

## **PIBIC/CNPEM 2026**

**Título:** Plataforma Microfluídica para Geração Escalável de Microtecidos Hepáticos para Testes de Toxicidade de Fármacos

### **Nome do pesquisador responsável e unidade do CNPEM:**

Natan Roberto de Barros

Laboratório Nacional de Biociências – LNBio

Núcleo de tecnologia em engenharia de tecidos (NuTET)

### **Introdução**

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo, custoso e frequentemente limitado pela baixa capacidade preditiva dos modelos pré-clínicos utilizados na avaliação de segurança. Entre os principais desafios, destaca-se a ocorrência de efeitos adversos não previstos, como a lesão hepática induzida por fármacos, uma das principais causas de falhas em ensaios clínicos e de retirada de medicamentos do mercado. Esse problema está diretamente relacionado às limitações dos modelos experimentais tradicionais, como culturas celulares bidimensionais e modelos animais, que não reproduzem adequadamente a complexidade estrutural e funcional dos tecidos humanos.<sup>1</sup>

Nesse contexto, há uma crescente demanda por sistemas *in vitro* mais fisiologicamente relevantes, capazes de mimetizar o microambiente celular e melhorar a predição da resposta a fármacos. O fígado, por seu papel central no metabolismo de xenobióticos, constitui um alvo prioritário para o desenvolvimento desses modelos. No entanto, a obtenção de sistemas que conciliem relevância biológica, reprodutibilidade e escalabilidade ainda representa um desafio significativo.<sup>2</sup>

Diante disso, novas abordagens baseadas em engenharia de tecidos e biofabricação têm sido exploradas com o objetivo de superar essas limitações. Entre elas, destaca-se o uso de plataformas que permitem a organização tridimensional de células, abrindo caminho para o desenvolvimento de modelos mais robustos e aplicáveis em ensaios toxicológicos.<sup>3</sup>

### **Estado da arte**

Modelos tridimensionais, como esferoides celulares e organoides, têm se consolidado como alternativas promissoras às culturas bidimensionais, por melhor reproduzirem a arquitetura tecidual e as interações celulares presentes *in vivo*. Esses sistemas demonstram maior relevância fisiológica e têm sido amplamente utilizados em estudos de toxicidade e resposta a fármacos. Além disso, o avanço de sistemas microfisiológicos, como dispositivos organ-on-a-chip, tem possibilitado o controle mais preciso do microambiente celular, incluindo fluxo, gradientes químicos e interações entre diferentes tipos celulares.<sup>4</sup>

Apesar desses avanços, persistem limitações importantes. A formação de esferoides e organoides frequentemente apresenta variabilidade significativa, resultando em baixa

padronização e reprodutibilidade. Além disso, muitos desses métodos são de baixa produtividade, dificultando sua aplicação em ensaios de alto rendimento. Nesse cenário, a microfluídica de gotas tem emergido como uma tecnologia promissora, permitindo a geração controlada e automatizada de microgotas contendo células e biomateriais. Essa abordagem possibilita o encapsulamento preciso de células em hidrogéis, favorecendo a formação de microtecidos tridimensionais de maneira padronizada e escalável.<sup>5</sup>

Assim, a integração entre microfluídica de gotas e engenharia de tecidos representa uma estratégia inovadora para a produção de modelos tridimensionais com maior controle experimental, reprodutibilidade e potencial de aplicação em larga escala, especialmente no contexto de ensaios toxicológicos.

## **Objetivos**

Desenvolver a plataforma baseada em microfluídica de gotas, para a geração padronizada, reprodutível e em alta escala de microtecidos hepáticos tridimensionais, visando sua aplicação em ensaios de toxicidade de fármacos.

Objetivos específicos para 12 meses de Projeto PIBIC:

1. Desenvolver o sistema microfluídico de gotas para encapsulamento celular em hidrogéis, ajustando parâmetros como geometria dos canais, vazão das fases e condições de formação das microgotas.
2. Estabelecer protocolos para encapsulamento de células hepáticas, controlando densidade celular, composição do hidrogel e condições de cultivo para formação de modelos hepáticos viáveis.
3. Caracterizar estruturalmente e funcionalmente os modelos hepáticos, avaliando morfologia e marcadores de função hepática.

Em cenário destes objetivos serem alcançados em tempo hábil, como prova de conceito, a aplicabilidade dos modelos em ensaios de toxicidade será avaliada utilizando paracetamol como um fármaco modelo.

## **Metodologia**

***Fabricação e Caracterização do Dispositivo Microfluídico:*** O dispositivo microfluídico será fabricado por técnicas de litografia suave utilizando PDMS moldado a partir de um molde fotolitografado. Após selagem em vidro, serão realizados testes de fluxo para formação de gotas estáveis. Parâmetros como vazão das fases contínua e dispersa serão ajustados. A caracterização incluirá análise do tamanho e da monodispersidade das gotas.<sup>6</sup>

***Produção de Microesferas de Hidrogel:*** Microgotas contendo precursores de hidrogel para cultivo celular serão geradas por emulsificação em dispositivo microfluídico, seguidas de gelificação induzida por estímulo físico para formação de microesferas estáveis. As condições de gelificação serão ajustadas para garantir integridade estrutural. O tamanho das microesferas será controlado por meio da modulação das vazões e da geometria dos canais, enquanto a uniformidade será avaliada por microscopia óptica. Serão analisados parâmetros como distribuição de tamanho e coeficiente de variação, visando a obtenção de populações monodispersas e reprodutíveis.<sup>7</sup>

**Formação dos modelos em microesferas:** Células hepáticas serão suspensas na fase aquosa e encapsuladas durante a formação das microgotas, com ajuste da densidade celular para controle do número de células por microesfera. Após o encapsulamento, a viabilidade celular será avaliada. As microesferas serão então cultivadas em meio apropriado, sob condições controladas de temperatura e CO<sub>2</sub>, com trocas periódicas de meio, visando promover organização tridimensional e maturação celular. Diferentes condições experimentais, incluindo densidade celular, composição do hidrogel e tempo de cultivo, serão testadas e comparadas para otimização do sistema.

**Caracterização dos modelos hepáticos:** A viabilidade celular será avaliada por ensaios metabólicos, como redução de resazurina ou atividade mitocondrial. A função hepática será analisada pela quantificação de albumina e ureia no sobrenadante, com normalização pelo número de microesferas. Para caracterização celular, serão realizadas marcações fluorescentes de viabilidade (live/dead), proliferação e organização estrutural, além de imunomarcações para marcadores hepáticos. As amostras serão analisadas por microscopia de fluorescência e comparadas entre diferentes condições experimentais.

**Análise estatística:** Os dados obtidos serão analisados estatisticamente utilizando testes apropriados para verificar a significância dos resultados, como ANOVA ou teste t, comparando diferentes condições experimentais e validando as conclusões experimentais.

### Cronograma de atividades

Atividade/Mês	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fabricação e Caracterização do Dispositivo	●	●										
Produção de Microesferas de Hidrogel		●	●	●								
Formação dos Modelos em Microesferas				●	●	●	●					
Caracterização dos Modelos Hepáticos						●	●	●	●			
Análises finais e elaboração de relatórios								●	●	●	●	
Escrita de Resumo e Pôster para Participação no Congresso de Estudantes do CNPEM (CEC)											●	●

### Referências

1. Atienzar, F. A. *et al.* Key Challenges and Opportunities Associated with the Use of In Vitro Models to Detect Human DILI: Integrated Risk Assessment and Mitigation Plans. *Biomed Res. Int.* **2016**, 9737920 (2016).
2. Han, W., Wu, Q., Zhang, X. & Duan, Z. Innovation for hepatotoxicity in vitro research models: A review. *Journal of Applied Toxicology* **39**, 146–162 (2019).
3. Amirifar, L. *et al.* Droplet-based microfluidics in biomedical applications. *Biofabrication* **14**, 022001 (2022).
4. Khorsandi, D. *et al.* Patient-Derived Organoids as Therapy Screening Platforms in Cancer Patients. *Adv. Healthc. Mater.* **13**, 2302331 (2024).
5. Ding, S. *et al.* Patient-derived micro-organospheres enable clinical precision oncology. *Cell Stem Cell* **29**, 905-917.e6 (2022).
6. de Barros, N. R. *et al.* Enhanced Maturation of 3D Bioprinted Skeletal Muscle Tissue Constructs Encapsulating Soluble Factor-Releasing Microparticles. *Macromol. Biosci.* **23**, 2300276 (2023).
7. Carvalho, B. G. *et al.* Gelatin methacryloyl granular scaffolds for localized mRNA delivery. *Aggregate* **5**, e464 (2024).