



ANÁLISE ESTRATÉGICA DE TENDÊNCIAS DE MICROAMBIENTES PARA CONSTRUÇÃO DE ORGAN-ON-A-CHIP

Palavras-Chave: MICROFLUÍDICA, ORGAN-ON-A-CHIP, HIDROGEL

Autores(as):

BEATRIZ DOS SANTOS VIANA, FEQ – UNICAMP

GABRIELA GOMES DA SILVA, FEQ – UNICAMP

DANIEL PEREIRA SACOMANI, FEQ – UNICAMP

PROF.^a DRA. LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE (orientadora), FEQ – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica enfrenta dificuldades no desenvolvimento de novos fármacos, devido à falta de modelos *in vitro* adequados para prever seu efeito no microambiente-alvo, que é dinâmico e complexo (DARTOIS; RUBIN, 2022). Estatisticamente, apenas um em cada 5000-10000 candidatos é aprovado e comercializado (SEELAND, 2013). Os modelos *in vitro* tradicionais, tais como cultura 2D em frascos, placas de Petri ou *transwell*, são simples e baratos, porém apresentam limitações na reprodução das condições dinâmicas por serem estáticos (DUVAL et al., 2017). Os modelos animais (modelos *in vivo*) têm a vantagem de serem dinâmicos, mas apresentam limitações quanto à similaridade do microambiente-alvo em termos de morfologia e fisiologia, pois envolvem espécies diferentes (BRAKE et al., 2017). Além disso, esses modelos suscitam questões éticas, pois implicam o uso de seres sencientes que podem sofrer com os procedimentos experimentais (FONTANA et al., 2021). Portanto, o desenvolvimento de modelos *in vitro* fisiologicamente relevantes que permitam a triagem de fármacos e superem obstáculos associados aos métodos tradicionais é imprescindível.

Avanços científicos na área de microfluídica tem possibilitado a criação de microambientes *in vitro* que mimetizam com acurácia condições observadas *in vivo* (ODDO et al., 2019), nos microdispositivos chamados de *organ-on-a-chip*. Nesse sentido, essa tecnologia vem sendo usada para complementar os modelos atuais de teste de fármacos, conseguindo reproduzir o microambiente-alvo do corpo humano de forma mais realista e dinâmica (SUN; WARDEN; DING, 2019). Em linhas gerais, a microfluídica é um campo científico que estuda o escoamento de fluidos em canais com dimensões da ordem de micrômetros (BATTAT; WEITZ; WHITESIDES, 2022). Essa escala reduzida aumenta a relação área-volume do escoamento, intensifica os processos de difusão em relação à convecção e torna as forças viscosas mais relevantes do que as forças inerciais (XIA et al., 2021).

O PDMS é o material predominante na estrutura dos microdispositivos, por possuir atributos como transparência, que permite a obtenção de imagens por microscopia, resistência mecânica, permeabilidade de gases, facilidade de processamento e baixa reatividade (RAJ M; CHAKRABORTY, 2020). Contudo, o PDMS não reproduz adequadamente a superfície dos microambientes de tecidos humanos e interfere no cultivo e adesão celular por ser muito hidrofóbico (CAMPBELL et al., 2021). Nesse sentido, o uso de hidrogéis, definidos como redes poliméricas tridimensionais que intumescem em água, podem ser usados para superar as limitações do cultivo de células em PDMS, mimetizando a matriz extracelular e oferecendo condições anatômicas e fisiológicas favoráveis ao crescimento celular (VERHULSEL et al., 2014).

O microdispositivo do tipo *lung-on-a-chip*, precursor entre os chamados *organ-on-a-chip*, foi desenvolvido para a mimetização da interface alvéolo-capilar, conforme o demonstrado na **Figura 1A** (HUH, 2015). Esse microdispositivo foi fabricado por litografia macia e gravura química para formar as cavidades laterais, e é composto por duas cavidades separadas por uma membrana porosa de PDMS, em que células epiteliais e endoteliais são semeadas na parte inferior e superior da membrana, respectivamente. Através de vácuo aplicado pelos canais laterais, ocorre o estiramento e encolhimento da membrana de PDMS, reproduzindo propriedades funcionais, mecânicas e estruturais da interface alvéolo-capilar durante a respiração. Além disso, esse dispositivo foi utilizado para estudar a resposta imunológica quando exposto a inflamação bacteriana, adicionando células neutrófilos ao fluido no canal vascular. O design deste microdispositivo foi um marco para

o desenvolvimento de outros microdispositivos organ-on-a-chip, destacando sua importância como precursor dessa tecnologia.

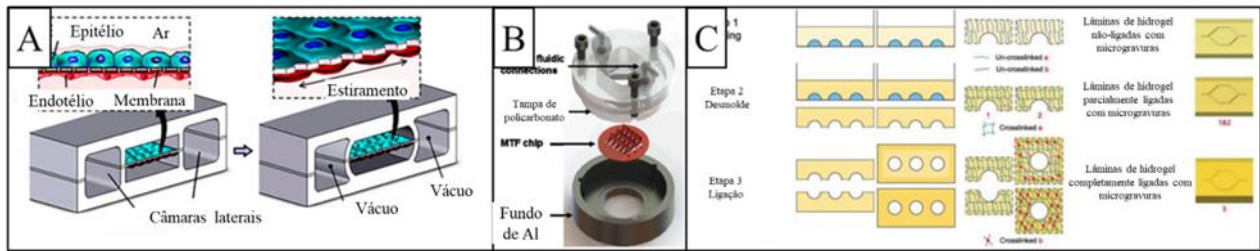


Figura 1: Representações dos *organ-on-a-chip* estudados: (A) *lung-on-a-chip* (Adaptado de HUH, 2015); (B) *heart-on-a-chip* (Adaptado de AGARWAL et al., 2013); e (C) *vessel-on-a-chip* (Adaptado de NIE et al., 2018).

Os microdispositivos *heart-on-a-chip* mimetizam o microambiente do tecido cardíaco, reproduzindo o estiramento do tecido. Agarwal et al. (2013) desenvolveram um dispositivo em forma de *Muscular Thin Film* (MTF), conforme a **Figura 1B**, visando facilitar a comercialização de microdispositivos, principalmente pela reprodutibilidade dos resultados das análises nessas plataformas. Para isso, usaram um design que permite múltiplos ensaios de contração simultâneos. Também desenvolveram um método semi-automático de produção de microdispositivos, usando um laser para criar um padrão onde as células são cultivadas. Além disso, adicionaram recursos ao microdispositivo, como uma tampa transparente de policarbonato, um fundo de alumínio, para controle de temperatura e eletrodos para estimular o tecido formado por impulsos elétricos.

Os dispositivos *vessel-on-a-chip* reproduzem o microambiente de vasos sanguíneos de forma dinâmica. Nie et al. (2018) apresentaram um modelo que usa um hidrogel de gelatina e GelMA, moldado sob duas metades de um padrão que formam um canal. Esse processo é mais automatizado e reprodutível. O tecido formado foi cultivado com células HUVECs (do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) nas paredes dos canais, mostrando a biocompatibilidade do hidrogel. O microdispositivo simulou condições patológicas com um fator de necrose tumoral, demonstrando a capacidade de reproduzir características de um vaso sanguíneo em condições inflamatórias e saudáveis.

Este trabalho projeto teve como objetivo a análise de diferentes tecnologias vigentes aplicadas na construção de *organ-on-a-chip*, além do desenvolvimento de um dispositivo do tipo *vessel-on-a-chip*. Para isso, foram propostos os seguintes objetivos específicos: (i) analisar o histórico, a funcionalidade e a estrutura de três tipos de *organ-on-a-chip*: *lung-on-a-chip*, *heart-on-a-chip* e *vessel-on-a-chip*; (ii) identificar carências e oportunidades que podem ser atendidas com os microdispositivos; (iii) aplicar uma técnica rápida e de baixo custo para a formação de microcanais no microdispositivo; e (iv) selecionar a melhor composição de hidrogéis para a estrutura do microdispositivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para mapear as tendências de desenvolvimento de tecnologias de microdispositivos do tipo *organ-on-a-chip*, foram consultadas plataformas que contém bases de dados de informações bibliográficas, tais como *Web of Science*, *Scopus* e *Google Scholar*. Nessas plataformas, foram selecionados artigos acadêmicos, trabalhos de estado da arte e protocolos que utilizaram as palavras-chave “*lung-on-a-chip*”, “*heart-on-a-chip*”, “*vessel-on-a-chip*”, “*organ-on-a-chip*” e “*microfluidics*”. As informações-chave extraídas dos artigos foram organizadas em catálogos, para facilitar a análise das tendências e das lacunas na área.

O método de construção para desenvolvimento do *vessel-on-a-chip*, baseou-se no trabalho de Kim et al. (2015), em que microagulhas foram utilizadas para moldar microcanais em uma matriz de hidrogel. Neste projeto, um molde previamente utilizado no grupo de pesquisa foi produzido via impressão 3D (SETHI3D, Campinas-SP, Brasil) com o apoio do Laboratório de Microfabricação (CNPEM) e utilizado para cura do PDMS (The Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning). Para isso, inicialmente o molde foi colado em lâmina de vidro (Perfecta, São Paulo, Brasil), agulhas 18G (BD PrecisionGlide, New Jersey, EUA) foram posicionadas nas aberturas laterais e PDMS foi adicionado até que toda região do dispositivo fosse preenchida. O dispositivo foi então submetido a um sistema de vácuo por 20 min, para remoção completa de bolhas de ar e, então, levado à estufa para cura do polímero a 60 °C por 3 h. Após a cura do PDMS, as agulhas foram cuidadosamente retiradas e o dispositivo foi desmoldado. Por fim, com o auxílio de equipamento de descarga de corona (Electro-Technic Products, Chicago, USA), o dispositivo produzido foi selado em lâmina de vidro. Para a construção dos canais em hidrogel, as agulhas foram inseridas novamente no molde de PDMS, e o hidrogel foi adicionado na cavidade central. Após a gelificação, as agulhas foram retiradas, moldando os canais no hidrogel, conforme a **Figura 2A**.

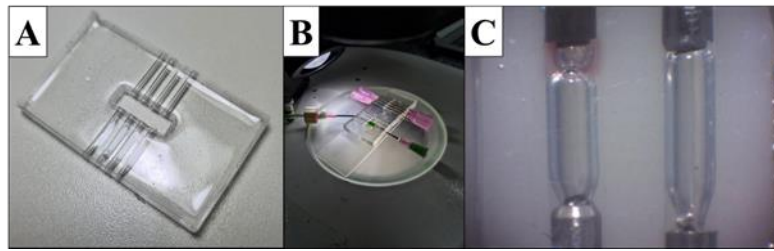


Figura 2: (A) Estrutura de PDMS finalizada, com a cavidade central e as entradas para as agulhas; (B) montagem do microdispositivo com as agulhas no estereoscópio para operação do microdispositivo; e (C). captura feita pelo estereoscópio dos microcanais na matriz de GelMA e das agulhas posicionadas.

O hidrogel utilizado nesse trabalho foi a GelMA, material sinterizado previamente pelo grupo de pesquisa de acordo com o protocolo apresentado por Loessner et al. (2016). A GelMA foi dissolvida em tampão fosfato 1X (PBS, LABORCLIN, Pinhais-PR, Brasil) nas concentrações de 10, 15 e 20 % (m/v), e gelificada pela exposição à luz UV de 365 nm (Sterilight, intensidade de $0,02 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). A caracterização da GelMA foi feita por ensaios de sinérese, intumescimento e compressão. A sinérese, caracterizada pela quantidade de água perdida pelo gel durante o processo de gelificação, foi determinada pela diferença de massa da GelMA antes e após a gelificação, conforme a Equação (1). O intumescimento, capacidade do gel em aumentar o seu volume na presença do seu solvente, foi determinado pela diferença de massa da GelMA gelificada antes e após a incubação em PBS 1X a 37°C , conforme a Equação (2). A compressão foi realizada em um texturômetro (TA.XT plusC Texture Analyser, Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) e o módulo de compressão, em N, foi obtido para cada amostra. Este último corresponde à tensão máxima suportada pelo material antes da sua ruptura e ele foi obtido graficamente a partir de uma curva de tensão, em N, em função do deslocamento, em mm, registrada pelo equipamento. Esse parâmetro foi determinado com o objetivo de avaliar a resposta das amostras de GelMA quando estas são submetidas a forças de compressão.

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{m_{\text{líquido}} - m_{\text{gel}}}{m_{\text{líquido}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{m_{24h} - m_{\text{inicial}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100\% \quad (2)$$

Após a caracterização do material e escolhida a melhor concentração, a GelMA foi adicionada ao dispositivo. Para isso, as agulhas foram inseridas novamente e retiradas após a reticulação do hidrogel via UV. A **Figura 2C** ilustra o hidrogel no interior da cavidade central, com as agulhas posicionadas, nas entradas e saídas, para operação. O dispositivo foi operado sob fluxo contínuo de duas soluções, uma PBS 1X e de corante em PBS, com objetivo de avaliar a difusão do corante através do hidrogel. Para isso, foi utilizado uma bomba seringa (PHD Ultra Harvard, Massachusetts, EUA) com seringas de vidro (Hamilton Company, Nevada, EUA) de 500 μL , e a difusão do corante ao longo do tempo foi registrada por fotos, capturadas utilizando estereoscópio (Bel Photonics, Itália). A **Figura 2B** representa a montagem do microdispositivo, assim como das agulhas, no estereoscópio, para visualização da difusão do corante na matriz de GelMA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão bibliográfica indicou que os *organ-on-a-chip* abordados neste trabalho apresentam a tendência de automatizar e simplificar o processo de produção, utilizando técnicas de impressão 3D. Essas técnicas reduzem o custo, o tempo e a complexidade da construção dos microdispositivos. Outra tendência observada foi o uso de hidrogéis na estrutura dos microdispositivos, inclusive em modelos totalmente baseados em hidrogéis. O objetivo dessa abordagem é reproduzir melhor os aspectos morfofisiológicos do microambiente em estudo, através da utilização de hidrogéis que se assemelhem à matriz extracelular.

Da caracterização do hidrogel, a sinérese e o intumescimento da GelMA refletem suas propriedades mecânicas: quanto mais resistente for o gel, menos água ele perde na gelificação (baixa sinérese) e mais água ele absorve em ambiente aquoso (alto intumescimento). A sinérese é representada pela porcentagem de água que o gel perde durante a reticulação das cadeias poliméricas. Quanto menor a concentração de GelMA, maior a sinérese, uma vez que há uma maior quantidade de solvente em excesso interpenetrado na rede polimérica. Quanto maior a concentração de GelMA, maior as propriedades mecânicas do gel e menor a sinérese. Esse comportamento é refletido na **Figura 3A**, em que a sinérese média das amostras de GelMA 10% é maior que aquelas das amostras de 20% ($62 \pm 4\%$ e $23 \pm 6\%$ para GelMA 10% e GelMA 20% respectivamente). A sinérese

e as propriedades mecânicas do gel podem variar com o tempo de exposição e intensidade da luz UV, podendo ser uma das fontes do desvio padrão elevado nos resultados.

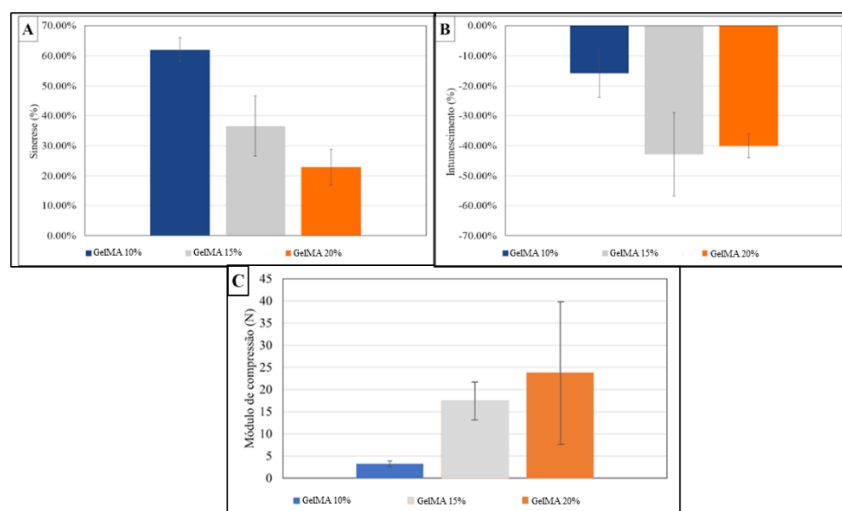


Figura 3: Resultados dos testes de caracterização feitos nos géis de GelMA a concentrações de 10%, 15% e 20%. (A) Teste de sinérese; (B) Teste de intumescimento; e (C) Módulo de compressão.

Já a respeito do intumescimento, que mede a absorção de solvente pelo gel em um ambiente saturado, os resultados presentes na **Figura 3B** mostram que todas as amostras perderam massa. Para a GelMA, esse resultado pode ser justificado pela temperatura utilizada para essa análise (37 °C), uma vez que durante a reação de metacrilização da gelatina em GelMA, parte das cadeias não são substituídas por grupos metacrilatos, mantendo parcialmente a característica termo-reversível da gelatina, que quando submetida a temperaturas superiores a 30 °C, revertem a reticulação, eliminando solvente interpenetrado na cadeia (SHIE et al., 2020). Esperava-se que a perda de água fosse maior com menor concentração de GelMA, mas as amostras de 10% perderam menos água do que as de 15% e 20% ($16 \pm 8\%$, $43 \pm 14\%$ e $40 \pm 4\%$ para GelMA 10%, 15% e 20% respectivamente). O gel de 15% também obteve o maior desvio padrão. Esses resultados podem ser associados a erros experimentais, como quebra do gel ou presença de PBS na pesagem.

Com relação à análise de textura, foi estudado a resistência do gel à compressão e a força que o gel resiste antes de romper. A **Figura 3C** apresenta os valores do módulo de compressão para cada concentração de GelMA: 10% ($3,25 \pm 0,69$ N), 15% ($17,44 \pm 4,28$ N) e 20% ($23,72 \pm 16,11$ N). O módulo de compressão pode ser relacionado com a concentração do gel, onde quanto maior a concentração de GelMA, maior o módulo de compressão, pois as cadeias poliméricas se entrelaçam mais e reforçam as propriedades mecânicas do gel (KOPAČ; RUČIGAJ; KRAJNC, 2020).

A difusão do corante na GelMA foi testada em três concentrações (10%, 15% e 20%). Esperava-se que a difusão fosse menor com maior concentração, mas a sinérese e a baixa adesão do hidrogel ao PDMS causaram vazamento da solução de corante nas concentrações menores que 20%. Isso mostra a necessidade de tratar o PDMS para torná-lo mais hidrofílico e aumentar a adesão do hidrogel (HU et al., 2020). A difusão foi analisada apenas na concentração de 20%, observada na **Figura 4**. Fotos do microdispositivo foram tiradas a cada três minutos para medir a difusão. Após 45 minutos, visualmente não foi possível observar diferenças do corante nas imagens capturadas, indicando a saturação do gel.

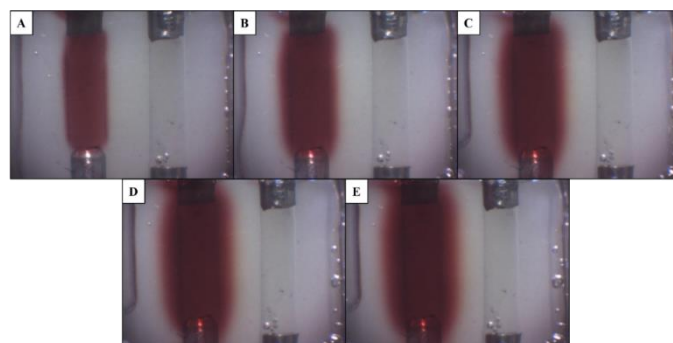


Figura 4: Mapeamento do processo de difusão de corante através da GelMA com concentração de 20% após (A) 0 min; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; e (E) 60 min.

4. CONCLUSÃO

Os microdispositivos do tipo *organ-on-a-chip* são relevantes para a engenharia biomédica, especialmente para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho, foi construído *um vessel-on-a-chip* com microcanais moldados em GelMA para simular capilares sanguíneos e estudar a difusão de corante. Essa técnica foi escolhida pela simplicidade e pelo custo-benefício, além da versatilidade e adaptabilidade. O dispositivo foi construído e operado com êxito, permitindo a observação da transferência difusiva de corante pelo hidrogel.

O GelMA com alta concentração foi o hidrogel escolhido, por apresentar melhores propriedades mecânicas. Esse resultado é refletido na menor sinérese e no maior módulo de compressibilidade que as outras concentrações. O microdispositivo de hidrogéis com concentração abaixo de 20% teve problemas, pois o gel se soltava da estrutura de PDMS ao remover as agulhas. A concentração acima de 20% possibilitou a operação, mas precisa ser avaliada quanto à viabilidade do cultivo celular.

O descolamento do hidrogel da estrutura de PDMS pode ser atribuído à alta hidrofobicidade do PDMS. O hidrogel se descolou ao retirar as agulhas, mas não afetou a estrutura dos microcanais. Esse fenômeno pode ter causado erros nos ensaios de difusão. Para evitar isso, recomenda-se um tratamento na superfície do PDMS para torná-la mais hidrofílica.

5. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 18, p. 3599, 2013.
- BATTAT, S.; WEITZ, D. A.; WHITESIDES, G. M. An outlook on microfluidics: the promise and the challenge. **Lab on a Chip**, v. 22, n. 3, p. 530–536, 2022.
- BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 261–286, ago. 2002.
- BRAKE, K. et al. In vivo Studies for Drug Development via Oral Delivery: Challenges, Animal Models and Techniques. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 08, n. 09, 2017.
- CAMPBELL, S. B. et al. Beyond Polydimethylsiloxane: Alternative Materials for Fabrication of Organ-on-a-Chip Devices and Microphysiological Systems. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 7, n. 7, p. 2880–2899, 12 jul. 2021.
- DARTOIS, V. A.; RUBIN, E. J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 685–701, 27 nov. 2022.
- DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, jul. 2017.
- FONTANA, F. et al. Requirements for Animal Experiments: Problems and Challenges. **Small**, v. 17, n. 15, p. 2004182, 6 abr. 2021.
- HU, H. et al. Hydrophilic PDMS with a sandwich-like structure and no loss of mechanical properties and optical transparency. **Applied Surface Science**, v. 503, p. 144126, fev. 2020.
- HUH, D. A human breathing lung-on-a-chip. *Annals of the American Thoracic Society*. **Anais...American Thoracic Society**, 1 mar. 2015.
- KIM, J. A. et al. Collagen-based brain microvasculature model *in vitro* using three-dimensional printed template. **Biomicrofluidics**, v. 9, n. 2, 1 mar. 2015.
- KOPAC, T.; RUČIGAJ, A.; KRAJNC, M. The mutual effect of the crosslinker and biopolymer concentration on the desired hydrogel properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 557–569, set. 2020.
- LOESSNER, D. et al. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 727–746, 17 abr. 2016.
- NIE, J. et al. Vessel-on-a-chip with Hydrogel-based Microfluidics. **Small**, v. 14, n. 45, p. 1802368, nov. 2018.
- ODDO, A. et al. Advances in Microfluidic Blood–Brain Barrier (BBB) Models. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1295–1314, dez. 2019.
- RAJ M, K.; CHAKRABORTY, S. PDMS microfluidics: A mini review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 27, p. 48958, 15 jul. 2020.
- SEELAND, S. **How in vitro alterations in cellular energy pathways can overcome obstacles in drug research**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/280664422>>.
- SHIE, M.-Y. et al. Effects of Gelatin Methacrylate Bio-ink Concentration on Mechano-Physical Properties and Human Dermal Fibroblast Behavior. **Polymers**, v. 12, n. 9, p. 1930, 26 ago. 2020.
- SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of Modern Physics**, v. 77, n. 3, p. 977–1026, 6 out. 2005.
- SUN, J.; WARDEN, A. R.; DING, X. Recent advances in microfluidics for drug screening. **Biomicrofluidics**, v. 13, n. 6, p. 061503, nov. 2019.
- VERHULSEL, M. et al. A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips. **Biomaterials**, v. 35, n. 6, p. 1816–1832, fev. 2014.