UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VINICIUS MINORU RUSSO TARODA

VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE VACINA PARA INFLUENZA UTILIZANDO CULTIVO DE CELULA ANIMAL

LORENA
2016

VINICIUS MINORU RUSSO TARODA

VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE VACINA PARA INFLUENZA UTILIZANDO CULTIVO DE CELULA ANIMAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo como requisito parcial para conclusão da Graduação do curso de Engenharia Bioquímica

Orientador: Prof.ª Dra. Maria Bernadete de Medeiros

Lorena
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Taroda, Vinicius Minoru Russo
Viabilidade da produção de vacina para influenza utilizando cultivo de células animais / Vinicius Minoru Russo Taroda; orientadora Maria Bernadete de Medeiros. - Lorena, 2016.
35 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientadora: Maria Bernadete de Medeiros

1. Vacinas. 2. Influenza. 3. Células animais. I. Título. II. Medeiros, Maria Bernadete de, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos Orixás por me guiarem, me protegerem e me ajudar em meu desenvolvimento.

Aos meus pais, Elis e Douglas, pela dedicação e paciência para comigo, e familiares por sempre acreditarem em meu potencial e me apoiarem em minhas decisões.

Aos meus amigos de republica, por me ajudarem em minha vida acadêmica e tornarem minha estadia em Lorena mais agradável.

A professora Maria Bernadete de Medeiros, que aceitou ser minha orientadora durante a iniciação cientifica, também a Barbara Pereira e Fabricio Ferreira, pelo apoio durante essa fase, que me ajudou a decidir o caminho profissional que pretendo seguir.

E a todos as pessoas que passaram por minha vida ajudando a moldar a pessoa que sou hoje.

Resumo

Taroda, V. M. R. **Viabilidade da produção de vacina para influenza utilizando cultivo de células animais.** 2016. 34p Monografia (Graduação em Engenharia Bioquimica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de são Paulo, Lorena, 2016.

Com a ocorrência de novas epidemias derivadas da infecção pelo vírus influenza A (H1N1 e H3N1) e casos em que doenças sazonais se proliferam fora de época, como ocorrido neste ano, novas tecnologias de produção de vacinas vêm sendo pesquisadas para a substituição do método de produção por ovos embrionados, que demanda de tempo, espaço e não apresenta opções de escalonamento e otimização. Os novos métodos adotam a utilização de cultivo de células animais, campo que tem se desenvolvido com os avanços biotecnológicos, no que se refere ao desenvolvimento de biorreatores e estudo de novos meios de cultura e linhagens celulares. Levando em consideração as informações obtidas por meio de diversos estudos e experimentos relatados na literatura, aponta-se reatores e linhagens, que poderiam apresentar bons resultados de produção.

Palavras-chave: Vacina. Influenza. Células animais.

Abstract

Taroda, V. M. R. **Viability of the influenza vaccine production by using animal cells cultivation**. 2016. 34p. Monografia (Graduação em Engenharia Bioquimica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de são Paulo, Lorena, 2016.

With the occurrence of new epidemics of infection caused by influenza A (H1N1 and H3N2) and in cases that seasonal diseases have been proliferated out of season, as it has happened this year, new vaccine production technologies have been researched to replace the production methods for embryonated eggs which requires time, space and doesn`t show staggering and optimization options. The new methods adopt the usage of animal cell cultivation, an area which has been developed with the biotechnology advances regarded to the development of bioreactors and study of new culture ways and cell lines. Taking into account the information obtained from studies and reported experiments in literature, it is pointed out reactors and cell lines that could provide good production results.

Keywords: Vaccine. Influenza. Animal cells

Tabela de figuras

Figura 1- Esquematização da estrutura do vírus influenza. 15
Figura 2- Esquema do mecanismo de replicação do vírus Influenza. 16
Figura 3- Representação da hibridização do vírus influenza. 18
Figura 4- frasco T 22
Figura 5- garrafa roller 23
Figura 6- sistema staked-plate 24
Figura 7- frasco spinner 25
Figura 8- biorreator em bolsa 26
Figura 9- biorreatores agitado e air lift 27
Figura 10 - biorreator de fibra oca 27

Lista de tabelas

Tabela 1- Exemplo de linhagens celulares utilizadas,..... 20

Lista de anexos

Anexo A - suplementos mais utilizados no cultivo de células animas 34

Sumário

1. Introdução 13
2. Objetivos 14
3. Revisão 15
3.1. Vírus influenza 15
3.1.1. Estrutura 15
3.1.2. Replicação do vírus 16
3.2. Coleta de dados para vacina 17
3.3. Produção em ovos 17
3.3.1. Preparo do vírus para produção da vacina em ovos 17
3.3.2. Produção da vacina em ovo embrionado 18
3.4. Cultivo de células animais 19
3.4.1. Células animais 19
3.4.2. Meios de cultura 20
3.4.3. Biorreatores 21
3.4.3.1. Sistema para células ancoragem-dependente 23
3.4.3.2. Biorreatores de leito 24
3.4.3.3. Sistemas para células em suspensão ou aderidas em microcarregadores 25
3.4.3.4. Biorreatores ou fermentadores 26
3.4.3.5. Reatores de fibras ocas 27
4. Escolha do método ..... Erro! Indicador não definido.
5. Conclusão 30
Referências 31

1. Introdução

Doenças existiam mesmo antes de nossa espécie, estas podendo ser causadas por vírus e micro-organismos. Algumas dessas doenças causaram elevada mortandade, como é o caso da gripe espanhola, que causou cerca de 40 milhões de mortes, em 1918, gripe asiática e gripe de Hong Kong, ocorridas após a década de 50, que vitimaram cerca de dois milhões pessoas. (PRINCIPAIS..., 2009). A última pandemia foi causada pelo vírus H1N1, que ficou conhecido como gripe suína, e pode ter causado centenas de milhares de mortes, ocorrida em 2009. (GRIPE..., 2012)

Nota-se que as últimas pandemias foram causadas pelo vírus influenza, causador das gripes. Infecções como a influenza são facilmente transmissíveis, ocorrendo por secreções das vias respiratórias ou contato com superfícies contaminadas. O período de transmissibilidade tem seu início 24 horas antes dos sintomas e apresenta duração média de 7 dias em adultos e 14 dias em crianças. (CARNEIRO et al., 2010). Mesmo com a existência de medicamentos antivirais para o tratamento da influenza A, o risco de transmissão é alto devido ao contato diário entre as pessoas. Deste modo, mesmo com a utilização de medicamentos existe o risco de um alastramento da doença. A fim de evitar possíveis epidemias, bem como melhorar a qualidade de vida da população, houve o desenvolvimento de vacinas. Por meio da vacinação algumas doenças foram erradicadas como é o caso da varíola, em 1980.(HENDERSON, 2011)

A produção de vacinas contra a influenza utilizando ovos embrionados não mudou muito desde a década de 1950. Isto abre espaço para estudo de novas técnicas com o objetivo de otimizar a produção de vacinas contra o vírus, utilizando a técnica de cultivo de células animais, assim como na produção de outras vacinas.

2. Objetivos

Objetivos gerais: realizar uma revisão bibliográfica a fim de apresentar o método de produção de vacina contra influenza A e os diferentes métodos para o cultivo de célula animal.

Objetivo especifico: apontar um ou mais métodos para a produção da vacina utilizando o cultivo de célula animal.

3. Revisão

3.1. Vírus influenza

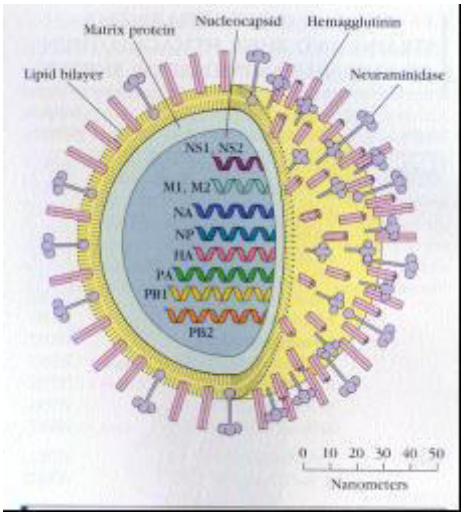
3.1.1. Estrutura

O vírus da influenza pertence à família Orthomyxoviridae e pode ser dividido em 3 tipos, influenza A, B e C. A causadora das pandemias são vírus do tipo A, sendo ainda subdivididos levando em consideração as proteínas da superfície do envelope, hemaglutinina (HA ou H) e neuraminidase (NA ou N), entre outras proteínas.

O envelope do vírus da gripe tem forma esférica, de tamanhos entre 90-100 nm de diâmetro, representada na figura 1, o envelope é formado por partes da membrana plasmática da célula e possui as duas proteínas H e N, sendo a H responsável por se aderir a célula hospedeira e pela entrada do vírus na célula, enquanto o N previne que o vírus se ligue a uma célula inadequada para sua replicação e pela liberação do vírus após a replicação.

O genoma viral é formado por oito segmentos de RNA e cada seguimento forma um ribonucleoproteína (RNP) pela associação com nucleoproteínas, cada um desses RNP encontra-se ligado com RNA polimerase, podendo codificar mais que uma proteína por segmento de RNA. (PEDRO; COSTA, 2001)

Figura 1- Esquematização da estrutura do vírus influenza.



Fonte: (PEDRO e COSTA, 2001)

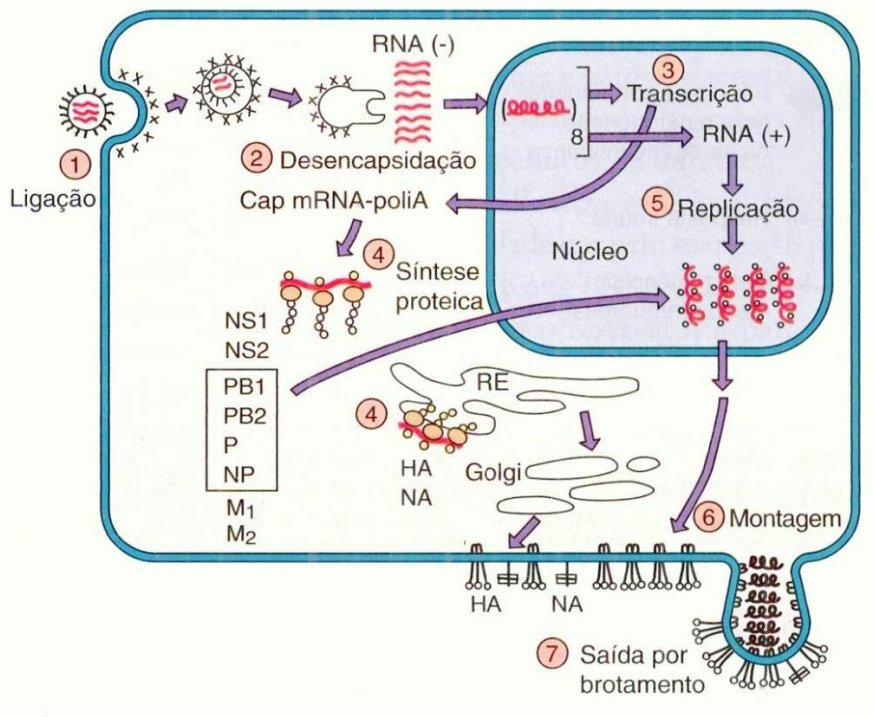
3.1.2. Replicação do vírus

A replicação se inicia com a ligação do vírus pelos receptores HA que induzirá a entrada na célula hospedeira formando um endossoma. A parede do endossoma e do envelope se fundirão devido a formação de monômeros de hemaglutinina conhecidos como HA2, esta fusão libera o nucleocapsídeo no citoplasma da célula.

Todos os segmentos serão levados ao núcleo onde serão transformados pelos RNA polimerases ligadas aos RNA(-) virais, estes são transcritos para RNA(+) e codificados em RNA mensageiros ou replicados em novos RNA(-). Alguns desses seguimentos de mRNA seguem para o citoplasma onde suas proteínas serão sintetizadas. As proteínas do envelope serão sintetizadas pelos ribossomos no reticulo endoplasmático, os seguimentos de RNA virais continuam sua replicação, até que a proteína N1 se ligue a eles, levando a parada da síntese de novos mRNA.

As proteínas HA, NA e M2 se ligam a membrana plasmática, os novos nucleocapsídeos são levados até a superfície da célula, com a ajuda das proteínas M1 e NS2, essas então se associam às proteínas já incorporadas na membrana. O empacotamento se completa com o fechamento da membrana plasmática, liberando o vírus. (PEDRO; COSTA, 2001)

Figura 2- Esquema do mecanismo de replicação do vírus Influenza.



Fonte: (FISIOPATOLOGIA..., 2012)

3.2. Coleta de dados para vacina

Devido à facilidade de mutação genética dos vírus, é necessário que o exista um acompanhamento dessas mutações, este trabalho é feito pela Organização Mundial de Saúde (WHO do inglês World Health Organization). Para que este sistema funcione anualmente são analisadas amostras retiradas de porcos e aves para verificar se o vírus sofreu variação nos antígenos. Este sistema foi implantado em 1947, e também são recolhidas amostras de pessoas com sintomas de influenza, que são primeiramente analisadas nos centros nacionais de influenza, e caso se trate de um novo vírus, é enviado para um dos quatro Centros Colaboradores de Referência e Pesquisa de Influenza. (GERDIL, 2003)

Por se tratar de uma doença sazonal que ocorre principalmente no inverno, a WHO analisa os dados recolhidos pelos centros, e a partir deles recomenda qual o melhor variante a ser incubado para a produção de vacinas mais eficazes. Os dados são passados para as companhias fabricantes de vacinas com 6 meses de antecedência, no hemisfério norte o resultado é entregue no mês de Fevereiro, enquanto que no sul é entregue no mês de Setembro. (BARR et al., 2014)

Para a produção de uma vacina eficiente é necessário a incubação dos vírus com maior probabilidade de infecção, que no caso da influenza A são os subtipos H3N2 e H1N1, e também é adicionada um vírus influenza do tipo B, causadores da gripe comum. Entre os anos de 1980 e 2002 foram necessárias um diversas modificações, sendo que dessas 14 foram para o subtipo H3N2, 8 para a H1N1 e 10 para o tipo B (GERDIL, 2003)

3.3. Produção em ovos

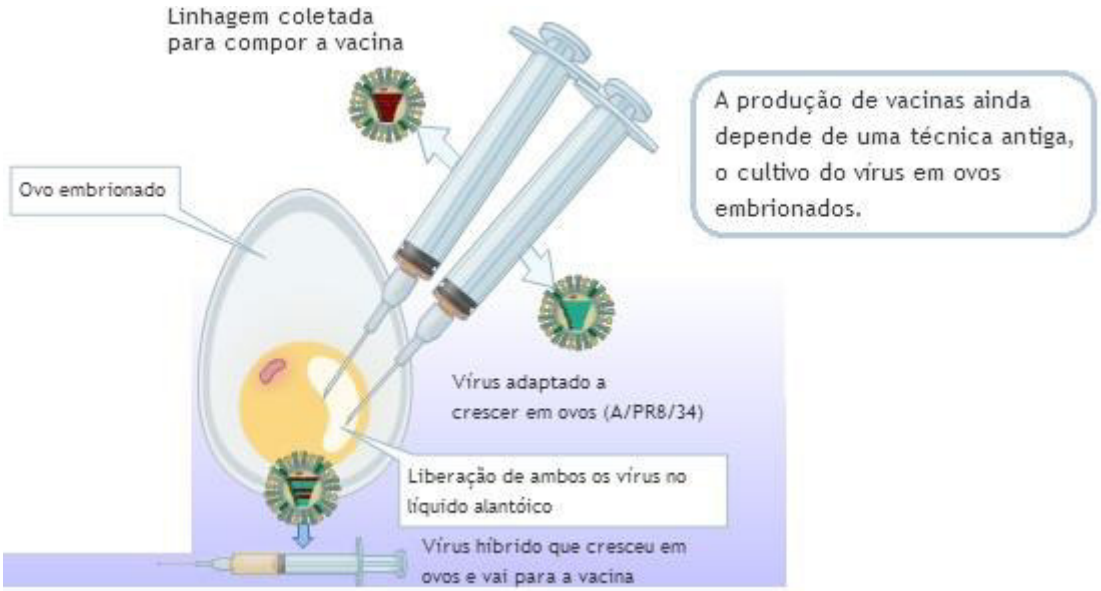
3.3.1. Preparo do vírus para produção da vacina em ovos

Para que o vírus consiga se replicar sem dificuldades nos ovos embrionados, é necessário uma hibridização do vírus com uma linhagem com

bom crescimento nas condições do ovo e a linhagem utilizada é a A/PR8/34, desde 1970.

A hibridização é feita utilizando o vírus vacinal e o adaptado; ambos são inoculados nas células, e desta forma, vários híbridos são gerados e por meio de testes isola-se o que produz imunidade contra o vírus apresentado pela WHO, que não seja perigoso e que tenha bom crescimento nos tecidos dos ovos (GERDIL, 2003).

Figura 3- Representação da hibridização do vírus influenza.



Fonte: (CURIOSIDADES..., 2012)

3.3.2. Produção da vacina em ovo embrionado

O ovo oferece um ambiente estéril e favorável para a replicação do hibrido de influenza, porem para que o vírus tenha uma boa taxa de replicação deve ser incubado em ovos com idade entre 7 e 19 dias, pois antes desse período o ovo não apresenta a cavidade alantoide, e após esse período o embrião começa a apresentar imunidade. (IAMARINO, 2009) Por esse motivo, o processo é de difícil escalonamento e demanda muito tempo e custos, além de apresentar um baixo rendimento. (HOMMA et al., 2011)

3.4. Cultivo de células animais

3.4.1. Células animais

As células animais diferem dos micro-organismos em muitos aspectos: são maiores, muitas formam tecidos e por esses e outros fatores tem maior complexidade em seu cultivo. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Hoje, existem alguns tipos de células usadas no cultivo de células animais, as células primárias, linhagens celulares diploides, linhagens celulares continuas e hibridomas. As células primarias são isoladas do tecido e cultivadas; as diploides são aquelas que apresentam número par de cromossomos; as linhagem celular contínuas são derivadas de células primárias, mas por uma transformação pode se proliferar indefinidamente; hibridomas são fusões entre linfócitos e células tumorais utilizados para a expressão de anticorpos monoclonais. (STEPHANO; SANTOS, 2015).

Para o crescimento de células primarias utilizasse o processo de repique, as células são inoculadas ao meio e espera-se que cresçam até determinado ponto, onde são novamente inoculadas em um novo meio para continuar seu crescimento. Algumas linhagens necessitam de um suporte para seu crescimento, sendo inibidas pelo contado com células vizinhas. As células podem se multiplicar apenas um certo número de vezes, que normalmente está entre 50 e 100 vezes, isto considerando apenas as células normais, que não causarão tumores em cobaias. (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961)

Estas células ainda podem ser divididas em epiteliais, que revestem os órgãos e são facilmente cultivadas; fibroblastos, retirada de tecido conjuntivo e usada com frequência; musculares, músculos são constituídos de mioblastos que podem ser crescidos por meio de cultura; e neuronais, neurônios são altamente diferenciadas e não podem ser crescidas por meio de cultivo. Algumas linhagens de células frequentemente utilizadas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1- Exemplo de linhagens celulares utilizadas,

Linhagem celular	Origem	Aplicações
BHK (baby hamster kidney)	Isolada em 1961 a partir de rim de hamster recém-nascido	Células aderentes, adaptáveis para crescimento em suspensão. Produção de vacina febre aftosa e raiva
MDCK	Rim de cadela	Linhagem aderente e utilizada na produção de vacinas para animais
MDBK	Rim de bovino	Linhagem aderente e utilizada na produção de vacinas para animais
MRC-5	Células embrionárias de pulmão humano	Célula diploide utilizada para produção de vacinas
Vero	Rim de macoco-verde africano, obtida em 1962	Linhagem estabelecida com algumas características de célula normal diploide

Fonte: adaptação de (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.2. Meios de cultura

Os meios de cultura tem sido estudado nos últimos 50 anos, desenvolvidos a partir de soro, sangue e outros extratos de tecidos, usados nos primeiros experimentos in vitro. Foram então realizadas analises para a formulação de meios sintéticos, sendo o primeiro desenvolvido por Eagle, em 1955. Este meio continha aminoácidos, vitaminas e ions, além de soro para suprir os componentes indefinidos para o crescimento celular in vitro, e o meio ficou conhecido como meio essencial mínimo de Eagle (do inglês EMEM). (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Novos meios foram sintetizados para suprir a necessidades das células conforme a utilização de novas culturas, e com o desenvolvimento e compreensão do seu metabolismo, novos soros puderam ser formulados para otimizar o crescimento das culturas. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Com objetivo de melhorar o crescimento das culturas é necessário a utilização de diversos suplementos que têm a finalidade de suprir as necessidades do tecido em desenvolvimento e adequar o meio para tal. Esses suplementos variam desde tampões de pH a soros e os principais suplementos utilizados estão relatados no anexo A. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Os meios de cultivo celulares têm grande complexidade; os meios iniciais como o de Eagle, foram projetados para pequenas escalas e

necessitam de soro para suprir as células. Com o desenvolvimento dos processos biotecnológicos foi necessário desenvolver meios para processos de grande escala, que por sua vez, não contem soro, mas possui concentração de nutrientes elevada. Estes meios ainda estão em desenvolvimento para o melhorar o rendimento de produção e diminuir os custos do processo. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Para a produção de vacinas virais ainda se necessita de otimização dos meios, para suprir grandes densidades celulares, que exige, além dos nutrientes para crescimento celular a replicação viral. (SANTOS e STEPHANO, 2015)

A Otimização de meios atualmente são feitas por meio de:

- Titulação de componentes: que se trata da adição de diferentes componentes analisando a resposta da linhagem.
- Mistura de meios: consiste em misturar meios já formulados e escolhe-se o meio com melhor desenvolvimento das células, apesar de ser um método mais rápido não obtém conhecimento do metabolismo da linhagem.
- Analise do metabolismo celular: consiste em verificar o consumo médio dos nutrientes e a formação de metabolitos, verificando-se a diferença entre as condições iniciais do meio e as finais.

3.4.3. Biorreatores

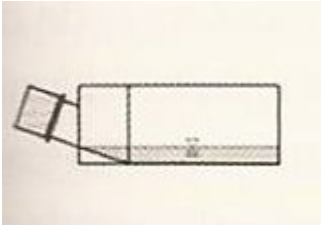
Os biorreatores para o cultivo de célula animal precisam apresentar parâmetros mais próximos possíveis do ambiente do qual o tecido foi removido, por meio de termostatização, controle de pH, fornecimento de nutrientes e oxigênio, além da retirada de CO_2. As características exigidas para um biorreator para o crescimento das células são:

- Mistura e aeração com baixo cisalhamento: o tamanho das células as tornam menos resistentes ao cisalhamento.
- Turbulência para transferência de calor: a faixa de crescimento ótimo tem uma faixa de variação pequena de aproximadamente $\pm$0,5ºC

- Dispersão adequada de ar e gás
- Prevenção de segregação do substrato
- Mensurabilidade dos principais parâmetros do processo
- Manutenção de estabilidade e esterilidade do processo
- Facilidade de manutenção e manuseio (SANTOS; STEPHANO, 2015)

O principal biorreator para produção de pequenas escalas são os frascos T, apresentado na figura 4, que podem produzir 10^7 células ancoragem-dependentes ou 10^8 células em suspensão. Devido ao custo e espaço, este processo não pode ser feito em grande escala, sendo usado principalmente durante a fase de desenvolvimento. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 4- frasco T



Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Para o desenvolvimento de escalonamento foram necessários dividir as células animis em três tipo: as ancoragem-dependentes, que necessitam de suporte; as que crescem em suspensão e as que podem crescer em ambos os casos. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Os principais problemas do escalonamento são: demanda de oxigênio, devido à baixa solubilidade do oxigênio. O fornecimento para grandes volumes de meio e altas densidades celulares torna a oxigenação do meio um dos principais dificuldades do escalonamento; gradiente de nutrientes e metabolitos, os metabólitos sintetizados pelas células animais tendem a permanecer ao redor delas dificultando a continuidade da produção e fornecimento de novos nutriente, dessa forma é necessário a utilização de equipamentos para a homogeneização do meio no biorreator; logística, enquanto pequenos frascos são facilmente manipulados, para inoculação e esterilização, os biorreatores não possuem tal facilidade e os tempos para

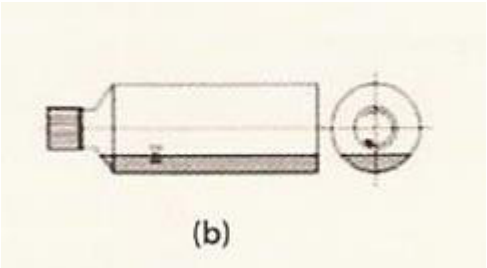
chegar a temperaturas de esterilização e incubação podem ser de horas. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.1. Sistema para células ancoragem-dependente

3.4.3.1.1. Garrafas roller

Consiste de frascos com superfície interna entre 490 cm² e 1.800 cm², que são preenchidos com uma quantidade de meio pequena, e colocado na horizontal, um eixo também na horizontal faz com que o meio circule pela superfície interna da garrafa. Deste modo as células aderem à superfície, a rotação é ajustada para que as células não se ressequem, auxiliando assim a transferência de oxigênio do processo. Para o aumento de escala é necessário apenas aumentar o número de garrafas, para uma grande escala é utilizada a automação para o manuseio das garrafas, sendo possível a produção de dezenas de milhares de garrafas. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 5- garrafa roller



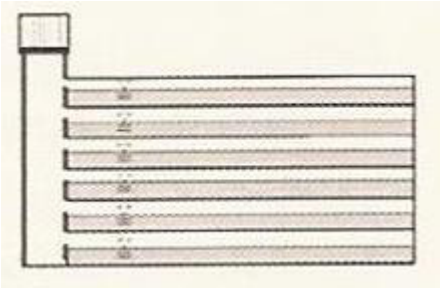
Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.1.2. Sistema stacked-plate ou multitray

Trata-se de superfícies empilhadas paralelamente, em uma unidade podendo conter até 40 superfícies, o meio é adicionado utilizando uma abertura e espalhado pelas placas devido a sua leve inclinação, cada unidade é selada, dificultando a retirada das células por raspagem. Outro problema é a dificuldade de manter a concentração de CO_2 no meio necessário para o tamponamento por bicarbonato, em alguns casos isto foi resolvido por adição de um sistema de distribuição de gases. Assim como o sistema de garrafas

roller, o escalonamento depende apenas do aumento do número de unidades. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 6- sistema staked-plate



Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.1.3. Microcarregadores

São pequenas partículas sintetizadas com interesse de proporcionar uma superfície para o ancoragem das células. Dessa forma as garante-se uma superfície media de 30 cm^2 por cm^3 ao utilizar microcarregadores de diâmetro de 200 µm, fornecendo uma superfície até 10 vezes maior que as garrafas roller e stacked-plate. Estas partículas tem a vantagem de partículas que necessitam de um suporte poderem ser cultivadas nos mesmos reatoras utilizados em cultivo de células suspensas. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Os microcarregadores possuem características físicas importantes para sua utilização, como a densidade e as mais utilizadas estão em torno de 1,02 e 1,04 g/cm^3; transparência, importante para a análise das células em microscópios; porosidade, a maioria é projetada para a aderência na superfície, as células crescidas nos poros apresentam maior resistência a cisalhamento devido a proteção do microcarregador; diâmetro, para garantir a homogeneidade do reator e a eficiência volumétrica. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.2. Biorreatores de leito

Os biorreatores de leito são divididos em leito fixo e leito fluidizado, o leito fixo consiste de uma camada de alta densidade de microcarregadores, um trocador de gás, um tanque de armazenamento para o meio e uma bomba que

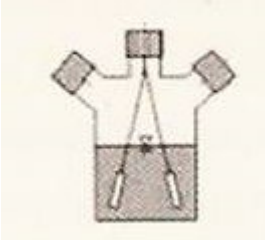
move o meio do tanque estoque para o biorreator. Estes reatores tem um bom rendimento espaço/tempo e são utilizados para produção de vírus. Já o leito fluidizado tem a vantagem de apresentar altas taxas de vazão que garante alta taxa de transferência de massa e calor. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.3. Sistemas para células em suspensão ou aderidas em microcarregadores

3.4.3.3.1. Frascos spinner

São frascos com dispositivos de agitação, com volumes entre 100 ml e 36 Litros. Apesar de existirem biorreatores pequenos, o frasco apresenta menor custo, que o biorreator, por tem menos sistemas de instrumentação e controle. Os frascos normalmente são utilizados na produção do inoculo ou testes para o desenvolvimento de medicamentos e diagnósticos. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 7- frasco spinner



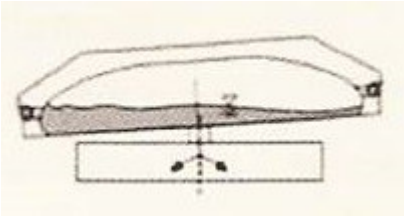
Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.3.2. Bolsas para cultura

As bolsas para cultura são caracterizadas por serem impermeáveis a gases, descartáveis e tem volume entre 100 ml e 500 litros. Sua utilização consiste em ter o meio de cultura preenchendo metade da bolsa, enquanto a outra metade é preenchida por CO_2 e ar e esta bolsa é colocada sobre um balanço automatizado, de modo que ajude na difusão do oxigênio sem que cause a formação de bolhas. Este método é utilizado para a o crescimento de inoculo para escalas maiores e suas principais vantagens são o fato de possuir entradas para sistemas de controle e ser descartável, reduzindo o tempo

necessário para limpeza e esterilização das bolsas. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 8- biorreator em bolsa



Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

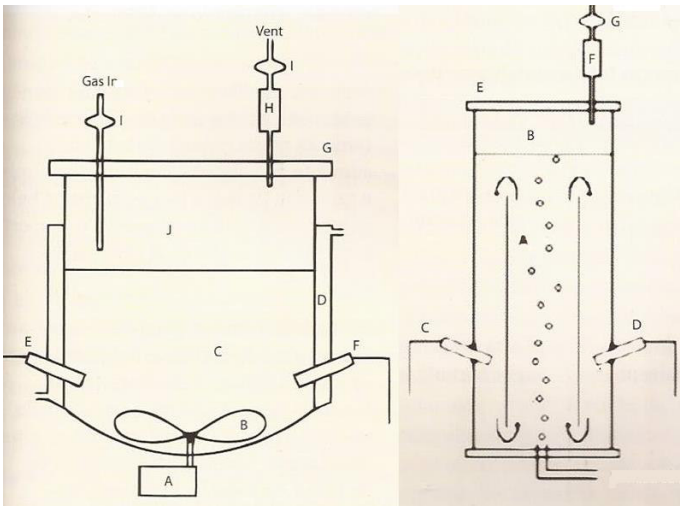
3.4.3.4. Biorreatores ou fermentadores

Os biorreatores mais utilizados atualmente na produção em larga-escala são os reatores de tanque agitados e os reatores air-lift. O mais utilizado é reator agitado, que tem conhecimento vasto adquirido de fermentações microbianas, porém as células animais exigiram algumas modificações para a utilização desses reatores. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Devido ao conhecimento dos reatores de tanque agitado, o processo de escalonamento é mais simples, assim como o controle dos parâmetros do meio. O grande problema deste biorreator é garantir a homogeneidade do meio, assim como a ocorrência de apoptose, sendo esta induzida por modificação dos parâmetros de oxigênio, pH, ou até mesmo estresse físico das células; normalmente se utiliza reatores de tanque agitado de 20 mil litros. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Já os reatores air-lift apresentam um menor custo, pois a agitação se dá por uma taxa de transferência de gás; as bolhas ascendentes fazem a homogeneização do meio, e outro motivo para o menor custo é a menor necessidade de esterilização a longo prazo, além de possuir a facilidade de escalonamento. Porém, estes reatores não são recomendados para grandes variações de parâmetros como a concentração de biomassa, viscosidade, formação de espuma, entre outras. Normalmente são utilizados reatores air-lift de 5 mil litros para o cultivo de células animais. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 9- biorreatores agitado e air lift

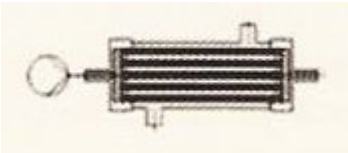


Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

3.4.3.5. Reatores de fibras ocas

Se trata de um reator de sistema heterogêneo; as células se aderem na parte externa de um capilar no qual percorre o meio de cultura; os nutrientes passam pela fibra, e são utilizados pelas células, que liberam seu produto na região extracapilar, e depois são retirados por perfusão. A vantagem desse reator é a utilização de altas densidades celulares. Para reatores pequenos, este sistema oferece bom rendimento, porém o uso em grande escala é prejudicado pelo fato de pressão ao longo da fibra diminuir, impossibilitando o uso industrial. (SANTOS; STEPHANO, 2015)

Figura 10 - biorreator de fibra oca



Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)

4. Possíveis escolhas de produção

A produção atual da vacina apresenta dificuldades, tendo em vista que os ovos utilizados devem ser provenientes de galinhas orgânicas, que não recebem antibióticos, fazendo com que os ovos sejam menores e reduzindo sua produção. Existe também necessidade de estarem fertilizados, e por fim o processo apresenta baixo rendimento para a vacina contra a Influenza A, sendo apenas de uma dose por ovo. (BLANCO, 2009)

Graças aos avanços feitos nos sistemas de sensores e controle dos biorreatores, e os avanços nas linhagens de cultura alcançados atualmente, tornou-se possível o crescimento de células animais em larga escala, sendo utilizadas para a produção de diversos compostos, como vacinas, proteínas, anticorpos, entre outros. (HU; AUNINS, 1997)

Confirmado pelos estudos realizados no departamento de saúde do Reino Unido em 2001, a utilização de células animais provenientes de rim de cadela (MDCK), adotando a tecnologia de microcarregadore, mostra a possibilidade de um reator de 1000 litros ter a capacidade produzir em equivalente a 30800 ovos, tornando o método viável. (TREE et al., 2001)

O processo ainda poderia ser otimizado com a utilização de biorreatores de fibra oca, que poderiam ser escalonados, necessitando apenas de uma resolução para o problema de distribuição de oxigênio e nutrientes ao longo da fibra. (TANASE et al., 1997).

Em seus estudos, DE NAPOLI(2014) mostra como resolver tais problemas pelo projeto de um reator, que ao utilizar-se de altos fluxos de recirculação, otimiza o transporte de oxigênio e nutrientes, podendo manter grande parte ou todas as células oxigenadas e nutridas. Isso mostra que é possível utilizar reatores de fibra oca para produção de células em um futuro próximo, e por sua vez, a produção de vírus para as vacinas de influenza em tais biorreatores.

Outra linhagem de célula que vem sendo estudada e apresenta bons resultados é a Vero, pois apresenta uma boa eficiência na imunização contra o

vírus (EHRLICH et al., 2012), apesar de ainda não apresentar uma produção tão eficiente(KISTNER et al., 1998)

5. Conclusão

Admitindo-se os avanços no cultivo de células animais, tanto na área de reatores quanto no estudo das linhagens celulares, pode-se afirmar, que com a utilização de reatores air-lift ou reatores de tanque agitado otimizados, a produção de vacinas contra a influenza seria viável.

Possivelmente com avanços na área de reatores de fibra oca, este também possa utilizado na produção das vacinas, tendo em vista que possui maior facilidade de retirada dos vírus por meio da perfusão, facilitando, assim, tanto a replicação viral quanto a purificação do vírus para a produção da vacina.

Com a utilização de processos com o uso de cultivo de célula animal, a produção de vacinas pode ter menor custo, para a produção por ovos existe a necessidade de uma granja para o cuidado das galinhas orgânicas, que exige alimentação, climatização e espaço utilizado para sua criação, e ter uma produção mais rápida e de maior rendimento.

Referências

BLANCO, G. A nova vacina. Super interessante, Outubro 2009. Disponivel em: <http://super.abril.com.br/ciencia/a-nova-vacina>. Acesso em: 3 junho 2016.

CURIOSIDADES – Produção da vacina. Influenza biomedicina/ Uni - BH, 21 Novembro 2012. Disponivel em: <https://influb.wordpress.com/2012/11/21/curiosidades-vacina-produca/>. Acesso em: 3 junho 2016.

FISIOPATOLOGIA da doença. Influenza biomdicina/ Uni-BH, 29 Outubro 2012. Disponivel em: <https://influb.wordpress.com/2012/10/29/fisiopatologia-da-doenca/>. Acesso em: 3 junho 2016.

GRIPE H1N1 em 2009 matou mais que o estimado, diz estudo. GLOBO, 26 junho 2012. Disponivel em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2012/06/gripe-h1n1-em-2009-matou-mais-que-o-estimado-diz-estudo.html>. Acesso em: 2 junho 2016.

IAMARINO, A. A vacina contra a gripe: Produção. Biblioteca vitual de saúde, 7 Outubro 2009. Disponivel em: <http://blog.h1n1.influenza.bvsalud.org/pt/2009/10/07/a-vacina-contra-gripe-producao/>. Acesso em: 4 junho 2016.

PEDRO, A.; COSTA, M. Influenza: o vírus da gripe. Évora: Universidade de Évora, 2001. Disponivel em: <http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2000/imuno00_gripe.htm>. Acesso em: 4 junho 2016.

PRINCIPAIS pandemias no mundo. Jornal de Noticias, 11 julho 2009. Disponivel em: <http://www.jn.pt/nacional/dossiers/gripe-a/o-que-deve-saber/interior/principais-pandemias-no-mundo-1216970.html>. Acesso em: 2 junho 2016.

SANTOS, P. B.; STEPHANO, M. A. capitulo. In: VITOLO, M. Biotecnologia farmacêutica. 1. ed. São Paulo: Blucher, v. 1, 2015. p. 157-201.

STEPHANO, M. A.; SANTOS, P. B. Biotecnologia Farmacêutica Aspectos sobre a aplicação industrial. São Paulo: Blucher, 2015.

BARR, I. G. et al. WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. **Vaccine**, v. 32, n. 37, p. 4713–4725, 2014.

CARNEIRO, M. et al. Influenza H1N1 2009: revisão da primeira pandemia do século XXI. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 2, p. 206–213, 2010.

DE NAPOLI, I. E. et al. Transport modeling of convection-enhanced hollow fiber membrane bioreactors for therapeutic applications. **Journal of Membrane Science**, v. 471, p. 347–361, 2014.

EHRLICH, H. J. et al. Clinical development of a Vero cell culture-derived seasonal influenza vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4377–4386, 2012.

GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1776–1779, 2003.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HENDERSON, D. A. The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. **Vaccine**, v. 29, p. D7–D9, 2011.

HOMMA, A. et al. Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 445–458, 2011.

HU, W.-S.; AUNINS, J. G. Large-scale mammalian cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 148–153, 1997.

KISTNER, O. et al. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. **Vaccine**, v. 16, n. 9-10, p. 960–968, 1998.

TANASE, T. et al. Comparison of micro-filtration hollow fiber bioreactors for mammalian cell culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 499–501, 1997.

TREE, J. A. et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems

with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3444–3450, 2001.

Anexo A - suplementos mais utilizados no cultivo de células animas

Suplemento	Descrição	Finalidade
Soro	Fração obtida do sangue animal (bovinos e equinos).	Fonte natural de fatores de crescimento, lipídeos, vitaminas, fatores de adesão, metais. Por exemplo: soro fetal bovino.
Extrato de tecidos	Mistura de componentes animais e plantas selecionados.	Fonte natural de fatores de crescimento.
Hidrolisados/peptonas	Tecidos e células parcialmente hidrolisados de forma acida ou enzimática.	Fontes naturais de peptídeos, aminoácidos, vitaminas, carboidratos. Por exemplo: extrato de levedura.
Hormônios/fatores de crescimento	Proliferação celular. Polipeptídios ativos, proteínas e esteroides, entre outros	Ativar as vias de estímulo e controle da proliferação. Por exemplo: IGF-1 (*insulin growth factor -1*) .
Reguladores do ciclo celular	Misóginos baseados em lectina e inibidores sintéticos da caspase.	Promover a divisão e inibir a apoptose em, por exemplo, culturas primarias.
Fatores de adesão e matriz extracelular	Componentes de adesão/associação celular: gelatina, colágeno, lamininas e fribronectina, entre outros.	Promover a adesão ou associação a microcarregadores e frascos.
Antibióticos/antimicóticos	Inibidores do metabolismo de bactérias e fungos	Prevenir, controlar e eliminar vírus adventícios e outros micro-organismos contaminantes. Por exemplo: penicilina e estreptomicina.
Vitaminas e nutrientes concentrados	Misturas definidas de aminoácidos, vitaminas e íons metálicos.	Enriquecer o meio, aumentando a capacidade de produção. Concentrado 100x de aminoácidos essenciais.
Sais e nutrientes simples	Glutamina, glicose, piruvato, $Na_2HCO_3, CaCl_2$.	Suplementar meios especiais.
Concentrados lipídicos	Estabiliza dispersões de esteróis, ácidos graxos, lectinas e vitaminas lipossolúveis.	Fornecer lipídeos para células auxotróficas ou reduzir a necessidade de biossíntese, levando ao metabolismo mais eficiente em processos industriais.
Agentes seletivos	Toxinas, análogos, inibidores.	Selecionar, amplificar e manter genes exógenos. Por exemplo MSX (metionina sulfoximina).
Tampões de Ph	HEPES, NaH_2PO_4, Na_2HCO_3.	Controlar o pH, permitindo a cultura ou a produção utilizando células.
Transportadores de ferro	Quelantes naturais ou sintéticos associados ao ferro.	Manter a concentração de ferro intracelular. Por exemplo: Transferrina humana.

Continua

Conclusão

Suplemento	Descrição	Finalidade
Polímeros de alto peso molecular sintéticos	Metilcelulose, polivinilpirrolidona, surfactantes.	Promover viscosidade, reologia de fluidos e proteção contra o cisalhamento. Por exemplo: Plutonic®F68.

Fonte: (SANTOS; STEPHANO, 2015)