

Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios

Microphysiological systems composed of human organoids in microfluidic devices: advances and challenges

RESUMO

Talita Miguel Marin*

Eduardo Pagani

Introdução: Modelos com maior capacidade preditiva e que produzam resultados a custos mais baixos e em prazos menores são necessários para o desenvolvimento de fármacos. Os sistemas microfisiológicos (SMF) que cultivam tecidos humanos em histoarquitetura tridimensional (3D) apresentam-se como alternativas promissoras para esses objetivos. **Objetivo:** Este trabalho de revisão tem por objetivo abordar o estado da arte mundial do desenvolvimento dos SMF e ilustrar a experiência brasileira inicial com essa tecnologia. **Métodos:** A pesquisa e coleta de dados abrangendo a temática “Sistemas Microfisiológicos”, e os subtemas “Dispositivos Microfluídicos” e “Cultura 3D de Células Humanas”, foi baseada em busca eletrônica no Portal de Periódicos Capes, nas bases de dados científicas Scopus, PubMed e *Science Direct* e utilizando a ferramenta de busca Google Scholar. **Resultados:** Dentre os sistemas microfisiológicos existentes, os que são caracterizados pelo cultivo de tecidos humanos organizados em histoarquitetura tridimensional em dispositivos microfluídicos foram recentemente introduzidos, como sendo os mais promissores. Além disso, entre os anos 2000-2017, registramos aumentos de aproximadamente 12, 985 e 380 vezes no número de publicações acadêmicas relacionadas às áreas de Microfluídica, *Organ-on-a-Chip* e SMF respectivamente, ilustrando o impacto dessa tecnologia atualmente. **Conclusões:** Essa tecnologia relativamente recente tem alto potencial para superar as limitações dos modelos experimentais *in vitro* atuais.

PALAVRAS-CHAVE: *Human-On-a-Chip*; Organoides; *Disease-on-a-Chip*; iPSC; Sistemas Microfisiológicos

ABSTRACT

Introduction: Models with higher predictive capacity and able to produce results at lower costs and in shorter times are needed for drug development. The microphysiological systems (MPS) that cultivate human tissues in three-dimensional histoarchitecture (3D) are promising alternatives for these objectives. **Objective:** This review work aims to address the state of the art of SMF development and illustrate the initial Brazilian experience with this technology. **Method:** The research and data collection covering the theme “Microphysiological Systems”, and the subtopics “Microfluidic Devices” and “3D Culture of Human Cells”, was based on electronic search in Capes Journals Portal, scientific databases Scopus, PubMed and Science Direct and with the Google Scholar search tool. **Results:** Among the existing microphysiological systems, those that are characterized by the culture of human tissues organized in three-dimensional histoarchitecture in microfluidic devices were recently introduced, as being the most promising ones. In addition, between the years 2000-2017, we recorded approximately increases of 12, 985 and 380 times in the number of academic publications related to the areas of Microfluidics, *Organ-on-a-Chip* and MPS respectively, illustrating the impact of this technology today. **Conclusions:** This relatively recent technology has high potential to overcome the limitations of current *in vitro* experimental models

Centro Nacional de Pesquisa em
Energia e Materiais (CNPem),
Campinas, SP, Brasil

*E-mail: talita.marin@lnbio.cnpem.br

Recebido: 30 set 2017
Aprovado: 25 abr 2018

KEYWORDS: Human-on-a-Chip; Organoids; Disease-on-a-chip; iPSC; Microphysiological Systems



INTRODUÇÃO

Os testes pré-clínicos na pesquisa médica/biológica e no desenvolvimento de fármacos frequentemente não predizem com acurácia as respostas observadas em seres humanos, levando a altas taxas de atrito¹. A agência federal americana *Food and Drug Administration* (FDA) estima que 92% dos medicamentos aprovados em testes com animais falham em seres humanos. Os modelos animais garantem acesso à fisiologia sistêmica incluindo a distribuição e metabolização em vários tecidos, à resposta do sistema imune, à influência dos microambientes e das barreiras e interações órgão-órgão, bem como às respostas comportamentais. No entanto, já foi demonstrado que a distância filogenética entre humanos e animais (por exemplo: ilustrada por alterações ou diferenças proteômicas) diminuem seu poder preditivo^{2,3,4,5,6}. Portanto, é clara a necessidade de modelos com maior capacidade preditiva e que também reduzam o tempo e os custos do desenvolvimento de substâncias ou produtos pertencentes a diversos setores industriais tais como fármacos, produtos alimentícios, cosméticos, sanitizantes e produtos agropecuários para citar alguns exemplos.

Atualmente, a quase totalidade dos testes de segurança exigidos pelas autoridades regulatórias para fármacos é realizada em animais. As poucas exceções não são suficientes ao cumprimento da regulamentação exigida^{7,8}. Os métodos *in silico* (simulações computacionais) já estão disponíveis no Brasil com o apoio da Rede Nacional de Métodos Alternativos⁹ (RENAMA). Esses métodos são úteis para a avaliação de viabilidade, mas insuficientes para o desenvolvimento e registro de produtos inovadores, exigindo métodos experimentais *in vivo* ou o desenvolvimento de alternativas *in vitro*. Os dispositivos microfluídicos ou *chips*, que combinam tecidos humanos em um arranjo tridimensional e condições estáveis de homeostase, podem se tornar a solução para esse problema¹⁰. Na maioria das vezes, células humanas cultivadas em duas dimensões não conseguem recapitular de forma adequada e nem abranger todos os aspectos funcionais dos tecidos, bem como das interfaces tecido-tecido e da dinâmica dos órgãos do corpo humano^{11,12,13,14,15}. Tecidos modelados a partir de células humanas em microdispositivos podem melhorar a acurácia preditiva de estudos pré-clínicos de eficácia e segurança de medicamentos, cosméticos e outras substâncias ou produtos relacionados ao uso em humanos^{11,12,15,16}.

O princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*) foi desenvolvido em 1959 por Russell e Burch¹⁷, propiciando a consolidação dos métodos alternativos. O termo “métodos alternativos” pode ser definido como abordagens que tenham um ou mais dos seguintes desfechos: 1) métodos que induzam a redução do número de animais experimentais usados em determinado procedimento ou redução para o mínimo necessário. 2) refinamento da metodologia que culmine com a redução significativa da dor ou desconforto sofrido pelos animais. 3) métodos que não utilizem animais - substituição completa de animais em determinado procedimento ou avaliação¹⁸.

A crescente pressão ética e política sobre a implementação de ações que objetivassem a substituição do uso de animais de experimentação deu origem à adoção, em 2009, pela União Europeia, do requisito regulamentar que prevê a avaliação de

segurança de ingredientes cosméticos através de testes que não usem animais¹⁹. Em 2013, a União Europeia banuiu oficialmente o uso de animais para pesquisas de desenvolvimento de cosméticos - ingredientes e produtos acabados - comercializados no bloco²⁰.

Essas ações representaram um grande incentivo ao desenvolvimento e à adoção de métodos alternativos no mundo e no Brasil. O empenho e compromisso brasileiros com a promoção, a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais propiciou a criação da RENAMA, em julho de 2012 pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e em setembro de 2012, do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), uma parceria entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz). Estas foram as primeiras parcerias na América Latina com o intuito de coordenar ações que pudessem propiciar a redução, refinamento ou substituição do uso de animais de experimentação no Brasil²¹. Neste sentido, o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA (LNBio, Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia [Inmetro] e INCQS) iniciou em 2015 o projeto *Human-on-a-Chip* visando a implementação e nacionalização da tecnologia baseada em sistemas microfisiológicos (SMF), com perspectivas de futuros desdobramentos que possam vir ao encontro do princípio dos 3Rs.

Este trabalho de revisão aborda o estado da arte mundial do desenvolvimento dos SMF, com ênfase nos que cultivem organoides humanos sob microfluídica, e ilustra a experiência brasileira inicial com essa tecnologia.

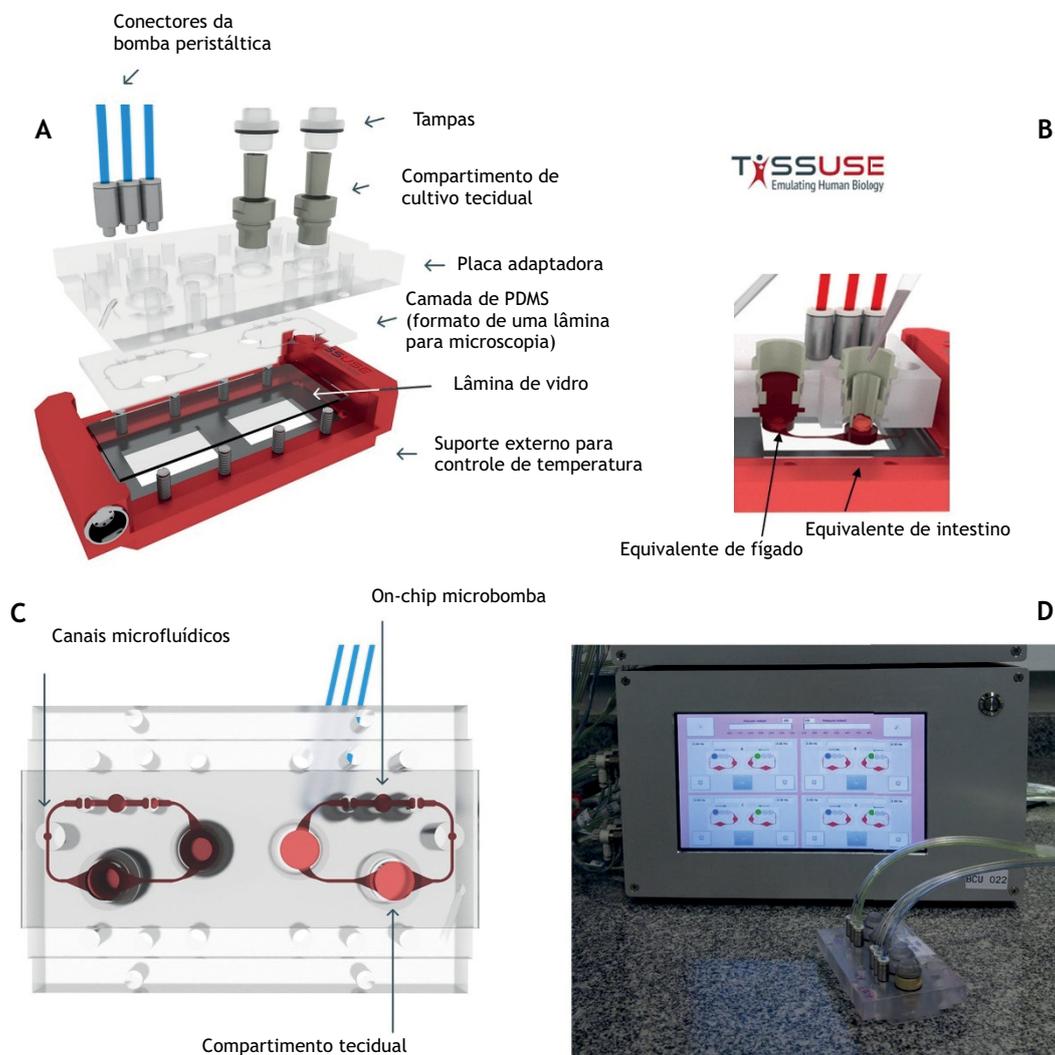
MÉTODO

A pesquisa e coleta de dados que abrangeu o tema “Sistemas Microfisiológicos”, bem como os subtemas “Dispositivos Microfluídicos” e “Cultura 3D de Células Humanas” (3D = tridimensionais), foi realizada eletronicamente no Portal de Periódicos Capes, nas bases de dados científicas Scopus, PubMed e *Science Direct* e de forma auxiliar com a ferramenta de busca *Google Scholar*. Este artigo objetivou revisar e reunir de forma crítica as principais informações e atualizações sobre os tópicos previamente citados. A busca e a coleta abrangeram publicações realizadas a partir de 2003, ano em que o desenvolvimento e os estudos na área de engenharia tecidual e microfluídica tornaram-se mais robustos, até os principais trabalhos publicados recentemente na área de SMF. As buscas também compreenderam o uso de palavras-chave ou termos, tais quais: “métodos alternativos ao uso de animais em laboratório”, “poder preditivo de métodos *in vitro* para testes de substâncias”, *Human-on-a-Chip*, *Body-on-a-Chip*, *Organ-on-a-Chip*, iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*), organoides humanos, *Disease-on-a-Chip*, sistemas microfisiológicos e microfluídica. Adicionalmente, essa revisão foi complementada com um breve relato, que visa ilustrar a experiência do LNBio até o momento, no desenvolvimento, proficiência e implementação da tecnologia de SMF no Brasil em parceria com a empresa alemã TissUse. A plataforma é operada por uma



unidade controladora acoplada a uma bomba de vácuo, e combina um sistema de canais de microfluídica, com dois compartimentos de cultura de tecidos, cada um do tamanho do poço das placas de 96 poços (fígado) ou de 24 poços (intestino), como demonstrado na Figura 1. O modelo construtivo do dispositivo microfluídico de 2-OC (*Two-Organ-Chip*) da TissUse possui dois compartimentos distintos por circuito de cocultivo celular (Figura 1). Os 2-OC foram fabricados aplicando litografia suave padrão e moldagem de réplicas de polidimetilsiloxano (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA). Esse dispositivo consiste de uma lâmina de PDMS, contendo as disposições dos canais, das microbombas e as aberturas para os compartimentos de cultivo celulares, permanentemente ligada a uma lâmina de vidro (75 x 25 mm) para microscopia, por oxidação de plasma de baixa pressão (Femto - Diener electronic, Ebhausen, Germany). Essa ligação permanente dá origem a uma única peça que possui microcanais com altura de 100 μm . As três bombas

peristálticas *on-a-chip* (construídas na lâmina de PDMS) têm a espessura de 500 μm . Esse microdispositivo para dois organoides (2-OC) proporciona duas características que melhoram sua funcionalidade: acoplamento mecânico e comunicação “humoral” entre os tecidos²². O volume para cultivar dois tecidos (fígado e intestino por exemplo) é de 900 μl por circuito. O volume extracelular total é de cerca de 1000 μl por circuito. A microbomba propicia um fluxo pulsátil estável do fluido ou meio de cultura. As superfícies superior e inferior das placas são transparentes e permitem a visualização e a caracterização morfológica dos organoides em tempo real. O sentido do fluxo perfusor dentro dos compartimentos do *chip*, bem como a frequência do fluxo, são determinados de acordo com os tipos de tecidos e experimentos. No caso do 2-OC Intestino + Fígado, o sentido do fluxo foi do intestino para o fígado (emulando a absorção intestinal e o direcionamento do que foi absorvido ao fígado pelo sistema porta) e a frequência estabelecida foi a de 0,8 Hz²².



A) Desenho esquemático do modelo construtivo do dispositivo microfluídico TissUse. B) Vista de um corte longitudinal do 2-OC mostrando os compartimentos de cultivo de equivalentes de intestino e fígado. C) Vista inferior do 2-OC com destaque para os canais microfluídicos que interconectam os compartimentos de cultivo tecidual. D) Plataforma 2-OC instalada e em operação no LNBio - Unidade controladora (bomba peristáltica) conectada ao 2-OC.

Fonte: Adaptado de <https://www.tissuse.com/en/products/2-organ-chip/> e de Maschmeyer et al. (2015).

Figura 1. Plataforma *Two-Organ-Chip* da empresa TissUse.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organoides humanos

A emulação da histoarquitetura existente *in vivo* é essencial para a obtenção de respostas de relevância fisiológica dos modelos de órgãos humanos *in vitro*. A tridimensionalidade e a comunicação intercelular são características fundamentais à plena expressão fenotípica e funcional da maioria dos tecidos²³. Não menos importante é o contato entre diferentes tipos celulares. O microambiente complexo tridimensional no qual as células se organizam *in vivo* possibilita a interação entre diferentes tipos celulares e entre as células e a matriz extracelular (MEC)^{24,25,26}.

Organoides são estruturas artificiais, que representam fragmentos funcionais de órgãos, criadas para estudos *in vitro* capazes de exercer as funções primordiais *in vivo* do órgão correspondente²⁷. Sua concepção conceitual parte das unidades morfofuncionais dos respectivos órgãos. Por exemplo, os lóbulos hepáticos representam as unidades morfofuncionais do fígado, que possui cerca de 1 milhão de lóbulos. Cada lóbulo contém cerca de 1 milhão de células de 20 diferentes tipos, principalmente hepatócitos. O formato do lóbulo é aproximadamente hexagonal com a veia hepática no centro e as tríades hepáticas (veia porta, artéria hepática e duto biliar) nos vértices. Uma rede complexa de vasos sanguíneos (sinusoide) as irriga²⁸. Unidades morfofuncionais similares podem ser identificadas em cada órgão do corpo humano²⁹.

Normalmente, os organoides são estruturas tridimensionais constituídos por diferentes tipos celulares organizados em um arranjo determinado (microestrutura). Um tipo de microestrutura muito popular é o esferoide. A confecção de organoides esferoidais possui vários aspectos benéficos que os tornam um modelo atrativo: são fáceis de produzir e manusear, seu tamanho e composição podem ser controlados de forma relativa (pois as células continuam a proliferar após a formação da esfera) e não necessitam de molde para a sua formação. Esta última característica permite que as células se arranjam de forma espontânea durante o processo de agregação, aumentando as chances de apresentarem um fenótipo organotípico^{30,31}, além do fato de estarem livres da necessidade de aderência a qualquer tipo de superfície não fisiológica. Ainda, a possibilidade da utilização de diferentes tipos celulares no mesmo organoide esferoidal permite o surgimento de contatos intercelulares heterotípicos, conferindo avanço adicional nos aspectos de funcionalidade e diferenciação teciduais^{23,27}.

Outros modelos teciduais tridimensionais confeccionados *in vitro*, também muito convenientes e utilizados, são os organoides de barreira, dos quais pode-se citar a barreira intestinal, barreira renal constituída de células epiteliais do túbulo proximal ou por podócitos glomerulares, córnea, pele, barreira hematoencefálica.

Dispositivos microfluídicos

Apesar de haver uma grande diversidade de SMF, a maioria deles é baseada em dispositivos microfluídicos que buscam mimetizar o ambiente celular de um ou mais órgãos humanos³². O termo microfluídica diz respeito ao fluxo de líquidos em canais de dimensões micrométricas, ou seja, menores do que 1 mm em pelo menos

uma dimensão³³. Dispositivos microfluídicos são formados por conjuntos de microcanais interconectados que podem ser divididos em duas categorias: 1) sistema microfluídico passivo com fluxo determinado pela força da gravidade e 2) sistema microfluídico ativo com fluxo determinado pela ação de uma bomba que pode ou não ser parte de uma unidade controladora. A rede de microcanais entalhados no *chip* pode ser acessada através de aberturas (entradas e saídas) que conectam o interior ao exterior. É através desses orifícios que os tecidos humanos, substâncias e meio de cultura são integrados ou retirados do dispositivo microfluídico, com o uso de tubos, adaptadores de seringas, pipeta etc. Também por essas aberturas os *chips* são conectados aos sistemas ativos externos (controle de pressão, seringa ou bomba peristáltica) ou formas passivas (por exemplo, pressão hidrostática).

Ao se projetar um SMF é essencial estabelecer o regime de fluxo a ser adotado no dispositivo microfluídico.

A escolha dos materiais para a construção dos dispositivos microfluídicos deve levar em conta seus possíveis impactos no cultivo celular e também as propriedades das substâncias a serem testadas. Diversos materiais são atualmente usados, tais como: polímero (PDMS), silicone, cerâmica, vidro e metais. A construção de cada um envolve processos específicos: deposição eletrônica, corrosão, moldagem por injeção, gravação em relevo e litografia suave em PDMS. Os sistemas mais complexos são geralmente confeccionados com mais de um tipo de material.

O polímero PDMS é provavelmente o material mais utilizado para a confecção dos dispositivos, pois é muito conveniente para o cultivo celular. Trata-se de um elastômero transparente, permeável a gases, biocompatível, de baixo custo e fácil manipulação. Porém, o PDMS tem a desvantagem de poder adsorver e absorver pequenas moléculas com propriedades hidrofóbicas^{34,35,36}, fato que impacta de forma significativa na acurácia de predições envolvendo o uso de tais substâncias. Como alternativa pode-se fazer uso de polímeros termoplásticos como o policarbonato (PC), polimetilmetacrilato (PMMA) e copolímero olefino cíclico (COC) que não adsorvem pequenas moléculas²³.

Sistemas Microfisiológicos: *Organ-on-a-Chip* e *Human-on-a-Chip* (*Body-on-a-Chip*)

Diferentes, as Plataformas Microfluídicas de Cultivo Celular ou SMF são atualmente uma tecnologia que se encontra em fase de desenvolvimento, demandando ainda considerável avanço em bioengenharia. Os avanços realizados na última década na criação de modelos *in vitro* de culturas biomiméticas, baseadas em microtecnologia, fomentaram um interesse mundial crescente no desenvolvimento de plataformas que combinem tecidos humanos com microfluídica, dando origem ao termo *Organ-on-a-Chip*. Neste caso, a palavra *chip* deriva do inglês e refere-se a um dispositivo fino e de pequenas dimensões (podendo ou não conter elementos eletrônicos). Dependendo do número de órgãos e do desenvolvimento de diferentes microambientes celulares, pode-se ainda utilizar os termos *Human-on-a-Chip* ou *Body-on-a-Chip*. Com essa tecnologia, espera-se mimetizar *in vitro* a funcionalidade de órgãos humanos *in vivo*, com intuito de prever melhor os efeitos



de substâncias no corpo humano. O estímulo de cisalhamento conferido pelo fluxo é importante para diversos aspectos funcionais dos tecidos cultivados. Por isso, garantir o fluxo fisiológico e adequado a cada caso é crítico para o estabelecimento dos SMF.

Os projetos de SMF devem ser balizados na otimização dos processos de confecção e cultivo dos tecidos humanos, de maneira que a ação do sistema microflúídico ou do sistema de perfusão propicie estímulo mecânico de cisalhamento em níveis capilar e intersticial dentro de parâmetros fisiológicos. Além de permitir a remoção de substâncias secretadas ou metabólitos e possibilitar a interação de células localizadas em compartimentos ou tecidos diferentes, promove a criação de microambientes com gradientes biomoleculares e presença de *shear stress* controlado²³.

Tendo em vista que há uma grande diversidade de tipos de SMF (baseados em cultura 2D ou 3D, em organoides parenquimatosos ou de barreira, em fluxo passivo ou ativo, contendo ou não elementos eletrônicos, tais quais sensores, eletrodos etc.) e que, como já mencionado, o microambiente tridimensional *in vivo* no qual as células apresentam relações entre si, com diferentes tecidos e com a MEC, impactam diretamente na diferenciação e função de cada órgão, consideramos que os SMF constituídos de dispositivos microflúídicos para cultivo de tecidos humanos 3D *in vitro* em um ambiente controlado de estímulos mecânicos e eletrofisiológicos proporcionam as melhores condições possíveis de emulação²³.

Organ-on-a-Chip

O termo *Organs-on-Chips* são sistemas microengenheirados biomiméticos que contêm canais microflúídicos que veiculam meio de cultura com nutrientes e extraem catabólitos dos tecidos em cultivo. Podem ser definidos alternativamente como modelos de órgãos humanos em microescala (de 10^{-6} até 10^{-4} em relação ao tamanho original)^{37,38}.

Os sistemas *Organ-on-a-Chip* buscam produzir níveis de funcionalidade de tecidos e/ou organoides não alcançados pelo cultivo celular estático, além de também possibilitar a análise em tempo real de parâmetros bioquímicos e metabólicos^{15,29}, tais como albumina, lactato desidrogenase (LDH), glicose, O_2 , concentração de Glutathione (GSH), estado funcional de mitocôndrias, estrutura e morfologia do núcleo celular, estado redox, concentração de ATP etc. Esses parâmetros são monitorados por meio de biossensores internos ou externos, através de imagens microscópicas e análises do fluido coletado do sistema^{39,40,41}.

Os modelos *Organ-on-a-Chip* equipados com acessórios de monitoramento e de detecção (biossensores) podem conferir vantagens importantes relacionadas à economia de tempo e melhora da reprodutibilidade dos dados produzidos. Além do mais, a possibilidade de monitoramento contínuo *in situ* de respostas biológicas induzidas por fármacos durante um longo intervalo de tempo é crucial para adequada investigação dos parâmetros farmacológicos e, por consequência, para o aumento do poder preditivo dos SMF. A empresa Emulate, Inc., do *Wyss Institute*, alocado na Universidade de Harvard, desenvolveu microdispositivos que possuem eletrodos embutidos para mensuração de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER), com intuito de monitorar de forma não

invasiva a formação e a integridade de diferentes modelos *in vitro* de órgãos de barreira, tais como o pulmão ou intestino⁴².

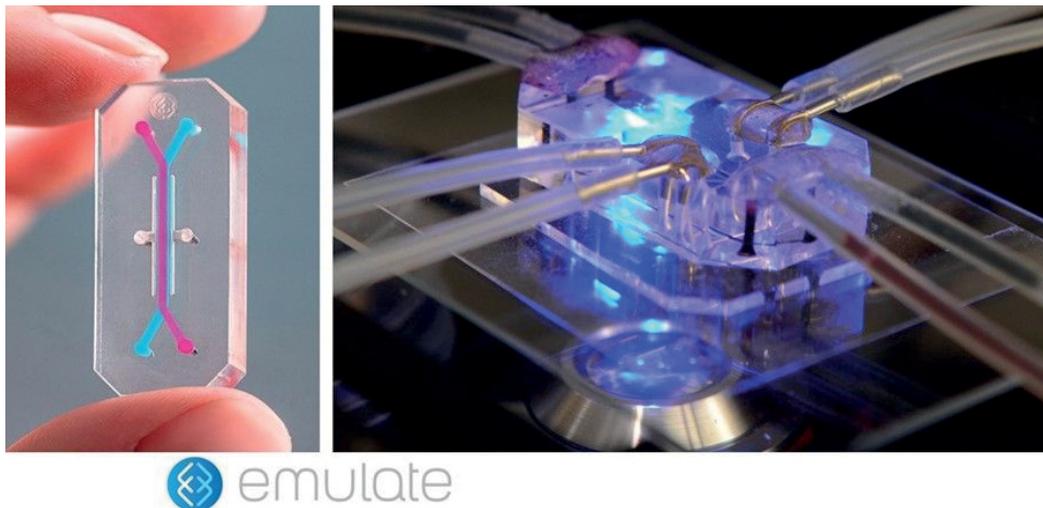
Outro exemplo vem do Centro de Pesquisa e Inovação em Biomateriais da Escola de Medicina da Universidade de Harvard, que desenvolveu todo um sistema de monitoramento contínuo e automatizado, em uma plataforma modular, integrada e equipada com multi-biossensores com capacidade de detecção biofísica e bioquímica, integrados a módulos de *Organ-on-a-Chip*. O sistema conta com uma bomba peristáltica, um módulo de controle do fluxo microflúídico, módulos contendo sensores biofísicos para O_2 , pH, temperatura e contração de células cardíacas, módulo contendo sensores bioquímicos para proteínas hepáticas (por exemplo: Glutathione S-Transferase alfa, albumina), proteínas cardíaca (Creatina quinase), um mini-microscópio para monitoramento da morfologia dos organoides, além de um módulo de captura para bolhas do sistema⁴³.

Assim esses SMF permitem emular de forma mais acurada as condições do meio interno incluindo as condições de pressão e temperatura, difusão de nutrientes (glicose, aminoácidos e lipídeos), além de fatores humorais tróficos e de crescimento¹⁰, bem como a remoção mais eficaz de catabólitos. Os SMF possuem vias de difusão microflúídicas que permeiam os tecidos à semelhança dos capilares sanguíneos e permitem o cultivo tridimensional com contato intercelular e tração mecânica ou *shear stress*, responsáveis em parte pela morfologia tissular. Essas características proporcionam a emulação das condições *in vivo* e supostamente levam a um padrão de resposta da preparação mais semelhante ao de um organismo vivo^{15,44,45,46} como já discutido anteriormente. Dessa maneira conclui-se que o advento da tecnologia *Organ-on-a-Chip* vem ao encontro do reconhecimento de que a morfogênese celular, as interações célula-célula, o ambiente biomecânico são tão importantes quanto são as células em si^{47,48,49,50,51,52}. Como exemplos podemos citar a orientação topográfica⁵³, definição espacial da cultura^{44,54,55,56}, o estímulo de cisalhamento e outros tipos de estímulo mecânico (estiramento, compressão etc.)^{57,58,59}, e gradiente bioquímico^{60,61}.

Essa tecnologia representa uma alternativa ao uso de animais em aplicações farmacêuticas, químicas e ambientais¹⁵.

Outros importantes exemplos de *Organ-on-Chip* vem mais uma vez da empresa *Emulate*. Os organoides humanos cultivados isoladamente até o momento incluem: pulmão (células endoteliais microvasculares pulmonares com interface com células epiteliais alveolares)⁶², vias áreas inferiores (células humanas primárias diferenciadas em epitélio mucociliar)^{44,63}, intestino (linhagem celular humana CaCo2)⁶⁴, rim (células epiteliais do túbulo proximal humanas)⁶⁵, e medula óssea (células de rato)⁶⁶. A Figura 2 ilustra o modelo de *Chip* da *Emulate*. Nessa tecnologia, cada organoide mimetiza as interfaces celulares de seu respectivo órgão, assim como algumas de suas características fundamentais, por exemplo o movimento peristáltico do intestino.

Em 2016 o Fórum Econômico Mundial selecionou especificamente a tecnologia *Organ-on-a-Chip* como uma entre as dez mais emergentes do mundo⁶⁷. Neste sentido, o campo de estudos relacionado a sistemas microflúídicos, *Organ-on-a-Chip* e SMF experimentou um grande salto no concernente ao número de publicações acadêmicas relacionadas ao longo das últimas duas décadas. Entre



Fonte: Adaptado de Emulate (<https://emulatebio.com/>).

Figura 2. Exemplo de sistema *Organ-on-a-Chip* da empresa Emulate.

os anos 2000-2014 houve um aumento de aproximadamente 12 vezes, 985 vezes e 380 vezes do número de publicações acadêmicas relacionadas às áreas de microfluídica, *Organ-on-a-Chip* e SMF respectivamente (Gráfico). O aumento das publicações exemplifica a atividade e o interesse crescentes nessa tecnologia.

As palavras-chave “microfluídica” (*microfluidics* em Inglês), “*Organ-on-a-Chip*” e sistemas microfisiológicos (*Microphysiological systems* em inglês) foram buscadas pelo Google Scholar. Os números de publicações encontradas por essa busca para cada um dos oito intervalos de dois anos e para o intervalo de três anos estão representados no Gráfico a partir do ano de 1998 até o ano de 2017.

Human-on-a-Chip

Os SMF baseados em cocultivo de dois ou mais órgãos interconectados em um dispositivo de microfluídico são comumente chamados de *Multi-Organ-Chips*. Atualmente são as plataformas precursoras das futuras *Human-on-a-Chip* ou *Body-on-a-Chip* que estão em fase de desenvolvimento e projetam acima de dez órgãos interconectados⁶⁸ já para o ano de 2018.

Um bom exemplo ilustrativo desses tipos de SMF vem da empresa alemã TissUse GmbH, uma empresa derivada do Instituto de Biotecnologia da Universidade *Technische* de Berlim, na Alemanha.

Os primeiros protótipos consistiram de dispositivos para dois órgãos interconectados sob um fluxo regulável gerado por uma bomba externa alojada dentro de uma unidade controladora computadorizada (Figura 1). Nestes dispositivos, chamados de *2-Organ-Chip* ou *2-OC*, foram feitos estudos com duplas de organoides, tais quais biópsia de pele humana e esferoides hepáticos^{22,69}, pele humana e foliculo capilar⁷⁰, barreira intestinal reconstruída *in vitro* e esferoides hepáticos²², neuroesferas e esferoides hepáticos⁷¹.

Mais recentemente, foi incorporado o cultivo de células endoteliais que recobrem a área luminal dos canais microfluídicos e a área dos poços de cultivo tecidual, mimetizando a interface

vascular entre os tecidos e o fluxo (circulação) dentro do dispositivo⁷². Também foi desenvolvido um modelo de medula óssea construído sobre molde cerâmico de óxido de zircônio revestido com hidroxiapatita Sponceram® 3D (*Zellwerk GmbH*, Alemanha), que hospedou a cocultura de células mesenquimais estromais (MSC) e células-tronco hematopoiéticas derivadas do sangue do cordão umbilical (HSPC) viáveis por até 28 dias no *2-OC*⁷³.

Posteriormente, a TissUse também desenvolveu dispositivos para quatro órgãos (*4-Organ-Chip* ou *4-OC*) que deu origem à publicação que mostra o cultivo e manutenção de equivalentes de fígado, intestino, pele e rim interconectados neste dispositivo⁷⁴. Este novo dispositivo *4-OC* possui dois compartimentos de microfluídica separados: um simula a circulação sanguínea e outro que emula o circuito excretor, para a drenagem do fluido (análogo à urina) secretado pelo equivalente de rim.

Os SMF que contemplam dois ou mais órgãos têm grande potencial de aplicação em estudos de farmacocinética os quais envolvem análises dos perfis de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMETox) de uma substância ou de fármaco, além de também poder simular doenças humanas *in vitro*. O estudo das propriedades farmacocinéticas de uma substância ou candidato a fármaco é uma das aplicações possíveis e promissoras dos SMF, sendo uma etapa crítica no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Os modelos tradicionais de células humanas reproduzem de maneira não satisfatória as propriedades ADMETox observadas *in vivo*, apresentando uma modificação do nível de exposição (quando comparado ao verificado em humanos) e prejudicando, portanto, a avaliação toxicológica pela razão da maioria das respostas celulares avaliadas dependerem justamente e diretamente do nível de exposição do tecido à droga testada^{74,75,74,76,77,78,79,80,81}.

Dessa maneira, um SMF que contemple a integração de modelos de intestino e fígado humanos *in vitro*, os dois órgãos críticos para respostas de biodisponibilidade e exposição sistêmica,

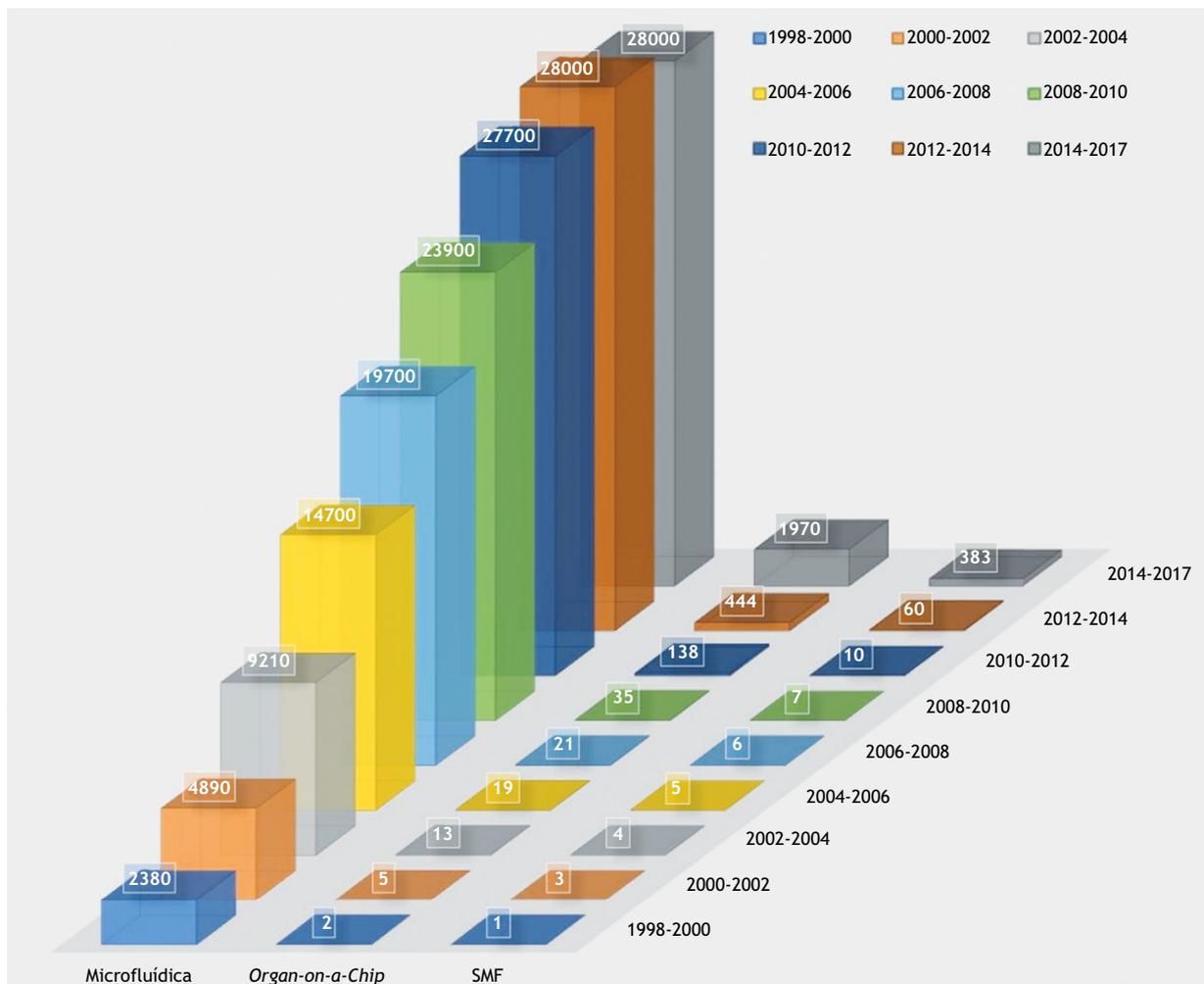


Gráfico. Evolução numérica do número de publicações.

tem significativa relevância⁸², e pode representar uma evolução no concernente ao poder preditivo, em relação aos modelos de cultura de células humanas estáticos e não integrados. Um exemplo de SMF para estudos farmacocinéticos foi o desenvolvido pelo grupo de Murat Cirit do Departamento de Engenharia Biológica do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT)⁸². O SMF consistiu de uma plataforma microfluídica (microdispositivo + bomba de perfusão) na qual foram integrados modelos de intestino e fígado humanos desenvolvidos *in vitro*, os quais foram mantidos sob comunicação contínua para a investigação simultânea dos valores de parâmetros farmacocinéticos tais como absorção e metabolização, após a administração oral de um dado composto (no caso dos SMF que contenham intestino e fígado, a emulação da administração oral é feita pela aplicação da substância teste no compartimento intestinal, ao passo que a mimetização da administração intravenosa é feita através da aplicação diretamente no compartimento hepático). Os autores demonstraram a possibilidade de obtenção de parâmetros intrínsecos como permeabilidade e *clearance* hepática, através da derivação dos dados obtidos no SMF por modelagem mecanística. Também sugeriram neste estudo que a comunicação entre os órgãos propiciada pelo SMF impactou positivamente na capacidade metabólica do modelo de fígado.

Outro exemplo de modelo de SMF otimizado para investigações farmacocinéticas vem do Laboratório de Biomecânica e Bioengenharia da Universidade de Tecnologia de Compiègne, em Picardia, na França. O grupo desenvolveu um SMF contendo os modelos de intestino e fígado humanos confeccionados *in vitro* e mantidos acoplados sob fluxo para a investigação do metabolismo intestinal e hepático de primeira passagem do fármaco paracetamol⁸³. Esta abordagem foi também combinada a um modelo matemático visando estimar parâmetros intrínsecos *in vitro* e possibilitar a extrapolação para os processos *in vivo*. O trabalho também mostrou a identificação de metabólitos como o sulfato de paracetamol que foi identificado através da atividade sinérgica entre os modelos de intestino e fígado ocorrida no SMF. Ambos os grupos afirmam nos estudos supracitados, a importância e a grande potencialidade que pode ter a aplicação de SMF em investigações farmacocinéticas, bem como a integração das abordagens *in silico* e *in vitro* baseada em SMF.

Disease-on-a-Chip

Os modelos *in vitro* Disease-on-a-Chip são uma variação ou adaptação dos Multi-Organ-Chips destinados à emulação de condições patológicas. Um dos exemplos ilustrativos é o modelo desenvolvido



pelo grupo do Instituto Federal de Tecnologia de Zurique (ETH). O modelo em questão utilizou o cultivo de tecido tumoral colorretal e tecido hepático murino e permitiu avaliar a eficácia do tratamento com ciclofosfamida com prévia bioativação em tecido hepático murino, no tratamento do tumor colorretal *in vitro*⁸⁴. Além de apresentar um modelo bem-sucedido de *Disease-on-a-Chip*, este grupo demonstrou a importância do cultivo simultâneo e integrado de mais de um tecido propiciado pelo SMF. Foi observada inibição do crescimento tumoral somente nos experimentos realizados em dispositivos microfluídicos, ou seja, em presença de fluxo. Não houve efeito antitumoral com a ciclofosfamida em ensaios sem fluxo, como a transferência descontínua via pipetagem, de sobrenadante das culturas estáticas de tecidos de fígado tratados com ciclofosfamida para as culturas também estáticas de tecido tumoral colorretal⁸⁴.

Neste trabalho fica explícito o impacto positivo da utilização de SMF sobre a resposta obtida no teste, que foi completamente distinta da resposta obtida na situação de ensaio realizada fora do SMF.

Outro grupo cultivou células de adenocarcinoma ductal pancreático em 3D sob fluxo e mostrou resposta à cisplatina mais fisiológica quando comparada aos modelos *in vitro* de cultivo tradicionais⁸⁵. As células tumorais, em geral, comportam-se diferentemente e apresentam fenótipo distinto quando cultivadas fora do corpo humano em 2D, ou mesmo quando cultivadas em 3D. Os sistemas *in vitro* de cultura celular 2D tradicionais ou sob insertos tipo *Transwell*[®], bem como modelos de esferoides por exemplo, usados na tentativa de mimetizar o microambiente tumoral (MT), têm mostrado limitado poder preditivo de eficácia terapêutica de várias drogas candidatas a fármaco⁸⁶.

O MT exerce grande influência no comportamento celular, principalmente no concernente à sobrevivência, proliferação, invasividade e sensibilidade ao tratamento com compostos^{87,88}. Tipicamente, os tumores são formados por células cancerígenas e estromais (fibroblastos e células imunes) nutridas pela rede vascular. O entendimento dessa intrincada inter-relação dos diferentes tipos celulares, bem como da inter-relação das células com componentes da matriz extracelular, é crítico para o avanço das estratégias de tratamento do câncer⁸⁹. Nos casos de modelos de tumores *in vitro* tradicionais isto é, não baseados em SMF, o desafio é maior devido à ausência da interação entre as células tumorais e a matriz extracelular e diferenças nas condições de gradiente de pH intratumoral, oxigenação e nutrição encontradas *in vivo*. Neste sentido, a aplicação dos modelos de SMF na investigação do comportamento e respostas de células tumorais pode ser vantajoso, na medida em que, ao propiciar condições mais aproximadas de MT encontradas no organismo humano, os SMF podem induzir nas células tumorais um padrão de comportamento mais próximo das condições *in vivo*. Através do avanço de técnicas de microfabricação, atualmente é possível desenvolver dispositivos microfluídicos cuja organização espacial por compartimentalização das células e controle sobre a difusão de fatores solúveis críticos às homeostases do sistema viabilizem a reconstrução de modelos complexos de cultura celular que contemplem a necessária integração entre os diferentes tipos celulares e entre células e componentes do microambiente⁹⁰.

O trabalho de Albanese et al.⁹¹, baseado em modelo de *tumor-on-a-chip*, demonstrou a reprodução bem-sucedida *in vitro* do efeito

de permeabilidade e retenção (EPR). Vários tumores sólidos possuem características estruturais que incluem hipervascularização, arquitetura vascular defeituosa, e drenagem linfática prejudicada, caracterizando o conhecido efeito de EPR, descrito para moléculas específicas⁹², tipicamente compostos macromoleculares, lipossomos e nanopartículas, que tendem a acumular muito mais no tecido tumoral do que no tecido normal⁹³. Alabnese et al. mostraram que a penetração e a acumulação de nanopartículas em esferoides de células tumorais integrados ao dispositivo microfluídico foram significativamente influenciadas pela presença de fluxo e de MEC no entorno. O estudo verificou a importância da região de interface formada pela MEC, fluido e superfície do tecido; essa região de interface emulada no SMF mostrou-se necessária à reprodução *in vitro* do efeito EPR, comportando-se como um reservatório de interface fluido-tecido, no qual as nanopartículas se acumulam e difundem-se progressivamente para o tecido. Esse transporte passivo, a partir do reservatório de interface, impacta diretamente o número de partículas a serem difundidas para o tecido e parece poder prever a extensão da acumulação de nanopartículas dentro do tumor *in vivo*.

O trabalho evidenciou a importância da mimetização do MT e o potencial uso do *tumor-on-a-chip* no desenvolvimento e padronização de carreadores medicamentosos, incrementando a investigação dos mecanismos de transporte de nanopartículas através de um tecido sob condições de fluxo fisiológico e acoplamento com MEC.

Há ainda outros exemplos de doenças emuladas nos SMF. O modelo desenvolvido baseado em microcanais revestidos por células endoteliais mimetizando a camada íntima de vasos sanguíneos, também se mostrou bem-sucedido em mimetizar as condições patológicas *in vitro*⁹⁴. Neste, observou-se expressão do fator de von Willebrand em resposta à estenose dos microcanais emulando o efeito da placa de atheroma (formação composta de gordura, cálcio e células inflamatórias, localizada na parede das artérias). A aplicação de SMF na investigação de doenças tem se mostrado promissora. Já existem desenvolvimentos de SMF para doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson⁹⁵, para doenças infecciosas ou potencial de infecção de determinado tecido⁹⁶, doenças vasculares como a trombose^{63,97}, doenças de vias aéreas^{62,63}, entre outras.

A experiência brasileira

No LNBio, um dos quatro laboratórios nacionais alocados no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), está sob desenvolvimento o projeto “*Human-on-a-Chip*”. A primeira etapa do projeto foi baseada no desenvolvimento de modelos de organoides humanos cultivados nos dispositivos de microfluídica, fabricados e vendidos pela empresa TissueUse GmbH, dispositivo esse denominado de *Two-Organ-Chip* ou 2-OC (Figura 2).

Os microdispositivos fabricados pela TissueUse são compostos por três tipos de materiais: policarbonato que compõe a placa adaptadora, PDMS no qual estão as válvulas e canais microfluídicos e uma lâmina de vidro que recobre o PDMS (Figura 1A). O modelo de SMF proposto pela TissueUse oferece acesso aos poços de cultivo celular, ao mesmo tempo que mantém os microcanais isolados e protegidos, possibilitando a confecção e maturação dos organoides



externamente, sua colocação nos *chips* e sua posterior retirada para histologia. Também permite o uso de maior variedade de tecidos humanos, como materiais de biópsias por exemplo.

No LNBio já acontece a confecção e o cultivo no 2-OC bem-sucedidos de organoides de fígado, coração e intestino, além do rim que está em fase de desenvolvimento.

Células e tecidos

Embora células primárias, provenientes de doadores vivos ou cadáveres, apresentem melhor funcionalidade, são de obtenção complicada e incerta, podendo produzir resultados inconsistentes devido ao fato de serem originadas de doadores diferentes na maioria dos casos. A depender da origem do tecido e do doador, não apresentam sobrevida necessária para realização de testes de duração mais longa.

Por isso, optamos por células de linhagens expansíveis e/ou células iPSC. A funcionalidade destas é geralmente menor, mas podemos controlar parâmetros importantes de maneira mais efetiva.

Equivalente barreira intestinal humana

Para produzir organoides que emulam a barreira intestinal, utilizamos células da linhagem CaCo2 (ATCC HTB-37) (Figura 3A) associadas à linhagem HT29-MTX (ATCC HTB-38) (Figura 3B). Ambas são linhagens epiteliais de adenocarcinoma de colo retal que possuem a maioria das características morfológicas e funcionais de células absorptivas do intestino delgado, incluindo enzimas digestivas e receptores. As células da linhagem HT29-MTX também possuem a capacidade de secretar mucina e outros compostos que formam o muco intestinal que auxilia a capacidade absorptiva^{98,99,100}. A barreira foi construída durante 21 dias em inserto *Transwell*® cuja membrana microporosa recebeu a sementeira da cocultura das duas linhagens intestinais supracitadas (Figura 3C).

O inserto, além de fazer as vezes de suporte para o cultivo celular, ainda teve a função de separar o organoide em dois compartimentos ou lados fisicamente distintos mimetizando as regiões intestinais intraluminal (compartimento superior ou lado apical) e intersticial/corrente sanguínea (compartimento inferior ou lado basolateral) (Figura 3D).

Equivalente fígado humano

Para os esferoides de fígado, utilizamos a linhagem de células HPR101 diferenciada em HepaRG®, associada à linhagem HHS-teC (*Human Hepatic Stellate Cells* #5300, Sciencell) (Figura 4). A primeira provém de um doador portador de carcinoma hepatocelular com concomitante infecção pelo vírus da Hepatite C.

As HepaRG® são células hepáticas progenitoras capazes de dar origem a hepatócitos e colangiócitos adultos completamente diferenciados. Possuem níveis significativos de funcionalidade hepática como a expressão estável de enzimas da família da CYP450 e de enzimas que atuam na conjugação de fármacos (fase 2) e de suportar o ciclo completo replicativo do vírus da hepatite B¹⁰¹. A segunda produz células do tecido conectivo intralobular que apresentam fenótipo semelhante aos miofibroblastos ou lipócitos. Estas células

participam da homeostase da matriz extracelular e dos processos de reparo, regeneração e fibrose do fígado. A proliferação e migração destas células, juntamente com a expressão de quimiocinas, estão envolvidas na patogênese da inflamação hepática e na fibrogênese.

De maneira geral a cultura de hepatócitos como esferoides tem demonstrado resultados positivos com respeito à função hepática, devido ao estabelecimento dos contatos homo e heterotípicos célula-célula e a presença de componentes-chaves de MEC dentro e nos arredores dos agregados⁶⁹. A Figura 3 mostra as células hepáticas sob cultivo 2D (Figura 3E e 3F), e a respectiva cocultura na histoarquitetura esferoidal (Figura 3G e 3I) integradas no 2-OC (Figura 3H). Os equivalentes de intestino e fígado foram mantidos sob cocultivo no 2-OC por 14 dias.

Os cardiomiócitos humanos usados para confecção da cardioesfera foram gerados a partir da reprogramação de células sanguíneas (eritroblastos) obtidas de um indivíduo saudável de 38 anos de idade, do sexo masculino. As iPSC foram diferenciadas em cardiomiócitos adultos. A empresa brasileira *PluriCell Biotech* forneceu os cardiomiócitos já diferenciados, usados para a confecção dos organoides no LNBio. Após formadas, as esferas (Figura 4C) foram integradas à plataforma 2-OC e cultivadas para realização de experimentos pilotos. Análises baseadas em microscopia eletrônica de transmissão de cortes de cardioesferas permitiram identificar estruturas celulares compatíveis com uma célula cardíaca sadia, tais quais unidades sarcoméricas, *GAP junctions*, mitocôndrias íntegras, depósitos de glicogênico, membranas e compartimentos membranosos intactos (Figura 4 A e B).

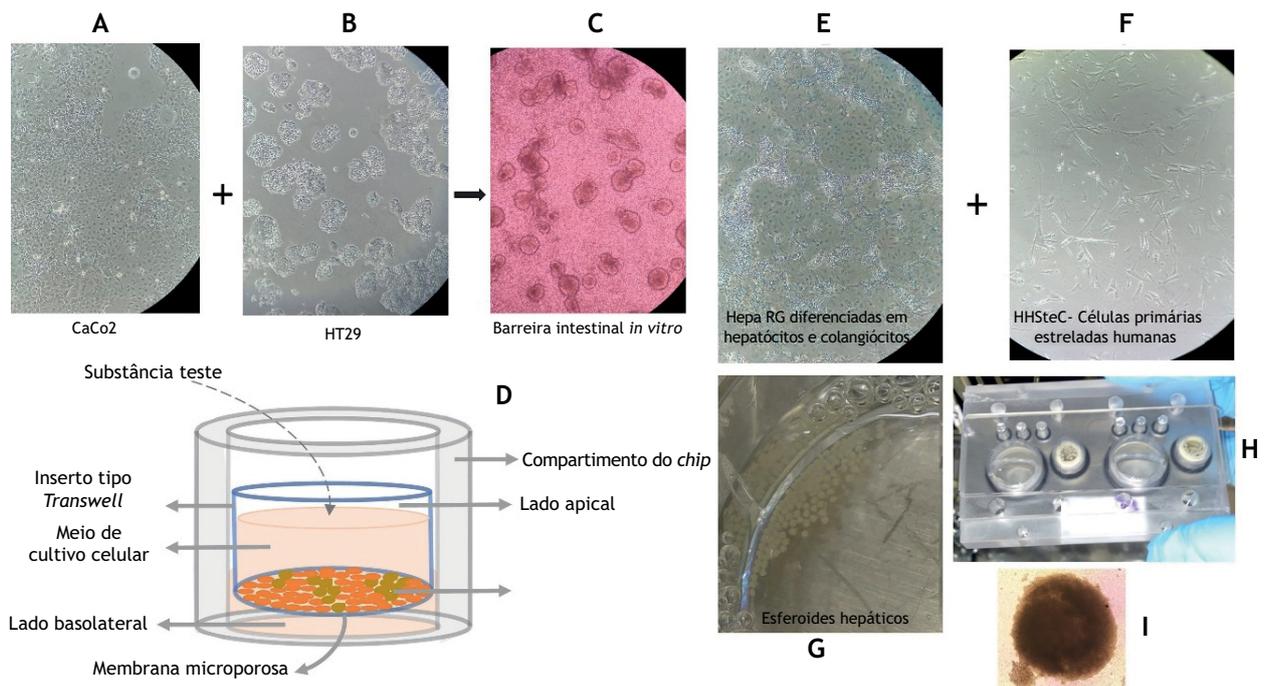
Interessantemente, o trabalho de Luni et al. mostrou que o processo de reprogramação de células somáticas humanas em iPSC é tremendamente influenciado pelo ambiente microfluídico (uma melhoria de 50 vezes em relação à reprogramação mais eficiente relatada usando células humanas sem modificações genéticas), sendo possível a diferenciação direta em hepatócitos e cardiomiócitos funcionais na mesma plataforma sem passo de expansão adicional¹⁰².

Perspectivas futuras e desafios

Apesar dos grandes avanços já obtidos, a engenharia de tecidos humanos em três dimensões (3D) para confecção de equivalentes de órgãos (em diferentes escalas e com diversos objetivos), bem como os dispositivos microfluídicos, estão em fase de desenvolvimento. Os avanços no manejo das células-tronco embrionárias e iPSC já contribuíram bastante e podem acelerar ainda mais o progresso deste campo, ao fornecerem acesso a diversas linhagens celulares para confecção de organoides.

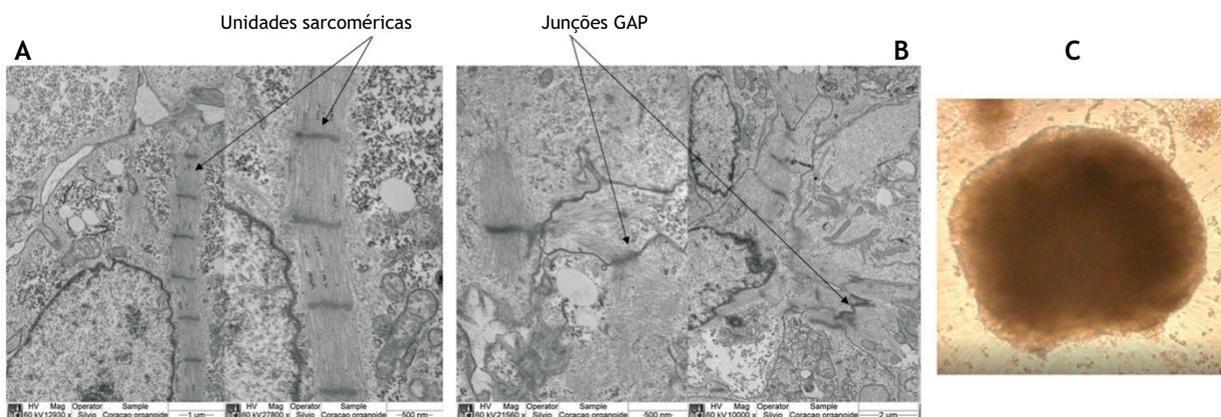
Vastas perspectivas se encontram também no campo da medicina personalizada com a possibilidade de culturas celulares “paciente-específica”^{103,104}. As iPSC são obtidas a partir de células primárias do corpo humano, tais como, células sanguíneas (por exemplo: eritroblasto), fibroblastos (obtidos de pele), células epiteliais do trato urinário (obtidas da urina), que passam por processo de desdiferenciação e em teoria podem ser rediferenciadas artificialmente em qualquer tipo celular¹⁰⁵.

Células de origem primária, apesar de apresentarem a funcionalidade superior, são desvantajosas em aspectos de logística de



A) Imagem microscópica das células CaCo2, com ampliação de 10 x. B) Imagem microscópica das células HT29-MTX, com ampliação de 10 x. C) Cocultura das células CaCo2 e HT29-MTX, com ampliação de 10x. D) Desenho esquemático do modelo equivalente de barreira intestinal feito no LNBio. E) Imagem de microscopia de luz de células HepaRG em 2D diferenciadas, com ampliação de 10 x. F) Imagem de microscopia de luz de células estreladas humanas em cultivo 2D, com ampliação de 10 x. G) Fotografia de esferoides hepáticos formados e coletados. H) Esferoides hepáticos integrados ao dispositivo 2-OC - TissUse GmbH. I) Imagem de microscopia de luz de um esferoide hepático, com ampliação de 4 x.

Figura 3. Organoides de intestino e de fígado humanos - equivalente à barreira intestinal humana.



A-B) Imagens de microscopia eletrônica de cortes histológicos cardioesferas ou equivalentes de coração humano. A) Destaque para a sequência de unidades sarcoméricas, mitocôndrias e depósitos de glicogênio no sarcoplasma. B) Destaque para as junções tipo GAP. C) Imagem de microscopia de luz de uma cardioesfera, com ampliação de 4X.

Figura 4. Organoide humano de coração - equivalente ao coração.

obtenção complexa, variabilidade genética (que pode ser benéfica somente em algumas situações) e instabilidade fenotípica/fisiológica *in vitro*. As células provenientes de linhagens imortalizadas têm a vantagem do acesso e manuseio simples, mas sua funcionalidade neste momento é menor que a das células primárias. Apesar do fato de ser a adoção de boas práticas de laboratório o fator mais crítico para assegurar que o cultivo celular seja livre de contaminantes diversos, as células de linhagens

apresentam maior risco de contaminação por *Mycoplasma*¹⁰⁶ e/ou contaminações inter e intraespécie e instabilidade genética^{107,108}.

Por isso, a disponibilidade de tipos celulares, capacidade de adaptação e a escolha mais adequada da fonte celular para a confecção de organoides cada vez mais realísticos e estáveis nos SMF são desafios encontrados para o estabelecimento da tecnologia *Human-on-a-Chip*.



Adicionalmente, é importante considerar a necessidade do desenvolvimento de um meio de cultura cuja formulação/composição seja otimizada para atender às necessidades dos diferentes tipos celulares cocultivados em SMF multiórgãos. A escolha do meio é feita em função de cada tipo celular, com intuito de melhorar a aderência à matriz extracelular, viabilidade pós-descongelamento, crescimento, replicação. Situações onde um tipo celular sobrevive e cresce perfeitamente em um meio no qual outro tipo celular não vai bem são muito comuns.

Esses fatores tornam a formulação do meio de cultura adequada a diferentes tecidos muito desafiadora. Isto posto, importante para todos os tipos de cultivo celular (incluindo as 2D, sem fluxo, sem acoplamento tecidual etc.), e muitas vezes limitante para o cultivo integrados de dois ou mais tecidos, é o desenvolvimento de uma formulação do meio de cultivo universal um dos gargalos para o avanço da tecnologia dos SMF. Trabalho de Oleaga et al., publicado em 2016, abriu uma perspectiva bastante animadora ao demonstrar em SMF o cultivo simultâneo, bem-sucedido por 14 dias, de modelos de fígado, coração, músculo esquelético e tecido neuronal em um meio de cultura circulante e livre de SFB⁷⁵.

A variação que ocorre entre lotes de soros animais, principalmente de soro fetal bovino (SFB) é crítica e pode interferir em testes de desenvolvimento de fármacos, por exemplo²³. Fatores tais como o desconhecimento da composição exata do SFB, a ocorrência de variabilidade sazonal e geográfica lote-a-lote¹⁰⁹ e interação não intencional com substâncias de teste^{110,111} podem levar a resultados inconsistentes, preocupações em relação à segurança do pessoal de laboratório em termos de risco à saúde por contato acidental com endotoxinas, micoplasma e contaminantes virais ou proteínas priônicas^{112,113,114}; escassez inesperada na disponibilidade global^{115,116}, bem como preocupações éticas sobre o sofrimento fetal¹¹⁷. Neste sentido, pesam em favor da substituição ou abolição do uso de SFB, os aspectos de segurança, científica e ética, em outras palavras, a busca pela otimização dos sistemas de teste *in vitro*, bem como o comprometimento com os princípios dos 3Rs são incentivos para o desenvolvimento e adoção de formulações de meio de cultura livres de SFB sejam eles quimicamente definidos ou com adoção de componentes substitutivos¹¹⁸. Recentemente, lisados de plaquetas humanas demonstraram ser uma alternativa promissora ao SFB^{116,119, 120, 121,122}.

Outro aspecto importante a ser considerado, é que o estudo do perfil farmacocinético deve preceder estudos toxicológicos e farmacodinâmicos. Isso porque em todos os casos, deve-se relacionar a exposição ao efeito e a exposição somente será conhecida por meio de estudos farmacocinéticos. Para isso, é fundamental conhecer a partição de drogas nos órgãos, distâncias de difusão, taxas metabólicas com intuito de emular a comunicação *in vivo* entre os órgãos¹²³. Isto posto, um fator primordial para se obter sucesso é o escalonamento proporcional dos diferentes organoides de maneira a refletir a relação que ocorre no corpo humano. A escolha e aplicação de um método apropriado de escalonamento garantirá que um fármaco atinja os órgãos em concentrações semelhantes à que se espera nos pacientes.

Por isso, determinar os princípios e as regras para o dimensionamento dos diferentes SMF é um dos passos mais críticos para o desenvolvimento dos SMF com grande impacto no uso futuro em estudos de desenvolvimento de fármacos^{123,124}. O correto escalonamento também garantirá que fatores parácrinos alcancem outros órgãos em concentrações fisiológicas mantendo a correta razão de acoplamento órgão-órgão nos SMF.

Existem diversos tipos de escalonamento com diferentes focos ou métodos dos quais podemos citar: o escalonamento alométrico (a escala entre o organoide e seus homólogos humanos e cada um com o outro), mais comumente usados^{125,126}, o escalonamento funcional¹²⁷ e multifuncional¹²⁸ (considera parâmetros como a compartimentação dos organoides em circuitos fluidicos, o fluxo, as vias de administração/excreção) e ainda o escalonamento baseado no volume do órgão e no tempo de residência do fluxo sanguíneo¹²⁹. O problema é que abordagens mais usadas para o dimensionamento como a miniaturização direta e escalonamento alométrico são baseadas em tamanho físico apenas¹²⁸. Para um estudo mais aprofundado, estão disponíveis revisões sobre métodos de escalonamento no contexto *Human-on-a-chip*^{14,123,130,131,132,133}.

Para cumprir o desafio de cocultivar de forma bem-sucedida, diferentes equivalentes de órgãos humanos *in vitro* interconectados em uma situação de homeostase autônoma, se faz necessário ultrapassar outros obstáculos como a ausência de sistemas linfático, nervoso, imunológico e vascular integrados sinergicamente. A vascularização é especialmente importante; normalmente a densidade volumétrica celular dos organoides em 3D não corresponde à encontrada no órgão *in vivo*, devido à pseudo-histoarquitetura e às limitações de entrega de oxigênio e nutrientes

A integração de um revestimento endotelial ao SMF é uma medida crítica na direção da melhora da performance fisiológica destes. A presença de uma rede de vasos que consiga penetrar e perfundir adequadamente um esferoide de 300 µm por exemplo, irá melhorar o suprimento de nutrientes, de oxigênio e auxiliar na remoção de metabólitos. Outros benefícios incluem a modulação da difusão de moléculas hidrofílicas para o interior do organoide e de tensões não fisiológicas que poderiam alcançar mais facilmente as células²³. Além disso, as células endoteliais possuem a capacidade de estabelecer um nicho vascular e propiciar organogênese *in vivo* e *in vitro*.

A combinação de emulação robusta com a possibilidade de realizar análises e obter dados eletrofisiológicos por meio de microeletrodos integrados ao SMF também abre grandes perspectivas. Os tecidos cardíaco, músculo-esquelético ou neuronal podem ser estudados dessa forma^{135,136}. A aferição da TEER em verificação de integridade da barreira em modelos de equivalentes de intestino¹³⁷, pele ou córnea também pode representar mais um benefício desta funcionalidade.

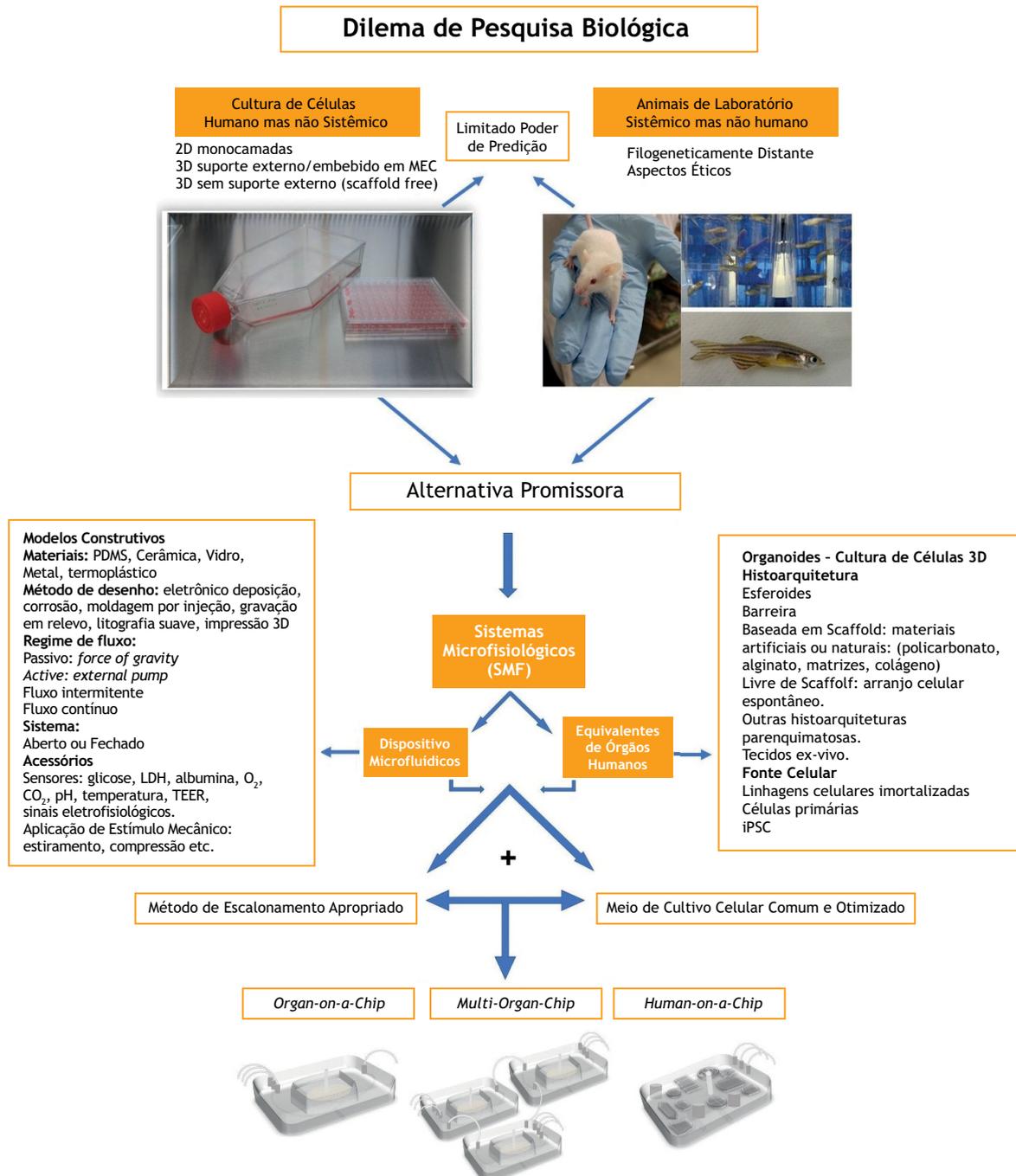
Adicionalmente, impressoras 3D podem ser de grande valia para a resolução de limitações dos atuais SMF. Ao propiciarem deposição precisa, ordenada e reprodutível de tipos celulares e materiais diversos, abrem a perspectiva de confecção de organoides



com complexa histoarquitetura. No caso dos rins ou do baço, a impressão de tecidos humanos em 3D é bastante conveniente, visto que não podem ser recriados de forma plena com a utilização das técnicas disponíveis atualmente¹³⁸. A empresa “Organovo” tem se destacado na área de impressão de tecidos humanos em 3D, oferecendo modelos de fígado (*ExVive™ 3D Bioprinted Human Liver Tissue Model*) e rim (*ExVive™ Human Kidney Tissue*) humanos¹³⁹. Além disso, as impressoras 3D abrem a perspectiva de otimização do processo de desenvolvimento e

fabricação dos dispositivos microfluidicos, que normalmente é laborioso e complexo, por necessitar de grandes investimentos e cuidados (sala limpa por exemplo e recursos humanos altamente especializados). A tecnologia de impressão 3D atual avançou a um ponto que permite a produção relativamente barata e rápida de sofisticados microdispositivos, configurando uma alternativa promissora aos protocolos atualmente empregados¹⁴⁰.

O fluxograma da Figura 5 ilustra uma proposta de abordagem para o desenvolvimento de SMF em centros de pesquisa, baseada



MEC: matriz extracelular; PDMS: polidimetilsiloxano; LDH: lactato desidrogenase; TEER: Resistência Elétrica Transepitelial; iPSC: *induced Pluripotent Stem Cells*.

Figura 5. Abordagem para o desenvolvimento e impacto dos Sistemas Microfisiológicos.



nos dados e informações aqui reunidos e interpretados. Contempla as razões que justificam o investimento na implementação dos SMF e os passos e aspectos críticos a serem considerados e ponderados nesse processo.

CONCLUSÕES

Apesar de todos os esforços e progressos realizados na direção do desenvolvimento de modelos experimentais que se aproximem o máximo possível da condição fisiológica humana, não é esse o fator mais crítico na relação SMF x corpo humano. Não obrigatoriamente os resultados ou dados obtidos dessas plataformas ou SMF devam ser realisticamente fisiológicos. O mais importante é que sejam comparáveis, transponíveis para o ser humano. Neste sentido, possuir e formalizar princípios de extrapolação que

permitam transpor de forma acurada os dados obtidos a partir dessas plataformas é tanto ou mais crítico do que a busca incessante pela emulação da fisiologia do organismo humano *in vitro*.

O progresso obtido até hoje nos projetos dos SMF sugerem o alto potencial dessa nova abordagem para superar as limitações dos modelos experimentais utilizados atualmente. Poderão, em prazo mais curto que se imagina, proporcionar a redução do uso de animais de laboratório e oferecer modelos com maior potencial preditivo aplicáveis à farmacologia, desenvolvimento de fármacos, emulação de doenças, avanço da medicina personalizada bem como o incentivo do desenvolvimento de melhores testes que contribuirão na melhoria de produtos e substâncias valiosos a ramos industriais tais quais os alimentício, cosmético e agropecuário.

REFERÊNCIAS

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):203-14. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
2. Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of dogs in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim.* 2013;41(5):335-50.
3. Dragunow M. The adult human brain in preclinical drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(8):659-66. <https://doi.org/10.1038/nrd2617>
4. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA.* 2006;296(14):1731-2. <https://doi.org/10.1001/jama.296.14.1731>
5. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(9):3507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110>
6. Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000245. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245>
7. European Medicines Agency. Science Medicines Health. ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. London: European Medicine Agency; 2009.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2nd ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
9. Laboratório Nacional de Biociências - LNBio, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM. Edital N° 01 RENAMA - Testes *in silico*. [s.d.][citado 10 set 2017]. Disponível em: http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2014/01/EDITAL-RENAMA_LNBio.pdf
10. Materne EM, Tonevitsky AG, Marx U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing: organotypicalness versus cost-efficient high throughput. *Lab Chip.* 2013;13(18):3481-95. <https://doi.org/10.1039/c3lc50240f>
11. Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, Kim HJ, Ingber DE. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip.* 2012;12(12):2156-64. <https://doi.org/10.1039/c2lc40089h>
12. Capulli AK, Tian K, Mehandru N, Bukhta A, Choudhury SF, Suchyta M et al. Approaching the in vitro clinical trial: engineering organs on chips. *Lab Chip.* 2014;14(17):3181-6. <https://doi.org/10.1039/C4LC00276H>
13. Hutson MS, Alexander PG, Allwardt V, Aronoff DM, Bruner-Tran KL, Cliffel DE et al. Organs-on-chips as bridges for predictive toxicology. *Appl Vitro Toxicol.* 2016;2(2):97-102. <https://doi.org/10.1089/avt.2016.0003>
14. Wikswo JP. The relevance and potential roles of microphysiological systems in biology and medicine. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(9):1061-72. <https://doi.org/10.1177/1535370214542068>
15. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21(12):745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
16. Zheng F, Fu F, Cheng Y, Wang C, Zhao Y, Gu Z. Organ-on-a-chip systems: microengineering to biomimic living systems. *Small.* 2016;12(17):2253-82. <https://doi.org/10.1002/sml.201503208>
17. Russell WM, Burche RI. The principles of humane experimental technique. London: UFAW; 1992.
18. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120-32.
19. European Parliament, Council Of The European Union. Regulation (EC) N° 1223/2009. [Cosmetic products]. Off J. Eur Union. 22 dez 2009.
20. Palmer N. Global cosmetic compliance summit. In: Cosmetic Compliance Conference; 2015 Apr 24-26; New York, NY.



21. Laquieze L, Lorencini M, Granjeiro JM. Alternative Methods to animal testing and cosmetic safety: an update on regulations and ethical considerations in Brazil. *Appl Vitro Toxicol.* 2015;1(4):243-53. <https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0008>
22. Maschmeyer I, Hasenberg T, Jaenicke A, Lindner M, Lorenz AK, Zech J et al. Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures: a first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95(Pt A):77-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.002>
23. Dehne E-M, Hasenberg T, Marx U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. *Futur Sci.* 2017;31;3(2):FSO185. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0002>
24. Bissell MJ. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *Int Rev Cytol.* 1981;70:27-100. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61130-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61130-4)
25. Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol.* 1982;99(1):31-68. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90388-5](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90388-5)
26. Lee EY, Parry G, Bissell MJ. Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *J Cell Biol.* 1984;98(1):146-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.146>
27. Simian M, Bissell MJ. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol.* 2017;216(1):31-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
28. Junqueira LC. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; [s. d.].
29. Marx U, Walles H, Hoffmann S, Lindner G, Horland R, Sonntag F et al. 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Altern Lab Anim.* 2012;40(5):235-57.
30. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 2004;22(4):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.002>
31. Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):209-13. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>
32. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature.* 2006;442(7101):403-11. <https://doi.org/10.1038/nature05063>
33. Nature.com. *Microfluidics.* Nature. 2018[citado 20 jan 2018]. Disponível em: <https://www.nature.com/subjects/microfluidics>
34. Toepke MW, Beebe DJ. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip.* 2006;6(12):1484-6. <https://doi.org/10.1039/b612140c>
35. Wang JD, Douville NJ, Takayama S, ElSayed M. Quantitative analysis of molecular absorption into PDMS microfluidic channels. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(9):1862-73. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0562-z>
36. Midwood PM, Janse A, Merema MT, Groothuis GMM, Verpoorte E. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. 2012;84(9):3938-44. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>
37. Shuler ML. Organ-, body- and disease-on-a-chip systems. *Lab Chip.* 2017;17(14):2345-6. <https://doi.org/10.1039/C7LC90068F>
38. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):760-72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>
39. Cyprotex. Spontaneously beating cardiac spheroids: 3D combined hypertrophy and cardiotoxicity assay. Nether Alderley: Cyprotex, [s. d.].
40. Li L, Zhou Q, Voss TC, Quick KL, LaBarbera DV. High-throughput imaging: focusing in on drug discovery in 3D. *Methods.* 2016;96:97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2015.11.013>
41. Letzsch S, Hänel F, Böttcher K, Kelm J. Cytotoxicity studies on 3D primary liver microtissues. Waltham: PerkinElmer; 2014. (Application note).
42. Henry OY, Villenave R, Crounce MJ, Leineweber WD, Benz MA, Ingber DE. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab Chip.* 2017;17(13):2264-71. <https://doi.org/10.1039/C7LC00155J>
43. Zhang YS, Aleman J, Shin SR, Kilic T, Kim D, Mousavi Shaegh SA et al. Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(12):E2293-302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612906114>
44. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Yuan Hsin H, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328(5986):1662-8. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
45. Hartung T, Blaauboer BJ, Bosgra S, Carney E, Coenen J, Conolly RB et al. An expert consortium review of the EC-commissioned report "alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010". *ALTEX.* 2011;28(3):183-209. <https://doi.org/10.14573/altex.2011.3.183>
46. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Benthem J, Zuang V et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol.* 2011;85(5):367-485. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>
47. Bhana B, Iyer RK, Chen WL, Zhao R, Sider KL, Likhitpanichkul M et al. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng.* 2010;105(6):1148-60. <https://doi.org/10.1002/bit.22647>
48. Parker KK, Tan J, Chen CS, Tung L. Myofibrillar architecture in engineered cardiac myocytes. *Circ Res.* 2008;103(4):340-2. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182469>



49. Lin YC, Kramer CM, Chen CS, Reich DH. Probing cellular traction forces with magnetic nanowires and microfabricated force sensor arrays. *Nanotechnology*. 2012;23(7):075101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/7/075101>
50. Fu J, Wang YK, Yang MT, Desai RA, Yu X, Liu Z et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*. 2010;7(9):733-6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1487>
51. Legant WR, Miller JS, Blakely BL, Cohen DM, Genin GM, Chen CS. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat Methods*. 2010;7(12):969-71. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1531>
52. Zhang B, Xiao Y, Hsieh A, Thavandiran N, Radisic M. Micro-and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering. *Nanotechnology*. 2011;22(49):494003. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494003>
53. Chiu LL, Montgomery M, Liang Y, Liu H, Radisic M. Perfusable branching microvessel bed for vascularization of engineered tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(50):E3414-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210580109>
54. Khetani SR, Bhatia SN. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):120-6. <https://doi.org/10.1038/nbt1361>
55. Leng L, McAllister A, Zhang B, Radisic M, Günther A. Mosaic hydrogels: one-step formation of multiscale soft materials. *Adv Mater*. 2012;24(27):3650-8. <https://doi.org/10.1002/adma.201201442> PMID:22714644
56. Stevens KR, Ungrin MD, Schwartz RE, Ng S, Carvalho B, Christine KS et al. InVERT molding for scalable control of tissue microarchitecture. *Nat Commun*. 2013;4:1847. <https://doi.org/10.1038/ncomms2853>
57. Hirt MN, Sörensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A et al. Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(6):307. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0307-z>
58. Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J* 2000;14(5):669-79. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.5.669>
59. Zhang B, Peticone C, Murthy SK, Radisic M. A standalone perfusion platform for drug testing and target validation in micro-vessel networks. *Biomicrofluidics*. 2013;7(4):44125. <https://doi.org/10.1063/1.4818837>
60. Rodenhizer D, Gaude E, Cojocari D, Mahadevan R, Frezza C, Wouters BG et al. Erratum: A three-dimensional engineered tumour for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. *Nat Mater*. 2016;15(2):244. <https://doi.org/10.1038/nmat4515>
61. Allen JW, Bhatia SN. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82(3):253-62. <https://doi.org/10.1002/bit.10569>
62. Benam KH, Novak R, Nawroth J, Hirano-Kobayashi M, Ferrante TC, Choe Y et al. Matched-comparative modeling of normal and diseased human airway responses using a microengineered breathing lung chip. *Cell Syst*. 2016;3(5):456-466.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.10.003>
63. Jain A, Barrile R, Meer AD, Mammoto A, Mammoto T, De Ceunynck K et al. Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(2):332-40. <https://doi.org/10.1002/cpt.742>
64. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip*. 2012;12(12):2165-74. <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>
65. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol*. 2013;5(9):1119-29. <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>
66. Torisawa YS, Spina CS, Mammoto T, Mammoto A, Weaver JC, Tat T et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nat Methods*. 2014;11(6):663-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2938>
67. Al-Rochan N. Organs-on-chips allow new views of human biology. *Sci Am* 2016 June 23.
68. Esch MB, Smith A, Prot JM, Sancho CO, Hickman J, Shuler ML. How multi-organ microdevices can help foster drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:158-69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.003>
69. Wagner I, Materne EM, Brincker S, Süßbier U, Frädrieh C, Busek M et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab Chip*. 2013;13(18):3538-47. <https://doi.org/10.1039/c3lc50234a>
70. Ataç B, Wagner I, Horland R, Lauster R, Marx U, Tonevitsky AG et al. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab Chip*. 2013;13(18):3555-61. <https://doi.org/10.1039/c3lc50227a>
71. Materne EM, Ramme AP, Terraso AP, Serra M, Alves PM, Brito C et al. A multi-organ chip co-culture of neurospheres and liver equivalents for long-term substance testing. *J Biotechnol*. 2015;205:36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.002>
72. Schimek K, Busek M, Brincker S, Groth B, Hoffmann S, Lauster R et al. Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. *Lab Chip*. 2013;13(18):3588-98. <https://doi.org/10.1039/c3lc50217a>
73. Sieber S, Wirth L, Cavak N, Koenigsmark M, Marx U, Lauster R et al. Bone marrow-on-a-chip: long-term culture of human hematopoietic stem cells in a 3D microfluidic environment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;12(2):479-89. <https://doi.org/10.1002/term.2507>
74. Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip*. 2015;15(12):2688-99. <https://doi.org/10.1039/C5LC00392J>



75. Oleaga C, Bernabini C, Smith AS, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W et al. Multi-Organ toxicity demonstration in a functional human in vitro system composed of four organs. *Sci Rep.* 2016;6(1):20030. <https://doi.org/10.1038/srep20030>
76. Esch MB, Mahler GJ, Stokol T, Shuler ML. Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury. *Lab Chip.* 2014;14(16):3081-92. <https://doi.org/10.1039/C4LC00371C>
77. Materne EM, Maschmeyer I, Lorenz AK, Horland R, Schimek KM, Busek M et al. The multi-organ chip: a microfluidic platform for long-term multi-tissue coculture. *J Vis Exp.* 2015;(98):e52526. <https://doi.org/10.3791/52526>
78. Esch MB, Ueno H, Applegate DR, Shuler ML. Modular, pumpless body-on-a-chip platform for the co-culture of GI tract epithelium and 3D primary liver tissue. *Lab Chip.* 2016;16(14):2719-29. <https://doi.org/10.1039/C6LC00461J>
79. Sung JH, Kam C, Shuler ML. A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab Chip.* 2010;10(4):446-55. <https://doi.org/10.1039/b917763a>
80. Viravaidya K, Sin A, Shuler ML. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog.* 2004;20(1):316-23. <https://doi.org/10.1021/bp0341996>
81. Sin A, Chin KC, Jamil MF, Kostov Y, Rao G, Shuler ML. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol Prog.* 2004;20(1):338-45. <https://doi.org/10.1021/bp034077d>
82. Tsamandouras N, Chen WL, Edington CD, Stokes CL, Griffith LG, Cirit M. Integrated gut and liver microphysiological systems for quantitative in vitro pharmacokinetic studies. *AAPS J.* 2017;19(5):1499-512. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0122-4>
83. Prot JM, Maciel L, Bricks T, Merlier F, Cotton J, Paultier P et al. First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(10):2027-40. <https://doi.org/10.1002/bit.25232>
84. Kim JY, Fluri DA, Marchan R, Boonen K, Mohanty S, Singh P et al. 3D spherical microtissues and microfluidic technology for multi-tissue experiments and analysis. *J Biotechnol.* 2015;205:24-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.003>
85. Beer M, Kuppala N, Stefanini M, Becker H, Schulz I, Manoli S et al. A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts. *Sci Rep.* 2017;7(1):1325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01256-8>
86. Young EW. Cells, tissues, and organs on chips: challenges and opportunities for the cancer tumor microenvironment. *Integr Biol.* 2013;5(9):1096-109. <https://doi.org/10.1039/c3ib40076j>
87. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22(1):287-309. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315>
88. Villasante A, Vunjak-Novakovic G. Tissue-engineered models of human tumors for cancer research. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(3):257-68. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1009442>
89. Ahn J, Sei YJ, Jeon NL, Kim Y. Tumor Microenvironment on a Chip: The Progress and Future Perspective. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(3):E64. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030064>
90. Domenech M, Yu H, Warrick J, Badders NM, Meyvantsson I, Alexander CM et al. Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics. *Integr Biol.* 2009;1(3):267-74. <https://doi.org/10.1039/b823059e>
91. Albanese A, Lam AK, Sykes EA, Rocheleau JV, Chan WC. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nat Commun.* 2013;4:2718. <https://doi.org/10.1038/ncomms3718>
92. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
93. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Clin Cancer Res.* 1999;5(1):83-94.
94. Westein E, Meer AD, Kuijpers MJ, Frimat JP, Berg A, Heemskerk JW. Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(4):1357-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209905110>
95. Fernandes JT, Chutna O, Chu V, Conde JP, Outeiro TF. A novel microfluidic cell co-culture platform for the study of the molecular mechanisms of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Front Neurosci.* 2016;10:511. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00511>
96. Villenave R, Wales SQ, Hamkins-Indik T, Papafragkou E, Weaver JC, Ferrante TC et al. Human gut-on-a-chip supports polarized infection of coxsackie B1 virus in vitro. *PLoS One.* 2017;12(2):e0169412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169412>
97. Jain A, Meer AD, Papa AL, Barrile R, Lai A, Schlechter BL et al. Assessment of whole blood thrombosis in a microfluidic device lined by fixed human endothelium. *Biomed Microdevices.* 2016;18(4):73. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0095-6>
98. Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(3):334-42. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.004>



99. Imura Y, Asano Y, Sato K, Yoshimura E. A microfluidic system to evaluate intestinal absorption. *Anal Sci.* 2009;25(12):1403-7. <https://doi.org/10.2116/analsci.25.1403>
100. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(8):1243-6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009>
101. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15655-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
102. Liu Y, Du J, Choi JS, Chen KJ, Hou S, Yan M et al. A high-throughput platform for formulating and screening multifunctional nanoparticles capable of simultaneous delivery of genes and transcription factors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(1):169-73. <https://doi.org/10.1002/anie.201507546>
103. Yamanaka S. A fresh look at iPSC cells. *Cell.* 2009;137(1):13-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>
104. Soldner F, Jaenisch R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science.* 2012;338(6111):1155-6. <https://doi.org/10.1126/science.1227682>
105. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):713-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>
106. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(5):2535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>
107. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques.* 2007;43(5):575-86. <https://doi.org/10.2144/000112598>
108. Kleensang A, Vantangoli MM, Odwin-DaCosta S, Andersen ME, Boekelheide K, Bouhifd M et al. Erratum: genetic variability in a frozen batch of MCF-7 cells invisible in routine authentication affecting cell function. *Sci Rep.* 2016;6(1):33011. <https://doi.org/10.1038/srep33011>
109. Baker M. Reproducibility: respect your cells! *Nature.* 2016;537(7620):433-5. <https://doi.org/10.1038/537433a>
110. Groothuis FA, Heringa MB, Nicol B, Hermens JL, Blaauboer BJ, Kramer NI. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology.* 2015;332:30-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.012>
111. Kramer NI, Hermens JL, Schirmer K. The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(7):1372-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.029>
112. Dormont D. Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev Biol Stand.* 1999;99:25-34.
113. Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev Biol Stand.* 1999;99:3-8.
114. Hawkes PW. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour Bioprocess.* 2015;2(1):34. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0063-7>
115. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffel H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010;53-62. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>
116. Gstraunthaler G, Rauch C, Feifel, Lindl T. Preparation of platelet lysates for mesenchymal stem cell culture media. *J Stem Cells Res Rev Rep.* 2015;2(1):1021.
117. Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro.* 2004;18(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>
118. Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J et al. Fetal Bovine Serum (FBS): past - present - future. *ALTEX.* 2018;35(1):99-118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
119. Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(5):326-35. <https://doi.org/10.1159/000354061>
120. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013;27(2):77-89. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.02.001>
121. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014;16(2):170-80. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
122. Shih DT, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol.* 2015;32(1):199-211. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.001>
123. Abaci HE, Shuler ML. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integr Biol.* 2015;7(4):383-91. <https://doi.org/10.1039/C4IB00292J>
124. Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip.* 2017;17(14):2395-420. <https://doi.org/10.1039/C6LC01554A>
125. Iori E, Vinci B, Murphy E, Marescotti MC, Avogaro A, Ahluwalia A. Glucose and fatty acid metabolism in a 3 tissue in-vitro model challenged with normo- and hyperglycaemia. *PLoS One.* 2012;7(4):e34704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034704>
126. Guzzardi MA, Domenici C, Ahluwalia A. Metabolic control through hepatocyte and adipose tissue cross-talk in a multicompartmental modular bioreactor. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(11-12):1635-42. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0541>
127. Wikswow JP, Block FE 3rd, Cliffel DE, Goodwin CR, Marasco CC, Markov DA et al. Engineering challenges for



- instrumenting and controlling integrated organ-on-chip systems. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013;60(3):682-90. <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2244891>
128. Maass C, Stokes CL, Griffith LG, Cirit M. Multi-functional scaling methodology for translational pharmacokinetic and pharmacodynamic applications using integrated microphysiological systems (MPS). *Integr Biol.* 2017;9(4):290-302. <https://doi.org/10.1039/C6IB00243A>
129. Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(10):2213-27. <https://doi.org/10.1002/bit.25989>
130. Wikswa JP, Curtis EL, Eagleton ZE, Evans BC, Kole A, Hofmeister LH et al. Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip. *Lab Chip.* 2013;13(18):3496-511. <https://doi.org/10.1039/c3lc50243k>
131. Sung JH, Srinivasan B, Esch MB, McLamb WT, Bernabini C, Shuler ML et al. Using physiologically-based pharmacokinetic-guided “body-on-a-chip” systems to predict mammalian response to drug and chemical exposure. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(9):1225-39. <https://doi.org/10.1177/1535370214529397>
132. Moraes C, Labuz JM, Leung BM, Inoue M, Chun TH, Takayama S. On being the right size: scaling effects in designing a human-on-a-chip. *Integr Biol.* 2013;5(9):1149-61. <https://doi.org/10.1039/c3ib40040a>
133. Sung JH, Esch MB, Prot JM, Long CJ, Smith A, Hickman JJ et al. Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans. *Lab Chip.* 2013;13(7):1201-12. <https://doi.org/10.1039/c3lc41017j>
134. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468(7321):310-5. <https://doi.org/10.1038/nature09493>
135. Ahadian S, Ramón-Azcón J, Ostrovidov S, Camci-Unal G, Hosseini V, Kaji H et al. Interdigitated array of Pt electrodes for electrical stimulation and engineering of aligned muscle tissue. *Lab Chip.* 2012;12(18):3491-503. <https://doi.org/10.1039/c2lc40479f>
136. Johnstone AF, Gross GW, Weiss DG, Schroeder OH, Gramowski A, Shafer TJ. Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology.* 2010;31(4):331-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.04.001>
137. Ferrell N, Desai RR, Fleischman AJ, Roy S, Humes HD, Fissell WH. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnol Bioeng.* 2010;107(4):707-16. <https://doi.org/10.1002/bit.22835>
138. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
139. Organovo Holdings INC. ExVive™ human tissue models & services for research. San Diego: Organovo; 2018.
140. Amin R, Knowlton S, Hart A, Yenilmez B, Ghaderinezhad F, Katebifar S et al. 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication.* 2016;8(2):022001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/022001>

Agradecimentos

À Célia Maria Gaudêncio e à Roberta Francese Paiva, pelo auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.