dirigen principalmente a mitigar el impacto de importantes afecciones de salud pública como, endemias, epidemias y pandemias.

1.4 Ciclo de infección de *in vitro*

El ciclo de vida del baculovirus *in vitro* es similar al *in vivo* con la diferencia de que el segundo se lleva a cabo con los virus derivados de la oclusión (ODV's) responsables de una infección primaria, mientras la infección *in vitro* se hace con los virus brotados (BV's) o no ocluídos responsables de la infección secundaria en un cultivo celular. El ciclo de infección puede describirse en cuatro fases (Haas, 2004) y se representa en la Figura 1-3, de la siguiente manera:

Figura 1-3: Representación del ciclo de infección con un baculovirus recombinante para la expresión de proteínas recombinantes. Figura de elaboración propia basada en figuras presentadas en Fabre et al (2019), Blissard & Theilmann (2018) y Hass (2004).



- Fase inmediatamente temprana: entre 0 y 1 hpi (hora después de la infección)

  La partícula viral entra a la célula por endocitosis mediada por la proteína clatrina (Blissard & Theilmann, 2018) y una vez dentro, en el endosoma, existe alrededor

del 50% de probabilidad de liberarse la nucleocápside tras la acidificación interna del endosoma (pH<5.5) y continuar su camino al núcleo, o bien, ser dirigida a los lisosomas para su degradación (Haas, 2004). Dado el primer caso, Blissard & Thelimann (2018), refieren que la fuerza impulsora que transporta la nucleocápside al núcleo y atraviesa el poro nuclear se da principalmente por un proceso de polimerización de actina en la base de la nucleocápside (Blissard & Theilmann, 2018; Monteiro et al., 2012).

- Fase temprana: entre 1 y 6 hpi

  Una vez llega la nucleocapside al núcleo, comienza la transcripción de los primeros genes del virus por la ARN polimerasa II de la célula huésped, algunos de estos genes se encargarán de favorecer la expresión de los siguientes genes virales mientras que otros se destinarán para el control de la célula huésped (Monteiro et al., 2012). Se ha observado que el virus comienza a regular decrecientemente las velocidades de unión, absorción e internalización del virus entre 2 y 19 hpi y la densidad celular cesa (Haas, 2004). También se ha evidenciado que el volumen celular incrementa rápidamente en las primeras horas de infección (Adnan et al., 2014; Gotoh et al., 2008).

- Fase tardía: entre 6 y 19 hpi

  Esta etapa se caracteriza por la expresión de la ADN-polimerasa viral, la replicación del ADN viral (vADN) en el estroma virogénico y la disminución de la transcripción de los genes y las proteínas de la célula huésped. Las tasas de replicación de vADN varían con el tiempo, al igual que la cantidad de ARN total en la célula (Haas, 2004; Monteiro et al., 2012). Se ha observado que el ciclo celular se detiene en la fase S o G2/M entre 8 y 24 hpi dependiendo de la fase de crecimiento en la que se infectó (Haas, 2004). Nuevas nucleocápsides son producidas en esta etapa y son marcadas por un mecanismo no muy claro por el momento, para quedarse en el núcleo (con el fin de formar los ODVs) y otras para ser transportadas (BV) desde el núcleo hasta la membrana plasmática por zonas enriquecidas de GP64 (Blissard & Theilmann, 2018) y liberados en un periodo de gemación de alrededor de 12 y 75 hpi (Haas, 2004).

- Fase muy tardía: mayor a 19 hpi

  En esta fase, ocurre la expresión de los genes tardíos de la infección, es decir, en el caso de la infección recombinante *in vitro*, es en este momento que los genes recombinantes que están bajo la regulación de los promotores virales tardíos se expresan. En el caso de la expresión bajo el promotor polh la expresión se da entre las 19 y 80 hpi. Posteriormente, entre 45 y 90 hpi ocurre la lisis celular y por ende la liberación de producto recombinante (en caso de ser intracelular)(Haas, 2004).

1.5 Baculovirus: *Autographa Californica* (AcMNPV)

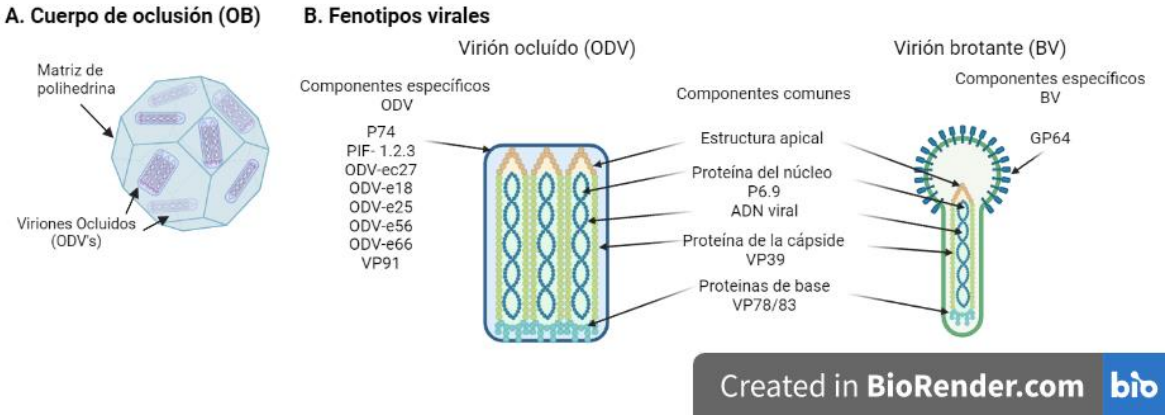
La familia de virus más utilizada en este campo es la *Baculoviriade* (Grzywacz, 2017). Los baculovirus son virus en forma de bastón que contienen ADN viral y se replican en el núcleo de las células de insecto. Las partículas virales miden entre 30 y 60 nm de diámetro y entre 250 y 300 nm de largo. El genoma del baculovirus consiste en un ADN circular covalentemente cerrado de doble hebra que tiene un tamaño de 80 a 180 kpb, dependiendo de la especie (Contreras-Gómez et al., 2014). Bergold and Wellington (1953) sugieren una composición macromolecular para virus de 72% proteína y 8 % ADN.

Dentro de esta familia de virus, el género *Alphabaculovirus* ha sido uno de los más estudiados y empleados, específicamente la especie nucleopoliedrovirus multicapsido de *Autographa californica*, o AcMNPV (Contreras-Gómez et al., 2014). Los nucleopoliedrovirus, se caracterizan por expresar una matriz proteica bajo el promotor (polh de la proteína poliedrina y formar cuerpos de oclusión (OB) que pueden albergar más de 100 viriones (van Oers, 2011) Figura 1-4,A. Los viriones se expresan en dos fenotipos morfológicos distintos, los de gemación (BV) y de oclusión (ODV) que se diferencian porque aparecen en distintas fases de la infección **Figura 1-4**,B. Además, en la infección *in vivo*, los BV's brotan de la membrana de la célula y propagan la infección de una célula a otra durante etapas tempranas de la infección. Mientras que los ODV se ensamblan en el núcleo celular y se liberan al ambiente en la etapa lítica de la infección, su conformación les permite tener una mayor estabilidad fuera del huésped. En particular, el AcMNPV puede empaquetar una (única) o un número variable (múltiple) de nucleocápsides por virión (multicapsidos) (van Oers, 2011). Otra característica fundamental de los *alphabaculovirus*,

es que la principal proteína de fusión de los BV es la GP64 y es crucial para el proceso de infección.

Figura 1-4:Cuerpos de oclusión y fenotipos virales de un virus tipo nucleopoliedrovirus multicápside. Figura tomada y adaptada de Van Oers (2011).

.



1.6 Cultivos de células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (sf9)

Los cultivos *in vitro* de células de insecto para la expresión de productos recombinantes se han desarrollado desde 1962 y se estima que se han adaptado más de 600 linajes para investigación y aplicación (M. Cox et al., 2014; Ghosh et al., 2020). Dentro de éstos linajes, los pertenecientes al orden Lepidóptera (polillas y mariposas) y Díptera (mosquitos y moscas) se destacan por su desarrollo y amplia investigación en la industria biotecnológica (M. Cox et al., 2014; Ghosh et al., 2020).

Dentro del orden Lepidóptera, se encuentran las células sf9, estas células son un clon de células *Spodoptera frugiperda* (sf21) provenientes del tejido ovárico del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* y han sido específicamente aisladas y adaptadas para crecer en suspensión (J. Drugmand et al., 2012). Estos dos últimos linajes celulares han sido ampliamente caracterizados, desde una perspectiva funcional (Berretta et al., 2013), metabólica (Bernal et al., 2009; Chiou et al., 2000; Ferrance et al., 1993; Monteiro, 2015) y

genómica (Nandakumar et al., 2017; Shu et al., 2017; Yu et al., 2015). Las características de crecimiento y cultivo tradicionales para el cultivo de sf se reportan en la **Tabla 1-2**.

Tabla 1-2: Parámetros de cultivo de células de insecto sf9. Tabla tomada y adaptada de Drugmand (2007) y Cox et al (2014).

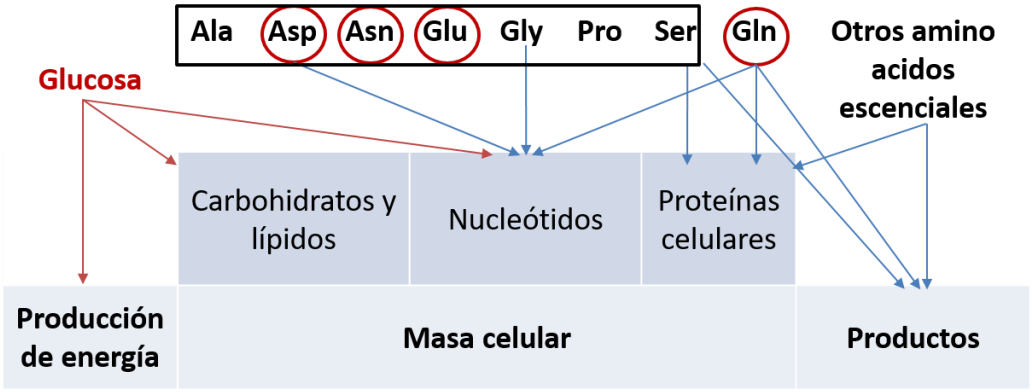
Fisiología- Condiciones de cultivo		
Tamaño celular	13	µm
Densidad celular en *batch*	4-10	10^6 cel/mL
Velocidad de crecimiento	0.025	h^{-1}
Velocidad máxima de consumo de oxígeno OURmax	0.0002 - 6.25	mmol L^{-1} h^{-1}
Temperatura de crecimiento optima	27	°C
pH optimo	6.2-6.4	
Industrialización		
Adaptado a medio libre de suero	Si	
Posibilidades de escalado	Buena	
Metabolismo		
Fuente de energía, carbono y nutrientes especiales	La fuente de carbono y energía (compuestos orgánicos), oxígeno, nitrógeno (sales, amino ácidos, proteínas), fósforo (sales).	
Tiempo típico de duración desde la inoculación hasta la etapa de producción	3-5 días	

Las células de insecto sf9 tienen un diámetro celular promedio de 13µm, pueden crecer en un rango de 25 a 30°C, sin embargo, el crecimiento celular y la productividad es frecuentemente afectada por la temperatura (M. Cox et al., 2014) y se ha examinado que, por debajo de los 27° C, la velocidad específica de crecimiento se reduce como consecuencia de menores tasas de consumo de oxígeno y glucosa y en algunos casos aumenta la productividad; mientras que, por encima de 27 °C, la densidad celular y la viabilidad decrece.

En cuanto a su metabolismo (Figura 1-5), la principal fuente de energía es glucosa, pero también se ha confirmado que pueden metabolizar azúcares como fructosa y disacáridos como sacarosa, maltosa y trehalosa (M. Cox et al., 2014). Se requieren como fuente de

nitrógeno, una variedad de aminoácidos y sales. Entre ellos aspartato, asparagina, glutamato, glutamina y serina, los cuales son consumidos a altas tasas durante el crecimiento celular para la síntesis de proteínas; mientras que amonio y alanina son subproductos del cultivo que actúan como sumidero de nitrógeno (L. Öhman et al., 1995). Aparte de utilizar el consumo de amino ácidos para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos, también se ha demostrado su consumo como fuente de energía (J. C. Drugmand, 2007), es el caso de la glutamina para células sf9. Algunos medios de cultivo incluyen la adición de componentes indefinidos como suero, extracto de levadura e hidrolizado de lactoalbúmina porque promueven el crecimiento y contienen nutrientes que pueden no estar disponibles en las formulaciones iniciales del medio de cultivo (M. Cox et al., 2014).

Figura 1-5: Metabolismo esquemático de la síntesis de masa celular y producto en células de insecto sf9*. Figura tomada y adaptada de Xie &Wang (1994).



*Glucosa como principal fuente de energía, alanina, ácido aspartato, asparagina, glutamato, glicina, prolina y serina son utilizados principalmente para la formación de proteínas y nucleótidos que forman la masa celular (recuadro negro); el resto de aminoácidos esenciales son utilizados para la formación de productos y otras estructuras proteicas; arginina, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina se han identificado que tienden a oxidarse en el ciclo TCA y proveer energía a la célula (círculos rojos).

El oxígeno es un nutriente clave para el crecimiento de este tipo de células y la tasa de consumo (OUR) varía significativamente dependiendo del linaje celular, la fase de cultivo, el sistema de cultivo y el medio (M. Cox et al., 2014). El control del oxígeno disuelto (DO,

por sus siglas en inglés) es fundamental para evitar la limitación o el exceso de oxígeno, inhibiendo la síntesis de proteasas o el daño oxidativo a las proteínas y maximizando el crecimiento celular.

Una composición macromolecular de las células sf9, de acuerdo a Ferrenace et.al.(1993) y Xie and Wang (1994) se propone como 72.9% de proteínas, 1.4% de ADN, 3.8% ARN,13.5% lípidos (Ferrance et al., 1993). Esta composición, más adelante fue adaptada por Monteiro (2015) y utilizada para describir una composición más detallada de la masa celular (Anexo A, Tabla A-1) en el crecimiento (Monteiro, 2015).

1.7 Ingeniería del bioproceso

La descripción y control de estos bioprocesos toma en cuenta otros parámetros además de los factores tradicionales en el cultivo celular (Temperatura, pH, concentración celular, agitación, pO_2), y son aquellos que dan cuenta de la productividad de las células infectadas y productos recombinantes, entre ellos los más importantes son:

- Tiempo de infección (TOI): el tiempo transcurrido desde el inicio de un cultivo y el momento de infección
- Densidad celular al momento de infección (CDI o CCI por sus siglas en inglés, cell/ml)
- Multiplicidad de infección (MOI, pfu/cell): es el número de partículas víricas infecciosas que una célula recibe. Por lo tanto, una infección con MOI alta (> 1) implica que al menos una partícula infecta una célula, por lo que se dice la infección está sincronizada (todas las células están infectadas al mismo tiempo), mientras que con MOI <1, no todas las células se infectan simultáneamente y se requieren varios ciclos de infección para infectar a toda la población celular (J. C. Drugmand, 2007).
- La densidad celular pico óptima (OPCD): la densidad celular máxima (PCD) que admite la mayor concentración de producto

Se han empleado diferentes tipos de operaciones para desarrollar esta clase de bioprocesos, entre ellas las de tipo '*batch'* o por lotes que es el más empleado, caracterizándose por ser simple, flexible y adecuado para procesos líticos, sin embargo, la

concentración celular máxima que se logra es limitada por el agotamiento de nutrientes y acumulación de residuos metabólicos como amonio y lactato (A. Contreras-Gómez et al., 2014). El modo '*fed-batch'* o discontinuo es más apropiado que el cultivo por lotes para alcanzar mayores densidades celulares, pero este tipo de operación se ve afectado por el efecto de "densidad celular" que reduce la producción específica de la proteína deseada debido a una alta concentración celular (Contreras-Gómez et al., 2014).

El reemplazo total o parcial del medio de cultivo al momento de la infección es otro modo de operación que contrarresta el efecto por densidad celular, pero involucra un impacto a nivel económico por los costos del medio de cultivo. Finalmente, la operación en continuo o perfusión, es aquella en la que el cultivo puede ser manejado cerca al estado estable y la producción de proteína puede ser continuamente removida, minimizando la degradación por enzimas proteolíticas. Es una operación más compleja que por lotes o discontinuo y no es adecuada para IC-BEVS que involucren fase de infección y lisis (Contreras-Gómez et al., 2014).

Se ha desarrollado diversos tipos de biorreactores para llevar a cabo este tipo de bioprocesos, aparte de los tradicionales tanques agitados en acero inoxidable, como los reactores airlift, reactores con balanceamiento (wave biorreactors®) que se componen de una bolsa desechable en forma de "almohada" y que está sobre una superficie que se mueve de un lado a otro, y reactores en forma cónica que son agitados siguiendo un patrón orbital de rotación similar al que es utilizado para cultivos de células en matraces agitados (Trujillo-Roldan & Valdez-Cruz, 2009), también están aquellos impresos en tres dimensiones esterilizados previamente y que pueden ser modificados o diseñados según las necesidades del usuario (Contreras-Gómez et al., 2014).

El modelamiento de bioprocesos es una herramienta ingenieril esencial en muchas industrias (Ortega Quintana et al., 2017) ya que a través de ellos se puede lograr diseños, optimizaciones, estimación de resultados, detección de fallas, entre otros, y especialmente para los BEVS otorgar versatilidad y rapidez en la aplicación de esta tecnología para la producción de fármacos recombinantes a gran escala y a menor costo. El modelamiento de este tipo de bioprocesos se ha llevado a cabo bajo distintos enfoques que tratan de

dilucidar la complejidad de este sistema y representar lo que sucede durante la infección con baculovirus. Se ha planteado modelos estequiométricos, modelos cinéticos y modelos metabólicos cuyo objetivo principal es estimar la cuantificación de las partículas virales y la proteína de interés, esto supone grandes desafíos que requieren una vasta comprensión de los fenómenos que ocurren, no obstante, la complejidad y la necesidad de obtener respuestas prontas para la implementación de este tipo de bioprocesos, ha generado el auge de la aplicación de modelos estadísticos que permitan entender y acercarse más rápido a una mejora en el proceso, optimización e implementación (Carinhas et al., 2011; Antonio Contreras-Gómez et al., 2018; Hu & Bentley, 2000).

1.7.1 Modelos estequiométricos

Gooijer (1989) propuso un primer alcance estequiométrico donde describe la reacción de infección (ver Ecuación 1.1) por el virus AcMPNV en un cultivo de células *Spodoptera frugiperda.*

$$\text{Célula de Insecto} + 20\ \text{BV} \rightarrow 200\ \text{BV} + \text{nP} \tag{1.1}$$

Aquí el número de virus no ocluídos (BV) para una MOI de 20 por célula fue calculado experimentalmente y tiene un valor de 200 virus no ocluídos aproximadamente, n representa el número de poliedros liberados (P) por célula de insecto, y tiene un valor de 25, sin embargo, puede variar con los parámetros de funcionamiento del reactor y no es fijo. Se asumieron cinéticas de primer orden para la infección y crecimiento celular. Los parámetros respectivos se calcularon experimentalmente y compararon con el modelo propuesto. Dicho análisis permitió acoplar las cinéticas de crecimiento e infección con el diseño del reactor, sin embargo, se sugiere que experimentos y otros parámetros de correlación entre la infección y el crecimiento puedan ser incluidos para validar y mejorar el modelo (de Gooijer et al., 1989).

Más adelante, Ferrance (1992) y Chiou et.al (2000) proponen otro alcance estequiométrico basado en la caracterización de las condiciones de cultivo y el medio de cultivo para la cepa sf9. Ferrance (1992) hace un análisis de las reacciones metabólicas y demuestra una estrecha relación entre las reacciones biosintéticas y energéticas entre el cultivo y el medio a nivel experimental (Ferrance et al., 1993). Mientras que Chiou (2000) más adelante, establece un modelo teórico estequiométrico para estudiar la demanda de nutrientes,

incluida la glucosa (glc), 20 aminoácidos (a) y la levadura (y), para la síntesis de masa celular empleando la cepa sf21. En este estudio los coeficientes estequiométricos(θ) para los nutrientes individuales en la ecuación estequiométrica (ver Ecuación 1.2) que rige el crecimiento de las células de insecto, se determinaron a partir de la información de la masa celular y su composición.

$$\theta_{glc}[\text{glucosa}] + \sum_{i=1}^{20} \theta_{a,i}[\text{aminoacido}]_i + \theta_y[\text{yeastolate}] = [\text{masa celular}] + \theta_{ATP}[\text{ATP}] \quad (1.2)$$

En ambos estudios se logró el diseño racional de medios de cultivo para lograr altas densidades celulares y mantener el rendimiento de proteína recombinante producto de la infección por baculovirus (Chiou et al., 2000). Sin embargo, el coeficiente estequiométrico calculado para glutamato y alanina en ambos estudios difieren en el orden de magnitud, por lo que se debe proponer un análisis más detallado en el modelo teórico propuesto por Chiou, además estos modelos no dan cuenta de la cantidad de oxígeno que se necesita para efectuar el crecimiento celular.

En el mismo año Chen-hu y Bentley (2000), desarrollaron un modelo matemático para caracterizar la infección por baculovirus, síntesis de proteínas y formación de VLP's en células de insecto como candidatos a vacuna para la bursitis infecciosa utilizando la cepa sf9. El modelo mostró concordancia con predicciones relacionadas al crecimiento celular, cinética de replicación, consumo de sustrato y muerte celular en cultivos por lotes. En esta investigación se asumió una cinética tipo Monod y velocidad de consumo de sustrato tipo Herbert-Pirt sin mantenimiento ni formación de producto para las células infectadas y no infectadas. Más aún, un análisis probabilístico y termodinámico demostró que es favorable la formación de VLP's (Hu & Bentley, 2000).

Otra investigación por Gotoh et.al (2004), estudió la velocidad específica de consumo de oxígeno en células sf9 descrita por una ecuación tipo Monod válida para un rango de temperaturas entre 20 y 34°C. Aquí se demostró que bajas temperaturas pueden mejorar la producción de proteínas y se estimaron velocidades de consumo de oxígeno máximas (Gotoh et al., 2004).

1.7.2 Modelos metabólicos

Bernal (2009), realizó por primera vez un análisis de flujos metabólicos (MFA) para cuantificar y analizar el metabolismo central de las células de linaje sf9. En este modelo se reconstruyeron las reacciones de transporte pasivo y activo para ciertos aminoácidos, glicólisis, ruta de pentosas- fosfato, el ciclo del ácido tricarboxílico, respiración, ciclos fútiles y síntesis de biomasa celular en términos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Este estudio permitió entender la interacción entre el consumo de carbono y las fuentes de nitrógeno, además de revelar la progresiva inhibición del metabolismo central cuando se tienen altas densidades celulares (Bernal et al., 2009).

Más adelante Carinhas et.al (2010), utiliza este modelo y lo complementa con las reacciones de biosíntesis de baculovirus y la síntesis de la proteína rNeuraminidasa derivada del virus de la influenza tipo N1. Estos autores logran proponer estrategias a nivel metabólico para mejorar el producto de baculovirus recombinante en las células de insectos sf9 y cumplir con los requisitos de entrega de vectores virales asociados con terapia génica clínica, logrando altos rendimientos específicos del producto objetivo (Carinhas et al., 2010), sin embargo, bajo el esquema propuesto, el nivel predictivo aún no era alcanzable (Carinhas et al., 2010).

El material más significativo en términos del análisis metabólico fue propuesto por Monteiro (2015), recopilando estudios minuciosos del metabolismo celular y enzimático tanto para células sf9 y High Five (Monteiro, 2015). De este trabajo, es fundamental para esta investigación destacar el análisis en el cual se realiza una comparación cuantitativa de los flujos intracelulares y extracelulares entre las células sf9 y High Five en la fase de crecimiento y durante la infección por baculovirus. Es clave resaltar que para el linaje sf9, durante la fase de crecimiento e infección se detectaron consumos de azúcares diferentes a la glucosa y mayores velocidades de consumo durante la infección. Así mismo la secreción de amonio y consumo de asparagina en menores cantidades que en el linaje High Five.

Una de las conclusiones notables de este artículo es el soporte científico para entender el por qué las células sf9 tienen mayores rendimientos para la amplificación de baculovirus y el por qué el linaje High Five tiene mejores rendimientos en la producción de proteínas.

Este panorama es explicado en términos de la energía disponible. Una mayor disponibilidad de energía en términos de ATP en las células sf9 puede proveer un ambiente favorable para la progresión del ciclo celular y la maduración de las partículas (Monteiro et al., 2017), mientras que el linaje High Five reorienta su actividad metabólica hacia el incremento de la actividad biosintética, un comportamiento determinante para lograr mayores rendimientos de proteínas recombinantes.

Hoy en día, el uso de herramientas basadas algoritmos de inteligencia artificial (IA) se ha empleado en este tipo de bioprocesos con el fin de superar algunas restricciones por falta de información de las redes metabólicas y actividades regulatorias. Carinhas (2011) propuso un modelo estequiométrico basado en un análisis metabólico para un sistema de células sf9 y formación de virus con composiciones estándar acoplado a un modelo estadístico para satisfacer y suplementar las reacciones e interacciones desconocidas de dicho modelo (Carinhas et al., 2011). Así mismo, otros autores han propuesto el análisis de componentes principales, la regresión de mínimos cuadrados parciales (Monteiro, 2015; Suarez-Zuluaga et al., 2019) y redes neuronales (Antonio Contreras-Gómez et al., 2018) para describir este sistema biológico, evidenciando la capacidad de la IA para complementar, proponer y desarrollar el modelamiento de los IC-BEVS.

1.7.3 Modelos cinéticos

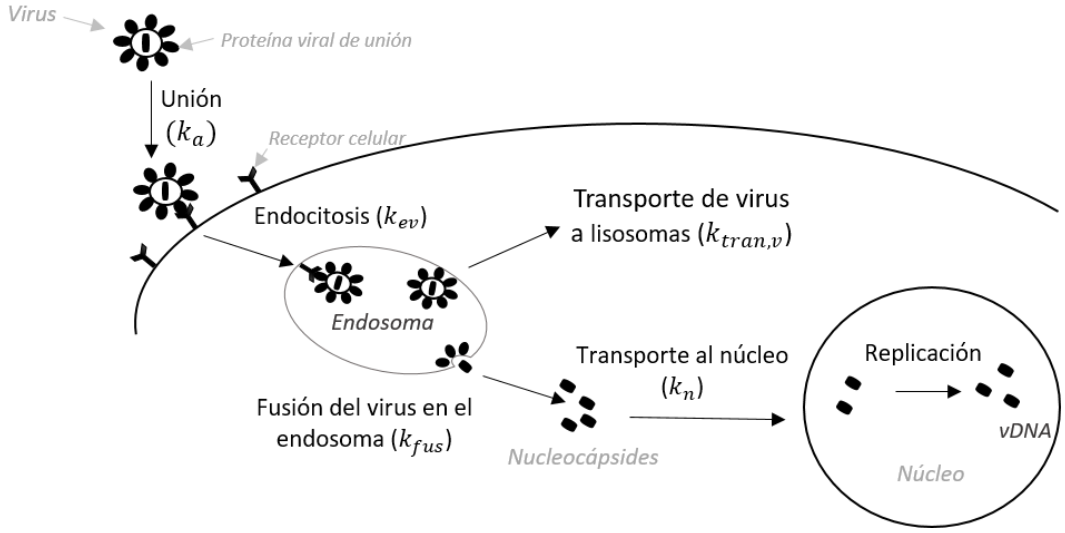
La descripción de la infección a través de modelos matemáticos ha permitido la integración de información biomolecular al modelamiento de estos procesos (Saxena et al., 2018). En particular, la cinética de infección ha sido descrita y abordada a través de módulos que describen ciertas etapas de la infección y que se han ido integrando para tener una visión más completa del ciclo de infección.

- Dee & Shuler (1996) son los autores de uno de los primeros modelos que se proponen para describir la internalización del virus. Estos autores describieron algunos de los eventos que ocurren durante la etapa inmediatamente temprana de la infección, estos son: la unión e internalización viral, fusión endosomal, enrutamiento lisosomal,

acumulación nuclear y formación de enlaces mono y multivalentes de baculovirus en células de insecto Sf21 (Dee & Shuler, 1997). El mecanismo propuesto está en función de la localización de los virus, es decir extracelulares, en el endosoma, en el citoplasma y/o en el núcleo, los cuales, se relacionan con uno o más eventos celulares que se proponen ocurrir bajo una expresión cinética de primer orden.

El mecanismo de infección para una unión monovalente bajo un solo tipo de receptor (Figura 1-6) se puede describir así: A nivel experimental el cambio en la concentración de virus extracelulares en un cultivo celular cambia proporcionalmente a la constante experimental de unión k_a . Los virus que logran internalizarse a la célula a través de endocitosis lo hacen a una constante de velocidad K_{ev}, luego en el endosoma, ocurren dos subprocesos, la fusión de la membrana del virus (K_{fus}) para liberar las nucleocapsides al citoplasma y el enrutamiento a lisosomas para su degradación ($K_{tran,v}$). Para alcanzar el núcleo y comenzar la replicación del vADN, los virus que se liberaron al citoplasma se transportan a una velocidad cuya constante de velocidad es K_n.

Figura 1-6: Mecanismo de infección de un baculovirus*. Figura tomada y adaptada de Dee & Shuler (1997).



*El virus se une a los receptores celulares y se internaliza por endocitosis. En el endosoma, el pH permite la fusión de la membrana viral con la endosomal liberando la nucleocápside al citoplasma, o bien hay una redirección de los virus hacia los lisosomas para degradación. Finalmente, las nucleocapsides en el citoplasma se transportan al núcleo para su replicación.

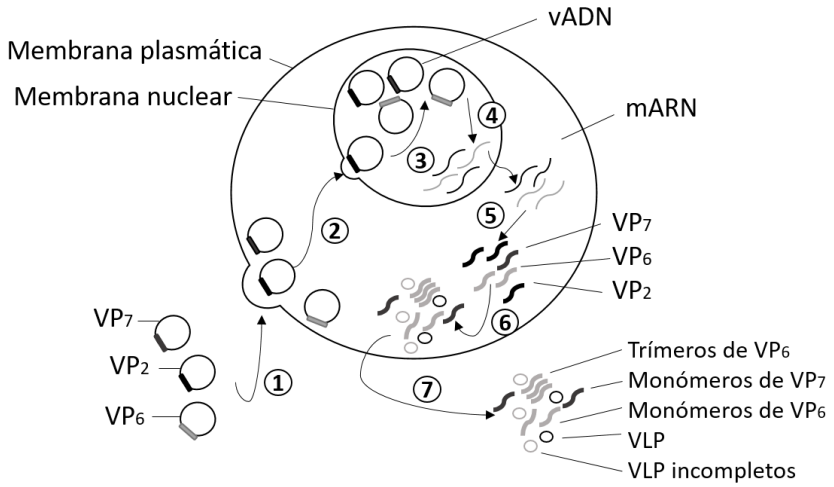
De acuerdo con Dee & Shuler (1997), en teoría, k_a $(k_a = (\alpha R_{sf} k_f))$, representa la agrupación de varios términos que influyen en la constante de unión. Uno de estos términos es cantidad de proteínas virales α que tiene un virus, la cantidad de receptores celulares R_{sf} de la célula huésped y la constante intrínseca de unión k_f de una proteína viral a un receptor, que en conjunto hacen única la interacción en un sistema IC-BEVS. Para el virus AcMNPV, se atribuye la unión a las células de insecto por la glicoproteína viral GP64 que se estima son 1000 glicoproteínas por virus$(\alpha \sim 1000)$. En cuanto a los receptores celulares (R_{sf}), asumen a partir de un ajuste experimental, debe ser un valor entre 10000 a 12000 receptores por célula. Además, es importante resaltar que la velocidad de unión depende de la concentración celular al momento de infección (CCI) ya que K_a es una constante volumétrica.

Los autores proponen que K_a puede tomar un valor máximo cuando la velocidad de unión está limitada únicamente por la difusión de la partícula viral ($K_{a_{max}}$), la cual se puede estimar a través de la ecuación de Smoluchowski (Dee & Shuler, 1997) y para un virus AcMNPV en forma de bastón de tamaño estándar $K_{a_{max}} = 1.62 \cdot 10^{-6} cm^3/cell \cdot h$. En condiciones experimentales y con medios con suero añadido, se reporta que la velocidad de unión es una reacción limitada por lo que el valor de K_a para un sistema de células de insecto del linaje sf21 y un virus AcMNPV cultivado en suspensión a 28°C es $K_a = 7.8 \cdot 10^{-8}\ c\,m^3/c\,ell \cdot h$.

- Roldão et al (2007) es otro autor que analiza y describe cinéticamente un sistema de células de insecto Sf9 con la infección de baculovirus recombinantes para la expresión de una estructura proteica de rotavirus (VLP's) conformada por tres proteínas (2,6 y 7): VP_2, VP_6 y VP_7. De las cuales las dos primeras son estructurales y la última una proteína glicosilada (Figura 1-7). En este análisis se retoman los conceptos planteados por Dee & Shuler (1997) y se plantean ecuaciones adicionales para describir posteriores eventos durante la infección, como la replicación del ADN viral, síntesis de mARN y síntesis de las proteínas virales que también se propone ocurren bajo cinéticas de primer orden. En este estudio se segregan las poblaciones celulares que son infectadas de las que no y se define una función limitante que refleja la pérdida de la

habilidad celular para sintetizar ADN viral y proteína recombinante a lo largo de la infección.

Figura 1-7: Mecanismo de infección para una co-infección con tres baculovirus monocistrónicos*. Figura tomada y adaptada de Roldão et al., (2007).



*Paso (1) unión y adsorción de los virus, (2) internalización de los virus, (3) replicación de vADN, (4) transcripción de vADN en el mRNA correspondiente, (5) síntesis de proteínas VP, (6) ensamblaje de estructura porteíca (Rota VLP) y (7) liberación de Rota VLP al medio extracelular.

Para una co-infección con tres virus monocistrónicos el mecanismo que se propone se representa en la Figura 1-7. El modelo se basa en la cantidad de células infectadas y no infectadas y el agotamiento del virus extracelular debido a la infección. La infección inicia con un alcance similar al de Dee & Shuler (1997), la unión virus-célula depende de una constante de unión K_a (Figura 1-7, paso 1). Luego el virus se internaliza por endocitosis, se fusiona con la membrana endosomal y las nucleocápsides se transportan al núcleo (Figura 1-7, paso 2), a este conjunto de tres subprocesos se le denominan "tráfico viral" y se estima que dura alrededor de 1.8 h. Posteriormente, una vez alcanzado el núcleo, la replicación del ADN viral iniciará alrededor de 6 hpi (Figura 1-7, paso 3) y su cinética depende de una constante de replicación de primer orden K_{rDNA}. Más adelante, ocurre la transcripción de los genes de las proteínas (VP_2, VP_6 y VP_7) que se encuentran bajo el control del promotor polH (Figura 1-7, paso 4) y se representan por cinéticas de primer orden, cuyas constantes de velocidad son $K_{sRNA_{VP_2}}, K_{sRNA_{VP_6}}, K_{sRNA_{VP_7}}$. Una vez el mARN se encuentra en el citoplasma,

comienza la síntesis de la proteína (Figura 1-7, paso 5), se presume que ocurre bajo una cinética tipo Michaelis-Menten, cuya máxima velocidad de síntesis es $K_{VP_2}, K_{VP_6}, K_{VP_7}$ respectivamente. En seguida, las proteínas se ensamblan para conformar la estructura proteica (Rota VLP) (Figura 1-7, paso 6) para finalmente liberarse al medio extracelular (figura 1-7, paso 7). Debido a que el mecanismo de ensamblaje no es muy claro, los autores asumen que el ensamblaje de los Rota VLP ocurre con la formación de trímeros de algunas proteínas para formar una estructura icosaedrica por lo que existe la posibilidad de que otras estructuras estables se formen y se liberen al medio.

De acuerdo con Roldão et al., (2007) la replicación del ADN, la síntesis de mRNA y de proteína se ven afectadas gradualmente a medida que la infección ocurre, por lo que están definidas dentro de un marco de tiempo y se asumen que decaen linealmente. También, en Roldão et al., (2007), K_a tiene un valor igual al reportado por Dee & Shuler (1997) para este sistema, ya que se mantiene la interacción entre AcMNPV y células del linaje sf (se asume que el linaje celular sf21 y sf9 tienen velocidades de unión e internalización similares).

En cuanto a la replicación del ADN, encontraron que ocurre a una tasa de $K_{rDNA} = 0.09\ \mathrm{h}^{-1}$ y parece ser independiente del constructo empleado. Respecto a la velocidad de síntesis de mARN, para las proteínas VP_2, VP_6 y VP_7 encontraron que la constante de síntesis no es igual para todas (0.12, 0.16 y 0.11h^{-1}, respectivamente) y que esta varía principalmente debido a los sitios de restricción empleados para la clonación en cada constructo y no por el tamaño del gen de la proteína (Roldão et al., 2007). Por otra parte, el modelamiento de la síntesis de la proteína de interés resultó adecuado bajo la cinética de Michaelis - Menten y especialmente se encontró que la máxima velocidad de síntesis de cada proteína varía considerablemente ($0.19, 0.11\ y\ 0.058\ \mu g \cdot 10^6/cell \cdot h$, respectivamente) lo que se atribuye a diferencias en la secuencia del codón de inicio y /o al tiempo de maduración de la proteína (puesto que proteínas más complejas requieren modificaciones postraduccionales). Esto último particularmente

reflejado en la proteína VP_7 que es la única glicosilada y se evidencia una menor velocidad de síntesis.

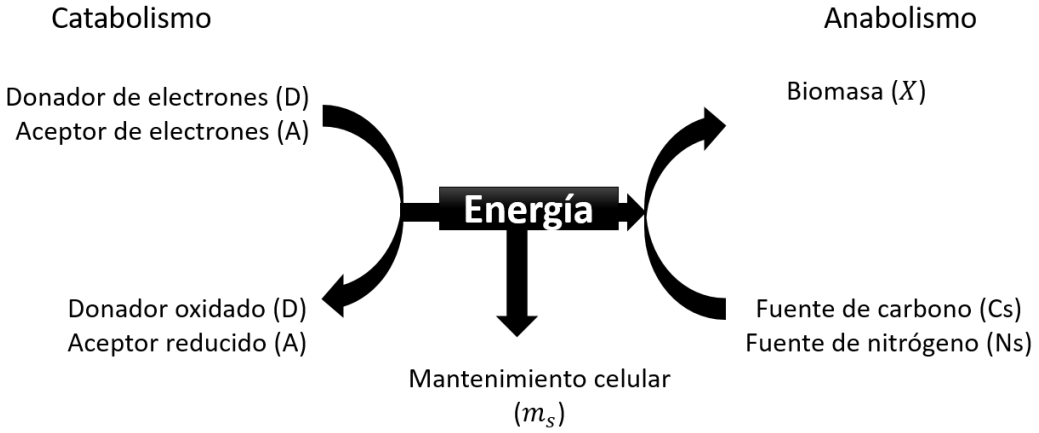
Finalmente, en este estudio aparece un nuevo evento celular y es el de muerte celular. Para células no infectadas, la muerte ocurre por circunstancias intrínsecas representada por una constante cinética de primer orden de $K_{d_1} = 0.008\ h^{-1}$. Cuando las células son infectadas, se ha evidenciado que la muerte celular incrementa de acuerdo con la cantidad de ADN viral en la célula, por lo que es más complejo estimar un valor.

1.8 Modelos termodinámicos de caja negra

La complejidad de modelar un sistema vivo (toda la célula) puede ser reducida al considerar las células como una caja negra en donde solo se tienen en cuenta las entradas y salidas del sistema, lo que implica una disminución en el número de parámetros a calcular, a este tipo de modelos se les conoce como caja negra o "*black box*". Este tipo de modelo se basa principalmente en la condición de un estado pseudo-estacionario que se asume al calcular el límite osmótico, el cuál conduce a concentraciones de metabolitos muy bajas en el metabolismo intracelular, por lo que todas las velocidades de consumo y secreción están directamente acopladas (Heinen, 2010). Heijnen & Van Dijken han aplicado este alcance a crecimientos heterotróficos bajo la condición de sustrato limitante y es de resaltar que la única información necesaria es la naturaleza de la fuente de carbono, el donante de electrones, el aceptor de electrones, la fuente de N y la temperatura (Heinen, 2010).

Los parámetros y grados de libertad para este tipo de modelos están determinados por el número de procesos independientes que se lleven a cabo, generalmente, crecimiento, formación de producto y mantenimiento, cada uno de estos procesos se caracteriza por una reacción que es una combinación de anabolismo y catabolismo (para la reacción de la biomasa y el producto) o puramente catabolismo (mantenimiento). El papel del catabolismo es proveer energía libre a través de la reacción redox entre un donador y un aceptor de electrones y el anabolismo, representar la conversión de los nutrientes en biomasa celular (Figura 1-8).

Figura 1-8: Definición del sistema en un modelo de caja negra. Figura tomada y adaptada de Heijnen & Kleerebezem (2010).



Cada uno de estos procesos está limitado por la cantidad de energía disponible, por lo que el balance de energía libre de Gibbs (Ecuación 1.3) será:

$$\sum q_i \Delta G_{fi}^0 + q_G = 0 \quad (1.3)$$

dónde (q_i) son las velocidades específicas de consumo (refieren signo negativo) y secreción (signo positivo), ΔG_{fi}^0 es la energía de formación del compuesto i a condiciones estándar y q_G la cantidad de energía libre de Gibbs producida. Aquí, la sumatoria debe ser una cantidad negativa (segunda ley de la termodinámica) y por lo tanto q_G >0 (Heinen, 2010).

Las relaciones de consumo y secreción pueden ser expresadas mediante una combinación lineal de las velocidades específicas de dichos procesos, y para ello es fundamental establecer una relación para la distribución del sustrato, entre ellas la más útil es del tipo Herbert-Pirt (Ecuación 1.4)

$$q_s = a\mu + bq_p + m_s \quad (1.4)$$

Donde: $a\ (mol\ S/Cmol\ X)$: Sustrato requerido para formación de biomasa, $b\ (mol\ S/mol\ P)$: Sustrato requerido para la formación de producto, $m_s\ (mol\ S/Cmol\ X \cdot h)$: Sustrato requerido para mantenimiento, $\mu\ (h^{-1})$: Velocidad específica de crecimiento y $q_p\ \big((mol\ P/C - mol\ X \cdot h)\big)$: Velocidad específica de formación de producto

Así, se requiere encontrar a, b y m_s para determinar la estequiometría del proceso.

1.8.1 Producción de energía catabólica

Estableciendo la reacción catabólica para un mol del donador de electrones a las condiciones celulares, se obtiene la energía libre de Gibbs que entrega dicha reacción, los coeficientes estequiométricos de los productos de esta conversión se calculan a través de balances elementales. Por lo tanto, primero se debe determinar la pareja de donador/aceptor de electrones, y luego mediante un balance de grados de reducción, es posible encontrar la mínima cantidad de aceptor de electrones que se requiere por mol de donador así:

$$Y_{AD,min} = \frac{\gamma_{Aceptor}}{\gamma_{Donador}} \quad (1.5)$$

Luego, se procede a balancear el resto de las especies involucradas en la reacción (como H_2O, CO_2 y H^+) y a partir de sus coeficientes estequiométricos (v_i) se establece la energía catabólica (Ecuación 1.6). Se debe tener en cuenta la variación de la energía libre de Gibbs con factores como la temperatura, pH y concentraciones cuando las condiciones a las que se da la reacción no corresponden a condiciones estándar y se deben aplicar las correcciones a que haya lugar.

$$\Delta_{cat}G = -\Delta_R G^{o'} = -\left(\sum_{i=1}^{n} v_i \Delta_f G_i\right) \quad (1.6)$$

La cantidad de $\Delta_{cat}G^{o'}$ debe evaluarse puesto que debe ser lo suficientemente exergónica ($\Delta_{cat}G^{o'}$ >15 kJ mol^{-1}) para generar energía biológica útil y que se pueda acoplar a los procesos celulares que demanden energía.

1.8.2 Predicción de los parámetros Herbert -Pirt

- Coeficiente de crecimiento a

De acuerdo a la Ecuación 1.4, el parámetro a representa la cantidad de sustrato que se necesita para la formación de biomasa, luego este parámetro se compone de dos términos, el primero que corresponde a la cantidad de sustrato necesario para formar una mol de biomasa (actúa como fuente de carbono), y una cantidad de sustrato adicional que se toma para liberar cierta cantidad de energía catabólica necesaria para impulsar la reacción anabólica a_{cat} , por lo tanto, la estequiometría de la reacción de crecimiento global es igual a la suma de la reacción anabólica y una cierta cantidad de reacción catabólica :

$$a = a_{ana} + f_{cat} a_{cat} \tag{1.7}$$

, donde a_{ana} se deduce del planteamiento de la reacción anabólica o del balance de grados de reducción (Ecuación 1.8):

$$a_{ana} \cdot (donador\ de\ electrones/fuente\ de\ carbono) + b_{ana} \cdot Fuente\ de\ nitrogeno + c_{ana}H^+ + d_{ana}H_2O + e_{ana}CO_2 + 1Biomasa \quad \text{ó}$$

$$a_{ana} = \frac{\gamma_X}{\gamma_C} \tag{1.8}$$

El factor de multiplicación para el catabolismo f_{cat} es igual al número de veces que la reacción catabólica necesita ejecutarse para generar suficiente energía para impulsar la reacción anabólica, luego:

$$\mathrm{f_{cat}} = \frac{\Delta \mathrm{G_{diss}^{max}} + \Delta \mathrm{G_{ana}}}{\Delta \mathrm{G_{cat}}} \tag{1.9}$$

donde, $\Delta \mathrm{G_{ana}}$ es el cambio en la energía libre de Gibbs de la ecuación (1.8) y $\Delta \mathrm{G_{diss}^{max}}$ es el valor de energía libre de Gibbs necesario para la producción de 1 $\mathrm{C\ mol}$ de biomasa que se estima, mediante la correlación empírica (Heijnen & Kleerebezem, 2010):

$$\Delta \mathrm{G_{diss}^{max}} = 200 + 18 \cdot (6 - NoC_{cs})^{1.8} + \exp\{((3.8 - \gamma_{Cs})^2)^{0.16} \cdot (3.6 + 0.4 \cdot NoC_{Cs})\} \tag{1.10}$$

- Coeficiente de mantenimiento m_s

La cantidad de sustrato que se invierte para procesos de mantenimiento celular (como la recirculación de materiales, desnaturalización y reensamblaje de proteínas entre otros), se estima a partir de la correlación (Ecuación 1.11):

$$m_G = 4.5 \exp\left[\frac{-69000}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right] \quad (1.11)$$

Esta correlación tiene +-40% de precisión para un rango de 5-75°C y asume que los requerimientos energéticos dependen de la temperatura mediante una función tipo Arrhenius con una energía de activación de 69kJ/mol. Esta expresión se basa en resultados experimentales de diferentes cultivos bajo carbono limitante. Dentro de los cultivos experimentales empleados para la correlación se utilizaron varios microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y células de plantas, luego la expresión no es restrictiva a procariontes (Heijnen & Kleerebezem, 2010).

Por lo tanto, m_S será:

$$m_S = \frac{m_G}{\Delta_{cat}G} \quad (1.12)$$

- Coeficiente de producto

Cuando se desea expresar, analizar o existe la presencia de productos en el metabolismo celular, el parámetro b representa la demanda de sustrato necesaria para su formación (Ecuación 1.13) y se determina bajo un procedimiento similar al de a, es decir se debe calcular la mínima cantidad de sustrato que se necesita para la formación de 1 mol de producto, establecer la reacción y determinar su factibilidad de acuerdo con la energía libre de Gibbs de la reacción teórica $(\Delta_P G_{th})$. Así entonces ésta determinará, la necesidad o no de energía catabólica adicional que se calcula mediante la relación de las energías $\Delta_P G_{th}$ y $\Delta_{cat}G$ para una eficiencia de conversión η del 50%.

$$b = b_{min} + b_{cat} + b_{TDF} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} + \frac{\Delta_P G_{th}}{\Delta_{cat}G \cdot \eta} + \frac{np \cdot 10}{\Delta_{cat}G} \quad (1.13)$$

Por lo tanto, si $\Delta_P G_{th} \ll 0$, el producto no necesita energía catabólica para proceder luego $b_{cat} = 0$, si $\Delta_P G_{th} > 0$ la reacción de producto teórica necesita energía que se calcula como

b_{cat}. El último término se refiere a la necesidad de incluir la energía que se necesita para la formación de polímeros biológicos y se denomina como la fuerza motriz termodinámica (TDF) que depende del número de carbonos del producto np.

1.9 Construcción y análisis de modelos metabólicos

Los modelos de redes metabólicas representan todas las reacciones bioquímicas y los flujos de materiales dentro de las células. Estas redes conectan los metabolitos en el exterior e interior celular a través de las reacciones intracelulares y las de intercambio con el ambiente extracelular. Su reconstrucción, generalmente computacional, busca simular el funcionamiento del sistema modelado basado en restricciones teóricas y/o experimentales. Entre los métodos de análisis están: análisis de flujo metabólico (MFA), análisis de balance de flujo (FBA), rutas extremas (EP) o modos elementales (EM). MFA y FBA tienen como objetivo la cuantificación del flujo, mientras que EP o EM se utilizan para inferir las propiedades del flujo (von Stosch et al., 2014).

El análisis de flujos metabólico (MFA), es un tipo de análisis que se basa en restricciones estequiométricas dadas por la medición de variables extracelulares (como velocidades de consumo y secreción) para cuantificar flujos metabólicos internos en una red metabólica previamente definida (Antoniewicz, 2015). Algunas de las aplicaciones del MFA es la cuantificación de flujos a condiciones industriales relevantes, como la limitación de nutrientes o la presencia de inhibidores de crecimiento, también se emplean para la determinación de rendimientos de metabolitos clave en el crecimiento celular como ATP, NADH y NADPH. (Antoniewicz, 2021).

En un MFA, la red metabólica compuesta por *n* reacciones y *m* metabolitos representa la matriz estequiométrica A y asumiendo la hipótesis metabólica para metabolitos intracelulares en un escenario en estado pseudo-estable, los flujos metabólicos (v) están restringidos por la matriz A así:

$$A \times v = 0 \tag{1.14}$$

Para estimar los flujos metabólicos, las restricciones estequiométricas se complementan con tasas metabólicas externas medidas (r):

$$R \times v = r \tag{1.15}$$

Por lo tanto, el sistema de ecuaciones (1.14 y 1.15), se resuelve por una regresión de mínimos cuadrados

$$\min SSR = \sum (r - r_m)^2 / \sigma_r^2 \tag{1.16}$$

Con este enfoque, los flujos metabólicos se pueden estimar en sistemas que están completamente determinados (es decir, que contienen todas las mediciones de tasa externa necesarias) y sobredeterminados (es decir, que contienen un conjunto redundante de mediciones de tasa externa).

1.10 Análisis de escala de tiempo y los tiempos característicos

A pesar de que los análisis de flujo metabólico son una herramienta muy potente en la ingeniería metabólica, presenta algunas limitaciones e inconsistencias porque requieren información adicional, como la regulación y control que pueden ser integradas mediante modelos cinéticos, sin embargo, la mayoría no están bien definidos (Baart y Martens, 2012) y aún más, esta escases de información, se evidencia en sistemas eucariontes cuya aplicación ha sido limitada por su alta complejidad (Carinhas et al., 2011; Niklas et al., 2010). En particular, para la infección por baculovirus, los modelos metabólicos aún no son lo suficientemente robustos para predecir flujos y se ha recurrido a diferentes técnicas predictivas para su análisis (Carinhas et al., 2011).

En este trabajo se propone un análisis cinético de la infección bajo un tipo de análisis denominado análisis de escala de tiempo (TSA), el cual es según Jovanovic et al., (2021) "…una herramienta analítica de ingeniería y un enfoque de diseño en el que todos los procesos, tasas, flujos, tiempos de contacto o cualquier otro fenómeno dinámico en un proceso observado se representan mediante sus correspondientes tiempos

característicos. El tiempo característico es "un tiempo", medido en unidades de tiempo, que representa objetivamente la velocidad o intensidad de cualquier fenómeno dinámico en un proceso (bio)químico…". Los tiempos característicos se obtienen de los rigurosos modelos matemáticos y cinéticos que describen un fenómeno o subproceso en particular.

Ahora bien, según Níelsen y Villadsen (1994), los modelos cinéticos son "… una correlación verbal o matemática entre las velocidades y concentración de reactantes/productos, los cuales son insertados en balances de materia y permiten la predicción del grado de conversión de sustratos y el rendimiento de productos individuales en otras condiciones de operación…". Los modelos cinéticos pueden considerar la biomasa como una entidad descrita solo por su concentración (modelos no estructurados), lo que implica que no se tienen en cuenta los cambios internos de las células o bien, sí tener en cuenta dichos cambios internos y sus componentes intracelulares (modelos estructurados) que proporcionan una mejor comprensión del sistema (Almudena, 1999).

Entonces, desde un punto de vista general (Figura 1.9), un proceso químico o biológico implica la ocurrencia de uno o varios fenómenos (subprocesos) que ocurren en secuencia o en paralelo a ciertas velocidades (las cuáles se expresan generalmente mediante modelos cinéticos) y aquellas velocidades se pueden representar en términos de constantes de tiempo únicas (tiempos característicos), las cuales son una herramienta para determinar la escala de tiempo a la que ocurren dichos subprocesos (procesos rápidos o lentos) (Morgenroth, 2015).

Figura 1-9: Representación esquemática de los tiempos característicos en un proceso.

La descripción de la infección a través de modelos matemáticos ha permitido la integración de información biomolecular al modelamiento de estos procesos (Saxena et al., 2018). En particular, la cinética de infección ha sido descrita y abordada a través de módulos que describen ciertas etapas de la infección y que se han ido integrando para tener una visión más completa del ciclo de infección.

2. Problema de investigación y objetivos

2.1 Planteamiento del problema

¿Cómo reconstruir un modelo de caja negra para el cultivo de células de insectos basado en principios termodinámicos y cinéticos que a su vez den cuenta del estado metabólico celular al momento de la infección por baculovirus?

2.2 Hipótesis

La combinación del análisis termodinámico y la estequiometría de reacción con los parámetros cinéticos permite la descripción cuantitativa del cultivo de células de insecto (sf9) y se relaciona estrechamente con los fenotipos descritos por los modelos metabólicos propuestos hasta el momento, lo que implica que puede ser utilizado para predecir velocidades de consumo y secreción de las células y de esta manera acelerar la interpretación y desarrollo de productos recombinantes mediante la expresión de baculovirus.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento e infección de células *Spodoptera frugiperda* (sf9) mediante un enfoque termodinámico y metabólico *in silico* como plataforma para el entendimiento y mejoramiento de la producción de fármacos recombinantes**.**

2.3.2 Objetivos específicos

- Proponer un modelo caja negra basado en la bioenergética del proceso estableciendo las relaciones correspondientes a la distribución de sustrato para la etapa de crecimiento.

- Complementar el análisis del modelo de caja negra con un modelo metabólico propuesto en la literatura para células de insecto sf9 en la etapa de crecimiento e infección.

- Analizar desde una perspectiva cinética la evolución de los subprocesos de infección y crecimiento celular.

3. Metodología

3.1 Estimación de la reacción de proceso mediante el modelo de caja negra

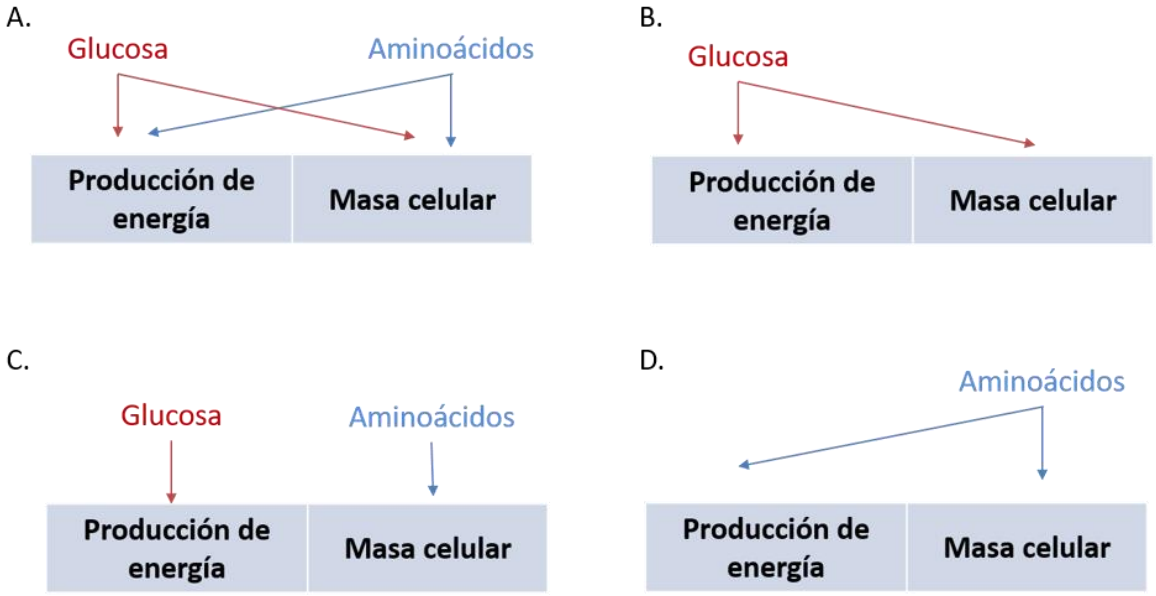
Para describir la bioenergética del crecimiento de células de insecto se utilizó la propuesta por Heijnen & Kleerebezem (2010). Esta metodología principalmente se dirige al análisis del crecimiento microbiano, sin embargo, partiendo del supuesto general que la termodinámica que rige los bioprocesos de crecimiento heterotrófico en el que la energía libre de Gibbs que se obtiene de un sustrato (Donador de electrones) en la reacción catabólica, es esencial tanto para microorganismos, como para organismos superiores (Heijnen & Kleerebezem, 2010) por lo que el sistema en cuestión puede describirse bajo este alcance. Además, en cada paso metodológico se analizan las consideraciones bajo las cuales se han estimado algunas correlaciones y parámetros de esta metodología para demostrar su validez y aplicación. Los resultados obtenidos son comparados y analizados a través de resultados experimentales y modelos teóricos disponibles en la literatura.

Bajo esta visión, se propone encontrar la relación estequiométrica global del crecimiento (Ecuacion 3.1) la cuál es una combinación de la reacción catabólica y la reacción anabólica, que se refieren a la obtención de energía libre y la formación de proteínas, lípidos y estructuras celulares (biomasa), respectivamente, haciendo uso de relaciones termodinámicas, balances elementales de masa, energía y carga.

$$\frac{-ms}{\mu}(reacción\ catabólica) + 1\ (reacción\ de\ biomasa) \tag{3.1}$$

En primer lugar, es importante establecer la distribución del sustrato, que sigue una relación tipo Herbert- Pirt (Ecuación 1.4). Para ello, se tomaron en cuenta los subprocesos independientes de crecimiento y mantenimiento celular.

Figura 3-1: Escenarios para el análisis del metabolismo de células de insecto.



La demanda de nutrientes de cultivos animales es mucho mayor a la de microorganismos, las células tienden a producir subproductos tóxicos y su metabolismo y crecimiento es altamente variable por lo que hace un poco más complejo su análisis (Xie & Wang, 1994) y se deben tener en cuenta en la construcción del modelo de caja negra. Como se mencionó en la sección 1.6 en el metabolismo de las células de insecto sf9 los aminoácidos tienen un papel fundamental en la formación de biomasa y generalmente también para la obtención de energía (Figura 3-1 A). Bajo esta perspectiva se analizaron 2 escenarios, el primero, en el que se propone un modelo de caja negra dependiente de glucosa como donador de electrones y fuente de carbono utilizando amonio como fuente de nitrógeno (Figura 3-1 B), y el segundo, que también toma la glucosa como el donador de electrones con la diferencia que propone una fuente orgánica de nitrógeno que tiene en cuenta la contribución de carbono y nitrógeno de los aminoácidos (Figura 3-1 C). Un tercer escenario

que daría a lugar es el sostenimiento del cultivo únicamente a partir de aminoácidos (Figura 3-1 D), del que se discutirá brevemente en el escenario 2 (Figura 3-1 C).

En cuanto a la formación de subproductos, alanina, lactato y amonio son las principales moléculas resultantes del metabolismo celular, sin embargo, éstos ocurren fundamentalmente a concentraciones altas de glucosa y/o aminoácidos (Monteiro, 2015; L. Öhman et al., 1995; Xie & Wang, 1994). En particular, el diseño de los modelos de caja negra se realizó teniendo en cuenta lo siguiente:

- La disponibilidad tanto de glucosa como de nitrógeno es limitante, luego la formación de subproductos como alanina y amonio se reduce drásticamente (L. Öhman et al., 1995; Xie & Wang, 1994). Según la literatura (Bhatia et al., 1997; L. Öhman et al., 1995), la concentración limitante de glucosa a la cual no hay formación de alanina oscila de 0.2-4 mM.
- No se desea el consumo de glutamina para la síntesis de aminoácidos no esenciales debido a la formación de amoníaco que la acompaña. La estrategia clave para disminuir la formación de amoníaco es aumentar la incorporación de aminoácidos extracelulares no esenciales en la masa celular ((Xie & Wang, 1994).

3.1.1 Estimación de la fuente orgánica de nitrógeno

Una de las principales diferencias entre las células de insecto con microorganismos, es que las primeras obtienen el nitrógeno amoniacal (NH_4^+) necesario para la reacción anabólica a partir del metabolismo de fuentes orgánicas de nitrógeno$(C_nH_kO_jN_i{}^r)$ que implícitamente también actúan como fuente de carbono. Para estimar una fuente de nitrógeno orgánica, se optó por determinar una fórmula molecular que dé cuenta de la cantidad de átomos que aporta cada uno de los 20 aminoácidos necesarios para el cultivo de estas células. Dicha fórmula se calculó a partir de las composiciones másicas y molares reportadas por Monteiro (2015) y evaluando el estado de disociación de cada aminoácido en el pH de trabajo (Anexo C, Tabla C-3). El grado de reducción (γ_N) de la fuente de nitrógeno se determinó utilizando los valores de referencia biológicos de cada elemento (Heinen, 2010). Este nuevo compuesto resulta ser una ‘mezcla’ de amino ácidos, por lo que la energía libre de Gibbs se estima a partir del aporte molar de cada aminoácido siguiendo la metodología de Gibbs-Duhem para propiedades extensivas de una mezcla (Sandler, 2006),

3.1.2 Estimación de la fórmula elemental de la biomasa

La estimación de la fórmula molecular de la biomasa fue deducida a partir de los coeficientes molares y composición macromolecular reportada para el linaje celular sf9 en Monteiro (2015) en la etapa de crecimiento (Anexo A, Tabla A-1). Esta descripción representa un 91.6% (w/w) de la biomasa celular entre lo que considera 72.9% de proteínas, distribuido en 20 aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), 1.4% (w/w) de ADN distribuido entre 4 desoxirribosas (dAMP, dCMP, dGMP, DTMP), 3.8%(w/w) de ARN distribuido en 4 nucleótidos (AMPRN, CMPRN,GMPRN,UMPRN) y 13.5% de ácidos grasos.

Para estimar la composición elemental de la biomasa, se tomó la fórmula molecular de cada compuesto [3] y los coeficientes molares reportados por Monteiro (2015) para calcular la contribución de cada elemento por célula. Para ello se tomaron las siguientes consideraciones: 1. La fórmula molecular de nucleótidos de ADN y ARN son iguales, con el fin de mantener la integridad de los datos reportados por Monteiro (2015). 2. Los ácidos grasos que componen principalmente el linaje celular sf9 corresponden a ácido oleico (48%w/w), ácido palmitoleico (21.5%w/w), ácido esteárico (17.9%w/w) y ácido palmítico (4.5%w/w), en cuanto a fosfolípidos hay abundancia de Fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina (3,4 % y 0,7 %w/w respectivamente)((Marheineke et al., 1998), sin embargo, Ferrance (1993) propone una formula molecular aproximada para ácidos grasos que corresponde en asumir al principal precursor de su síntesis (ACOA), al realizar los cálculos correspondientes se determinó que esta última resulta estar más acorde con lo reportado por Monteiro (2015). El grado de reducción (γ_{aa}) se determinó utilizando los valores de referencia biológicos de cada elemento, la energía libre de Gibbs de formación y su entalpía se tomaron como los predeterminados para una composición de biomasa estándar (Heinen, 2010).

[3] Las propiedades moleculares de cada compuesto fueron consultadas en Equilibrator 3.0 interfaz libre y disponible en https://equilibrator.weizmann.ac.il/

3.2 Análisis de los modelos de caja negra.

Los modelos de caja negra se compararon entre sí a través de parámetros como la eficiencia energética, el coeficiente de respiración RQS, rendimientos y algunos valores reportados en la literatura para células de insecto.

3.3 Planteamiento del modelo metabólico

El modelo metabólico utilizado para el análisis de flujos fue el publicado por Monteiro (2015). Este modelo se basa en el modelo metabólico previamente reportado por Bernal (2009) y Carinhas (2011), el cual tiene en cuenta las principales rutas centrales del metabolismo de células sf9 que son: glicólisis, ruta de pentosas fosfato, el ciclo de ácidos tricarboxílicos, respiración, ciclos fútiles y síntesis de biomasa celular en términos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, además de incluir reacciones de transporte pasivo y activo para determinadas sustancias como el sustrato, aminoácidos y gases como oxígeno, amonio y dióxido de carbono. La lista de reacciones consideradas se encuentra en el Anexo B, Tabla B-2. Los resultados de los flujos metabólicos se analizaron bajo los nodos más importantes del metabolismo celular: el nodo Piruvato y oxoglutarato (Anexo B, Tabla B-3 y B-4).

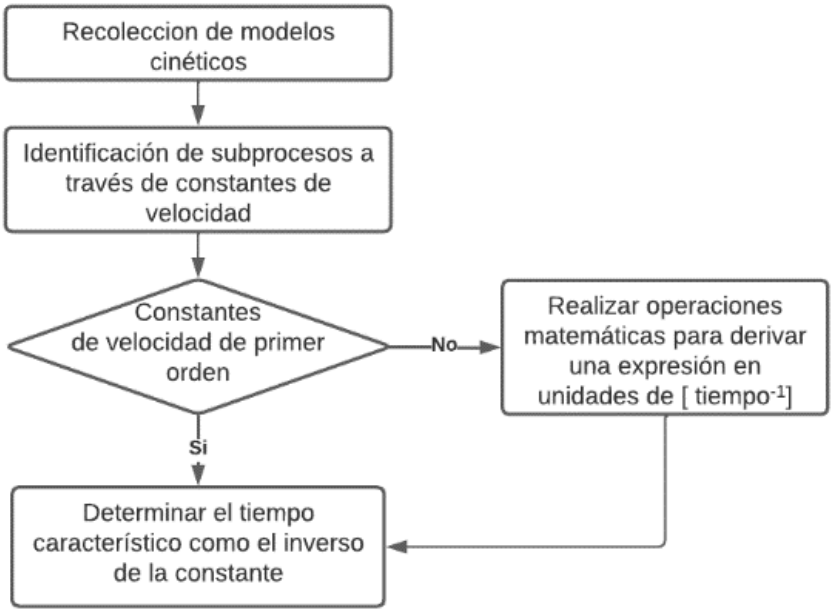
3.4 Simulaciones computacionales

Los análisis a nivel metabólico se realizaron en el software CellNetAnalayzer (von Kamp et al., 2017) mediante el método MFA utilizando como entrada los valores obtenidos en los modelos de caja negra y definiendo a priori condiciones deseadas de acuerdo al foco de estudio. En todos los escenarios propuestos, los sistemas fueron redundantes por lo que se solucionaron por el método de mínimos cuadrados ponderados utilizando la matriz pseudo inversa de Penrose (Bernal et al., 2009).

3.5 Identificación de tiempos característicos

Para determinar los tiempos característicos a partir de modelos cinéticos se propone la siguiente metodología Figura (3.2).

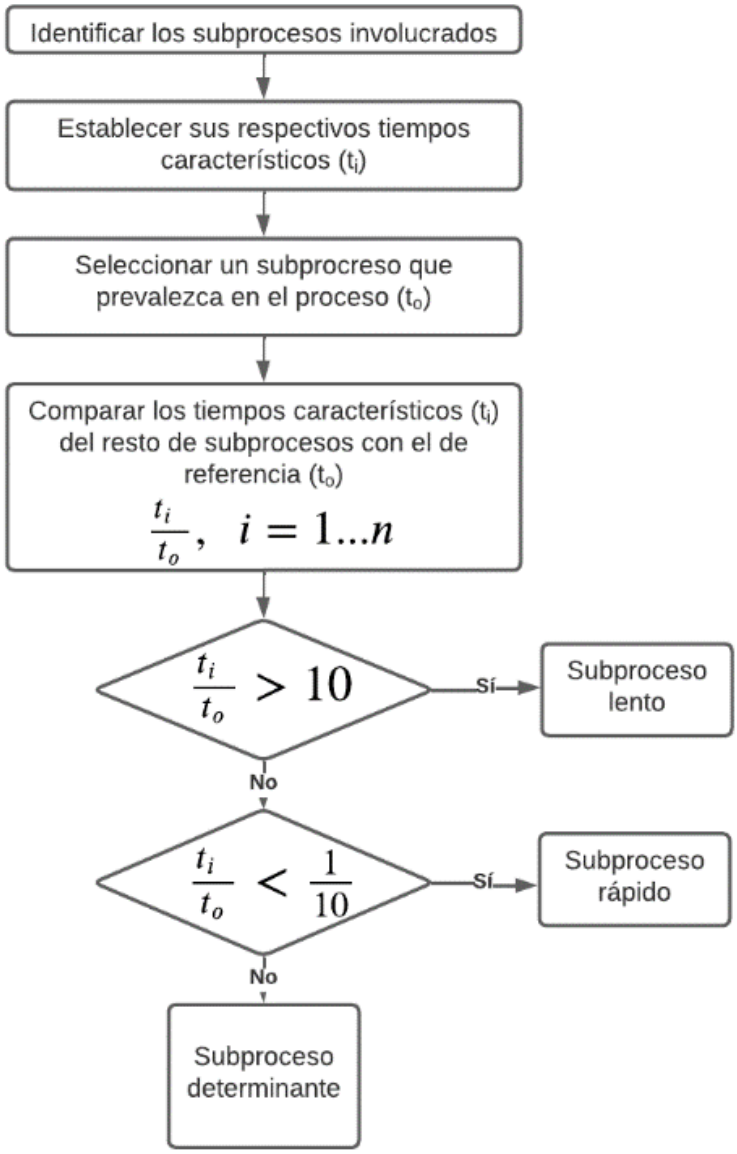
Figura 3-2: Procedimiento usado para determinar los tiempos característicos a partir de modelos cinéticos



3.6 Análisis de tiempos característicos

Para un proceso que se representa por (n) subprocesos el análisis de escala de tiempo que se propone es el siguiente:

Figura 3-3: Procedimiento usado para analizar la escala de tiempo de un conjunto de subprocesos[4]



Adicionalmente, es importante identificar dentro del proceso, aquellos subprocesos que ocurren en secuencia o en paralelo, puesto que el tiempo característico que representa a dicho escenario dependerá de su ocurrencia así:

[4] El criterio de selección de un proceso lento o rápido fue un factor de 10.

Tabla 3-1: Escenarios que definen el subproceso determinante a partir de los tiempos característicos y la ocurrencia de un par de subprocesos.

Ocurrencia de los subprocesos	Tiempo característico t	Subproceso determinante $t_1 \gg t_2$
Secuencia	$t = t_1 + t_2$	t_1
Paralelo	$\frac{1}{t} = \frac{1}{t_1} + \frac{1}{t_2}$	t_2

De acuerdo a la Tabla 3-1, para un par de subprocesos que ocurren en secuencia, la velocidad general del proceso está determinada por el proceso más lento (es decir, el proceso con el tiempo característico más alto), por otra parte, si dichos subprocesos ocurren en paralelo, entonces los procesos más lentos son de menor importancia y la velocidad general del proceso estará determinada por el proceso más rápido (es decir, el proceso con el tiempo característico más pequeño) (Morgenroth, 2015).

4. Resultados y discusión

4.1 Modelo de caja negra

Para la elaboración del modelo de caja negra se asumieron como condiciones del proceso aquellas reportadas como óptimas en la literatura (Tabla 1-1) para el crecimiento aerobio de células de insecto sf9 (pH=6.2 y temperatura 27°C). La concentración de glucosa limitante fue de 4mM a la cual se ha reportado no hay formación de alanina (Bhatia et al., 1997).

4.1.1 Fórmula elemental de la biomasa

La fórmula molecular que se obtuvo fue $C_1H_{1.999}O_{0.570}N_{0.297}$. Los elementos fósforo y azufre representan menos del 2% del peso molecular y con el fin de simplificar los cálculos dichos elementos no se tuvieron en cuenta. El peso molecular es $27.28\ \mathrm{g}\cdot \mathrm{C_{mol}X^{-1}}$ y el grado de reducción (γ_x) de 3.967. Estos valores se encuentran dentro de los reportados para organismos como bacterias y fungi (Doran, 2013).

4.1.2 Fórmula elemental de la fuente orgánica de nitrógeno

La fuente orgánica de nitrógeno (aa) que se obtuvo tiene la forma $C_1H_{2.053}O_{0.544}N_{0.295}$. El azufre proveniente de metionina y cisteína representa el 2.4% del peso molecular y no se tuvo en cuenta para realizar los cálculos. El peso molecular es de $26.89\ \mathrm{g}\cdot \mathrm{Cmol\ aa^{-1}}$ y el grado de reducción (γ_{aa}) es de $4.10\ e^-\cdot Cmol\ aa^{-1}$ y se estima que la energía libre de Gibbs de formación es de $-18.43\ \mathrm{kJ}\cdot \mathrm{Cmol\ aa^{-1}}$.

4.1.3 Escenario de análisis 1: Glucosa como donador de electrones y fuente de carbono

El primero de los escenarios que se evaluó fue asumiendo que la glucosa es la principal fuente de energía y carbono en el crecimiento celular. Esto significa que participa tanto en la reacción catabólica (Ecuación 1.5), como anabólica (Ecuación 1.8).

En primer lugar, para la reacción catabólica, la oxidación completa de glucosa (Ecuación 4.1) entrega una energía catabólica de $\Delta_{cat}G^{\circ\prime} = 2852.2\ kj/mol$, siendo altamente favorable en términos energéticos.

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O \quad (4.1)$$

Luego, la biomasa tiene un grado de reducción de $\gamma_x = 3.967$ y la glucosa actúa como fuente de carbono, entonces $\gamma_C = 24$ y usando la ecuación (1.8), $a_{ana} = 0.165$. Finalmente asumiendo que la fuente de nitrógeno es amonio libre ($a_n = 0.297$, la reacción anabólica queda de la forma:

$$-0.165C_6H_{12}O_6 - 0.297{NH_4}^+ - 0.0081\mathrm{CO_2} + 0.4378\ \mathrm{H_2O} + \ C_1H_{1.999}O_{0.570}N_{0.297} + 0.297H^+ (4.2)$$

Esta reacción es favorable energéticamente ($\Delta G_{ana} = -18.05\ kJ/mol$) y en teoría procedería sin la necesidad de energía catabólica, sin embargo, según Heijnen (2010), esta energía solo tiene en cuenta la necesaria para la construcción de compuestos constituyentes de la biomasa (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos..), por lo tanto, también se hace necesario incluir energía adicional para los procesos biológicos como los de transporte, modificaciones estructurales y otros, luego la cantidad de energía libre de Gibbs necesaria para la producción de biomasa debe ser mayor. Dicha energía adicional se obtiene de la oxidación del donador de electrones Ecuación 1.9, consecuentemente, $|f_{cat}| = 0.0763$ y por lo tanto, de la Ecuación 1.7 $|a| = 0.2416$.

El requerimiento energético para mantenimiento celular se estimó utilizando la correlación 1.11 a las condiciones óptimas de crecimiento celular $(T = 27°C)$:

$m_G = 5.493 \frac{\text{kJ}}{\text{hCmol}_x}$ y por lo tanto: $m_s = \frac{5.493}{2858} = 1.9 \cdot 10^{-3}$ (4.2)

Ante la ausencia de productos, y continuando con la metodología de Heijnen, la estequiometria global de crecimiento queda de la forma:

$$-0.242C_6H_{12}O_6 - 0.297NH_4{}^+ - 0.458O_2 + 0.45\text{CO}_2 + 0.8954\,\text{H}_2\text{O} + C_1H_{1.999}O_{0.570}N_{0.297} + 0.297H^+ \quad (4.3)$$

A partir de los coeficientes termodinámicos estimados para la correlación Herbert-Pirt (q_s), las velocidades de consumo y producción para los demás componentes pueden calcularse a partir de una combinación lineal. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4-1. Relaciones Herbert-Pirt de los compuestos que intervienen en el escenario de glucosa como donador de electrones y fuente de carbono.

Compuesto	**Relación obtenida** $\left(\frac{\boldsymbol{mol_i}}{\boldsymbol{C_{mol}X \cdot h}}\right)$
$C_6H_{12}O_6$	$q_{glc} = -0.242\mu - 1.9 \cdot 10^{-3}$
$NH_4{}^+$	$q_n = -0.297\mu$
O_2	$q_{O_2} = -0.458\mu - 0.0115$
CO_2	$q_{CO_2} = 0.45\mu - 0.0115$
H_2O	$q_{H_2O} = 0.895\mu - 0.0115$
H^+	$q_H = 0.297\mu$

A partir de las relaciones obtenidas se observa que el consumo de $NH_4{}^+$ y la producción de H^+ únicamente están en función de velocidad de crecimiento ya que únicamente intervienen en la reacción anabólica.

Desde el punto de vista termodinámico, el crecimiento de células de insecto utilizando amonio como fuente de nitrógeno es factible siempre y cuando exista una cantidad suficiente de glucosa para soportar el gasto energético. A diferencia de las células mamarias, las células de insecto soportan concentraciones de amonio de hasta 10 mM y no afecta su crecimiento (Bédard et al., 1993) y aún más son capaces de asimilarlo e incorporarlo en sus rutas metabólicas. Soportando parte de este escenario, Lars. Öhman et al., (1996) reportaron el crecimiento de células de insecto en condiciones de cultivo sin

adición de glutamina, glutamato y aspartato y suplementado con 5 mM de cloruro de amonio, obteniendo resultados comparables con los que incluyen esos tres aminoácidos (Lars. Öhman et al., 1996). La habilidad de incorporar nitrógeno amoniacal para la formación de biomasa como sustituto de algunos aminoácidos es un tema que requiere un análisis más profundo, especialmente, en la comprensión del metabolismo del nitrógeno en estas células.

4.1.4 Escenario de análisis 2: Glucosa como donador de electrones y una fuente de nitrógeno orgánica

En este escenario, se asume que la glucosa actúa como donador de electrones, luego la reacción catabólica (Ecuación 4.1) se mantiene.

Para la construcción de la reacción anabólica, se obtiene primero el coeficiente estequiométrico para la fuente de nitrógeno a partir del balance elemental entre las especies involucradas, luego $a_n = \frac{0.297}{0.295} = 1.00678$, sin embargo, ocurre un asunto en particular y es que la entrada de 1.00443 mol de la fuente de nitrógeno orgánica es más que suficiente para producir 1 Cmol de biomasa en términos de átomos de carbono e hidrógeno, lo que sugiere un reservorio adicional a la biomasa para dichos compuestos. La primera hipótesis es asumir que dichos átomos terminen en la formación de CO_2 y H_2O, pero el balance de grados de libertad (GL=3-4=-1) indica que el problema estaría sobreestimado y para encontrar una solución única es necesario descartar una ecuación o bien redefinir las variables independientes. Descartar alguna ecuación del balance elemental induce serios problemas, luego la hipótesis de que un subproducto oxidado actúe como reservorio de estos elementos es factible.

En el metabolismo de los aminoácidos de células de insecto, el grupo amino se remueve mediante transaminaciones para su utilización en compuestos nitrogenados como los nucleótidos y/u otros aminoácidos. El esqueleto de carbonos resultante se convierte en un intermediario metabólico que, en este caso, principalmente alimentan al ciclo de ácidos tricarboxílicos y el nodo piruvato. De ahí que, los principales subproductos extracelulares

del metabolismo de las células de insecto son dos, lactato y alanina que se derivan de la reducción de piruvato. Dado que, bajo el escenario de caja negra, la cantidad de nitrógeno es limitante para la producción de 1 Cmol de biomasa, se descarta la producción de alanina y otros compuestos nitrogenados, por lo tanto, se toma al lactato $(\gamma_p = 12)$ como el reservorio final para estos elementos.

De esta manera, se replantea el balance de grados de reducción (Ecuación 1.8), para encontrar la mínima cantidad de subproducto a partir de 1.0044 mol de nitrógeno orgánico así:

$$a_n \cdot \gamma_{N-source} + \gamma_x + a_p \cdot \gamma_p = 0 \ \rightarrow a_p = -\frac{a_{n*} \cdot \gamma_{N-source} + \gamma_x}{\gamma_p} \quad (4.4)$$

Reemplazando con los valores correspondientes en la ecuación 4.4 $a_p = 0.0108$ luego la ecuación anabólica queda de la forma:

$$-1.0044 C_1H_{2.053}O_{0.544}N_{0.295} - 0.028\mathrm{CO_2} - 0.0005\mathrm{H_2O} + \ C_1H_{1.999}O_{0.570}N_{0.297} + 0.0108H^+ + 0.0108\ C_3H_5O_3^- \quad (4.5)$$

Bajo esta perspectiva, según la ecuación anabólica 4.5 se requiere la fijación de $\mathrm{CO_2}$ para lograr la reducción de los electrones libres. Al igual que en el escenario anterior, pese a que la reacción es favorable energéticamente $(\Delta G_{ana} = -39.6\ kJ/Cmol)$ se requiere la entrada de energía adicional para soportar otros procesos biológicos. En este escenario se propone que dicha energía se obtiene del catabolismo de la glucosa, por lo tanto, se procede a calcular nuevamente f_{cat} a partir de la ecuación 1.9 para el nuevo valor de ΔG_{ana}. El resultado sugiere que la fracción de energía catabolica que se debe lograr es de $|f_{cat}| = 0.0674$ y por lo tanto, en la ecuación 1.7 $|a| = 0.0674$. Nótese que en este caso $a_{ana} = 0$ puesto que la glucosa no participa en la reacción anabólica.

Finalmente, el consumo de energía para mantenimiento celular también se le atribuye a la glucosa, y al igual que la ecuación 4.2: $m_s = 1.9 \cdot 10^{-3}$.

Ahora bien, la ecuación de crecimiento global tiene la forma:

$$-0.0674\ \mathrm{C_6H_{12}O_6} - 1.0044(\ C_1H_{2.053}O_{0.544}N_{0.295}) - \ 0.4045\mathrm{O_2} + 1C_1H_{1.92}O_{0.57}N_{0.29} + 0.376\ \mathrm{CO_2} + 0.404\ \mathrm{H_2O} + 0.0108H^+ + 0.0108C_3H_5O_3^- \quad (4.6)$$

Las relaciones Herbirt – Pirt en este escenario se presentan en la Tabla 4.2.

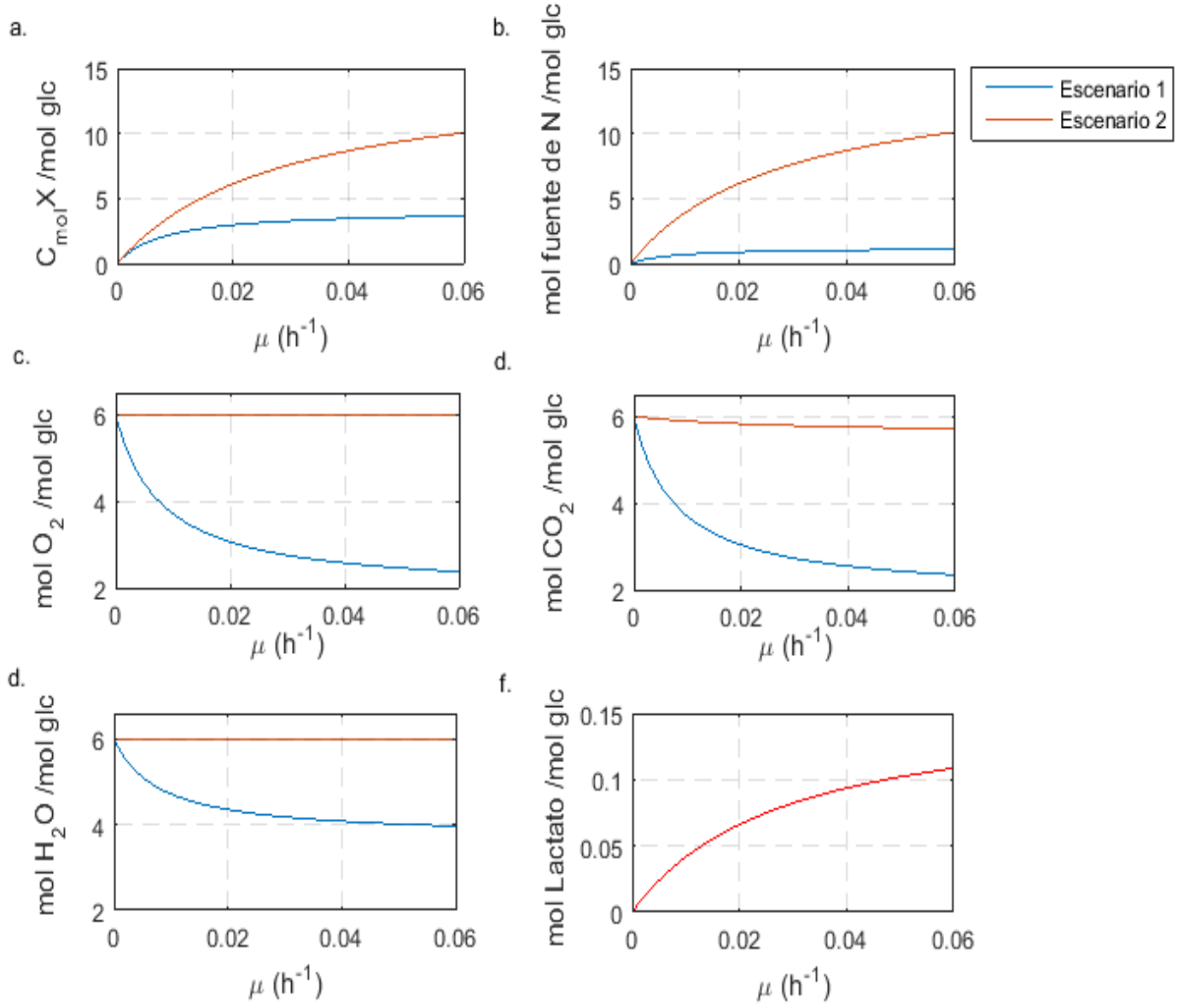
Tabla 4-2: Relaciones Herbert-Pirt de los compuestos que intervienen en el escenario de glucosa como donador de electrones y una fuente orgánica de carbono.

Compuesto	**Relación obtenida** $\left(\frac{mol_i}{C_{mol}X \cdot h}\right)$
$C_6H_{12}O_6$	$q_{glc} = -0.0674\mu - 1.9 \cdot 10^{-3}$
$C_1H_{2.053}O_{0.544}N_{0.295}$	$q_{CN} = -1.0044\mu$
O_2	$q_{O_2} = -0.404\mu - 0.0115$
$\mathrm{CO_2}$	$q_{CO_2} = 0.376\mu - 0.0115$
$\mathrm{H_2O}$	$q_{H_2O} = 0.405\mu - 0.0115$
H^+	$q_H = 0.0108\mu$
$C_3H_5O_3^-$	$q_{Lac} = 0.0108\mu$

En este escenario, se disminuye drásticamente el consumo de glucosa en comparación al escenario 1 ($\sim 60\%$) y adicionalmente resulta lactato como subproducto. En la reacción anabólica apenas un 0.44% de los átomos de carbono de la fuente de nitrógeno orgánica que entran se destinan para la producción de un ácido de 3, 4 o 5 carbonos, que en este caso se asumió como lactato. De acuerdo a Stein (2020), “Una producción por debajo de 2mM de lactato en células de insecto, indica un cultivo libre de estrés y muestra que la mayor parte de glucosa es completamente oxidada” (Stein, 2020), lo que soporta parte de este escenario, en el cual se propone que toda la glucosa se oxide. Más aún, se espera que a través del modelo metabólico se esclarezca el redireccionamiento de este metabolito, específicamente evaluando el nodo piruvato. Sin embargo, es claro que se pueden plantear otros escenarios que den cuenta de la utilización del sobre flujo de electrones que deberán ser complementados con modelos metabólicos para superar las limitaciones del modelo de caja negra (sustrato limitante).

En la Figura 4-1 se presenta la variación de los coeficientes estequiométricos de proceso en función de la velocidad de crecimiento para los dos escenarios.

Figura 4-1: Comportamiento de los coeficientes estequiométricos de la reacción del global de crecimiento en función de la velocidad de crecimiento para el Escenario 1: Glucosa con amonio y Escenario 2: Glucosa con fuente orgánica de nitrógeno.



A partir de esta figura se observa que los rendimientos de formación de biomasa por mol de glucosa (Figura 4-1a) son superiores cuando se tiene en cuenta la energía y el flujo de carbonos que aportan los aminoácidos. En cuanto a la relación nitrógeno/glucosa (Figura 4-1b), se observa que se requiere una mayor cantidad de nitrógeno orgánico/glucosa (escenario 2) respecto a una fuente amoniacal para soportar el cultivo.

En la figura 4-1 c, se representa la cantidad de oxígeno que se necesita por mol de glucosa. En el escenario 1, mayores velocidades de crecimiento requieren una mayor cantidad de glucosa para formar la biomasa, adicional a la catabólica empleada para energía, luego la

relación de oxígeno/glucosa empieza a decaer. En el escenario 2, se observa, que, sin importar la velocidad de crecimiento, la relación oxígeno/glucosa es 6, ya que su consumo es proporcional a la estequiometría de la reacción catabólica. Esto está alineado con lo reportado por Garnier et al., (1996), quien sugiere que la velocidad específica de consumo de oxígeno debe ser 6 veces superior a la de glucosa en células de insecto, debido al proceso de respiración (Garnier et al., 1996). Un análisis similar aplica para figura 4-1e que indica el comportamiento de agua liberada por mol de glucosa consumida.

En la figura 4-1d, se observa la cantidad de CO_2/mol glucosa producido. Para el escenario 1, al igual que en el caso del oxígeno, la cantidad de glucosa que se consume aumenta de la mano de la velocidad de crecimiento, luego la relación decae, mientras que en el escenario 2, la relación tiende a seguir la estequiometría de la reacción catabólica, pero en este caso, una fracción de CO_2 se invierte en la reacción anabólica, por lo que la relación decae ligeramente a medida que incrementa μ.

Finalmente, en la figura 4-1f, se observa la relación de lactato producido por mol de glucosa. Esta relación incrementa conforme aumenta la velocidad de crecimiento, lo que se esperaba por la relación directa entre estos dos compuestos.

Evaluar la producción de energía catabólica y/o identificar subproductos a partir de aminoácidos es bastante complejo puesto que el nitrógeno participa en varios procesos metabólicos (Ciclo de urea, TCA, biosíntesis de aminoácidos, inclusive en la formación de compuestos desconocidos del nitrógeno (L. Öhman et al., 1995)) y puede terminar en distintos puntos dentro del metabolismo celular. Una forma que se propone para evaluar la factibilidad del crecimiento a partir únicamente de amino ácidos es mediante la ecuación 4.5, la cual actuaría como reacción catabólica y anabólica, luego la energía libre de Gibbs ($\Delta G_{ana} = -39.6\ kJ/Cmol$) es favorable pero no la suficiente para generar energía biológica útil para soportar los distintos procesos metabólicos, entonces sostener un cultivo bajo estas condiciones no sería apropiado.

4.1.5 Análisis de los modelos de caja negra

En la sección anterior se propusieron dos escenarios termodinámicos que abordan el crecimiento celular desde dos perspectivas, ausencia y presencia de una fuente de nitrógeno orgánica y la dependencia de glucosa como fuente de energía. Es importante destacar que, en primer lugar, en términos termodinámicos, se presume que esta es la primera vez que se utiliza la correlación 1.11 para la estimación de la energía de mantenimiento de células eucariotas complejas, por lo que se cree pertinente comparar su valor con otros reportados en la literatura para células con una complejidad similar a las de insecto. La disponibilidad de datos permitió la comparación entre células hibridoma y CHO. Miller y colaboradores (1989) estimaron la energía para mantenimiento celular de células hibridoma a través de datos experimentales y encontraron un valor de $0.07\ kJ/\mathrm{g}\cdot\mathrm{h}$ a 37°C (Miller et al., 1989), por otra parte, Zseiloba (2021) mediante trabajos experimentales y computaciones determinaron un valor de $0.176\ kJ/\mathrm{g}\cdot\mathrm{h}$ a 37 °C (Széliová et al., 2021). Empleando la correlación 1.11 a 37°C, la energía de mantenimiento para células de insecto (factor de conversión $(1.69\cdot 10^{9}\ \mathrm{cell/g})$, se obtiene un valor de $0.484\ kJ/\mathrm{g}\cdot\mathrm{h}$. Asumiendo que la dependencia de la energía de mantenimiento celular depende únicamente de la temperatura, su estimación a partir de la correlación 1.11 estaría siendo sobreestimada. Sin embargo, es importante reconocer que el peso de 1 Cmol puede variar entre una y otra célula y afectar el valor energético por gramo de biomasa, sin embargo, no se descarta la influencia de otros factores como la energía de activación que deban ajustarse para este tipo de células. Por lo tanto, basados en la precisión de la correlación $(\pm 40\%)$ y el orden de magnitud del valor calculado, se considera una estimación válida de este requerimiento energético.

En segundo lugar, una forma de analizar la energía que puede ser almacenada (en forma de productos o biomasa) en comparación a la de entrada (reacción catabólica), es a través de una fracción energética denominada como eficiencia energética (Von Stockar, 2013) y tiene la forma:

$$\eta = -\frac{Y_{x/s}\,\Delta G_{b}^{o}}{\Delta G_{a}^{o}} \tag{4.7}$$

A partir de los resultados en los escenarios 1 y 2 la eficiencia energética es de 2.61 y 22.5%. Entre mayor sea la eficiencia, mayor será el grado de acople del crecimiento al catabolismo, por lo que en el caso de proliferación celular, se espera que este valor este cercano al 50% (Von Stockar, 2013). En este sentido el escenario 2 representa una mejor perspectiva para el crecimiento celular, sin embargo, aún hay campo para estudiar y mejorar dicha relación.

Por otra parte, bajo el escenario 1, se destaca la disminución de la presencia de subproductos no deseados relacionados al flujo extra de carbonos que induce el consumo de aminoácidos (como lactato y alanina) y además disminuir costos de adquisición de algunos aminoácidos que puedan ser sustituidos por sales de amonio, sin embargo, en comparación con el escenario de análisis 2, el consumo de glucosa se dispara un 60%, por lo que sería conveniente evaluar la relación costo beneficio.

En ambos escenarios se da prioridad a oxidar la glucosa, por lo que el coeficiente de respiración (RQS) que representa las moles de dióxido de carbono liberado por mol de oxígeno consumido está alrededor de 1 a lo largo del crecimiento celular.

Adicionalmente, en comparación a otros trabajos a nivel experimental, es interesante señalar que existe un grado de similiaridad entre los valores encontrados bajo el alcance termodinámico propuesto aquí y aquellos encontrados experimentalmente, a pesar de las condiciones propias de cada estudio. Por ejemplo Chiou (2000) a través de un análisis teórico para el diseño de un medio de cultivo, determinó que el consumo de glucosa requerido para un cultivo de células de insecto es de $3.1 \cdot 10^{-12}\ mol\ glc/cell$ (Chiou et al., 2000). A partir de la estequiometría de las reacciones globales de crecimento y efectuando las conversiones respectivas[5] para los escenarios 1 y 2 , este requerimiento es de $5.47 \cdot 10^{-12}\ y\ 1.52 \cdot 10^{-12}\ mol\ glc/cell$. Otra investigación relacionada, es la de Ohman (1995) quien realizó experimentos tipo lotes discontinuo en los que aplicó escenarios de glucosa

[5] El peso molecular de biomasa es de 27.28 g/cmolX y peso seco $1.69 \cdot 10^{9} cell/g$ calculado en la sección X .

limitante y glucosa-glutamina limitante, encontrando mejores rendimientos ($7.69 \cdot 10^{-13}\ mol\ glc/cell$) en comparación a escenarios en los que uno o ambos nutrientes estaban en exceso.

La velocidad específica de consumo de oxígeno máxima reportada para células de insecto en etapa de crecimiento (sin infección), es de alrededor de $6 \cdot 10^{-13}\ \frac{molO_2}{cell \cdot h}$ a 27-28°C (Gotoh et al., 2004). Asumiendo que la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) está limitada por la capacidad respiratoria de éstas células, a partir de dicho valor se puede proponer un estimado de la velocidad de crecimiento máxima que se podría esperar bajo los escenarios termodinámicos propuestos, y esta corresponde a μ_{max} 0.0308 y 0.0326 h^{-1} para el escenario 1 y 2 respectivamente.

4.2 Análisis metabólicos

El modelo metabólico empleado considera 69 reacciones y 50 metabolitos internos (balanceados) (Anexo B, Tabla B-2). El balance de ADP, urea y mevalonato no se pudo cerrar porque estos compuestos también participan en procesos bioquímicos que no fueron considerados en la red (Carinhas et al., 2010). Además, existen tres relaciones independientes correspondientes a NADH, NADPH y $FADH_2$, lo que resulta en un rango matricial de 47 y 22 grados de libertad. Se analizaron tres escenarios en los que se ingresaron 23 velocidades de consumo/secreción más algunas velocidades intracelulares en las que únicamente glucosa y lactato están involucradas (Bernal et al., 2009). En general se asumió una varianza del 10% para todas las medidas y bajo estos parámetros y las restricciones de reversibilidad para cada reacción se realizó el análisis MFA como un sistema redundante (en el que se definen más velocidades de flujo que las necesarias). El análisis de las matrices se realizó a través del índice de consistencia h en comparación con la función de prueba χ^2, en todos los casos $h > \chi^2$ indicando un problema en el modelamiento o variables ingresadas. A través de un análisis “Gross measurements” se detectó que los flujos de consumo de aminoácidos son los que contribuyen considerablemente en los errores. Este tipo de solución es altamente sensible a la varianza de las medidas ingresadas, en este caso se asumieron del 10% para todas las medidas, pero los resultados indican que pueden diferir de este valor, por lo que se sugiere en futuros estudios *in silico* identificar con certeza las varianzas asociadas.

Los cuatro escenarios que se analizaron se plantearon con el fin de establecer una relación entre los modelos termodinámicos de caja negra obtenidos en la sección anterior y el modelo metabólico existente así:

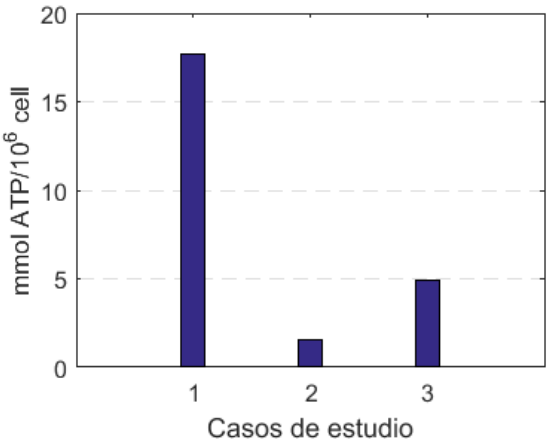
- En el primer caso de estudio se evalúan los valores calculados en el modelo de caja negra 1 (glucosa dependiente) del cual se encontraron las velocidades de consumo y secreción de glucosa, oxígeno, amonio y CO_2 bajo la premisa de ausencia de aminoácidos por lo que las velocidades de consumo de aminoácidos (19 velocidades) se asumieron como cero para una velocidad específica de crecimiento de 0.03 h^{-1}.

- En el segundo caso de estudio se evalúa el modelo de caja negra 2 (glucosa y aminoácido dependiente) del cual se estimaron las velocidades de consumo de glucosa, oxígeno y nitrógeno y, de secreción dióxido de carbono y lactato para una velocidad de crecimiento estándar de 0.03 h^{-1}. Las velocidades de consumo para cada aminoácido se estimaron a partir de la cantidad de fuente de nitrógeno orgánica calculado por el modelo de caja negra y la fracción molar de cada aminoácido en dicha fuente.

- En el tercer escenario se evalúa los valores de consumo y secreción determinados por el modelo de caja negra 2 a una velocidad de crecimiento de 0.03 h^{-1} al igual que el punto anterior, pero en ausencia de metabolitos extracelulares que se conocen contribuyen al metabolismo energético (aspartato, asparagina, glutamina, glutamato, alanina y lactato) (Xie & Wang, 1994).

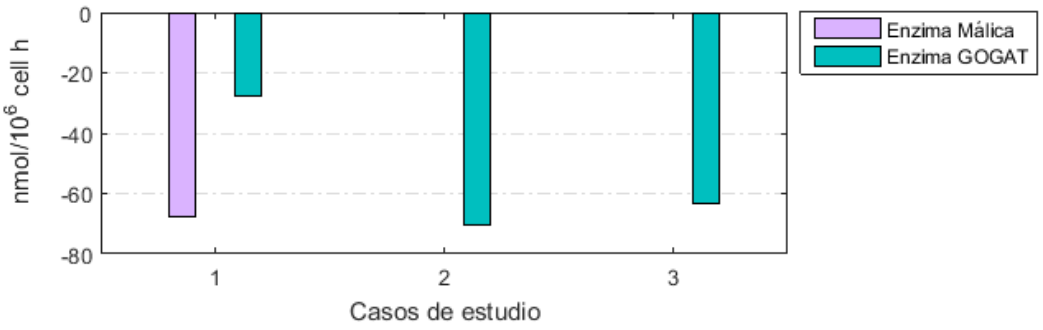
Los casos de estudio se evaluaron en función de la cantidad específica de energía producida (Figura 4-2). Además, se discute la factibilidad de los escenarios comprometida por la direccionalidad de algunas reacciones que involucran a la ruta anaplerótica y la asimilación del nitrógeno (Figura 4-3).

Figura 4-2: Estimación de la cantidad específica de ATP para los casos de estudio propuestos.



En la Figura 4-2, se observa la biosíntesis específica neta de ATP para cada escenario. En el primer caso de estudio, en el que el cultivo depende únicamente de glucosa para suplir las necesidades metabólicas, se observa la mayor biosíntesis de ATP, sin embargo, debido a la ausencia de aminoácidos esenciales para el crecimiento celular, hace que la factibilidad de este escenario esté comprometida. La factibilidad de este escenario es poco probable debido a la limitada/nula capacidad metabólica de las células de insecto para sintetizar algunos aminoácidos por rutas constitutivas como leucina, lisina, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, tirosina, histidina y de acuerdo con VLAK et., al (2002) ya se ha evidenciado que su ausencia afecta profundamente la proliferación celular (VLAK et al., 2002). Es por eso que el resto de escenarios incluyen los aminoácidos prolina, metionina, arginina y cisteína. En estos escenarios se observa que la capacidad energética de ATP específica se reduce hasta tres veces cuando los 19 aminoácidos están presentes y hasta dos veces cuando hay una limitada adición de aminoácidos. De hecho, algunos autores (Ferrance et al., 1993; L. Öhman et al., 1995) han encontrado a nivel experimental que la limitación de aminoácidos favorece el crecimiento celular.

Figura 4-3: Flujos metabólicos de reacción 15 (catalizada por la enzima málica) y reacción 69 (catalizada por la enzima GOGAT) que presentaron cambios en direccionalidad.



Ahora bien, la factibilidad de los escenarios propuestos se vio comprometida por la direccionalidad de las reacciones catalizadas por la enzima málica (v15) y/o la enzima GOGAT (v69) esto como resultado de la necesidad mantener el estado energético a través del ciclo TCA y la biosíntesis de aminoácidos. Esto sugiere que se requiere un mayor aprovechamiento de los nutrientes en los escenarios propuestos. Esta situación fue superada con la inclusión de una nueva reacción (Ecuación 4.8).

$$Amm + ATP + Glu \leftrightarrow Gln + ADP \quad , \quad \Delta G\left(\frac{kJ}{mol}\right) = -5.6 \qquad (4.8)$$

Esta reacción es catalizada por la enzima GS (glutamato sintetasa) la cual es una enzima ATP dependiente y está involucrada en la asimilación de nitrógeno inorgánico y su incorporación en aminoácidos como la glutamina. La actividad de esta enzima esta usualmente relacionada a la actividad de GOGAT, la cual se encarga de transferir el grupo amino de la glutamina a la molécula de AKG para producir 2 moléculas de glutamato y de esta forma proveer directa o indirectamente los grupos aminos a los aminoácidos ausentes y/o a la formación de nucleótidos (Wang et al., 2011). Esta enzima está presente en microorganismos, levaduras y hongos, y también se ha registrado en células de insecto (Doverskog et al., 2000), sin embargo, el modelo en cuestión no incluye reacciones que ocurren en paralelo y/o ciclos ya que el análisis tipo MFA no puede identificar este tipo de reacciones y utiliza modelos reducidos para su ejecución (Monteiro, 2015). En este trabajo se conocía el valor mínimo que debía tomar esta reacción por los análisis previos y se asumió este valor para determinar nuevamente la redistribución de flujos. Así, el modelo ajustado resulta en una matriz de 70 x 50, rango de 47 y 23 grados de libertad. Los

resultados de los flujos energéticos para los casos 2 y 3 se presentan en las tablas 4-3 y 4-4.

La red metabólica se analizó a través de los coeficientes de reparto del nodo piruvato (Tabla 4-3) y nodo AKG (Tabla 4-4) ya que juegan un papel importante en la redistribución intracelular de flujos metabólicos (Bernal et al., 2009).

Tabla 4-3: Coeficientes de reparto metabólico en el nodo de piruvato de células Sf9 de *S. frugiperda* no infectadas para los dos casos de estudio 2 y 3.

Nodo Piruvato	Caso de estudio 2	Caso de estudio 3
Flujos de entrada		
Glicolisis (PEP a Pyr)	0.68	0.82
Enzima Málica (ME)	0.32	0.18
Flujos de salida		
Lactato (LDH)	0.05	0
Alanina (AlaAT)	-0.18	0.2
Acetil-CoA (PDH)	1.19	0.85

El nodo piruvato (Tabla 4-3) refleja la participación del piruvato como intermediario en distintos subprocesos metabólicos como el metabolismo de aminoácidos, detoxificación de amonio y/o como sumidero de distintas rutas metabólicas como la glicolisis y el ciclo TCA (Bernal et al., 2009).

En esta tabla se observa que en ambos escenarios gran parte del piruvato está siendo oxidado a través del ciclo TCA y aproximadamente un 20% más en el escenario 3. El flujo hacia la producción de lactato es mínimo en ambos casos ya que fue una condición impuesta. La baja incorporación de aminoácidos en el TCA induce a menores flujos en las rutas anapleróticas, por lo que se aprecia un menor valor en el flujo de la enzima málica para el escenario 3. Adicionalmente se observa que en el escenario 2, la alanina está siendo metabolizada por el metabolismo energético (es un flujo de entrada) a diferencia del escenario 3 donde no hay metabolismo de este aminoácido ni su uso para detoxificación de amonio. El coeficiente de partición para acetyl-coA fue 1.2 y 0.85

indicando que el ciclo TCA es funcional y tiende a una acumulación de este metabolito en el caso de estudio 2 (Bernal et al., 2009) .

Tabla 4-4: Coeficientes de reparto metabólico en el nodo oxoglutarato de células Sf9 de *S. frugiperda* no infectadas

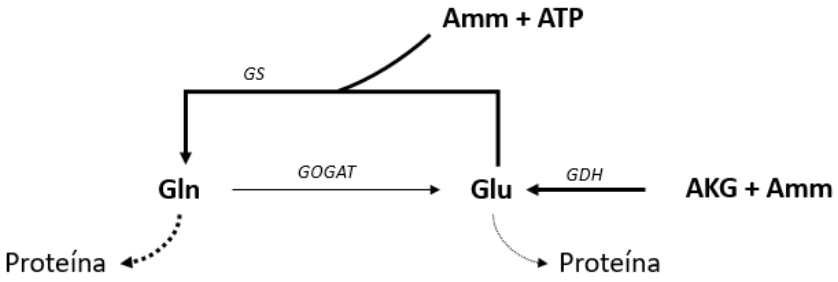
Nodo AKG	Caso de estudio 2	Caso de estudio 3
Flujos de entrada		
Isocitrato (ICDH)	0.56	0.52
Alanina (AlaAT)	-0.13	0.13
Aspartato (AspAT)	0.21	0.23
Glutamato (GDH)	0.36	0.13
Flujos de salida		
Succinyl COA(αKGDH)	0.64	0.52
Glutamato (GOGAT)	0.00	0.00

En el nodo AKG (Tabla 4-4) se evalúa la capacidad de este metabolito en conectar el metabolismo de aminoácidos con el ciclo TCA y con el nodo piruvato a través de la enzima (AlaAT). A partir de estos datos, se observa un comportamiento similar en la actividad de la enzima Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Aspartato aminotransferasa (AspAT) en ambos escenarios además se refleja el cambio de dirección en la transaminación de alanina (AlaAT). Al incluir la reacción GS se está priorizando el camino a la síntesis de proteína por esta ruta, luego la actividad de la enzima GOGAT se reduce (Figura 4-4). En el escenario dos, la presencia de glutamato indica una mayor actividad en la enzima GDH y por lo tanto un flujo mayor en la succinyl coA, lo que tiene consecuencias en la eficiencia del ciclo TCA.

De acuerdo con Bernal (2003), la existencia de varias rutas para la detoxificación de amonio (aparte de la actividad de alanina aminotranferasa) hacen posible la baja toxicidad de este metabolismo para las células debido a su participación en distintas rutas metabólicas. De hecho, la factibilidad de los escenarios propuestos se logra al favorecer la ruta para la síntesis la proteína a partir de la asimilación de nitrógeno inorgánico (Figura 4-4), la cual requiere un ATP/mol adicional para proceder. Bajo esta ruta, no solo se

disminuye la aparición de subproductos del metabolismo celular, como lactato y alanina, sino también se incrementa el uso de glucosa como principal fuente de energía a través del ciclo TCA. El impacto en la actividad regulatoria de las células respecto a estas enzimas aún no es claro (Cueto Rojas, 2016), aunque ya existen estudios para entender su comportamiento en microorganismos que muestran que GS es el punto de regulación preferido entre las tres enzimas en la red de asimilación de nitrógeno (Wang et al., 2011). Es importante destacar que para el análisis no se tuvo en cuenta la compartimentalización de amonio, ni reacciones secundarias respecto a ciclos fútiles del nitrógeno que aún se encuentran bajo investigación en este tipo de células y que pueden ayudar a entender el ciclo del nitrógeno en estas células.

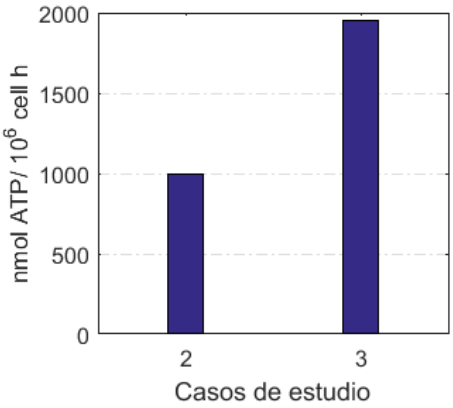
Figura 4-4: Modelo esquemático de la red de asimilación de nitrógeno*. Figura tomada y adaptada de Wang (2011).



*Las flechas indican la dirección de las reacciones. GDH, GS y GOGAT indican las enzimas que catalizan las reacciones.

Algunos estudios para favorecer el metabolismo energético de las células de insecto se basan en mejorar la actividad del ciclo TCA adicionando intermediarios como piruvato y aKG (Carinhas et al., 2010). En los casos de estudio propuestos la mayor contribución al ciclo TCA se realiza a través del caso de estudio 3 en el que se hace un mejor aprovechamiento de la glucosa para síntesis de ATP en comparación al caso de estudio 2 (Figura 4-5).

Figura 4-5: Estimación de tasas de síntesis específica de ATP netas para los escenarios propuestos 2 y 3.



4.3 Análisis de escala de tiempo en la infección con baculovirus

El análisis de la infección de las células de insecto se realizó a través de un análisis de escala de tiempo, en el cual se propone una infección de células de insecto sf9 con un nucleopoliedrovirus recombinante *Autographa califórnica* que contiene un gen insertado que codifica una forma secretada de neuraminidasa de influenza tipo N1 bajo el control del promotor de la polihedrina (BvGCN4-NA1). Para ello, primeramente, se definieron los eventos celulares que dan a lugar a partir de la información recopilada en los artículos (Dee & Shuler, 1997; Haas, 2004; Roldão et al., 2007).

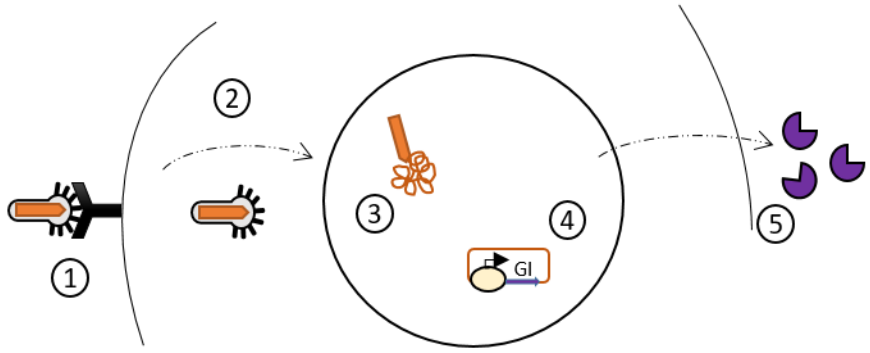
En total, se identificaron 13 eventos celulares que mejor describen lo que ocurre durante el ciclo de infección, estos son: unión, tráfico viral[6], inhibición de la tasa de internalización del virus, cese de la división celular, incremento rápido del volumen celular, detención del ciclo celular, replicación del vADN, síntesis de ARN, disminución en la síntesis de proteínas

[6] tráfico del viurs: evento celular que comprende un conjunto de subprocesos que dan a lugar para transportar la partícula viral desde la superficie de la membrana celular hasta el núcleo: internalización por endocitosis, liberación de nucleocápside al citoplasma y transporte al núcleo.

del huésped, secreción de baculovirus brotados, producción de la proteína recombinante (bajo promotor polH), incremento de volúmenes celulares reducidos y muerte celular por infección.

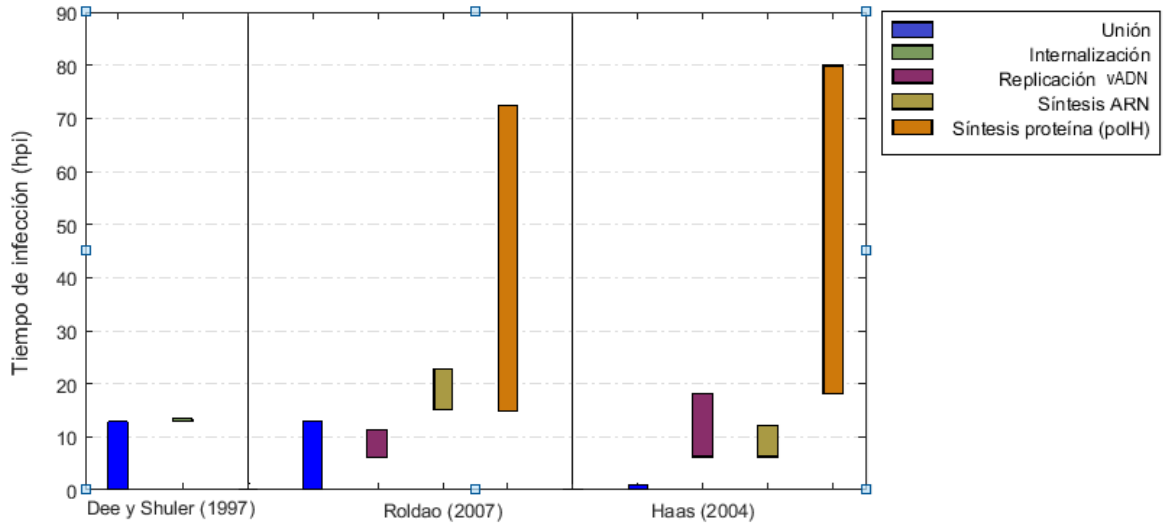
De acuerdo con esta investigación, la mayoría de los eventos celulares han sido abordados por un alcance matemático a excepción de la inhibición de la tasa de internalización viral, el cese de la división celular y la disminución en la síntesis de proteínas del huésped de los cuales únicamente se conocen intervalos de tiempo en los que dan a lugar. Respecto a los eventos relacionados con los cambios en el volumen celular, estos han sido modelados como estrategia para el seguimiento de la infección a través del cambio del diámetro o volumen de la célula que sigue una distribución normal y que se ha evidenciado cambia a lo largo de la infección (Gotoh et al., 2008; Haas, 2004). En cuanto a la muerte celular debido a la infección, se ha descrito como una función dependiente de la cantidad del ADN viral total que tiene una célula, por lo que su valor cambia en el tiempo (Roldão et al., 2007; Zhang et al., 2020). Con el fin de disminuir la complejidad del análisis, estos últimos eventos (la inhibición de la tasa de internalización viral, el cese de la división celular, la disminución en la síntesis de proteínas del huésped, el cambio en el volumen y la muerte celular por infección) no se consideraron para el análisis de tiempo de escala. Por consiguiente, los eventos celulares que se analizaron fueron la unión, internalización del virus, replicación del vADN, replicación del ARN, síntesis de proteína (bajo promotor polH) y muerte celular intrínseca. Estos eventos se representan en la figura 4-6.

Figura 4-6: Representación de los eventos considerados para el análisis de tiempo de escala. 1: unión virus-célula, 2: Internalización del virus, 3: replicación del ADN viral 4: síntesis de ARN, 5: Síntesis de proteína de interés 6: muerte celular intrínseca (no se muestra)



Basados en la información cinética de cada uno de estos eventos celulares se presentan tres escenarios en los cuales se utilizó un sistema biológico de células de insecto del linaje sf y un baculovirus recombinante AcMNPV (Figura 4-7). El primer escenario está basado en la información cinética de Dee & Shuler (1997) y únicamente comprende la etapa temprana de infección, por lo que solo se presentan los eventos de unión y trafico viral. El segundo escenario, está basada en la información cinética reportada por Roldão et al., (2007) que al igual que Haas (2004) plantean un alcance más amplio de la infección, con información de etapas tardías de la infección (Replicación vADN, síntesis de ARN y síntesis de proteínas). Es de destacar que los tiempos característicos fueron calculados como el inverso de su respectiva constante cinética, a excepción de los reportados por Haas (2004) que se reportan en términos de intervalos de tiempo.

Figura 4-7:Tiempos característicos estimados para cinco eventos celulares basados en la información cinética reportada por Dee y Shuler (1997), Roldão et al., (2007) y Haas (2004).



*Observación: El tiempo característico de la síntesis de proteína en Roldão et al., (2007) fue calculado a partir de la etapa exponencial de la síntesis de proteína reportada por Roldão et al., (2007) figura 7-C, ya que particularmente para este evento su respectivo tiempo característico a partir de la cinética fue atípico (Anexo E, Tabla E-5).

El inicio de la infección comienza con la unión virus – célula. En el caso de Dee & Shuler (1997) y Roldão et al., (2007), ambos autores asumen un cultivo en suspensión a 28°C es

$K_a = 7.8 \cdot 10^{-8}\ cm^3/cell \cdot h$ por lo que para una misma concentración celular ($CCI = 1 \cdot 10^6\ cell/ml$) el tiempo característico máximo que tomaría la unión mediada por receptores es de 12.82 h. Por su parte Haas (2004), propone que el cultivo ocurre a una máxima velocidad de unión (Difusión de la partícula, en un cultivo libre de suero, representado por $K_{a_{\max}}$) y estima que luego de 1 hpi el virus ya se encuentra en el núcleo, es decir en este caso unión y tráfico viral están agrupados.

Se ha reportado que, dependiendo del mecanismo de entrada del virus, es decir por unión a un receptor viral o por difusión de la partícula viral, el tiempo que toma esa partícula en llegar al núcleo varía (Paul & Prakash, 2010). En este orden de ideas, el proceso de internalización del virus para Dee & Shuler y Roldão et al., (2007) sigue su tránsito hasta el núcleo principalmente conducido por la internalización viral vía endocitosis (0.76h), donde se dice que el virus internalizado se fusiona casi instantáneamente con el endosoma (0.8h) tan pronto como el pH somal cae por debajo del umbral de fusión del virus para liberar la nucleocápside al núcleo y poder ser transportada al núcleo (0.2h) a través de microtúbulos que guían su camino, por lo que asumiendo que dichos eventos ocurren en serie, el tiempo característico corresponde a un valor de 1.8 h (Figura 4-7, Dee & Shuler (1997)). Por otra parte, cuando la entrada se da por difusión de la partícula viral, se cree que su transporte al núcleo está guiada por proteínas de tipo Miosina (Paul & Prakash, 2010) y toma alrededor de 0.5 h en completarse.

Una vez la nucleocápside llega al núcleo, comienza la replicación del ADN viral. En este caso, Roldão et al., (2007) y Haas (2004), concuerdan en que inicia a las 6 hpi, al igual que otros autores (Saxena et al., 2018; Zhang et al., 2020). Teniendo en cuenta la cinética reportada por Roldão et al., (2007), el tiempo característico de la replicación del vADN asumiendo que es de primer orden durante todo el proceso es de 5.26 h. Haas (2004) reporta que dicho evento es un poco más largo (14 h). Sin embargo, es importante destacar que la replicación del vADN según Roldão et al., (2007) depende de la cantidad de ADN total en el tiempo y la cinética está anidada a una función temporal que decae en el tiempo expresando la pérdida de la habilidad celular para replicar vADN, luego el intervalo total de replicación puede ser más amplio que las 5.26h.

Más adelante, a partir del vADN comienza la síntesis del ARN. Según lo reportado en Haas (2004), el incremento en el ARN total de la célula comienza al mismo tiempo que inicia la replicación del vADN, (Figura 4-7, escenario Haas (2004), síntesis de ARN), sin embargo, el ARN específico correspondiente a la proteína recombinante, que se encuentra bajo el control del promotor polH, de acuerdo con Roldão et al., (2007) comienza más adelante, a las 15 hpi y tiene una duración de 7.62h. Por lo que aquí se distingue entre el incremento en ARN total en la célula huésped y el ARN de específico de la proteína recombinante.

Finalmente, tanto Roldão et al., (2007) como Haas (2004), proponen que el inicio de la síntesis de proteína recombinante inicia paralelo la síntesis de ARN (Figura 4-7, Roldão et al., (2007)) entre las 15 hpi y 19 hpi. Esto sugiere, que al igual que la replicación del vADN, algunos subprocesos en este punto se conservan para un sistema específico célula-virus independientemente del gen de interés y el modo de internalización. Ahora bien, la duración de la expresión de la proteína es un factor importante a determinar, en Roldão se estimó que es 57 h y Haas reporta que es de 61 h, aunque también puede ser un fenómeno que se conserva, es importante profundizar un poco más en cómo está ligado a la concentración del virus en el interior celular y la muerte celular por infección, ya que se ha demostrado que a mayores concentraciones virales mayor es la velocidad de reducción en la viabilidad celular y por lo tanto, mayor la reducción en la síntesis de proteína (A. Contreras-Gómez et al., 2014).

Es de notar que una vez se replica el vADN, también existe la posibilidad de que se formen las partículas virales (BV) que se liberan al medio (Figura 1-4). Aunque en el escenario de tiempos característicos no se tuvo en cuenta este evento, Roldão manifiesta que la tasa de liberación de este fenotipo es muy baja en comparación a la replicación del vADN por lo que es despreciable. El presente trabajo está enfocado a la producción de proteínas recombinantes, luego no se profundizó en la formación de BV, sin embargo, es importante resaltar que, si el objetivo es la amplificación viral, es decir la obtención de BV, es fundamental tener en cuenta la velocidad a la que ocurre este evento y el momento en el que inicia. Haas (2004) sugiere que el tiempo durante el cual los viriones brotan es de 58 h e inicia las 17 hpi, así que durante la infección se deben buscar estrategias que

garanticen dicho tiempo para evitar la formación de partículas defectuosas y la correcta maduración del BV.

En general, se conoce que las células del linaje sf tienen mejores productividades en la producción de partículas virales a comparación de las células del linaje Tn5 o High Five. Teniendo en cuenta a Monteiro (2015), una explicación es que la actividad metabólica de las High Five se redirige durante la infección hacia rutas biosintéticas. Desde el punto de vista cinético y según Dee & Shuler (1997), los tiempos de internalización de las células High Five son un 30% más rápidos que los del linaje sf (+30 min) y teniendo en cuenta que las partículas virales se procesan a una velocidad mucho más baja que las proteínas recombinantes, este tiempo "extra" en las células sf puede ser una razón para favorecer la maduración de las nuevas partículas virales.

Por otra parte, en el escenario de Roldão et al., (2007), se encontró que a partir de los tiempos característicos para unión y replicación del vADN el tiempo característico de la unión virus - célula (calculado a la concentración celular y la constante de unión reportada) indica que este evento puede tomar más tiempo que el momento en el que inicia la replicación del vADN. Esto implica a nivel experimental, que a algunos virus les tomará más tiempo unirse a la célula y, por lo tanto, se internalizarán y expresarán cierta cantidad de vADN conforme logran llegar al núcleo en la infección, lo que puede conllevar a que exista un desfase en los subprocesos siguientes y que la infección no se dé homogéneamente.

El tiempo que le toma a un virus alcanzar el núcleo celular para este sistema está alrededor de 1.5 y 1.8 h según Dee & Shuler (1997) incluyendo los eventos de endocitosis, liberación de la nucleocapiside en el núcleo y el transporte al núcleo, algunos autores han reportado tiempos menores para este sistema, sin embargo, señalan que la variabilidad depende de la sensibilidad en la técnica empleada para estimar dichos valores (Hefferon et al., 1999).

A partir de la información presentada, se identificó que algunos de los eventos celulares, como el inicio de la replicación del vADN (6hpi), la síntesis de ARN y proteína recombinante (entre 15 y 19 hpi) independientemente del gen de interés posiblemente se conserven, pero será fundamental profundizar en los factores que hacen que estos procesos no sean constantes, sino que decaigan a lo largo del tiempo de infección, como la muerte celular

por infección, el diseño del constructo (en el caso de mARN) y la necesidad o no de modificaciones postraduccionales en el caso de la síntesis de proteína recombinante.

A través del análisis del proceso bajo una secuencia de eventos en serie y paralelo, se determinó que el único subproceso que ocurre a una velocidad lo suficientemente baja como para no tenerse en cuenta es la velocidad de muerte celular intrínseca, este proceso ocurre lento en comparación a los otros subprocesos por lo que no representa un punto relevante en este análisis. Por otra parte, se encontró que el tiempo característico del evento de unión virus-célula puede resultar determinante o no dependiendo de si la unión es mediada por receptores o no y dado que también se encontró que este evento celular puede afectar principalmente la homogeneidad del sistema, se realizó un análisis adicional para evaluar su uso como posible estrategia en la producción de proteínas recombinantes.

4.3.1 Unión virus - célula

La unión del virus a la célula está cinéticamente descrito por K_a y ha sido objeto de estudio por diversos autores (Dee & Shuler (1997); Wickham et al.(1992). Se ha encontrado que la unión se favorece a bajos pH, ya que los receptores celulares son dependientes del pH. Así mismo, la adición o ausencia de suplementos como el suero bovino influye en la capacidad de unión, ya que algunas de las proteínas presentes en el suero tienden a ser adsorbidas en la superficie celular y por ende limitar la unión del virus (Mukhopadhyay et al., 1993). Es pertinente señalar que se deben realizar algunas correcciones al valor de Ka para tener valores más precisos, como el número de receptores celulares y virales y los mecanismos de interacción entre receptores que otros autores han desarrollado (Zhang et al., 2020) y particularmente desde el punto de vista termodinámico la energía libre de Gibbs asociada a esta unión y la influencia de las condiciones ambientales como pH y temperatura que afectan su favorabilidad.

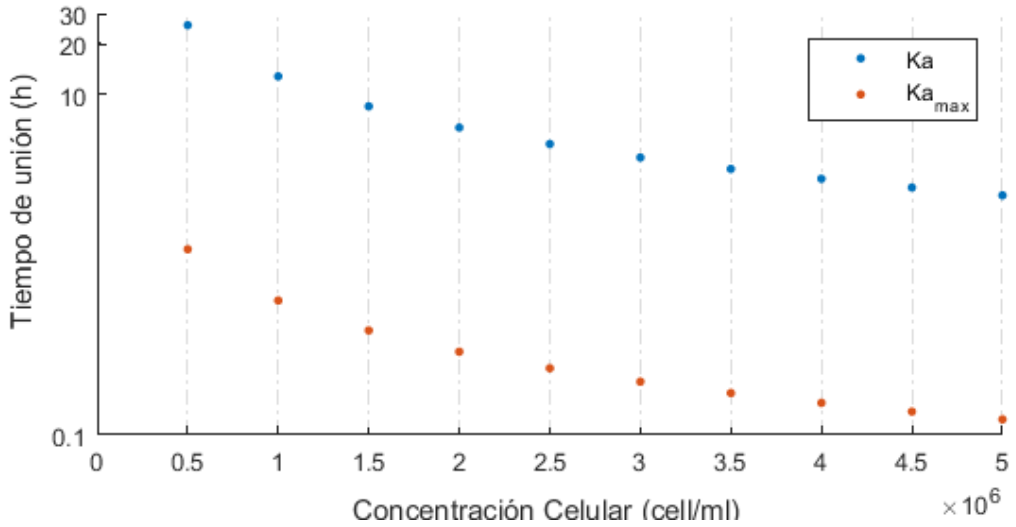
Asumiendo los valores reportados por Dee &Shuler (1997), la variabilidad en el tiempo de unión dependiendo si la constante de unión medida está mediada por receptores ($K_a = 7.8 \cdot 10^{-8}\ c\,m^3/c\,ell \cdot h$) o bien esta limitada a la difusión de la partícula ($K_{a_{max}} = 1.62 \cdot$

$10^{-6} cm^3/cell \cdot h$) para el sistema en cuestión, al igual que el efecto de la dependencia con la concentración celular se evaluó a partir de la definición del tiempo característico de la unión – virus célula (Ecuación 4.9) para Ka y $K_{a_{max}}$ para un rango de concentraciones de $0.5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6\ cell/ml$.

$$t_{unión} = \frac{1}{KaC} \tag{4.9}$$

*C: concentración celular al momento de infección (CCI) , Ka: constante de unión virus-célula

Figura 4-8: Variación del tiempo característico de unión en función de la concentración celular y la constante de unión



En la figura 4-5 se observa la variación del tiempo característico de la unión virus célula dependiendo de la constante de unión y la concentración celular. Se observa que, para una misma concentración celular, los tiempos de unión son alrededor de 20 veces superiores para un tipo de unión virus-célula mediada por receptores en comparación a una limitada por difusión. Cuando se trabaja a Ka, el tiempo característico de este tipo de unión puede variar entre un rango de 25.6 - 2.3 h mientras que con $K_{a_{max}}$, se reduce a 1.23 - 0.11 h para CCI entre, $0.5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6\ cell/ml$, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, distintos autores reportan que la replicación del ADN comienza alrededor de 6 horas después de la infección independientemente de la

concentración celular, luego tiempos de unión elevados ($> 6h$) implicarían un desfase en la infección celular, especialmente a concentraciones bajas ($0.5\,, 1, 2 \cdot 10^6\ cell/ml$) con constantes de unión tipo Ka y una tendencia a extender el proceso de infección. En la literatura, Carinhas et al (2009) recomienda bajas concentraciones celulares y bajas MOI para amplificación virales, por lo que basados en el análisis de tiempo de escala, se podría afirmar que una de las razones que puede explicar este hecho es que, a bajas concentraciones celulares, la unión viral se da de una forma más lenta y por lo tanto permite la maduración de este tipo de partículas.

Por otra parte, concentraciones superiores, implican tiempos de unión más bajos tanto para Ka como para $K_{a_{max}}$, lo que implicaría una infección más homogénea ya que para MOI superiores a 1 pfu/cell, se esperaría que todas las células se infecten y, además que el material genético que se va a procesar esté en el núcleo para el momento en el inicie la replicación del vADN. Dado que la velocidad de procesamiento de proteínas es más rápida que la de partículas virales, en este caso no es necesario tener un proceso de infección lento, por lo que se pueden emplear mayores concentraciones celulares para tal fin.

A nivel industrial, se ha identificado que la MOI y el tiempo al momento de infección (TOI) son variables controlables en el proceso de infección y son uno de los factores determinantes para controlar la homogeneidad del cultivo y su finalidad (Suarez-Zuluaga et al., 2019). Basado en el análisis de escala de tiempo que se realizó, la velocidad de unión virus-célula junto al proceso de internalización también puede brindar herramientas para el control del proceso de infección ya que a través de estos parámetros se pueden llegar a mejorar la calidad del producto final y el tiempo de operación.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Objetivo específico 1: Proponer un modelo caja negra basado en la bioenergética del proceso estableciendo las relaciones correspondientes a la distribución de sustrato para la etapa de crecimiento.

A través del enfoque termodinámico de caja negra se propusieron dos modelos para representar el crecimiento celular de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (sf9). Cada uno de estos modelos bajo la dependencia de glucosa como principal fuente de energía y con la condición de ausencia y presencia de una fuente de nitrógeno orgánica. Desde el punto de vista macroscópico se encontró que ambos escenarios son factibles energéticamente y en particular, que la inclusión de una fuente de nitrógeno orgánica compuesta principalmente por aminoácidos, se convierte en una fuente importante de carbono que implica la formación de subproductos metabólicos (como lactato), mientras que el uso de amonio como fuente de nitrógeno permite la disminución dichos subproductos metabólicos. En general, se encontró una eficiencia energética de acople mayor en el escenario en el que se empleaba una fuente de nitrógeno orgánica con 22.5% en comparación a un 2 % utilizando una fuente de nitrógeno inorgánica. Además, se encontró que los valores específicos para las velocidades de consumo y/o secreción, se encuentran dentro del mismo orden de magnitud con velocidades experimentales reportadas.

Objetivo específico 2: Complementar el análisis del modelo de caja negra con un modelo metabólico propuesto en la literatura para células de insecto sf9 en la etapa de crecimiento e infección.

Los modelos de caja negra propuestos se evaluaron con un modelo metabólico que consideraba las principales rutas biosintéticas de las células de insecto y se analizó mediante un análisis MFA. Aunque dada la alta sensibilidad del método de solución en parámetros estadísticos como las varianzas asociadas a las medidas, no se logró un intervalo de confianza aceptable estadísticamente, sin embargo, se evaluaron tres casos de estudio para entender el comportamiento de las restricciones propuestas por los modelos de caja negra. Como se esperaba, se encontró que el cultivo no puede ser soportado únicamente por una fuente de nitrógeno inorgánica, debido a la capacidad metabólica de las células de insecto y además que, la presencia de aminoácidos como lisina, leucina, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, tirosina e histidina son necesarios para el crecimiento celular.

Por otra parte, se evaluó el modelo de caja negra con la presencia de los 19 aminoácidos como fuente de nitrógeno y otro en ausencia de aminoácidos contribuyentes al metabolismo energético a partir de las velocidades estimadas por el modelo de caja negra. En este punto se encontró que su factibilidad depende de la actividad enzimática de la enzima Málica y GOGAT que se encargan de la redistribución de flujos a través de rutas anapleróticas y del nodo AKG. Para superar esta barrera, se propuso la inclusión de una reacción de asimilación de nitrógeno inorgánica (GS), la cual reorganiza la distribución del flujo metabólico hacia la producción de glutamina para la biosíntesis de proteínas. De esta forma se encontró que el mejor escenario metabólico propuesto se da en ausencia de aminoácidos contribuyentes al metabolismo energético (aspartato, serina, glicina. asparagina, glutamina, glutamato y alanina) obteniendo un 50% mayor síntesis de ATP en comparación con el escenario que los incluía. Además, bajo dicho escenario, se encontró un mejor ajuste al modelo de caja negra con una aproximación en la estimación de las velocidades extracelulares de alrededor del 20%.

Objetivo específico 3: Analizar desde una perspectiva cinética la evolución de los subprocesos de infección y crecimiento celular.

El proceso de infección celular se analizó bajo la perspectiva cinética y de escala de tiempo de la infección, se encontró que las primeras 6h después de la infección son claves para

determinar la homogeneidad y la duración del proceso de infección. En particular la estimación del tiempo de unión virus-célula (que depende del tipo de medio con o sin adición de suero, temperatura, concentración viral al tiempo de infección, el tipo de virus y célula huésped) es un parámetro que puede emplearse para la mejora de los procesos de expresión de proteínas recombinantes. Esto debido a que su manipulación puede permitir mejorar la homogeneidad en el cultivo al controlar la cantidad de virus que ingresa a la célula previo a iniciar la replicación viral, especialmente en la producción de proteínas recombinantes que se producen a altas velocidades.

De forma general, se puede concluir que la aproximación termodinámica a través de los modelos de caja negra brinda herramientas para el entendimiento de procesos complejos como el crecimiento celular de eucariontes y esto acoplado al modelo metabólico permite identificar puntos clave del metabolismo que pueden ser abordados para mejorar la producción celular. Finalmente, la perspectiva cinética permitió observar la complejidad de la infección desde un punto de vista práctico y abrir las puertas para la investigación de estos procesos desde otra perspectiva.

5.2 Recomendaciones

Se proponen las siguientes recomendaciones para futuros trabajos:

i. Dentro del análisis de caja negra es clave definir la pareja de aceptor/donador de electrones y en particular, cuando se vincula una fuente orgánica de nitrógeno ya que distintas hipótesis se pueden plantear para modelar los requerimientos energéticos. La presencia de una fuente de nitrógeno orgánica implica un sobreflujo de carbonos que conlleva a la aparición de subproductos metabólicos. En este caso se propuso lactato como aceptor final de estos electrones, sin embargo, dada la versatilidad de este tipo de células se sugiere analizar otros escenarios utilizando ácidos de tres carbonos como piruvato y/o intermediarios del metabolismo de aminoácidos como urea y mevalonato.

ii. Debido a que la técnica empleada para el análisis metabólico fue MFA, la cual se emplea principalmente para evaluar flujos extracelulares determinados a nivel experimental, se sugiere especial cuidado con las varianzas asociadas a

las medidas cuando éstas son calculadas teóricamente ya que esto es crucial para obtener resultados estadísticos consistentes. Posibles estrategias para abordar esta situación es la revisión del planteamiento de la ecuación de biomasa y su conformación macromolecular, dado que la velocidad de crecimiento es la principal entrada para la consistencia del modelo. Para abordar la varianza de las velocidades calculadas se pueden analizar escenarios con un factor de 'ruido' simulando la variación en las medidas como un comportamiento aleatorio, como por ejemplo el método de Montecarlo.

iii. Sería interesante incluir en el análisis de escala de tiempo otros eventos celulares como la muerte por infección viral y la velocidad de brotamiento de partículas virales y su interacción con otros eventos celulares, para ello es fundamental continuar con la investigación y el modelamiento cinético de este tipo de bioprocesos.

Anexos

Anexo A: Composición de las células de insecto y coeficientes molares

Tabla A-1: Composición de las células de insecto sf9 y coeficientes molares en etapa de crecimiento. Tomado y adaptado de Monteiro (2015).

Componente	% (w/w)	$\mathbf{nmol \cdot 10^{-6} cel\acute{u}las}$
Ala	8,25	221,4
Arg	5,93	81,4
Asn	4,4	79,6
Asp	4,69	84,3
Cys	2,8	55,3
Gln	6,2	101,4
Glu	4,96	80,6
Gly	8,54	272
His	2,16	33,3
Ile	4,22	76,9
Leu	8,11	147,8
Lys	6,79	111,1
Met	2,17	34,8
Phe	3,19	46,2
Pro	5,26	109,2
Ser	6,89	156,8
Thr	5,73	115
Trp	1,1	12,9
Tyr	2,59	34,2
Val	6,02	122,9
dAMP	0,42	0,1
dCMP	0,28	0
dGMP	0,28	0
dTMP	0,42	0,1
AMPRN	1,14	0,4
CMPRN	0,76	0,3
GMPRN	0,76	0,3
UMPRN	1,14	0,4
FA	13,5	59

Anexo B: Lista de reacciones bioquímicas consideradas en el modelo metabólico de células sf9

Tabla B-2: Lista de reacciones consideradas para el análisis MFA de las células de insecto sf9. Tomado y adaptado de Monteiro (2015).

#	Reversibilidad	Reacción	Enzima
Glicolisis			
1	0	Glc+ ATP = G6P + ADP	Hexokinasa (HK)
2	0	G6P = F6P	Fosfoglucosa isomerasa (PGI)
3	0	F6P + ATP = 2 GAP	
4	0	GAP + NAD + ADP = PEP + NADH + ATP	
5	-1	PEP + ADP = Pyr + ATP	
Ruta Pentosas Fosfato			
6	0	3 G6P + 6 NADP = 3 CO_2+ 3 R5P + 6 NADPH	
Ciclo TCA			
7	0	Pyr + NAD = ACoA + CO_2 + NADH	Piruvato deshidrogenasa (LDH)
8	0	ACoA + OAA = Cit	Citrato sintasa (CS)
9	0	Cit + NAD = CO_2 + AKG + NADH	
10	0	AKG + NAD = CO_2 + SuCoA + NADH	Oxoglutarato deshidrogenasa AkgDH
11	0	SuCoA + ADP = Succ + ATP	Succinil-coA sintetasa (SucCoAS)
12	0	Succ + FAD = Fum + $FADH_2$	Succinato deshidrogenasa (SucDH)
13	0	Fum = Mal	Fumarasa (Fum)
14	0	Mal + NAD = OAA + NADH	Malato deshidrogenasa (MDH)
Reacción anaplerótica			
15	0	Mal = Pyr + CO_2	Enzima málica (ME)
Reacción Nodo Piruvato			

16	-1	Pyr + NADH = Lac + NAD	Lactato deshidrogenasa (LDH)
17	-1	Pyr + Glu = Ala + AKG	Alanina aminotransferasa (AlaAT)
Metabolismo de Amino Ácidos			
18	-1	Glu + NAD = AKG + Amm + NADH	Glutamato deshidrogenasa (GDH)
19	-1	Ser=Pyr+Amm	
20	-1	Glu + OAA = AKG + Asp	Aspartato aminotransferasa (AspAT)
21	0	Ser + Met + NAD + ATP = SuCoA + Amm + Cys + NADH + 2 ADP	
22	0	Cys = Pyr + Amm	
23	-1	2 Gly + NAD = CO_2 + Amm+ Ser + NADH	
24	0	2 AKG + Lys + 4 NAD + NADPH + FAD = 2 CO_2 + 2Glu + 2AcCoA + 4 NADH + NADP + $FADH_2$	
25	0	AKG + Leu + NAD + ATP + FAD = CO_2 + Glu + 2AcCoA + NADH + ADP + $FADH_2$ + mevalonato	
26	0	AKG + Ile + 2 NAD + ATP + FAD = CO_2 + Glu + AcCoA + SuCoA + 2 NADH + ADP + $FADH_2$	
27		AKG + Arg + NAD = 2 Glu + NADH + urea	
28	0	Thr + NAD = AcCoA + Gly + NADH	
29	0	AKG + Val + 3 NAD + ATP + FAD = CO_2 + Glu + SuCoA + 3 NADH + ADP + $FADH_2$	
30	0	Phe + NADH + O_2 = Tyr + NAD	
31	0	AKG + Tyr + O_2 = CO_2 + Glu + AcCoA + Fum	
32	0	His = Glu + Amm	
33	-1	Asn = Amm + Asp	
34	-1	Pro + NADP + 0.5 O_2 = Glu + NADPH	
Producción de energía (Respiración y Ciclos Fútiles)			
35	-1	NADH + 2.5 ADP + 0.5 O2 = NAD + 2.5 ATP	
36	-1	1.5 ADP + FADH2 + 0.5 O2 = 2.5 ATP + FAD	
37	-1	NAD + NADPH = NADH + NADP	Transhidrogenasa
38	-1	ATP = Energía	
Síntesis de Biomasa			
39	0	1000 Protein + 219.8 FA + 177.3 ADN + 445 ARN = 1 Biomass	
40	0	0.758 Ala + 0.276 Glu + 0.347 Gln + 0.931 Gly + 0.537 Ser + 0.38 Lys + 0.506 Leu + 0.263 Ile + 0.279 Arg + 0.289 Asp + 0.394 Thr + 0.421 Val + 0.119 Met + 0.158 Phe + 0.117 Tyr + 0.114 His +	

		0.374 Pro + 0.273 Asn + 10.014 ATP + 0.189 Cys = 1 Protein + 10.014 ADP	
41	0	0.5 CO2 + 1 R5P + 1.9 Gln + 1.3 Ser + 1.3 Asp + 0.7 NAD + 1 NADPH + 9 ATP = 1.9 Glu + 0.8 Fum + 0.8 Gly + 1 ADN + 0.7 NADH + 1 NADP + 9 ADP	
42	0	1 CO2 + 1 R5P + 1.9 Gln + 1 Ser + 1.3 Asp + 1 NAD + 1 ATP = 1 Glu + 0.8 Fum + 0.5 Gly + 1 ARN + 1 NADH + 1 ADP	
43	0	9 ACoA + 10 NADH + 7 NADPH + 26 ATP + 1 O2 = 1 FA + 10 NAD + 7 NADP + 26 ADP	
		Reacciones de Transporte	
44	0	$Glc_e = Glc_i$	
45	-1	$Lac_i = Lac_e$	
46	-1	$Ala_i = Ala_e$	
47	-1	$Amm_i = Amm_e$	
48	0	$CO_{2i} = CO_{2e}$	
49	0	$O_{2e} = O_{2i}$	
50	-1	Glu_e + 1 ATP = Glu_i + 1 ADP	
51	-1	Asp_e + 1ATP = Asp_i + 1ADP	
52	-1	Gln_e + 0.33 ATP = Gln_i + 0.33 ADP	
53	-1	Ser_e + 0.33 ATP = Ser_i + 0.33 ADP	
54	-1	Gly_e + 0.33 ATP = Gly_i + 0.33 ADP	
55	0	Thr_e + 0.33 ATP = Thr_i + 0.33 ADP	
56	0	Met_e + 0.33 ATP = Met_i + 0.33 ADP	
57	-1	Pro_e + 0.33 ATP = Pro_i + 0.33 ADP	
58	-1	Asn_e + 0.33 ATP = Asn_i + 0.33 ADP	
59	0	Leu_e + 0.33 ATP = Leu_i + 0.33 ADP	
60	0	Ile_e + 0.33 ATP = Ile_i + 0.33 ADP	
61	0	Val_e + 0.33 ATP = Val_i + 0.33 ADP	
62	0	Phe_e + 0.33 ATP = Phe_i + 0.33 ADP	
63	-1	Tyr_e + 0.33 ATP = Tyr_i + 0.33 ADP	
64	0	His_e + 0.33 ATP = His_i + 0.33 ADP	
65	0	Lys_e + 0.33 ATP = Lys_i + 0.33 ADP	
66	-1	Arg_e + 0.33 ATP = Arg_i + 0.33 ADP	
67	-1	Cys_e + 0.33 ATP = Cys_i + 0.33 ADP	
68	0	= rBiomass	
69*	0	AKG + Gln + NADH = 2 Glu + NAD	Glutamato sintasa (GOGAT)
70	0	Amm + ATP = Gln + ADP	(GS)

*Reacción presente únicamente en el linaje celular Sf9. 0: reacción irreversible; -1: reacción rreversible.

Tabla B-3: Coeficientes de partición del nodo Piruvato. Tomado y adaptado de Bernal (2009)

Nodo Piruvato	
Flujos de entrada	
Glicolisis (PyK)	$\frac{v_{PyK}}{v_{PyK}+_{ME}}$
Enzima Málica (ME)	$\frac{v_{ME}}{v_{PyK}+_{ME}}$
Flujos de salida	
Lactato (LDH)	$\frac{v_{LDH}}{v_{PyK}+_{ME}}$
Alanina (AlaAT)	$\frac{v_{AlaAT}}{v_{PyK}+_{ME}}$
Acetil-CoA (PDH)	$\frac{v_{PDH}}{v_{PyK}+_{ME}}$

Tabla B-4: Coeficientes de partición del nodo AKG. Tomado y adaptado de Bernal (2009).

Nodo AKG	
Flujos de entrada	
Isocitrato (ICDH)	$\frac{v_{isocitrato}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$
Alanina (AlaAT)	$\frac{v_{AlaAT}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$
Aspartato (AspAT)	$\frac{v_{AspAT}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$
Glutamato (GDH)	$\frac{v_{GDH}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$
Flujos de salida	
Succinyl COA(αKGDH)	$\frac{v_{\alpha\mathrm{KGDH}}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$
Glutamato (GOGAT)	$\frac{v_{GOGAT}}{v_{OAA}+v_{AspAT}+v_{GDH}+v_{AlaAT}}$

Anexo C: Composición de fuente de nitrógeno orgánica

Tabla C-5: Composición de la fuente de nitrógeno orgánica y su respectivo grado de reducción y energía de formación. Las fracciones molares se calcularon de acuerdo a lo reportado por Monteiro (2015).

Componente	%mol	γ_i	$\Delta_f G$
Ala	11.20	12	-132
Arg	4.12	21	231.1
Asn	4.03	12	-253.7
Asp	4.26	12	-498.9
Cys	2.79	12	-102.7
Gln	5.13	18	-179
Glu	4.08	16	-421
Gly	13.75	6	-215.3
His	1.68	20	130.3
Ile	3.89	30	109.4
Leu	7.48	30	104.4
Lys	5.62	28	164.4
Met	1.76	24	62.4
Phe	2.34	40	173.8
Pro	5.53	22	4.7
Ser	7.93	10	-285.3
Thr	5.82	16	-220.6
Trp	0.65	46	304.6
Tyr	1.73	38	10.2
Val	6.21	24	22.2

*Nota: El valor de la energía de formación de cada compuesto fue calculada en equilibritaror.com

Anexo E. Tiempos característicos

Tabla E-6: Eventos de infección celular con sus respectivas constantes cinéticas y tiempos característicos de Dee & Shuler (1997)

Subproceso	**Constante cinética** $(\boldsymbol{h^{-1}})$	**Tiempo característico** $(\boldsymbol{h})$
Unión virus-célula	$K_a \mathrm{C} = (\alpha K_f R_{so}) C$	2.6-25.64 *
Endocitosis	K_{ev}	0.71
Fusión nuclear	K_{fus} , $K_{tran,v}$	0.83
Transporte al núcleo	K_n	0.203

$*$ Para concentraciones celulares al momento de infección (CCI) entre $5 \cdot 10^6 - 0.5 \cdot 10^6$ cell/ ml respectivamente .

Tabla E-7: Eventos de infección celular con sus respectivas constantes cinéticas y tiempos característicos de Roldão et al., (2007).

Subproceso	**Constante cinética** $(\boldsymbol{h^{-1}})$	**Tiempo característico** $(\boldsymbol{h})$
Unión virus-célula	$K_a \mathrm{C}$	12.86
Replicación DNA	K_{rDNA}	5.26
Síntesis de mRNA	K_{sRNA}	9.09*
Síntesis de proteína de interés	$K_{VP_i} C / C_{Vp_i}$	2051**
Muerte celular (intrínseca)	K_{d_1}	1250

*Tiempo calculado como el promedio de las tres velocidades de síntesis de ARN reportadas

** Tiempo calculado a partir de $K_{VP_i} = 0.058 \left(\frac{\mu g}{cell \cdot h} \cdot 10^6\right)$, $C = 0.1 \cdot 10^6 \frac{cell}{ml}$, $C_{Vp_i} = 11.9 \frac{\mu g}{ml}$ reportadas en Roldão et al., (2007).

Bibliografía

Adnan, N. A. A., Suhaimi, S. N., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., & Phang, L. Y. (2014). Optimization of bioethanol production from glycerol by Escheric h ia coli SS1. *Renewable Energy*, *66*, 625–633. https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032

Almudena, L. M. (1999). *Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano*.

Antoniewicz, M. R. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *42*(3), 317–325. https://doi.org/10.1007/s10295-015-1585-x

Antoniewicz, M. R. (2021). A guide to metabolic flux analysis in metabolic engineering: Methods, tools and applications. *Metabolic Engineering*, *63*(October 2020), 2–12. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.11.002

Bédard, C., Tom, R., & Kamen, A. (1993). Growth, Nutrient Consumption, and End-Product Accumulation in Sf-9 and BTI-EAA Insect Cell Cultures: Insights into Growth Limitation and Metabolism. *Biotechnology Progress*, *9*(6), 615–624. https://doi.org/10.1021/bp00024a008

Bernal, V., Carinhas, N., Yokomizo, A. Y., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2009). Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: A quantitative analysis of energetic metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, *104*(1), 162–180. https://doi.org/10.1002/bit.22364

Berretta, M. F., López, M. G., Taboga, O., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2013). Functional analysis of Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus late expression factors in Sf9 cells. *Virus Genes*, *46*(1), 152–161. https://doi.org/10.1007/s11262-012-0843-5

Bhatia, R., Jesionowski, G., Ferrance, J., & Ataai, M. M. (1997). Insect cell physiology. In *Cytotechnology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–9). https://doi.org/10.1023/A:1007985208221

Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annual Review of Virology*, *5*, 113–139. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356

Bosma, B., du Plessis, F., Ehlert, E., Nijmeijer, B., de Haan, M., Petry, H., & Lubelski, J. (2018). Optimization of viral protein ratios for production of rAAV serotype 5 in the baculovirus system. *Gene Therapy*, *25*(6), 415–424. https://doi.org/10.1038/s41434-018-0034-7

Carinhas, N., Bernal, V., Monteiro, F., Carrondo, M. J. T., Oliveira, R., & Alves, P. M. (2010). Improving baculovirus production at high cell density through manipulation of energy metabolism. *Metabolic Engineering*, *12*(1), 39–52. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.008

Carinhas, N., Bernal, V., Teixeira, A. P., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M., & Oliveira, R. (2011). Hybrid metabolic flux analysis: Combining stoichiometric and statistical constraints to model the formation of complex recombinant products. *BMC Systems Biology*, *5*. https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-34

Chang, D., Liu, Y., Chen, Y., Hu, X., Burov, A., Puzyr, A., Bondar, V., & Yao, L. (2020).

Study of the immunogenicity of the VP2 protein of canine parvovirus produced using an improved Baculovirus expression system. *BMC Veterinary Research*, *16*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02422-3

Chiou, T. W., Hsieh, Y. C., & Ho, C. S. (2000). High density culture of insect cells using rational medium design and feeding strategy. *Bioprocess Engineering*, *22*(6), 483–491. https://doi.org/10.1007/s004499900091

Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., & Chisti, Y. (2014). Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology Progress*, *30*(1), 1–18. https://doi.org/10.1002/btpr.1842

Contreras-Gómez, Antonio, Beas-Catena, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., & Molina Grima, E. (2018). The use of an artificial neural network to model the infection strategy for baculovirus production in suspended insect cell cultures. *Cytotechnology*, *70*(2), 555–565. https://doi.org/10.1007/s10616-017-0128-x

Cox, M., Alves, P., Carrondo, M., & Vicente, T. (2014). Industrial Large Scale of Suspension Culture of Insect Cells. In *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells* (First Edit).

Cox, M. M. J. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, *30*(10), 1759–1766. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016

Cueto Rojas, H. F. (2016). Anaerobic Amino Acid Production in Saccharomyces cerevisiae: A Thermodynamics Approach [Delft University of Technology]. In *TU Delft University*. https://doi.org/https://doi.org/10.4233/uuid:a565936a-b081-4581-9eb0-8c66bff307a8

de Gooijer, C. D., van Lier, F. L. J., van den End, E. J., Vlak, J. M., & Tramper, J. (1989). A model for baculovirus production with continuous insect cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 497–501. https://doi.org/10.1007/BF00263855

Dee, K. U., & Shuler, M. L. (1997). A mathematical model of the trafficking of acid-dependent enveloped viruses: Application to the binding, uptake, and nuclear accumulation of baculovirus. *Biotechnology and Bioengineering*, *54*(5), 468–490. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<468::AID-BIT7>3.0.CO;2-C

Doran, M. P. (2013). Engineering Principles Second Edition. In *Academic Press*.

Doverskog, M., Jacobsson, U., Chapman, B. E., Kuchel, P. W., & Häggström, L. (2000). Determination of NADH-dependent glutamate synthase (GOGAT) in Spodoptera frugiperda (Sf9) insect cells by a selective 1H/15N NMR in vitro assay. *Journal of Biotechnology*, *79*(1), 87–97. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00215-7

Drugmand, J. C. (2007). *Characterization of insect cell lines is required for appropriate industrial processes : case study of high-five cells for recombinant protein production*. Universidad Católica de Lovaina.

Drugmand, J., Schneider, Y., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, *30*(5), 1140–1157. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.014

Fabre, L. L., Arrías, P. N., Masson, T., Pidre, M. L., & Romanowski, V. (2019). Baculovirus-derived vectors for immunization and therapeutic applications. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 2: Applied Virology Approaches Related to Human, Animal and Environmental Pathogens*, 197–224. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814966-9.00011-1

Ferrance, J. P., Goel, A., & Ataai, M. M. (1993). Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(6), 697–707.

https://doi.org/10.1002/bit.260420604
Garnier, A., Voyer, R., Tom, R., Perret, S., Jardin, B., & Kamen, A. (1996). Dissolved carbon dioxide accumulation in a large scale and high density production of TGFβ receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. *Cytotechnology*, *22*(1–3), 53–63. https://doi.org/10.1007/BF00353924
Ghosh, A., Dhall, H., & Dietzgen, R. G. (2020). *Insect cell culture as a tool in plant virus research : a historical overview*.
Gotoh, T., Chiba, K., & Kikuchi, K. I. (2004). Oxygen consumption profiles of Sf-9 insect cells and their culture at low temperature to circumvent oxygen starvation. *Biochemical Engineering Journal*, *17*(2), 71–78. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00140-2
Gotoh, T., Fukuhara, M., & Kikuchi, K. I. (2008). Mathematical model for change in diameter distribution of baculovirus-infected Sf-9 insect cells. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(2), 379–386. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.008
Grzywacz, D. (2017). Basic and Applied Research: Baculovirus. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00003-2
Haas, R. (2004). *Asynchronies in Synchronous Baculovi rus Infections*. *March*.
Hefferon, K. L., Oomens, A. G. P., Monsma, S. A., Finnerty, C. M., & Blissard, G. W. (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*, *258*(2), 455–468. https://doi.org/10.1006/viro.1999.9758
Heijnen, J. J., & Kleerebezem, R. (2010). Bioenergetics of Microbial Growth. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1–24. https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib084
Heinen, J. J. (2010). Impact of thermodynamic principles in systems biology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 121, pp. 139–162). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2009_63
Hu, Y. C., & Bentley, W. E. (2000). A kinetic and statistical-thermodynamic model for baculovirus infection and virus-like particle assembly in suspended insect cells. *Chemical Engineering Science*, *55*(19), 3991–4008. https://doi.org/10.1016/S0009-2509(99)00579-5
Jhaveri, R. (2021). The Next Set of COVID-19 Vaccines: Leveraging New Development Platforms to Increase Access for More People Around the World. *Clinical Therapeutics*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.03.007
Kamen, A. A., Venereo-sanchez, A., & Chahal, P. S. (2021). Advancements in molecular design and bioprocessing of recombinant adeno-associated virus gene delivery vectors using the insect-cell baculovirus expression platform. *Biotechnology Journal*, *16*(April 2020), 1–17. https://doi.org/10.1002/biot.202000021
Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z., & Wang, Z. (2013). Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein Expression and Purification*, *90*(2), 104–116. https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.009
Liu, Y., Yang, C., Liu, C., Shen, C., Shiau, L., & Ioeng, J. B. I. B. (2010). Using a fed-batch culture strategy to enhance rAAV production in the baculovirus / insect cell system. *JBIOSC*, *110*(2), 187–193. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.004
Lubelski, J., Hermens, W., & Petry, H. (2014). Insect Cell-Based Recombinant Adeno-Associated Virus Production: Molecular Process Optimization. *BioProcessing Journal*, *13*(3), 6–11. https://doi.org/10.12665/j133.lubelski
Marheineke, K., Grünewald, S., Christie, W., & Reilander, H. (1998). Lipid composition of Spodoptera frugiperda (Sf9) and Trichoplusia ni (Tn) insect cells used for baculovirus

infection. *FEBS Letters*, *441*(1), 49–52. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01523-3

Miller, W. M., Wilke, C. R., & Blanch, H. W. (1989). Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. *Biotechnology and Bioengineering*, *33*(4), 477–486. https://doi.org/10.1002/bit.260330413

Monteiro, F. (2015). *Rational Design of Insect Cell-based Vaccine Production - Bridging Metabolomics with Mathematical Tools to Study Virus-Host Interaction*s. 207. www.itqb.unl.pt%5Cnwww.ibet.pt

Monteiro, F., Bernal, V., & Alves, P. M. (2017). The role of host cell physiology in the productivity of the baculovirus-insect cell system: Fluxome analysis of Trichoplusia ni and Spodoptera frugiperda cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*(3), 674–684. https://doi.org/10.1002/bit.26089

Monteiro, F., Carinhas, N., Carrondo, M. J. T., Bernal, V., & Alves, P. M. (2012). Toward system-level understanding of baculovirus-host cell interactions: From molecular fundamental studies to large-scale proteomics approaches. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue NOV). https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00391

Morgenroth, E. (2015). *How are characteristic times (□ char) and non-dimensional numbers related ? Fall*, 1–8. https://www.ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/baug/ifu/water-management-dam/documents/education/Lectures/UWM3/SAMM.HS15.Handout.CharacteristicTimes.pdf

Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, S. N., & Talwar, G. P. (1993). Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of vero cells to cytodex microcarriers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *56*(4), 369–374. https://doi.org/10.1002/jctb.280560407

Nandakumar, S., Ma, H., & Khan, A. S. (2017). Whole-Genome Sequence of the Spodoptera frugiperda Sf9 Insect Cell Line. In *American Society for Microbiology*.

Niklas, J., Schneider, K., & Heinzle, E. (2010). Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(1), 63–69. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.011

Öhman, L., Ljunggren, J., & Häggström, L. (1995). Induction of a metabolic switch in insect cells by substrate-limited fed batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *43*(6), 1006–1013. https://doi.org/10.1007/BF00166917

Öhman, Lars., Alarcon, M., Ljunggren, J., Ramqvist, A. K., & Häggström, L. (1996). Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnology Letters*, *18*(7), 765–770. https://doi.org/10.1007/BF00127885

Ortega Quintana, F. A., Álvarez, H., & Botero Castro, H. A. (2017). Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado. *Revista ION*, *30*(1), 73–90. https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006

Paul, A., & Prakash, S. (2010). Baculovirus reveals a new pH-dependent direct cell-fusion pathway for cell entry and transgene delivery. *Future Virology*, *5*(5), 533–537. https://doi.org/10.2217/fvl.10.45

Possee, R. D., Chambers, A. C., Graves, L. P., Aksular, M., & King, L. A. (2020). *Recent Developments in the Use of Baculovirus Expression Vectors*.

Roldão, A., Vieira, H. L. A., Charpilienne, A., Poncet, D., Roy, P., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M., & Oliveira, R. (2007). Modeling rotavirus-like particles production in a baculovirus expression vector system: Infection kinetics, baculovirus DNA replication, mRNA synthesis and protein production. *Journal of Biotechnology*,

128(4), 875–894. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.003
Sandler, S. I. (2006). *Chemical, Biochemical Engineering, And TermodinamicsChemical, Biochemicai Engineering, And Termodinamic* (Wiley (ed.); 4ta Edició).
Saxena, A., Byram, P. K., Singh, S. K., Chakraborty, J., Murhammer, D., & Giri, L. (2018). A structured review of baculovirus infection process: Integration of mathematical models and biomolecular information on cell–virus interaction. *Journal of General Virology*, *99*(9), 1151–1171. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001108
Shu, B., Zhang, J., Sethuraman, V., Cui, G., Yi, X., & Zhong, G. (2017). Transcriptome analysis of Spodoptera frugiperda Sf9 cells reveals putative apoptosis-related genes and a preliminary apoptosis mechanism induced by azadirachtin. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12713-9
Slack, J., Arif, B. M., Monteiro, F., Carinhas, N., Carrondo, M. J. T., Bernal, V., & Alves, P. M. (2006). The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. *Advances in Virus Research*, *3*(NOV), 99–165. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00391
Sokolenko, S., George, S., Wagner, A., Tuladhar, A., Andrich, J. M. S., & Aucoin, M. G. (2012). Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnology Advances*, *30*(3), 766–781. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.009
Stein, R. (2020). *Process Intensification of Spodoptera frugiperda (Sf) Cell Growth via Multi-Parallel Bioreactor System* (Issue 2012). MIT Sloan School of Management.
Suarez-Zuluaga, D. A., Borchert, D., Driessen, N. N., Bakker, W. A. M., & Thomassen, Y. E. (2019). Accelerating bioprocess development by analysis of all available data: A USP case study. *Vaccine*, *37*(47), 7081–7089. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.026
Széliová, D., Štor, J., Thiel, I., Weinguny, M., Hanscho, M., Lhota, G., Borth, N., Zanghellini, J., Ruckerbauer, D. E., & Rocha, I. (2021). Inclusion of maintenance energy improves the intracellular flux predictions of CHO. In *PLoS Computational Biology* (Vol. 17, Issue 6). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009022
Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(December). https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420
van Oers, M. M. (2011). Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology*, *107*(SUPPL.), S3–S15. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.001
Van Oers, M. M., Pijlman, G. P., & Vlak, J. M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology*, *96*(1), 6–23. https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0
VLAK, J. M., de GOOIJER, C. D., TRAMPER, J., & MILTENBURGER, H. G. (2002). *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects*. *1*, 303.
von Kamp, A., Thiele, S., Hädicke, O., & Klamt, S. (2017). Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, *261*(January), 221–228. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.001
Von Stockar, U. (2013). The role of thermodynamics in biochemical engineering. In *Biothermodynamics: The Role of Thermodynamics in Biochemical Engineering*. EFPL Press. https://doi.org/10.1201/b15428-3
von Stosch, M., Carinhas, N., & Oliveira, R. (2014). Hybrid modeling for systems biology: Theory and practice. *Modeling and Simulation in Science, Engineering and*

Technology, *65*, 367–388. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08437-4_7

Wang, L., Lai, L., Ouyang, Q., & Tang, C. (2011). Flux balance analysis of ammonia assimilation network in E. coli predicts preferred regulation point. *PLoS ONE*, *6*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016362

Wickham, T. J., Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R., & Wood, H. A. (1992). Equilibrium and kinetic analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines. *Journal of General Virology*, *73*(12), 3185–3194. https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-12-3185

Xie, L., & Wang, D. I. C. (1994). Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. *Biotechnology and Bioengineering*, *43*(11), 1164–1174. https://doi.org/10.1002/bit.260431122

Yu, Q., Xiong, Y., Gao, H., Liu, J., Chen, Z., Wang, Q., & Wen, D. (2015). Comparative proteomics analysis of Spodoptera frugiperda cells during Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus infection. *Virology Journal*, *12*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12985-015-0346-9

Zhang, Y., Enden, G., Wei, W., Zhou, F., Chen, J., & Merchuk, J. C. (2020). Baculovirus transit through insect cell membranes: A mechanistic approach. *Chemical Engineering Science*, *223*, 115727. https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115727