



Tutora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

2ª Consultoria Acadêmica – Disciplina: Fisiologia Humana
Bolsista: Gabrielle Andrade Mota – Graduanda do 4º período
Orientador: Prof. Dra. Temilce de Assis Cantalice

ORGAN-ON-A-CHIP: TECNOLOGIA INOVADORA NO DESENVOLVIMENTO DE PESQUISAS

1. Justificativa

O desenvolvimento de medicamentos está atrelado à demora durante as fases de teste, o que lentifica o processo de disponibilização para a população. Frente a esse panorama, novas tecnologias vêm sendo criadas com o objetivo de substituir arraigados modelos *in vivo* que falham em mimetizar de maneira fiel as condições do corpo humano. Nessa perspectiva, surge os Organ-on-a-chip, microchips que podem substituir modelos animais em ensaios pré-clínicos durante a realização de testes de toxicidade de novos fármacos (RAMADAN; ZOUROB, 2020).

2. Introdução

A inclusão de um novo medicamento ao mercado perpassa pela descoberta do fármaco, realização de testes pré-clínicos e testes clínicos, os quais envolvem um número crescente e diversificado de voluntários de acordo com a progressão para cada uma de suas 3 fases, objetivando a garantia de qualidade e eficácia. No entanto, é estimado que o processo completo de desenvolvimento de medicamentos dispenda cerca de 2,6 bilhões de dólares e dure em média 10 anos, o que demanda inovações por parte da indústria farmacêutica (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020).

O maior foco de inovação se concentra nos testes pré-clínicos, que tradicionalmente englobam o uso de modelos animais. Tais modelos, em especial devido a diferenças interespecíficas, não mimetizam de modo satisfatório os resultados que seriam obtidos em organismos humanos, além de estarem atrelados a questões éticas. Com base nisso, é originado o conceito dos 3Rs em 1959, buscando redução, refinamento e, em última instância,

substituição do uso de animais em pesquisas científicas. A redução concerne à adoção de quantidades limitadas de animais, enquanto o refinamento abrange métodos que causem reduzidos níveis de estresse e sofrimento a esses. De forma ambiciosa, a substituição objetiva a adoção de modelos de experimentação distintos, o que irá englobar os Organ-on-a-chip (TRÉZ, 2018; SUN, et al., 2019; RAMADAN; ZOUROB, 2020).

Incorporado à lista das 10 tecnologias emergentes de 2016, o Organ-on-a-chip (OOC) é um sistema que combina células cultivadas em ambiente 3D e fluidos em uma plataforma de tamanho reduzido, permitindo a mimetização do organismo humano a partir da replicação de propriedades como rigidez, porosidade, densidade e permeabilidade. Envolve a interdisciplinaridade entre engenharia, em especial no âmbito da microtecnologia, biologia celular e fisiologia para que seja obtido um modelo satisfatório a baixo custo e propiciado o monitoramento das substâncias produzidas e interações estabelecidas (WU, et al., 2020; MA, et al., 2021).

Ao longo dos últimos anos, OOC de fígado, pulmão, estômago, rim, pele, ossos, coração e barreira hematoencefálica já foram desenvolvidos, bem como modelos fisiopatológicos de diabetes, trombose e câncer, permitindo a análise dos efeitos de drogas em cada órgão e em nível sistêmico ao haver a integração dos microchips. Contudo, ainda há lacunas entre os modelos desenvolvidos em laboratório e a aplicação em escala industrial, o que suscita a otimização da tecnologia para agilizar a possível revolução no âmbito da pesquisa de novos medicamentos (RAMADAN; ZOUROB, 2020).

3. Produção e funcionamento

Os sistemas microfluídicos são baseados no emprego de reduzidos volume de fluidos, na escala de micro e nanolitros (10^{-9} a 10^{-18} L) no processo de miniaturização de elementos, tendo-se como vantagem a diminuição quantitativa de amostras, reagentes e tempo dispendido, além de recursos monetários. As inovações da área foram impulsionadas com o advento da microeletrônica, o que favoreceu o desenvolvimento de técnicas como a litografia suave, metodologia tradicional empregada na produção de OOCs (PIMENTEL, 2018; WU et al., 2020).

A fotolitografia precede a litografia suave e consiste no uso de substratos termoendurecíveis que serão expostos à luz ultravioleta, de modo a transferir – ou imprimir – um molde. Tal material, na etapa de litografia suave, será coberto por um polímero líquido que, após curado por temperatura, será removido da superfície, gerando um molde negativo posteriormente utilizado na fabricação do microchip (ANES, 2017; PIMENTEL, 2018). O polímero mais utilizado é o polidimetilsiloxano (PDMS), devido as suas características de transparência óptica, biocompatibilidade, estabilidade química, permeabilidade a gases, elasticidade e custo favorável (PIMENTEL, 2018; MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; PAOLI, et al., 2021). Na figura 1, é representada a fabricação do molde.

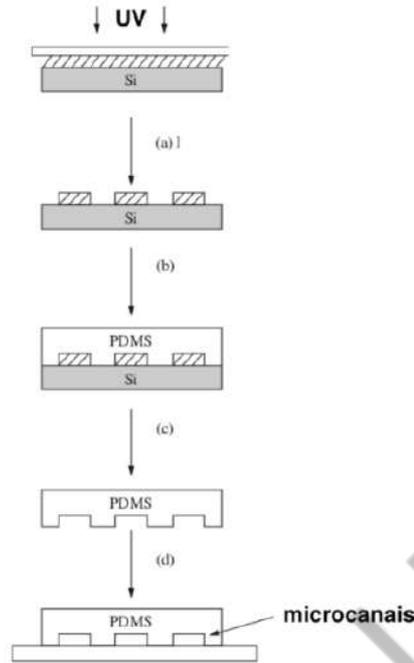


Figura 1: Fabricação de molde por litografia suave. O substrato de silício (Si) sofre ação de luz ultravioleta (UV), gerando uma estrutura que será coberta pelo polímero polidimetilsiloxano (PDMS) e formará o microchip.

Fonte: PIMENTEL, 2018

Os princípios envolvidos no desenvolvimento dos microchips compreendem a mimetização de parâmetros fisiológicos humanos, tais como débito cardíaco, fluxo sanguíneo, tensão de cisalhamento de fluidos, gradiente de concentração, estresse mecânico (referente às pressões sob as quais os órgãos são submetidos) e organização celular. De maneira inovadora, na tentativa de se distanciar de impasses éticos atrelados ao uso de órgãos doados, vem sendo utilizadas culturas de células humanas pluripotentes cultivadas em ambiente 3D, caracterizado pela replicação das propriedades de rigidez, porosidade, densidade e topografia da matriz extracelular. Essa organização é denominada Organoide e se apresenta como um avanço em relação à tradicional cultura de células em 2D (PARK; GEORGESCU; HUH, 2019; MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; WU et al., 2020).

Desse modo, o débito cardíaco direcionado para um órgão específico, conforme a fisiologia humana, deve corresponder a uma porcentagem do fluxo sanguíneo, enquanto que os fluidos perfundidos pela ação de microbombas garantem o dinamismo e a pressão física existente em sistemas biológicos, permitindo a disponibilização de nutrientes e oxigênio, bem como a formação de gradientes de concentração, por meio de um fluxo laminar de líquido. Assim, com a incorporação de fluidos aos OOCs, diferente de culturas celulares estáticas, é obtido um ambiente mais próximo do fisiológico (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; WU et al., 2020).

O fluido que substitui o sangue, além do transporte de diferentes nutrientes conforme as necessidades do órgão, deve carregar produtos de

excreção a exemplo do CO₂ para evitar o acúmulo. Nesse ambiente são utilizadas membranas porosas constituídas por hidrogel para garantir a compartimentalização, sendo o posicionamento das células – apical e basolateral - um elemento chave na garantia do estabelecimento das interações pretendidas entre as substâncias liberadas no meio e os órgãos. Os microchips podem ser orientados horizontal ou verticalmente (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; RAMADAN. ZOUROB, 2020). Na figura 2, tem-se uma representação esquemática de um OOC genérico.

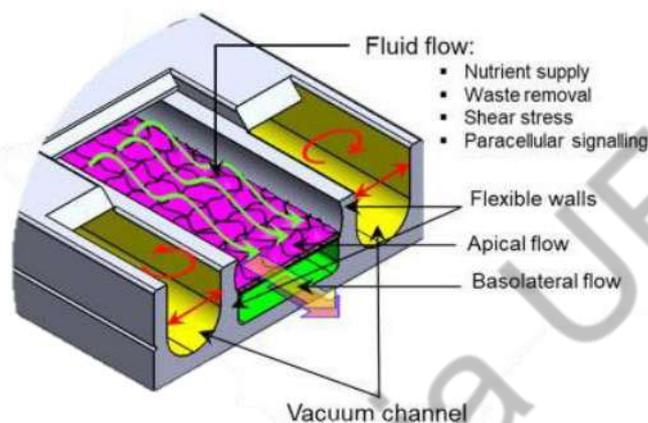


Figura 2: Esquema base de OOC. O microchip é organizado por células separadas por membranas de hidrogel que garantem a compartimentalização do sistema. Em cada compartimento, é estabelecido um fluxo contínuo de fluido que é responsável por reproduzir a pressão aos quais os órgãos são submetidos, possibilitar a sinalização entre as células e assegurar a chegada de nutrientes e a remoção de produtos de excreção, que são fundamentais na mimetização das condições fisiológicas do corpo humano.

Fonte: Adaptado de RAMADAN; ZOUROB, 2020

4. Aplicações dos OOCs

A reprodutibilidade de condições da biologia humana a partir da compartimentalização de culturas de células tem possibilitado a aplicação dos OOC na testagem de modelos fisiológicos e fisiopatológicos, bem como na mensuração de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de novas substâncias ativas. No que diz respeito à fisiologia, diversos modelos de órgãos já foram desenvolvidos até a atualidade e tendo em vista os processos de administração, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos, a análise de modelos renais hepáticos e cardíacos ganham destaque (WU, et al., 2020; MA, et al., 2021).

O fígado é o principal sítio de metabolização dos fármacos administrados, sendo composto majoritariamente por células parenquimatosas (hepatócitos), envolvidas na produção de proteínas e no metabolismo de glicose, lipídeos e demais substâncias, e por células não parenquimatosas, incluindo componentes

do endotélio e do sistema imune, estando relacionadas diretamente com as respostas a danos. É alarmante considerar que, devido a eventos de hepatotoxicidade, 26% dos ensaios clínicos de medicamentos falham, elevando o OOC à posição de importante candidato na resolução desse problema. Assim, a partir da mimetização do ambiente biológico, pesquisadores desenvolveram imunossensores para detectar a formação de biomarcadores, além da avaliação da síntese de metabólitos e ativação de componentes do sistema imune, o que constitui uma plataforma útil na identificação de possíveis efeitos indesejáveis (BECKWITT, et al., 2018; WU, et al., 2020).

Paralelamente, atribui-se ao coração relevante parcela dos casos de toxicidade que resultam na retirada de fármacos do mercado, de modo que o controle da pulsação dos cardiomiócitos irá refletir os efeitos da substância administrada, assim como modelos de rim possibilitam a visualização de seus aspectos de funcionamento. Cada OOC produzido pode ser integrado em um sistema comum por meio da perfusão de líquidos entre cada compartimento, uma só vez ou de maneira recirculante, dando origem aos denominados Human-on-a-chip (WU et al., 2020).

Esses sistemas podem ser dispostos em paralelo, série ou ambos e são úteis para analisar efeitos determinantes da farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco, bem como evidenciar mecanismos previamente desconhecidos, na medida em que permite a avaliação específica de interações desencadeadas, o que é facilitado pela escala reduzida de seus constituintes. As diferentes combinações de órgãos, no entanto, demandam aprofundado conhecimento acerca do funcionamento fisiológico (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; WU, et al., 2020).

5. Impasses e perspectivas futuras

Apesar da ampla aplicabilidade dos OOCs, o elevado custo associado à confecção e algumas características da matriz polimérica utilizada na litografia suave são fatores que atrasam a transferência desses modelos do campo experimental para a escala industrial. Inicialmente, tem-se que o PDMS, muito embora possua um conjunto de propriedades favoráveis à fabricação dos microchips, pode sofrer rearranjo de sua superfície e é permeável a gases e demais moléculas hidrofóbicas, o que pode comprometer o funcionamento padrão dos órgãos cultivados e as rotas de mecanismos estudadas (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; PAOLI, et al., 2021).

Com o objetivo de mitigar essa limitação, vem sendo observado o emprego de termoplásticos como Poliestireno (PS), Polímero Olefínico Cíclico (COP) e Copolímero Olefínico Cíclico (COC), matrizes que não interferem nas substâncias hidrofóbicas presentes no meio. Tais materiais podem ser manipulados através de técnicas distintas de prototipagem rápida, como a xurografia – que consiste na moldagem do material pelos cortes feitos por pequenas lâminas – e a cortagem com laser de CO₂, sendo auxiliadas por modernos sistemas digitais. O material ideal para os fins objetivados, portanto,

deve possuir os requisitos para reprodução de parâmetros biológicos, praticabilidade e baixo custo no sentido de permitir a reprodutibilidade do método (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; PAOLI, et al., 2021).

O investimento nessa tecnologia ainda é reduzido frente ao seu relevante potencial, o que se deve à diminuída possibilidade de aplicação na escala industrial dos métodos utilizados atualmente, devido aos custos e a falta de padronização nos processos produtivos. Além disso, problemas relacionados ao cultivo de células, atrelados à necessidade de estudos que compreendam mais a fundo a dinâmica de funcionamento do organismo humano, precisam ser superados para que haja o desenvolvimento crescente de novos OOCs – destoando do padrão de fígado e rins prevalente – e a possível integração no aperfeiçoamento do Human-on-a-chip (MARSCHMEYER; KAKAVA, 2020; MA, et al., 2021; PAOLI, et al., 2021).

6. Considerações finais

O avanço das pesquisas sempre esteve condicionado à capacidade de inovação humana. Na atualidade, no intuito de promover a resolução de uma ampla gama de condições fisiopatológicas, a indústria farmacêutica é marcada pelo desenvolvimento constante de novos medicamentos e técnicas metodológicas. Os Organ-on-a-chip são colocados como importantes candidatos na revolução da área, apesar de ainda não terem o seu uso amplamente difundido pela existência de limitações quanto ao custo e reprodutibilidade, o que suscita o investimento constante em Pesquisa & Desenvolvimento no sentido de consolidar a aplicação dessa tecnologia.

REFERÊNCIAS

ANES, C. F. **Produção de micropartículas deformáveis para o desenvolvimento de análogos: análise reológica e cálculo do índice de deformação**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica), Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, 2017.

BECKWITT, C. H. et al. Liver 'organ on a chip'. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 1, p. 15-25, 2018.

MA, C. et al. Organ-on-a-Chip: A new paradigm for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 2, p. 119-133, 2021.

MARSCHMEYER, I.; KAKAVA, S. Organ-on-a-Chip. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 179, 2020.

PAOLI, R. et al. Rapid Manufacturing of Multilayered Microfluidic Devices for Organ on a Chip Applications. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1382, 2021.

PARK, S. E.; GEORGESCU, A.; HUH, D. Organoids-on-a-chip. **Science**, v. 364, n. 6444, p. 960-965, 2019.

PIMENTEL, E. J. S. **Nova geração de sistemas microfluídicos baseada em materiais poliméricos inteligentes**. Dissertação (Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas), Escola de Ciências, Universidade do Minho, 2018.

RAMADAN, Q.; ZOUROB, M. Organ-on-a-chip engineering: Toward bridging the gap between lab and industry. **Biomicrofluidics**, v. 14, n. 4, 2020.

SUN, W. et al. Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 4, 2019.

TRÉZ, T. A. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 19, n. 2, p.97-113. 2018.

WU, Q. et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 19, n. 9, 2020.

PET-Farmácia UFRPE