



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

MICRODISPOSITIVO REVERSÍVEL PARA O MONITORAMENTO DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ANIMAIS

VIT FF¹, GODOI N¹ NUNES R², CARVALHO, BG,¹CARVALHO HF² E
DE LA TORRE LG¹.

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

E-mail para contato: latorre@feq.unicamp.br

RESUMO – *Microfluídica é uma área multidisciplinar que opera em dispositivos em escala micrométrica e trabalha com pequenas quantidades de fluidos. Os dispositivos microfluídicos são capazes de criar microambientes que mimetizam ambientes fisiológicos, sendo uma janela de observação para cultivo celular. Neste contexto, este trabalho apresenta um dispositivo microfluídico reversível para avaliação o comportamento de células animais em condições dinâmicas. Os dispositivos foram construídos em polidimetilsiloxano laminado (PDMS) pela técnica de ablação a laser de CO₂, permitindo o crescimento de fibroblastos (NIH/33). O dispositivo foi projetado para gerar gradiente de concentração o que permitirá avaliação em diferentes condições de cultivo simultaneamente. Os resultados mostram o potencial de utilizar microdispositivos reversíveis e reutilizáveis para avaliação do comportamento de células animais.*

1. INTRODUÇÃO

A microfluídica é a ciência que estuda a manipulação de pequenas quantidades de fluídos em canais com dimensões micrométricas (Whitesides, 2006). Por esta característica, uma vasta gama de plataformas microfluídicas tem sido aplicada nas mais diferentes áreas como: engenharia química, farmacêutica, medicina moderna e biotecnologia (Baek *et al.*, 2011). Dispositivos microfluídicos são ferramentas ideais para a criação e controle de gradientes de concentração (Li Jeon *et al.*, 2002), permitindo a avaliação de diferentes condições de cultivo celular, com aquisição de informações simultâneas, diminuindo algumas etapas de processos. O emprego de gradientes de concentração minimizam o tempo de repetição de experimentos e gastos com reagentes. A técnica comumente empregada para a fabricação de dispositivos microfluídicos é a litografia macia, que envolve muitas etapas e algumas delas complexas e de baixo rendimento do processo de fabricação (Borysiak. *et al.*, 2013), gerando dispositivos irreversíveis. Uma grande desvantagem destes dispositivos irreversíveis é a dificuldade de esterilização, principalmente para o estudo de células animais (Huang & Mason, 2013). Devido a isso, as maiores dos dispositivos irreversíveis acabam sendo descartáveis, acarretando em tempo de fabricação e custo elevado (Temiz, *et al.*, 2015). Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo a construção de um dispositivo reversíveis para o cultivo de células animais, utilizando a técnica de ablação a laser de CO₂. O material empregado foi o polidimetilsiloxano modificado (PDMS laminado). O dispositivo foi avaliado operacionalmente (teste de vazão e geração de gradiente difusivo) e biologicamente (análise do comportamento celular). Os resultados apontam que dispositivos reversíveis são uma



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

alternativa promissora e viável para estudo de células animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das células e fabricação do microdispositivo

O cultivo primário das células de fibroblastos (NIH/33) foi realizado em garrafas de cultivo de 75 cm² (Kasvi-Brasil) e em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (Sigma-Aldrich-USA). As células foram mantidas em incubadora por 48 h a 37°C e com umidade e atmosfera controlada (20% CO₂). Para a fabricação de microcanais, foi utilizado o PDMS laminado (Stockwell Elastomerics, USA), onde foi primeiramente desenhada a geometria em um software vetorial, e após essa geometria foi cortada utilizando a técnica de ablação a laser de CO₂ L-Solution 100 (Gravograph, USA), numa potência de 35 W.

2.2 Teste hidrostático e avaliação da capacidade de geração de gradiente difusivo

Para avaliar as condições operacionais do dispositivo, foram testadas diferentes vazões (1- 20 µL/min) por meio de bombas seringas (Harvard Apparatus modelo: PHD Ultra, USA). Para este teste foi utilizando somente água ultrapura nos canais de alimentação e analisado a faixa de vazão, a qual o dispositivo não perdia sua capacidade operacional. Nesse caso, foram impostas diferentes vazões de entrada ao longo de 30 minutos. Para avaliar a capacidade de geração de gradiente difusivo, primeiramente adicionou-se hidrogel (gelatina – Sigma-Aldrich-USA) manualmente com auxílio de micropipetas em todas as câmaras de cultivo. Em seguida, realizou-se o processo de solidificação do hidrogel durante 30 minutos a 4°C. Após o processo de solidificação total do hidrogel foi escoado em uma das entradas rodamina B (rodamina B-Sulforhodamine B sodium salt, Sigma-Aldrich-USA) a uma concentração de 0,01mM e na outra entrada água ultra-pura. As vazões para cada uma da entrada foi mantida a mesma (7 µL/min). O bombeamento ocorreu até a estabilização do gradiente de concentração no hidrogel (aproximadamente 45 min). Após foram obtidas imagens em microscopia de epifluorescência (Nikon Ti Eclipse-USA) nas câmaras de cultivo. As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ (National Institutes of Health-USA)

2.3 Comportamento das células s em ambiente microfluídico

Para avaliar o comportamento celular no ambiente microfluídico, foram adicionadas aproximadamente 100 células de fibroblastos em 10µL de matrigel (Sigma-Aldrich-USA), em cada câmara de cultivo do dispositivo. Após a inoculação, foi escoado nos canais de alimentação meio de cultura DMEM a uma vazão de 7µL/min. As células foram incubadas nas mesmas condições do item 2.1 e avaliado o comportamento celular após 24 e 48h.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fabricação do dispositivo

O microdispositivo foi projetado contendo um andar inferior, onde estão localizadas as câmaras de cultivo e um o andar superior, contendo dois os canais de alimentação,

responsável por escoar o meio de cultivo e/ou os reagentes para as células. O dispositivo conta com 10 câmaras de cultivo (andar inferior) com largura de 250 μm cada e um espaçamento entre eles de 100 μm (Figura 1).

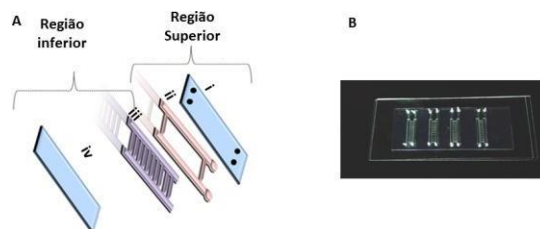


Figura 1- Dispositivo microfluídico. **A)** Esquema contendo as partes em separadas do dispositivo. (i) a tampa em vidro onde será acoplada conexões responsáveis por levar o fluxo até (ii) os canais de alimentação em PDMS laminado, que alimentam a parte inferior contendo as câmaras de cultivo (iii) e (iv) a base de vidro. **B)** Imagem do dispositivo com suas respectivas replicatas.

3.2 Geração de gradiente de concentração

A vazão de operacional foi estabelecida em de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$, pois essa vazão não ocasiona vazamento no dispositivo. Quanto ao teste de geração gradiente de concentração foram escolhidas para serem analisadas três câmaras de cultivo (duas periféricas e uma central). A partir das imagens obtidas em microscopia das câmaras de cultivo, foi possível subdividir cada câmara de cultivo em 18 sub-regiões, onde as áreas muito próximas às entradas dos canais de alimentação foram subtraídas, evitando possíveis erros na análise. As intensidades de fluorescência média nas câmaras e cultivo foram calculadas com o auxílio do software ImageJ, para cada uma das sub-regiões. Em seguida, foi construída perfil de intensidade de fluorescência, correlacionado a intensidade média de fluorescência com as diferentes concentrações de rodamina B. Foi possível identificar que o perfil de concentração apresentava um comportamento linear nas câmaras de cultivo, o que sugere que não há a contribuição convectiva dentro das câmaras, comprovando a formação do gradiente difusivo de concentração.

3.3 Comportamento celular no microambiente

A interação das células com o material utilizado para construção do dispositivo foi observada em microscopia (Zeis Axio-Germany), nos tempos de 0, 24 e 48h (Figura 3). Nessa primeira etapa não ocorreu a aplicação de gradiente de concentração, pois o intuito foi apenas observar o comportamento celular. Observa-se na Figura 2A a presença dos fibroblastos em toda a câmara de cultivo. No tempo inicial ($t=0$ h) as células apresentam morfologia esférica, ou seja, nesse primeiro momento as células não aderiram ao material. Após 24 e 48h, as células apresentam-se com morfologia diferenciada, com formato espalhado, sugerindo aderência e divisão celular. Esta alteração é evidenciada a partir das imagens obtidas das áreas ocupadas pelas células ao longo do tempo, conforme observado na Figura 2B. Por meio de uma análise estatística de Tukey, onde foi avaliado o P valor, foi possível verificar que entre os tempos 0 e 24 h, há uma diferença estatística significativa da área ocupada pelas células (intervalo de 95% de confiança). No entanto, e nos tempo de 24h e 48 h o valor obtido não apresenta diferença estatística significante. Desta forma, observa que o ambiente microfluídico não limita a adesão e divisão celular, podendo assim ser utilizado para a investigação do comportamento de fibroblastos.

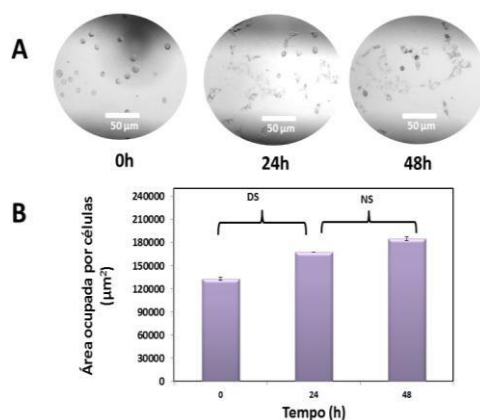


Figura 2-A) Imagem em microscopia obtida em campo claro do dispositivo com as células de fibroblastos em matrigel, em 0, 24 e 48 h. Foi utilizada objetiva com aumento de 10 X e barra com escala de 50µm. **B)** Distribuição das células ao longo da geometria do dispositivo, nos tempos de 0, 24 e 48h área total 250000µm².

4. CONCLUSÃO

O dispositivo construído é capaz de gerar gradiente de concentração em matriz polimérica. Além disso, o dispositivo permitiu o crescimento das células de fibroblastos em matrigel. A multiplicação celular, indica que o microambiente favorece futuros ensaios biológicos, apontando a potencialidade de investigar o comportamento celular em dispositivos reversíveis sob um gradiente de concentração.

6. REFERÊNCIAS

- BAEK, J. et al. Investigation of Indium Phosphide Nanocrystal Synthesis Using a High-Temperature and High-Pressure Continuous Flow Microreactor. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 50, n. 3, p. 627-630, ISSN 1433-7851, 2011
- BORYSIK, M.D. et al. Simple replica micromolding of biocompatible styrenic elastomers. *Lab Chip*. v.13, p. 2773–2784 2013.
- HUANG, Y.; MASON, A.J. Lab-on-CMOS integration of microfluidics and electrochemical sensors. *Lab Chip*. v.13, p.3929–3934 2013.
- LI JEON, N. et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature biotechnology*, v. 20, n. 8, p. 826–30, ago. 2002
- TEMIZ, Y. et al, Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectron. Eng.* v.132, p.156–175 2015.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 27 jul. 2006.